

**Molekulare Mechanismen  
der Insulinresistenz:  
Serin-Phosphorylierung von IRS-1**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
**Mark Rudolf Sommerfeld**  
aus Neuss  
2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Jürgen Eckel

Korreferent: Prof. Dr. Detlev Riesner

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2004

Liebst du etwas, lasse es los.  
Kehrt es zu dir zurück, ist es dein in diesem Moment.  
Bleibt es fort, hat es dir nie gehört.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Diabetes mellitus	1
1.2	Insulin-Signaltransduktion	2
1.3	IRS-Proteine	8
1.4	Regulationsmechanismen der Insulin-Signaltransduktion	11
1.4.1	Modulation von IRS-1 durch Serin-Phosphorylierung	12
1.5	Protein Kinase C: Mediator oder Inhibitor der Insulin-Signalkaskade?	15
1.6	Ziel der Arbeit	18
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Allgemeine Chemikalien	19
2.2	Radiochemikalien	20
2.3	Antiseren	20
2.4	Enzyme	21
2.5	Kit-Systeme	21
2.6	Bakterienstämme	21
2.7	Peptide	22
1.8	Nukleinsäuren	22
2.8.1	Plasmide	22
2.8.2	Synthetische Oligonukleotide	23
2.9	Chromatographie	24
2.10	Transformation und Plasmidamplifikation in <i>E.coli</i> -Bakterien	25
2.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
2.12	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	25
2.13	Restriktion von DNA	25
2.14	Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen	26
2.15	Ortsspezifische Mutagenese	26
2.16	DNA-Sequenzierungen	27
2.17	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	27
2.18	Proteolytische Spaltung der GST-Fusionsproteine	28
2.19	Partielle Aufreinigung des Insulinrezeptors	29

2.20	Bestimmung der Proteinkonzentration	30
2.21	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.22	Proteintransfer auf Membranen (Westernblot)	31
2.23	Immunodetektion mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL)	32
2.24	Strippen von Blotmembranen	33
2.25	Färbetechniken	33
2.25.1	Ponceau S-Färbung	33
2.25.2	Silberfärbung	34
2.25.3	Coomassie Blue-Färbung	34
2.26	Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel	34
2.27	Zweidimensionale HPLC-Analyse tryptischer Peptide	35
2.28	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)	36
2.29	Massenspektrometrische Analyse	36
2.30	<i>In vitro</i> Phosphorylierungsreaktionen	37
2.30.1	Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> durch den Insulinrezeptor	37
2.30.2	Serin/Threonin-Phosphorylierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> durch die PKC	38
2.30.3	Kombinierte Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup>	38
2.30.4	Bestimmung des Phosphateinbaus	39
2.31	GST-Pulldown Assay	39
2.32	Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA)	40
2.32.1	Immobilisierung der Peptide	41
2.32.2	Bindungsanalyse	42
2.32.3	Kompetitionsstudien	42
2.33	Auswertung der Daten und Statistik	43
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	44
3.1.1	Aufreinigung des GST-Fusionsproteins rIRS-1 <sup>449-664</sup>	44
3.1.2	Aufreinigung von GST-p85 $\alpha$	46
3.1.3	Proteolytische Spaltung von GST-p85 $\alpha$	47
3.2	Aufreinigung des Insulinrezeptors	48
3.3	Phosphorylierungen	50
3.3.1	Tyrosin-Phosphorylierung durch den Insulinrezeptor	50

3.3.2	GST-Pulldown Assay	51
3.3.3	Serin/Threonin-Phosphorylierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> durch die PKC	53
3.4.1	Einfluss der PKC aus dem Rattengehirn auf die Tyrosin- Phosphorylierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> und Assoziation von p85 $\alpha$	55
3.4.2	Einfluss der PKC- $\zeta$ auf die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS- 1 <sup>449-664</sup> und Assoziation von p85 $\alpha$	56
3.4.3	Einfluss der PKC auf den Insulinrezeptor	57
3.5	Identifizierung von PKC-Phosphorylierungsstellen	60
3.5.1	Konsensus-Analyse von rIRS-1 <sup>449-664</sup>	60
3.5.2	Detektion von pS612 mittels Antiserum	62
3.5.3	Massenspektrometrische Analyse von PKC- $\zeta$ - Phosphorylierungsstellen in rIRS-1 <sup>449-664</sup>	63
3.5.4	Tryptische Spaltung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> im SDS-Gel	64
3.5.5	Phosphopetidkartierung	65
3.5.6	Massenspektrometrische Analyse der RP-HPLC-Fraktionen	67
3.5.7	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)	70
3.6	Analyse von rIRS-1 <sup>449-664</sup> -Mutanten	71
3.6.1	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von S570A, S612A, S612/620A und T604/S620A	71
3.6.2	Vergleichende Phosphopeptidkartierung der rIRS-1 <sup>449-664</sup> - Mutanten S498A, S570A und S612A	73
3.6.3	Mutationsanalyse von Peptid 322–351 aus Peak 3	75
3.6.4	Austesten von Antiseren gegen pS570	76
3.6.5	Untersuchungen der Mutanten S570A und S612A im GST- Pulldown Assay	77
3.7	Phosphorylierungsmuster der PKC Isoformen aus dem Rattengehirn	78
3.8	Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA)	80
3.8.1	Interaktionsanalysen mit dem BIAcore X	81
3.8.2	Immobilisierung der Peptide Y608, pY608, pS612 und pY608- pS612	82
3.8.3	Regeneration der Chipoberfläche	83
3.8.4	Analyse der p85 $\alpha$ -Peptid-Interaktionen	84
3.8.5	Bestimmung der Affinitäten	86
3.8.6	Kompetitionsstudien	89

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	91
4.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> Modells	91
4.2	Identifizierung von PKC-Phosphorylierungsstellen	98
4.3	Einfluss einzelner Phosphoserine	100
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	104
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	106
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	120
7.1	Abbildungsverzeichnis	120
7.2	Tabellenverzeichnis	121

## Abkürzungen

AS	Aminosäure
BIM	Bisindolylmaleimide I
BSA	Rinderserumalbumin, Bovine Serum Albumin
DAG	Diacylglycerol
Da	Dalton
DOK	Downstream of kinase
DTT	Dithiotreitol
EA	Ethanolamin
ECL	Verstärkte (Enhanced) Chemilumineszenz
EDC	N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>g</i>	Erdbeschleunigung, 9,81 m/s <sup>2</sup>
Grb	Growth factor receptor binding protein
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase-3
GST	Glutathion-S-transferase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
ID	Immunodetektion
IgG	Immunglobulin G
IGF	Insulin-like growth factor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IR	Insulinrezeptor
IRS-1	Insulinrezeptor-Substrat-1
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Luminol	5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthal-azinedion
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCS	Multi Cloning Site, Multiple Klonierungsstelle
MEK	MAPK-Kinase
MEKK	MAPK-Kinase-Kinase
MS	Massenspektrometrie
mTOR	Mammalian target of rapamycin
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NC	Nitrocellulose
NHS	N-Hydroxysuccinimid
p85	regulatorische Untereinheit der PI3-kinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung
PDGF	Platelet-derived growth factor receptor
PDK1/2	Phosphoinositid abhängige Kinase-1/-2
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase, PI 3-Kinase
PKB	Protein Kinase B, auch als Akt bezeichnet
PKC	Protein Kinase C
PKC-rb	PKC aus dem Rattengehirn (rat brain)
PS	Phosphatidylserin
PTB	Phosphotyrosin-bindende Domäne



---

PTPase	Protein-Tyrosin-Phosphatase
upm	Umdrehungen pro Minute
Ras	Rat sarcoma protein
RU	Response Units
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	src-homologe Region 2
SH3	src-homologe Region 3
Shc	Src-homologes Kollagenprotein
SHP2	SH2-Domänen enthaltende Inositol-5-Phosphatase
Sos	Son-of-sevenless
SPR	Surface Plasmon Resonance, Oberflächenplasmonresonanz
src	Sarcoma Virus Oncogen Src
TBS	Tris-NaCl-Puffer
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Units, Enzymeinheit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WGA	Wheat Germ Agglutinin
YTA-Medium	Yeast-Tryptone-Ampicillin-Medium

# 1. Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus wurde lange als Krankheit mit geringer Bedeutung für die Weltgesundheit eingeschätzt. Derzeit nimmt diese Krankheit jedoch einen Platz als eine der Hauptbedrohungen für die menschliche Gesundheit im 21. Jahrhundert ein (Zimmet, 2000). Über die letzten beiden Dekaden wurde eine explosive Zunahme an diagnostizierten Diabetespatienten weltweit beobachtet. So wird global von etwa 150 Millionen Menschen mit Diabetes ausgegangen und es wird geschätzt, dass sich diese Zahl bis zum Jahr 2010 auf 220 Millionen und bis 2035 auf 300 Millionen erhöhen wird (Amos et al., 1997; King et al., 1998). Allein in Deutschland sind etwa 5% der Bevölkerung betroffen und die Erkrankungstendenz ist weiterhin steigend (Ratzmann, 1991). Die sich daraus ergebenden gesundheitsökonomischen Kosten sind erheblich. Eine kürzlich publizierte Berechnung der durch Patienten mit Typ 2 Diabetes in Deutschland verursachten volkswirtschaftlichen Kosten ergab einen Betrag von über 16 Milliarden Euro im Jahr 1998 (Liebl et al., 2001).

Es werden zwei Hauptformen des Diabetes unterschieden, Typ 1 und Typ 2. Beide Formen sind durch eine dauerhaft gesteigerte Blutzuckerkonzentration, der so genannten Hyperglykämie gekennzeichnet. Ursächlich liegt der Hyperglykämie stets eine mangelnde Insulinwirkung entweder durch ein Insulindefizit als Folge einer nicht ausreichenden Sekretion des Hormons oder durch eine Verminderung der Wirksamkeit des verfügbaren Insulins zugrunde. So resultiert der Typ 1 Diabetes aus einer autoimmun gesteuerten Zerstörung der pankreatischen  $\beta$ -Zellen, was zu einer absoluten Insulindefizienz führt. Patienten mit Typ 1 Diabetes sind zum Überleben auf die exogene Zufuhr von Insulin angewiesen. Ihre Anzahl ist relativ gering im Vergleich zu Patienten mit Typ 2 Diabetes, die etwa 95% aller Fälle weltweit ausmachen. Der Typ 2 Diabetes ist durch eine verminderte Insulinwirkung, der so genannten Insulinresistenz peripherer Gewebe und einer abnormalen kompensatorischen Insulinsekretion charakterisiert. Neben einer polygenetischen Prädisposition trägt eine Reihe von sekundären umweltbedingten Faktoren zur Insulinresistenz bei (Kahn, 1995). Hierzu zählen Adipositas, metabolische Faktoren, Alter und Mangel an körperlicher Aktivität. Die Pathophysiologie der Insulinresistenz involviert ein komplexes Netzwerk von Signalwegen und ist weitestgehend

unverstanden. Für die Entwicklung neuer Therapieansätze des Typ 2 Diabetes ist daher das genaue Verständnis der molekularen Mechanismen der Insulinwirkung und deren Veränderungen bei der Insulinresistenz in der Zelle essentiell.

## 1.2 Insulin-Signaltransduktion

Das Peptidhormon Insulin wird in den  $\beta$ -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas produziert. Die Sekretion von Insulin wird primär über die Glucosekonzentration reguliert und erfolgt als Antwort auf einen erhöhten Blutzuckerspiegel. Die metabolischen und mitogenen Effekte von Insulin werden über die Bindung an dessen Rezeptor auf der Zelloberfläche der Zielgewebe Leber, Muskel und Fett initiiert. Eine der wichtigsten biologischen Wirkungen des Insulins ist die rasche Beschleunigung der Glucoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen. Insulin induziert weiterhin die Glykogensynthese und -speicherung in Leber und Muskel, die Triglyceridsynthese in Leber und Fettgewebe sowie die Speicherung von Aminosäuren im Muskel (DeFronzo et al., 2001). Gleichzeitig hemmt Insulin die hepatische Gluconeogenese und zählt daher insgesamt zu den wichtigsten Regulatoren des Glucosemetabolismus (Klarlund et al., 1997). Eine weitere zentrale Funktion des Peptidhormons Insulin besteht in der Regulation von Zellwachstum und Proliferation durch die Aktivierung der Transkription von Genen, die für Kontrolle und Ablauf des Zellzyklus von großer Bedeutung sind (Straus, 1989).

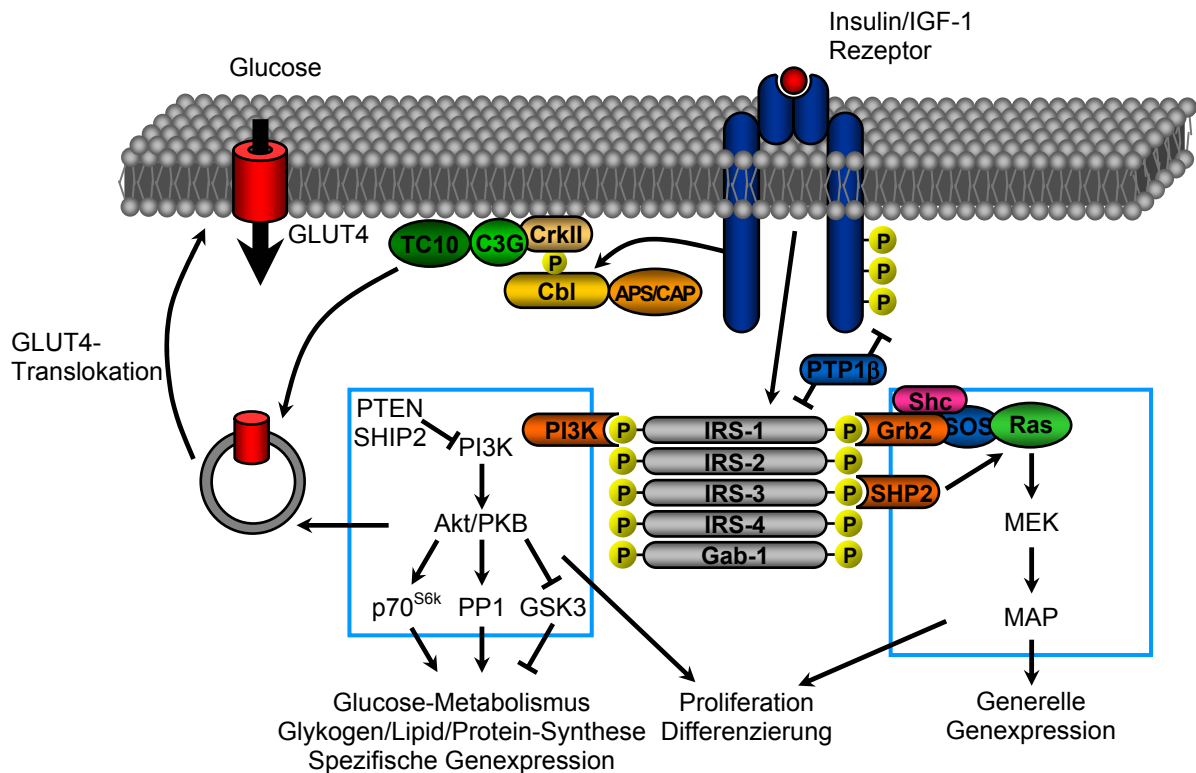
Der Insulinrezeptor gehört in die große Familie der Rezeptortyrosinkinasen, zu der unter anderem der EGF-Rezeptor (Epidermal growth factor receptor), der PDGF-Rezeptor (Platelet-derived growth factor receptor), der IGF-Rezeptor (Insulin-like growth factor receptor) und der FGF-Rezeptor (Fibroblast growth factor receptor) gezählt werden (Schlessinger, 2000). Der Insulinrezeptor wird nahezu in allen Zellen exprimiert. Seine Anzahl reicht von wenigen hundert Rezeptoren auf Erythrocyten bis zu mehreren hunderttausend auf Adipocyten und Hepatocyten. Der Insulinrezeptor ist ein heterotetrameres Glykoprotein und setzt sich aus zwei extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei die Zellmembran durchspannenden  $\beta$ -Untereinheiten zusammen, welche durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind (Kasuga et al., 1982). Die Untereinheiten des Rezeptors stammen aus einem

einzigem Gen und entstehen durch proteolytische Spaltung der Prorezeptoren. Die  $(\alpha/\beta)_2$  Struktur des nativen Rezeptors ist essentiell für die Ligand-induzierte Aktivierung der Rezeptorkinase, die nach einem allosteren Mechanismus verläuft (Treadway et al., 1991; Frattali et al., 1992). Das Binden von Insulin an die  $\alpha$ -Untereinheit führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und dadurch zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase der  $\beta$ -Untereinheit über einen Autophosphorylierungsmechanismus (Kasuga et al., 1983). Intrazelluläre Adaptorproteine binden daraufhin an den Rezeptor und werden an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert.

Mehrere intrazelluläre Substrate der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase wurden bisher in Insulin-sensitiven Geweben wie Muskel, Fett und Leber identifiziert. Das Insulinsignal wird über diese Tyrosin-phosphorylierten Adaptorproteine durch die Bildung von Signalkomplexen an verschiedene Signalkaskaden gekoppelt. Das erste identifizierte Kopplungsprotein für den Insulinrezeptor ist das Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) (Sun et al., 1991). Mittlerweile ergänzen eine ganze Reihe verwandter Proteine diese Gruppe, darunter weitere Proteine der IRS-Familie, Isoformen von Shc, Gab-1 (Grb-associated binder-1), Cbl, APS (Adaptorprotein mit PH- und SH2-Domäne) und p62<sup>dok</sup> (Pessin & Saltiel, 2000). Die durch das Hormon aktivierten Signalkaskaden erklären die Vielfalt der Insulinwirkung in den unterschiedlichen Geweben. Zwei Hauptkaskaden propagieren das durch den Insulinrezeptor generierte Signal, der PI 3-Kinase-Signalweg und der MAP-Kinase-Signalweg.

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3-Kinase) als Namensgeber des PI 3-Kinase-Signalweges nimmt eine zentrale Rolle in der metabolischen und mitogenen Wirkung von Insulin ein (Shepherd et al., 1995). Inhibitoren der Klasse Ia PI 3-Kinase oder die Transfektion mit dominant-negativen Konstrukten dieses Enzyms blocken den Großteil der metabolischen Wirkung von Insulin ab, darunter die Stimulation des Glucosetransports über GLUT4, die Glykogen- und Lipidsynthese (s. Abb. 1).

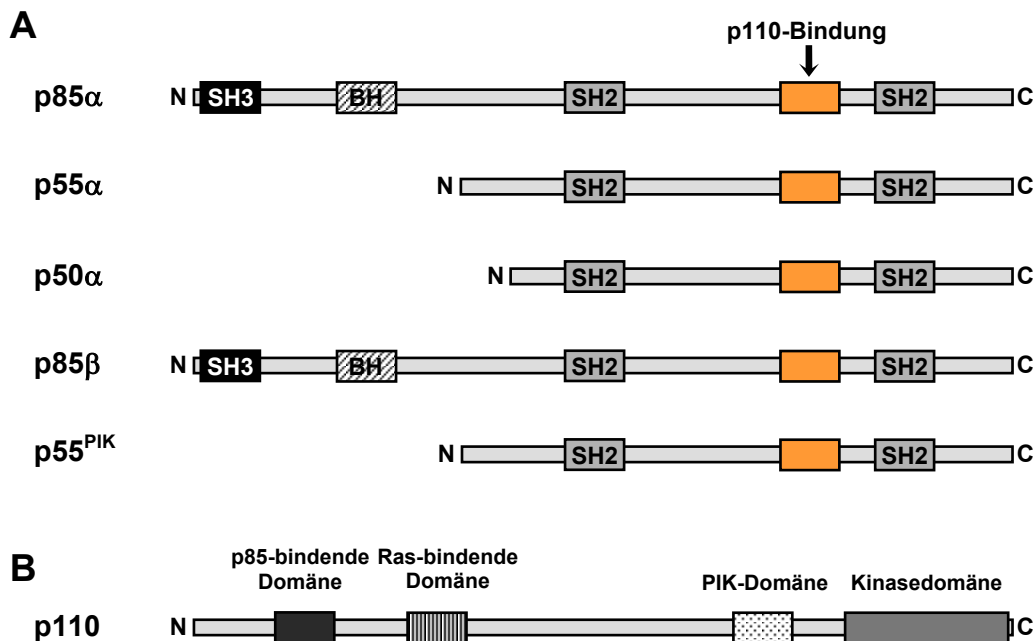
Die PI 3-Kinase ist ein heterodimeres Enzym und setzt sich aus einer katalytischen Untereinheit p110 und einer regulatorischen Untereinheit p85 zusammen, die zwei SH2 Domänen enthält. Über die Interaktion mit phosphorylierten YMXM- und YXXM-Motiven in den IRS-Proteinen erfolgt die Aktivierung der katalytischen Untereinheit und ist maximal, wenn beide SH2-Domänen gleichzeitig besetzt sind (Backer et al., 1992; Myers et al., 1992; Rordorf-Nikolic et al., 1995).



**Abb. 1: Überblick über die Insulin-Signaltransduktion.** Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor resultiert in der Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, darunter der PI 3-Kinase-, MAP-Kinase- und Cbl/CAP-Signalweg. Diese Signalwege koordinieren konzentriert vielfältige Prozesse in der Zelle, wie beispielsweise die rasche Glucoseaufnahme, den Glucose-, Lipid- und Proteinmetabolismus und die Genexpression (nach Saltiel & Kahn, 2001).

Die IRS-Proteine enthalten meist mehrere solcher potentiellen doppelten Interaktionsstellen. Eine vollständige Insulin-stimulierte Aktivierung der PI 3-Kinase durch IRS-1 wird vermutlich über die Tyrosine 608 und 628 vermittelt (Esposito et al., 2001). Von der regulatorischen Untereinheit wurden bisher acht Isoformen identifiziert, die aus den drei Genen p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  und p55<sup>PIK</sup>, das auch als p55 $\gamma$  bezeichnet wird, generiert werden (Pons et al., 1995) (s. Abb. 2 A). So entstehen die Isoformen AS53/p55 $\alpha$  und p50 $\alpha$  durch alternatives Spleißen des p85 $\alpha$ -Gens (Antonetti et al., 1996; Fruman et al., 1996). Von den Isoformen der regulatorischen Untereinheit ist das p85 $\alpha$  das vorherrschende und ihm wird der Hauptanteil bei der Weiterleitung der meisten Stimuli zu gesprochen. Die exakte Rolle der verschiedenen regulatorischen Untereinheiten der PI 3-Kinase in der Insulin-Signaltransduktion ist unklar. Die Spleißvarianten zeigen Unterschiede in der Fähigkeit der Enzymaktivierung (Antonetti et al., 1996), der Gewebeverteilung (Antonetti et al., 1996; Fruman et al., 1996) und der Sensitivität gegenüber Insulin (Kerouz et al., 1997). Drei hoch homologe Isoformen der Klasse Ia katalytischen Untereinheit wurden kloniert, alle mit einer molekularen Masse von etwa 110 kDa

und wurden mit p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  und p110 $\delta$  benannt. Bei allen liegt die Kinasedomäne nahe dem C-Terminus, Bindungsdomänen für p85 und Ras sind aminoterminal angeordnet (s. Abb. 2 B). Die Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  finden sich in vielen Geweben und bilden die Hauptaktivität in der Insulinwirkung, die Isoform  $\delta$  wird dagegen nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Shepherd et al., 1998).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der PI 3-Kinase-Untereinheiten.** (A) Struktur der regulatorischen Untereinheiten und der Klasse Ia katalytischen Untereinheit p110 (B) (SH2 = src-homologe-Domäne, BH = Bcr/Rac GTPase-aktivierendes Protein homologe-Domäne, PIK = Phosphoinositidkinase homologe-Domäne) (nach Shepherd et al., 1998).

Die PI 3-Kinase katalysiert in der Zelle die Phosphorylierung von Phosphoinositiden an der 3'-Position. Das Hauptprodukt der PI 3-Kinase nach einem Insulinstimulus ist Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>), das die PH-Domäne einer Reihe von Signalmolekülen bindet und deren Aktivität und subzelluläre Lokalisation verändert (Lietzke et al., 2000). So wird beispielsweise die Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 und -2 (PDK1 bzw. PDK2) über die Bindung der PH-Domäne an die Phospholipidprodukte der PI 3-Kinase zur Plasmamembran dirigiert und aktiviert. PDK1 phosphoryliert die Serin/Threonin-Kinase Akt an Threonin 308 und Serin 473 (Alessi et al., 1997). Die Kinase Akt wird in der Literatur auch als Protein Kinase B (PKB) bezeichnet. Akt selber phosphoryliert und inaktiviert die Glykogensynthase-3 (GSK3), was zur Aktivierung der Glykogensynthase und Bildung von Glykogen führt (Cross et al., 1996; Cohen et al., 1997; Alessi et al., 1997). Die aktivierte Akt modifiziert eine Reihe weiterer Substrate und kontrolliert so verschiedene

nachgeschaltete Signalwege, darunter den Glucosetransport über die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran, die Protein- und Glykogensynthese, Zellwachstum und Differenzierung (Alessi et al., 1996; Cross et al., 1996; Bandyopadhyay et al., 1997; Hemmings et al., 1997). Ebenso wichtig für den Insulin-stimulierten Glucosetransport wie die Akt sind die atypischen PKC-Isoformen  $\zeta$  und  $\lambda$  (Standaert et al., 1997; Standaert et al., 1999a; Standaert et al., 1999b). Die Aktivierung der PKC- $\zeta$  erfolgt durch die Phosphorylierung von Threonin 410 in dessen Aktivierungsschleife durch die PDK1 (Bandyopadhyay et al., 1999; Dong et al., 1999). An der Terminierung oder Gegenregulation des PI 3-Kinase-Signalweges beteiligt sind die SH2-Domänen enthaltende Inositol-5-Phosphatase (SHP2) und PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) (Ogg et al., 1998; Wada et al., 1999; Clement et al., 2001).

Zentrale Komponenten und Namensgeber der MAPK-Signalkaskade sind cytoplasmatische Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen, die in Säugetieren aufgrund ihrer Regulierbarkeit durch extrazelluläre, mitogen wirkende Liganden als Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK) oder extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) bezeichnet werden. Dieser Signalweg ist von primärer Bedeutung für die Mitogenese und Zellzyklusprogression. Nach der Aktivierung des Insulinrezeptors wird die MAPK-Kaskade durch die Bildung und Membranassoziation des Grb2/Sos-Komplexes initiiert, an der neben der Gruppe der IRS-Proteine das Adaptormolekül Shc (src-homologes Kollagenprotein) beteiligt ist (s. Abb. 1). Shc verfügt über eine PTB- und eine SH2-Domäne, die seine Interaktion mit dem Rezeptor steuern und die rezeptorvermittelte Tyrosin-Phosphorylierung gewährleisten (Pelicci et al., 1992; Kovacina & Roth, 1993). Der Komplex aus Shc/Grb2/Sos bzw. IRS/Grb2/Sos stellt eine Kopplung zwischen der aktivierten Rezeptortyrosinkinase und den Ras-Proteinen her (Skolnik et al., 1993). Grb2 enthält eine SH2-Domäne flankiert von zwei SH3-Domänen, über die das Adaptorprotein konstitutiv mit Sos (Son-of-sevenless) assoziiert. Das kleine Guanylnucleotid-Austauschprotein Sos katalysiert den Austausch von GDP zu GTP in Ras und führt so zu dessen Aktivierung (Gale et al., 1993). Die Mitglieder der Ras-Superfamilie sind regulatorische GTPasen und stellen zentrale Schaltstationen für Wachstums- und Differenzierungsvorgänge dar (Reuther & Der, 2000). Die MAPK-Proteine stehen am unteren Ende der Signalübertragung dieser Kaskade und haben häufig zwei weitere Proteinkinasen,

die MAPK-Kinasen (MEK) und MAPKK-Kinasen (MEKK) vorgeschaltet. Der am besten charakterisierte Vertreter der Serin/Threonin-spezifischen MEKK ist Raf, welcher durch das Ras-Protein in seiner GTP-gebundenen Form aktiviert wird und daraufhin die nachgeschalteten MEK phosphoryliert. Die MEK ihrerseits phosphorylieren und aktivieren die MAPK. Verschiedene MAPK-Subtypen mit unterschiedlicher Substratspezifität sind bisher identifiziert worden. Die Substrate der MAPK sind vielfältig und umfassen häufig Transkriptionsfaktoren. Eine zentrale Funktion der MAPK besteht daher in der Aktivierung und Steuerung der Genexpression (Übersichtsartikel: Seger & Krebs, 1995; Cobb & Goldsmith, 1995).

Derzeit wird ein weiterer Signalweg propagiert, denn neben der Aktivierung der PI 3-Kinase scheinen weitere Signale für die insulin-stimulierte Glucoseaufnahme notwendig zu sein (Pessin & Saltiel, 2000) (s. Abb. 1). Gemeinsam mit dem PI 3-Kinase-Signalweg soll der Cbl/CAP-Signalweg die Spezifität des Insulinsignals bewirken. Der initiale Schritt dieses Signalwegs wird durch die Tyrosin-Phosphorylierung des Proto-Onkogens c-Cbl durch den Insulinrezeptor eingeleitet (Ribon et al., 1997). In Insulin-sensitiven Zellen ist Cbl mit dem Adaptorprotein CAP (c-Cbl-associated protein) assoziiert, welches über seine carboxyterminale SH3-Domäne einen Prolin-reichen Sequenzabschnitt von Cbl bindet (Ribon et al., 1998a). Die Expression des Adaptorproteins CAP wird während der Adipozytendifferenzierung induziert und kann durch insulin-sensitivierende PPAR $\gamma$ -Agonisten (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) gesteigert werden (Ribon et al., 1998b). CAP wird zu einer Familie von Adaptorproteinen mit ähnlicher Struktur gezählt. Diese enthalten drei SH3-Domänen und eine Region mit einer Ähnlichkeit zu dem Peptid Sorbin, die auch als Sorbin-homologe (SoHo) Domäne bezeichnet wird (Kimura et al., 2001). Nach der Phosphorylierung transloziert der Cbl/CAP-Komplex zu speziellen Bereichen der Plasmamembran, den so genannten Lipid Rafts, mediiert durch die Interaktion der SoHo-Domäne von CAP mit dem Protein Flotillin (Baumann et al., 2000). Eine Überexpression von CAP-Mutanten, die nicht an Cbl oder Flotillin binden können, inhibiert sowohl die Cbl-Translokation als auch die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme. Über die Interaktion seiner SH2-Domäne mit dem phosphorylierten Cbl wird das Adaptorprotein CrkII ebenfalls zu den Lipid Rafts rekrutiert (Chiang et al., 2001). CrkII bildet konstitutiv einen Komplex mit dem Guanylnucleotid-Austauschfaktor C3G. In den Lipid Rafts katalysiert C3G in dem G-

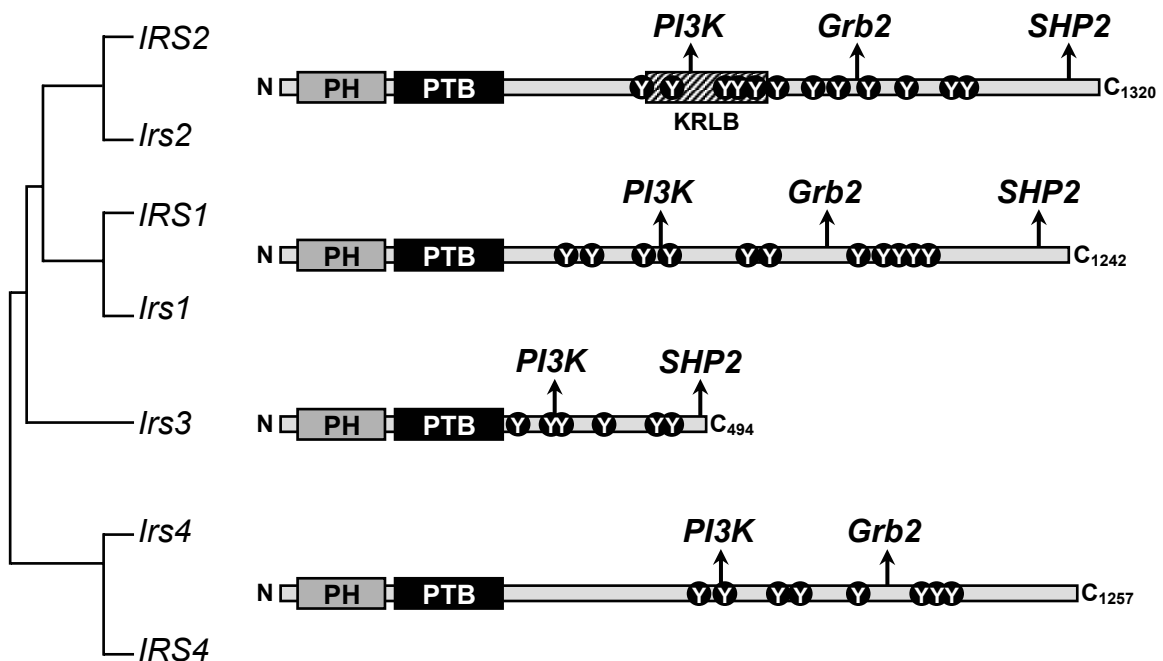


Protein TC10 den Austausch von GDP mit GTP, was zur Aktivierung des G-Proteins führt (Chiang et al., 2001). Die Lokalisierung von TC10 in den Lipid Rafts ist für seine Aktivierung durch Insulin notwendig (Watson et al., 2001). Die Aktivierung von TC10 scheint neben dem PI 3-Kinase-Signalweg ein zweites notwendiges Signal für die GLUT4-Translokation zur Plasmamembran zu sein (Chiang et al., 2001). Es wird vermutet, dass TC10 an der Stabilisierung oder Umorganisation des Actincytoskeletts involviert ist.

### 1.3 IRS-Proteine

Die IRS-Proteine nehmen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Grundfunktionen von Wachstum und Metabolismus in der Zelle ein. Sie dienen als Koppler ohne eigene intrinsische Aktivität zwischen verschiedenen Wachstumsfaktorrezeptoren und komplexen Netzwerken, beginnend mit der Interaktion von SH2-Domänen enthaltenden Proteinen (Übersichtsartikel: White, 1997; White, 1998; White, 2002). Sechs Mitglieder der IRS-Familie (IRS-1, -2, -3, -4, -5 und -6) wurden bisher identifiziert und kloniert mit jeweils unterschiedlicher subzellulärer Verteilung und Interaktion mit den SH2-Proteinen (Sun et al., 1991; Sun et al., 1995; Lavan et al., 1997a; Lavan et al., 1997b; Cai et al., 2003). Zusätzlich ist die Expression der IRS-Proteine Gewebe abhängig und variiert bei der Entwicklung, was zur Spezifität des Signalpotentials der Proteine beisteuern dürfte. Alle Mitglieder weisen Ähnlichkeiten in ihrer Struktur auf und verfügen über verschiedene konservierte Regionen. Bei den IRS-Proteinen ist aminoterminal eine Pleckstrin homologe (PH)-Domäne mit einer benachbarten Phosphotyrosin bindenden (PTB)-Domäne lokalisiert (s. Abb. 3). Die PH-Domäne dirigiert die Proteine über die Bindung von Phospholipiden zur Plasmamembran und kann ebenfalls saure Motive verschiedener Proteine binden. Die benachbarte PTB-Domäne ermöglicht die Interaktion mit Phosphotyrosinen in NPXY-Motiven der  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors (s. Abb. 4). Carboxyterminal finden sich eine Vielzahl weniger konservierter Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in YMXM- oder YXXM-Motiven. Der aktivierte Rezeptor modifiziert einige dieser Tyrosine durch die Übertragung einer Phosphorylgruppe, an die dann SH2-Domänen enthaltende Proteine mit hoher Affinität binden und dadurch nachgeschaltete Signalkaskaden aktivieren.

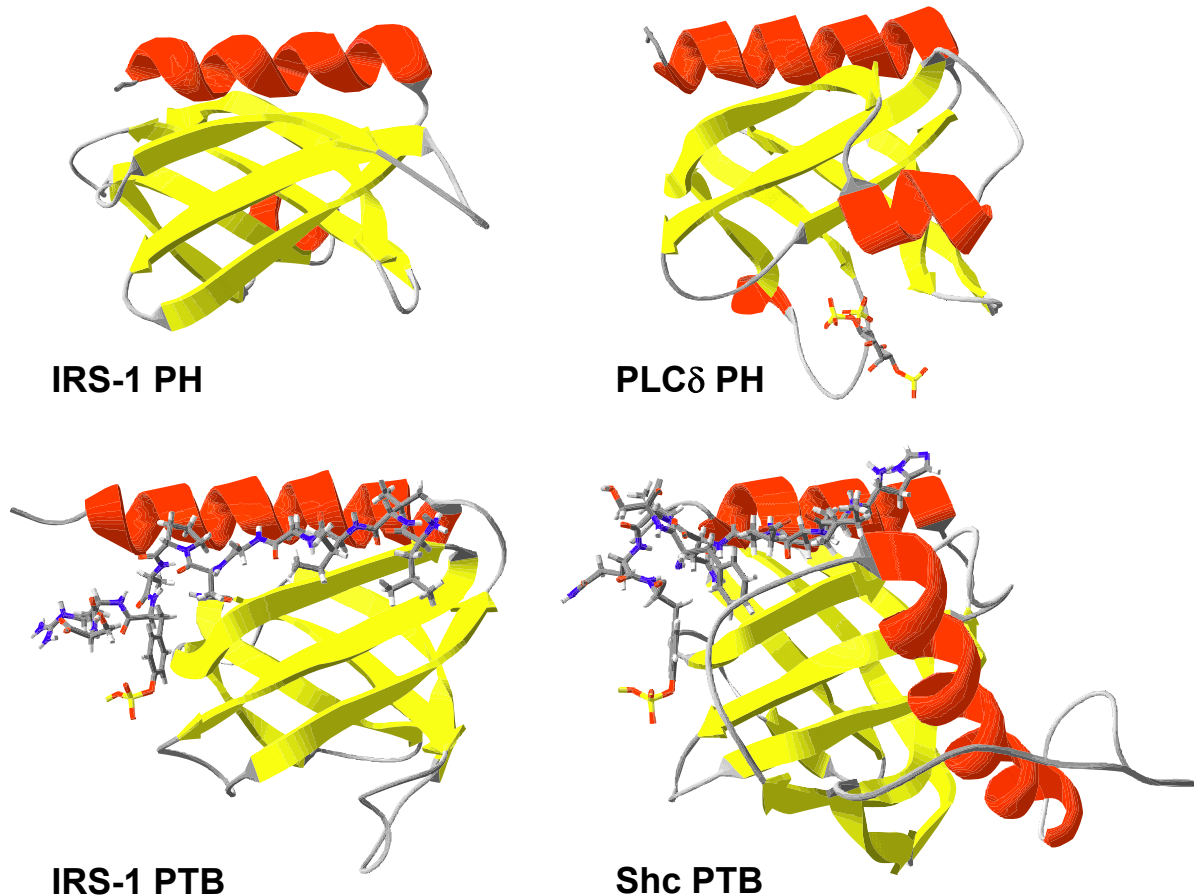
Beispielsweise wird die Bindung und Aktivierung der PI 3-Kinase durch IRS-1 vermutlich primär über die Tyrosine 608 und 628 vermittelt (Esposito et al., 2001).



**Abb. 3: Phylogenetische Analyse der IRS-Proteine aus Mensch und Maus.** Die phylogenetische Analyse wurde mit dem Programm ClustalW erstellt und verdeutlicht die nahe evolutionäre Verwandtschaft von IRS-1/Irs-1 und IRS-2/Irs-2 zwischen Mensch (Großbuchstaben) und Maus, welche aus IRS-4/Irs-4 hervorgegangen sein könnten. Die relativen Positionen der Pleckstrin homologen (PH)-Domäne, Phosphotyrosin bindenden (PTB)- und der KRLB (kinase regulatory loop-binding)-Domäne der IRS-Proteine sind angegeben. Potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen sind durch ein Y angedeutet und potentielle Bindungspartner wie die PI 3-Kinase, Grb-2 und SHP-2 sind ebenfalls aufgeführt (nach White, 2002).

IRS-1 ist das am besten charakterisierte Insulinrezeptorsubstrat. Das IRS-1 wurde ursprünglich als erstes Substrat des Insulinrezeptors identifiziert, wird aber ebenfalls von einer Anzahl weiterer Rezeptorsysteme als Substrat modifiziert, darunter die der Interleukin-Familie (IL-2, -4, -9, -13 und -15) über die Janus-Kinase, sowie der Interferone (IFN- $\alpha$ - $\beta$  und IFN- $\gamma$ ) und durch verschiedene Wachstumsfaktoren.

Der Hauptteil der Insulinwirkung wird vermutlich über IRS-1 und IRS-2 vermittelt. Eine phylogenetische Analyse zeigt die enge evolutionäre Verwandtschaft zwischen IRS-1 und IRS-2 von Mensch und Maus, die beide aus IRS-4 hervorgegangen sein dürften (White, 2002) (s. Abb. 3). Obwohl diese beiden Proteine eine Sequenzidentität von 43% aufweisen, im Bereich der PH- und PTB-Domänen sogar 65% bzw. 75%, konnten verschiedene Studien mit Knockout-Mäusen und Zellsystemen zeigen, dass diese Proteine primär redundante aber auch komplementäre Funktionen in der Insulin-Signaltransduktion übernehmen.



**Abb. 4: Dreidimensionale Struktur einzelner Domänen von IRS-1.** Die derzeit mittels Röntgenkristallographie bekannten Proteinstrukturen von IRS-1, die PTB- und PH-Domäne, sind vergleichend zu den homologen Domänen von PLC $\delta$  und Shc dargestellt. Die PTB-Domänen sind jeweils mit einem NPXpY-Peptid des Insulinrezeptors bzw. des TrkA-Rezeptors komplexiert, die PH-Domäne von PLC $\delta$  hat Inositol-1,4,5-trisphosphat gebunden. Darstellung mit Hilfe des Programms *DeepView*,  $\alpha$ -Helices sind rot und  $\beta$ -Faltblätter gelb hervorgehoben (nach Dhe-Paganon et al., 1999).

Das gezielte Inaktivieren des Gens von IRS-1 resultiert in Mäusen in generellen prä- und postnatalen Wachstumsstörungen zusammen mit einer milden Insulinresistenz in peripheren Geweben sowie einer herabgesetzten Glucosetoleranz (Araki et al., 1994; Tamemoto et al., 1994). IRS-2-Knockout-Mäuse zeigen ebenfalls eine Insulinresistenz, aber nur in wenigen Geweben Wachstumsstörungen. In solchen Mäusen führt eine multifaktorielle Resistenz kombiniert mit einer verringerten  $\beta$ -Zellmasse zu Typ 2 Diabetes (Withers et al., 1998). Das IRS-2 bildet in der IRS-Familie mit den Aminosäuren 591–786 eine einzigartige Region (KRLB-Domäne), die spezifisch mit der regulatorischen Kinaseschleife der Insulinrezeptor  $\beta$ -Untereinheit interagiert (Sawka-Verhelle et al., 1996). Da diese Domäne in IRS-1 nicht vorhanden ist, mag einen Teil der Signalspezifität von IRS-2 erklären. Die Funktion von IRS-3 und IRS-4 dagegen ist weniger klar. So weisen IRS-3- und IRS-4-Knockout-Mäuse normales bzw. nahezu normales Wachstum und Metabolismus auf (Liu et al., 1999;

Fantin et al., 2000). Es wird spekuliert, dass IRS-4 an Mechanismen der Fertilität beteiligt ist. Erst kürzlich berichteten Cai et al. (2003) von der Klonierung zweier weiterer Mitglieder der IRS-Familie und bezeichneten diese als IRS-5 und IRS-6 (bzw. DOK4/DOK5). Die beiden Proteine bestehen aus 326 bzw. 306 Aminosäuren und haben ein berechnetes Molekulargewicht von 37,1 bzw. 35,5 kDa. IRS-5 wird bis auf Niere und Leber ubiquitär exprimiert; die Expression von IRS-6 ist im Skelettmuskel am prominentesten. Beide Proteine werden in transfizierten Zellen nach einem Insulin- oder IGF-I-Stimulus phosphoryliert. IRS-5 assoziiert daraufhin mit RasGAP, Crk, Src und Fyn, aber nicht mit der PI 3-Kinase, Grb2, SHP-2, Nck oder PLC $\gamma$ -SH2-Domänen und aktiviert die MAP-Kinase. Dagegen interagiert IRS-6 weder mit den genannten SH2-Proteinen noch aktiviert es die MAP-Kinase (Cai et al., 2003).

#### 1.4 Regulationsmechanismen der Insulin-Signaltransduktion

Die Regulation und Modulation der Insulin-Signaltransduktion erfolgt über verschiedene Mechanismen, diskutiert werden in diesem Zusammenhang die Internalisierung des Insulinrezeptors, der Einfluss von Phosphatasen, die Regulation der Expression beteiligter Signalproteine und die Modulation durch Serin/Threonin-Phosphorylierung.

Die Terminierung des Insulinsignals erfolgt primär über eine schnelle Endocytose des Insulinrezeptors (Duckworth et al., 1998). Das an den Rezeptor gebundene Insulin wird anschließend in intrazellulären Kompartimenten abgelöst und abgebaut, der Rezeptor dagegen wird für eine erneute Nutzung zurück zur Zellmembran dirigiert. Ebenfalls erfolgt eine Terminierung des Insulinsignals durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen), die die schnelle Dephosphorylierung des Rezeptors und seiner Substrate katalysieren. Eine Reihe potentieller PTPasen wurden bisher identifiziert, die den Insulinrezeptor *in vitro* oder in der Zelle dephosphorylieren bzw. bei der Insulinresistenz hochreguliert werden. In den Vordergrund gerückt ist hierbei die cytoplasmatische PTP1B, denn die Gen-Inaktivierung von PTP1B resultiert in einer gesteigerten Tyrosin-Phosphorylierung des Insulinrezeptors im Muskel und einer verbesserten Insulinsensitivität (Elchebly et al., 1999). Auf der Ebene des IRS-1 wird neben PTP1B die Phosphatase SHP2 für eine Verringerung der Tyrosin-

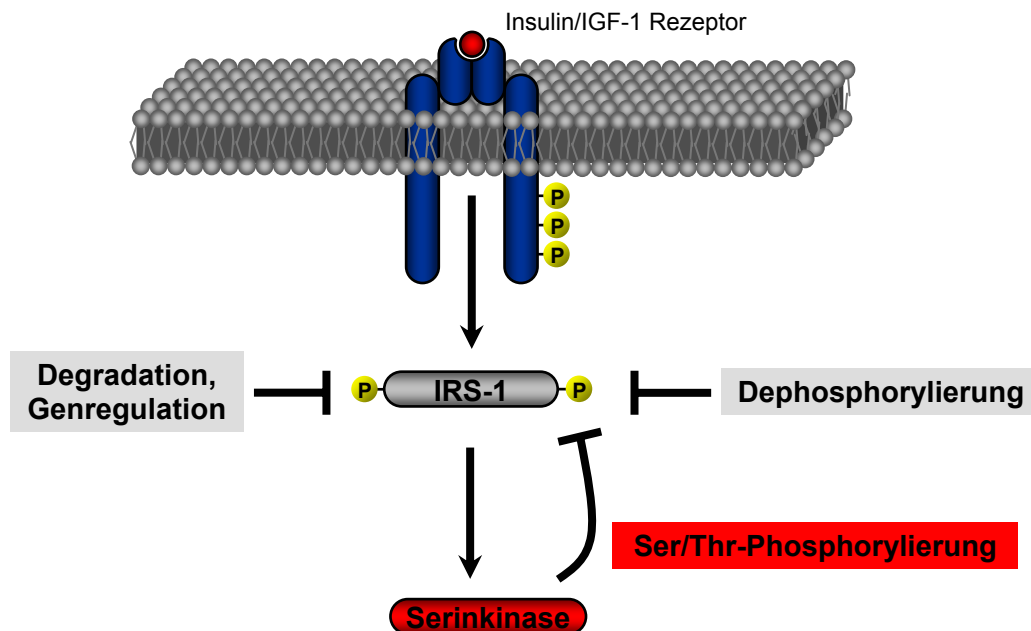
Phosphorylierung von IRS-1 verantwortlich gemacht. Reduzierte Mengen an SHP2 in Mäusen führen zu einer gesteigerten IRS-1 Tyrosin-Phosphorylierung und Assoziation mit der PI 3-Kinase (Arrandale et al., 1996; Goldstein et al., 2000). Insbesondere in Verbindung mit der verringerten Wirkung von Insulin bei Typ 2 Diabetikern und Adipositas werden Veränderungen bei der Expression von Signalproteinen beobachtet und daher als molekularer Marker für die Insulinresistenz diskutiert (Sesti et al., 2001). So findet sich eine signifikante Reduktion der IRS-1-Proteinmenge in Skelettmuskelbiopsien morbid adipöser Patienten (Goodyear et al., 1995) und in isolierten Adipocytten von Typ 2 Diabetes-Patienten (Rondinone et al., 1997).

#### **1.4.1 Modulation von IRS-1 durch Serin-Phosphorylierung**

Neben der Modifikation des Insulinrezeptors und der IRS-Proteine durch die Phosphorylierung von Tyrosinen werden diese Proteine an Serinresten phosphoryliert. Die Serin-Phosphorylierung ist in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, da derzeit davon ausgegangen wird, dass diese Modifikation insbesondere der IRS-Proteine innerhalb der Insulin-Signalkaskade eine negative Rückkopplung darstellt (s. Abb. 5). Durch eine Quervernetzung mit anderen Signalwegen könnte durch die fehlerhafte Aktivierung dieses Abschaltmechanismus zelluläre Insulinresistenz entstehen (Johnston et al., 2003).

In der Zelle wird IRS-1 konstitutiv an Serinen phosphoryliert (Sun et al., 1991; Araki, et al., 1994). Vermutlich ist diese basale Serin-Phosphorylierung notwendig, denn eine Dephosphorylierung durch Phosphatasen *in vitro* führt zu einer herabgesetzten Phosphorylierbarkeit von IRS-1 durch den Insulinrezeptor (Greene & Garofalo, 2002). Eine gesteigerte Serin-Phosphorylierung dagegen findet sich bei der Insulinresistenz und ist ebenfalls mit einer verringerten Tyrosin-Phosphorylierung durch den Insulinrezeptor und einer verringerten Aktivierung der nachgeschalteten PI 3-Kinase assoziiert. Als mögliche Mechanismen auf molekularer Ebene, die allein oder zusammen durch die Serin-Phosphorylierung zu einer herabgesetzten Phosphotyrosin-Menge führen und die Funktion von IRS-1 als Signalträger vermindern, werden die Störung der Insulinrezeptor/IRS-1-Interaktion bzw. die Inhibition der Insulinrezeptor-Kinase sowie die Störung der Assoziation mit SH2-

Proteinen wie der PI 3-Kinase diskutiert (Aguirre et al., 2002; Eldar-Finkelman & Krebs, 1997; Mothe & VanObberghen, 1996).



**Abb. 5: Modulationen der Signaltransduktion auf Ebene des IRS-1.** Verschiedene Mechanismen können den Signalträger IRS-1 beeinflussen. Von besonderem Interesse ist hier die Rückkopplung von Serin/Threonin-Kinasen innerhalb der Kaskade auf das IRS-1, die primär negative Auswirkungen auf dessen Funktion haben können. Bei der Insulinresistenz könnten diese Kinasen durch Quervernetzung mit anderen Signalwegen fehlerhaft aktiviert sein und somit die verminderte Signalweiterleitung erklären.

Die Serin-Phosphorylierung wird durch Insulin und IGF-I stimuliert und lässt sich durch die Inhibition zentraler Elemente der Insulin-Signaltransduktion wie der PI 3-Kinase (Wortmannin), der MAPK (PD98059) und mTOR (Rapamycin) hemmen (DeFea & Roth, 1997b; Li et al., 1999; Rui et al., 2001). IRS-1 wird demnach durch Serinkinasen innerhalb der Signalkaskade modifiziert, wodurch das Modell der negativen Rückkopplung entstand. Man geht davon aus, dass dieser Abschaltmechanismus einen integralen Bestandteil der Insulin-Signaltransduktion darstellt. Neben Insulin/IGF I induzieren die Serin-Phosphorylierung von IRS-1 das proinflammatorische Cytokin  $TNF\alpha$ , Angiotensin II, der Phosphatase-Inhibitor Okadainsäure, Aktivatoren der PKC (Phorbolster), freie Fettsäuren, Ceramide, Glucose, Anisomycin sowie weitere Faktoren (Hotamisligil et al., 1996; Shulman, 2000; White, 2002).

Bisher konnte für eine Reihe verschiedener Serinkinasen gezeigt werden, dass sie IRS-1 *in vitro* und/oder *in vivo* phosphorylieren können (s. Tab. 1), namentlich die Casein Kinase II, PI 3-Kinase bzw. PI 3-Kinase-associated Serine Kinase (PAS

Kinase), Phorbolster stimulierbare cPKC sowie die atypische PKC- $\zeta$ , GSK3 $\beta$ , MAP-Kinase, Akt, mTOR, IKK, JNK und AMPK. Die an der Entstehung der Insulinresistenz und an der negativen Beeinflussung von IRS-1 verantwortlichen Serinkinasen sind noch nicht eindeutig identifiziert. Das genaue Verständnis der Prozesse und involvierten Kinasen könnte mögliche Ansätze zur pharmakologischen Modulation der Insulinresistenz und damit des Typ 2 Diabetes liefern.

Eine Reihe von Phosphorylierungsstellen sind bisher beschrieben worden, die durch Serinkinasen in IRS-1 nach unterschiedlichen Stimuli kovalent modifiziert werden (s. Tab. 1). Die Identifizierung erfolgte teils durch Konsensus-Analyse und Mutation oder durch biochemische Untersuchungen.

**Tab. 1:** Serinkinasen, die IRS-1 *in vitro* und/oder *in vivo* phosphorylieren.

Kinase	Aktivierung	Phosphorylierte Aminosäure	Referenz
<i>Inhibitorische Wirkung:</i>			
CK II	Insulin	S99, T502 <sup>a</sup>	Tanasijevic et al., 1993
PI 3-Kinase, PAS Kinase	Insulin	n.b.	Lam et al., 1994; Cengel et al., 1998
GSK3	Insulin	n.b.	Eldar-Finkelman & Krebs, 1997; Greene & Garofalo, 2002
cPKC	Phorbolster	S612	DeFea & Roth, 1997a
MAPK	Phorbolster	S612	DeFea & Roth, 1997b
JNK1	TNF $\alpha$ , Anisomycin	S307	Aguirre et al., 2000
PKC- $\zeta$	Insulin	S318	Ravichandran et al., 2001; Liu et al., 2001; Beck et al., 2003
mTOR	TNF $\alpha$	S632, S635	Ozes et al., 2001
IKK	TNF $\alpha$	S307	Gao et al., 2002
<i>Positive Wirkung:</i>			
Akt	Insulin	S265, 302, 325, 358	Paz et al., 1999
AMPK	AICAR	S789	Jakobsen et al., 2001

<sup>a</sup> Nummerierung gemäß der Sequenz von *Rattus norvegicus*; PAS Kinase = PI 3-Kinase-associated Serine Kinase; n.b. = nicht bestimmt; AICAR = 5-Aminoimidazol-4-carboxamidribosid.

Früh entstand die Vermutung, dass Serine in direkter Nachbarschaft zu den YMXMS- Motiven von IRS-1 durch eine Phosphorylierung einen negativen Einfluss auf die Funktion von IRS-1 haben könnten. Analysiert wurden daher die Serine 612, 632, 662 und 731 durch eine gezielte Mutagenese (Mothe & VanObberghen, 1996). Die Mutation dieser Aminosäuren zu Alanin zeigten hier wie auch in anderen Arbeiten meist nur einen partiellen Einfluss, was auf die große Anzahl von Serinen und Threoninen in IRS-1 zurückgeführt wird, die zusammen etwa 20% der Aminosäuresequenz ausmachen. Das phosphorylierte Serin 307 identifizierten die Autoren Aguirre et al. (2000) durch eine biochemische *in vitro* Untersuchung nach

der Inkubation von IRS-1 mit der c-Jun aminoterminalen Kinase 1 (JNK1). Die Autoren zeigten ebenfalls eine Phosphorylierung von Serin 307 in Zellen nach einer Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  und Anisomycin, beides Aktivatoren der JNK. Serin 307 liegt nahe der PTB-Domäne von IRS-1 und daher wird eine Störung der Insulinrezeptor/IRS-1-Interaktion vermutet. Das Serin 789 wurde als Phosphorylierungsstelle der 5'-AMP-aktivierten Protein Kinase (AMPK) beschrieben (Jakobsen et al., 2001). Dieses Serin soll die Funktion von IRS-1 positiv modulieren, da eine Aktivierung der AMPK in Skelettmuskelzellen durch 5-Aminoimidazol-4-carboxamidribosid (AICAR) eine Steigerung der Insulin-stimulierten IRS-1-assoziierten PI 3-Kinase-Aktivität bewirkte. Die Autoren Qiao et al. (2002) identifizierten das Serin 789 ebenfalls in seiner phosphorylierten Form in Insulin-resistenten Nagern, sprechen diesem Aminosäurerest aber eine Rolle als negativen Modulator zu. Die verantwortliche Kinase wurde nicht identifiziert, soll aber nicht die AMPK sein. Die Insulin-stimulierte Serin-Phosphorylierung von IRS-1 im Bereich der PTB-Domäne durch die Akt scheint vor der Dephosphorylierung durch PTPasen zu schützen und daher wird die Akt ebenfalls als positiver Regulator betrachtet (Paz et al., 1999).

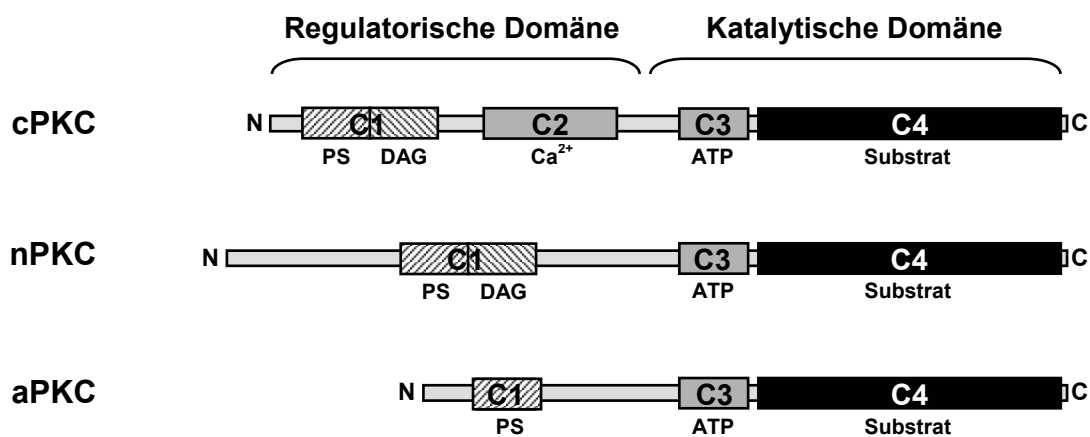
Kürzlich wurde eine Verbindung zwischen Serin-Phosphorylierung und Insulin-stimulierter Degradation von IRS-1 über den proteasomalen Weg hergestellt (Sun et al., 1999; Zhande et al., 2002; Greene et al., 2003). Die genauen Mechanismen sind nicht bekannt, allerdings scheint das Serin 307 an dem Insulin-stimulierten Abbau von IRS-1 beteiligt zu sein (Greene et al., 2003).

### **1.5 Protein Kinase C: Mediator oder Inhibitor der Insulin-Signalkaskade?**

Mitglieder der Protein Kinase C (PKC)-Familie sind an verschiedenen Prozessen der Insulin-Signaltransduktion beteiligt. Die widersprüchlichen Ergebnisse älterer Arbeiten über die mögliche Rolle der PKC entweder als Mediator oder als Inhibitor der Insulinwirkung waren nur schwierig miteinander in Einklang zu bringen (Considine & Caro, 1993). Derzeit scheint es dagegen deutlich zu werden, dass das breit gefächerte Wirkungsspektrum der PKC durch die unterschiedlichen Isoformen und in einem gewebeabhängigen Kontext bewirkt wird.



Die bisher identifizierten 12 Isozyme der PKC-Familie werden aufgrund ihrer Struktur und Kofaktorregulierung in drei Subtypen unterschieden: Die klassischen (cPKC- $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_2$  und - $\gamma$ ) sind durch die Bindung von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Phosphatidylserin (PS) und Diacylglycerol (DAG) stimulierbar, die neuen (nPKC- $\delta$ , - $\varepsilon$ , - $\eta$  und - $\theta$ ) dagegen sind  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig und die atypischen (aPKC- $\iota$ , - $\lambda$  und - $\zeta$ ,) sind sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ - als auch Phospholipid-unabhängig (Übersichtsartikel: Dekker et al., 1994; Newton, 1995; Idris et al., 2001; Idris et al., 2002; Schmitz-Peiffer, 2002). Die verschiedenen Isoformen zeichnen sich durch eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation, eine unterschiedliche Aktivierbarkeit durch die Kofaktoren (s. Abb. 6) sowie ein unterschiedliches Muster an Substratproteinen aus.



**Abb. 6: Schematische Struktur der klassischen, neuen und atypischen Protein Kinase C.** Die primäre Struktur der PKC kann in 4 konservierte Regionen gegliedert werden. Die aminoterminale Hälfte des Polypeptids bildet mit C1 und C2 die regulatorische Domäne. In C1 liegt eine Bindungsstelle für Phosphatidylserin (PS) und Diacylglycerol (DAG), C2 bindet  $\text{Ca}^{2+}$ . Carboxyterminal setzt sich die katalytische Domäne der Serin/Threonin-Kinase aus den Regionen C3, welche ATP bindet, und C4 zusammen. Region 4 enthält die eigentliche enzymatische Aktivität und bindet das Substrat (nach Idris et al., 2001).

Basierend auf den Sequenzen bekannter Phosphorylierungsstellen wurde ein allgemeines Konsensusmotiv der PKC mit  $\text{RXXS/TXRX}$  ermittelt, wobei X für jede beliebige Aminosäure steht (Pearson & Kemp, 1991). Die Autoren Nishikawa et al. (1996) untersuchten im Einzelnen die Spezifität von 9 PKC-Isoformen mit einer Peptidbibliothek und berichten, dass alle Isozyme bevorzugt Peptide mit hydrophoben Aminosäuren in Position +1 carboxyterminal des Serins und basischen Resten in Position -3 phosphorylieren. Weiterhin werden Peptide mit basischen Aminosäuren in Position -6, -4 und -2 selektiert. Für die individuellen PKC-Isozyme wurden aber dennoch zum Teil sehr unterschiedliche optimale Substratspezifitäten

bestimmt. Die strukturelle Basis dieser Selektivität der Isozyme basiert vermutlich auf einzelnen unterschiedlichen Aminosäureresten im katalytischen Zentrum.

Die Vorstellung, dass eine Aktivierung der PKC einen oder mehrere Schritte im Glucosetransport und -metabolismus transduziert oder abschwächt, entstand Mitte der Neunziger Jahre (Shmueli et al., 1993). Unterstützt wurde dies durch erste Hinweise, dass die PKC den Insulinrezeptor (Bollag et al., 1986) und die Glykogensynthase phosphoryliert (Blackmore et al., 1986). In folgenden Arbeiten konnten Änderungen der PKC-Aktivität in Leber, Muskel und Fettgewebe mit der Insulinresistenz assoziiert werden, beispielsweise im Alterungsprozess (Qu et al., 1999a), bei Adipositas (Qu et al., 1999b), durch Fruktose- und Fettdiät (Donnelly et al., 1994; Schmitz-Peiffer et al., 1997) und Muskeldenervation (Heydrick et al., 1991). Aktuelle Arbeiten haben gezeigt, dass die PKC-Isoformen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  starke inhibitorische Effekte auf die Autophosphorylierung der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase haben (Bossenmaier et al., 1997). Insbesondere die Serinreste 994, 1023 und 1025 des Insulinrezeptors sind an der durch die PKC- $\beta_2$  und der PKC- $\theta$  vermittelten Inhibition beteiligt (Strack et al., 2000).

In den unmittelbar auf die Stimulierung des Insulinrezeptors folgenden Signalereignissen phosphoryliert die PKC die IRS-Proteine (Tanti et al., 1994; Busch et al., 1998; Liu et al., 2001; Ravichandran et al., 2001) und inhibiert die Aktivierung der Akt (Barthel et al., 1998). Eine Überexpression der PKC-Isoform  $\zeta$  resultiert in einer verminderten Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1 (Liu et al., 2001; Ravichandran et al., 2001). Es gibt weiterhin Belege, dass die PKC vermutlich über die Phosphorylierung intermediärer Substrate einen indirekten Einfluss auf die Glucoseaufnahme über die Modulation der GLUT4-Proteinaktivität ausübt. So wurde unter der Verwendung von Troglitazone ein gesteigerter Glucosetransport parallel zu einer verringerten PKC-Aktivität gezeigt (Baehr et al., 1996).

Obwohl einige PKC-Isoformen einen negativen regulatorischen Effekt auf die Insulin-Signaltransduktion ausüben, sind andere wie die PKC- $\zeta$  und PKC- $\lambda$  integraler Bestandteil der Insulinsignalkaskade flussabwärts der PI 3-Kinase (Standaert et al., 1999a; Standaert et al., 1999b).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss der Serin/Threonin-Phosphorylierung auf die Funktion des Signalträgers IRS-1 auf molekularer Ebene zu untersuchen. Im ersten Teil dieser Arbeit soll daher durch die Etablierung eines *in vitro* Modells dieser Einfluss charakterisiert werden. Verwendet werden sollte dabei die Serin/Threonin-spezifische Protein Kinase C. Ausgewählt wurde diese Serinkinase da in der Zelle unter anderem die atypischen Isoformen PKC- $\zeta$  und - $\lambda$  durch Insulin aktiviert werden sowie eine Stimulation der klassischen PKC Isoformen durch Phorbolster zu einer gesteigerten Serin-Phosphorylierung von IRS-1 führt. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen der verwendeten PKC in IRS-1 und Charakterisierung ihres Einflusses.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Chemikalien

Acetonitril, Gradient grade	Merck, Darmstadt
N-Acetylglucosamin	SIGMA, München
Agarose, SeaKem ME	Biozym, Hess. Oldendorf
Albumin Fraktion V, fettsäurefrei	Roche, Mannheim
ATP	Roche, Mannheim
	SIGMA, München
Bisindolylmaleimid I	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Complete, EDTA-frei, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche, Mannheim
Complete, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche, Mannheim
Dimethyldichlorsilan	AppliChem, Darmstadt
GelCode Blue Stain reagent	Pierce, Rockford, IL, USA
Gö 6983	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Guanidiniumchlorid	SIGMA, München
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Insulin	Novo Nordisk, Mainz
Milchpulver, fettarm	Neuform, Fink GmbH, Herrenberg
	AppliChem, Darmstadt
Okadainsäure	SIGMA, München
Phosphatidylserin (1,2-Diacyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin)	SIGMA, München
PKC- $\zeta$ Pseudosubstratpeptid	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Ponceau S	SIGMA, München
Restore Western Blot stripping buffer	Pierce, Rockford, IL, USA
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Serum Albumin Iyophilisiert, reinst	Behring, Marburg
SuperSignal Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
Tergitol Type NP-40	SIGMA, München
Tryptone	Difco Lab., Detroit, USA

Tween-20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat)	SIGMA, München
UptiLight HRP Blotsubstrat	Uptima, Montlucon, Frankreich

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden in p. A. Qualität von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), ICN (Meckenheim), Merck (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), SIGMA (München) und Serva (Heidelberg).

## 2.2 Radiochemikalien

[ $\gamma$ <sup>32</sup> P]-ATP Redivue (spez. Aktivität > 5.000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Freiburg
------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------

## 2.3 Antiseren und Antikörper

Anti-GST	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-IR- $\beta$ (Ab-4, monoklonal)	Oncogene, Cambridge, MA, USA
Anti-IRS-1	Dr. J. A. Maassen, Leiden, Niederlande
Anti-IRS-1 pS570	Dr. Norbert Tennagels, Aventis, Frankfurt
Anti-IRS-1 pS616	Biosource, Camarillo, CA, USA
Anti-Phosphotyrosin Antikörper (RC20)	Transduction Laboratories, Inc., Lexington, KY, USA
Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	Promega Corp., Mannheim
Anti-Maus, HRP-konjugiert	Promega Corp., Mannheim
Anti-Myc (Klon 9E10)	Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA
Anti-p85 $\alpha$ (Klon 4)	Transduction Laboratories, Inc., Lexington, KY, USA
Anti-Ziege, HRP-konjugiert	SIGMA, München

## 2.4 Enzyme

$\alpha$ -Thrombin, bovine	Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA
Not I, Restriktionsendonuklease	Roche, Mannheim
Protein Kinase C aus Rattengehirn	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Protein Kinase C- $\zeta$ , human, rekombinant aus SF-9 Zellen	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Protein Phosphatase 2A <sub>1</sub> , Bovine Kidney	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Sal I, Restriktionsendonuklease	Roche, Mannheim
Trypsin, modifiziert, sequencing grade	Roche, Mannheim

## 2.5 Kit-Systeme

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
PhastGel Silver Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Phosphopeptide Isolation Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA

## 2.6 Bakterienstämme

**Tab. 2:** Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Hersteller
BL21 Codon Plus-RP	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> <i>endA</i> Hte [ <i>argU proL Cam</i> <sup>r</sup> ]	Stratagene, La Jolla, CA, USA
One Shot TOP 10 Competent Cells	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 <math>\Delta</math>(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str<sup>r</sup>) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.7 Peptide

**Tab. 3:** Sequenzen der für die Interaktionsstudien verwendeten Peptide.

Bezeichnung	Aminosäuresequenz <sup>1</sup>	Masse
Y608	DDGYMPMSPGV	1168,3 Da (pI 3,56)
pY608	DDG <b>p</b> YMPMSPGV	1266,3 Da
pS612	DDGYMPM <b>p</b> SPGV	1266,3 Da
pY608-pS612	DDG <b>p</b> YMPM <b>p</b> SPGV	1364,3 Da

<sup>1</sup> Die Sequenzen sind im Einbuchstabencode angegeben, pY bzw. pS bezeichnet die Phosphoform der entsprechenden AS.

Die in Auftrag gegebenen Peptide entsprechen den Aminosäuren 605 bis 615 aus dem IRS-1 der Ratte und wurden von Herrn Dr. Hoffmann im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem Applied Biosystems Model 433 Peptidsynthesizer hergestellt. Die Reinheit der Peptide wurde durch HPLC, UV-Spektrometrie und Massenspektrometrie überprüft.

## 2.8 Nukleinsäuren

### 2.8.1 Plasmide

**Tab. 4:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Kommentar	Herkunft
pGEX-5X-3	Genbank Acc. No.: U13858	Amersham
pGEX-5X-3-rIRS-1 <sup>449-664</sup>	Enthält die IRS-1 AS 449-664 aus <i>Rattus norvegicus</i> , einkloniert über Sal I und Not I	Biosciences, Freiburg Dr. Zhihua Ran, DDFI
pGEX-5X-3-rIRS-1 <sup>449-664</sup> -S612A	Punktmutation: S612A	diese Arbeit
pGEX-5X-3-rIRS-1 <sup>449-664</sup> -T604/S612A	Punktmutation: T604A und S612A	diese Arbeit
pGEX-5X-3-rIRS-1 <sup>449-664</sup> -S612/620A	Punktmutation: S612A und S620A	diese Arbeit
pGEX-5X-3-rIRS-1 <sup>449-664</sup> -S570A	Punktmutation/AS-Austausch:	diese Arbeit

pGEX-2T-p85 $\alpha$	<p>S570A</p> <p>p85<math>\alpha</math> aus <i>Bos taurus</i>, mit Myc-Tag am c-Terminus,</p> <p>Genbank Acc. No.: U13850</p>	<p>Dr. Peter Shepherd,</p> <p>Department of Biochemistry,</p> <p>University College London, UK</p>
----------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------

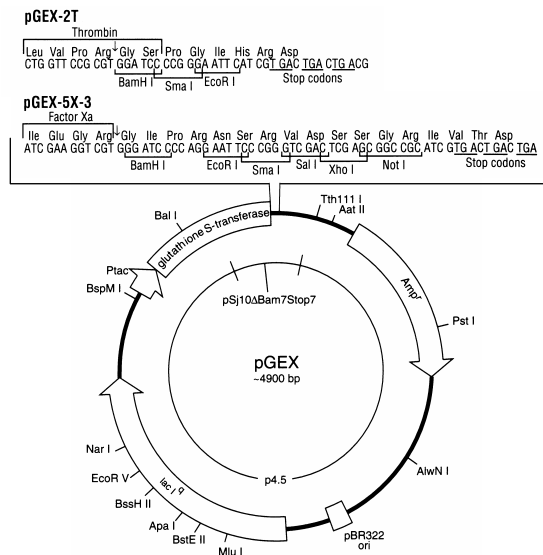


Abb. 7: Genkarte der Glutathion-S-transferase-Fusionsvektoren pGEX-2T und pGEX-5X-3.

### 2.8.2 Synthetische Oligonukleotide

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Mutageneseprimer.

Mutageneseprimer	
MS P01 S612A for	5'-GGC TAC ATG CCC ATG GCT CCC GGA GTG GCT CC-3'
MS P02 S612A rev	3'-CCG ATG TAC GGG TAC CGA GGG CCT CAC CGA GG-5'
MS P03 S612/620A for	5'-GC TAC ATG CCC ATG GCT CCC GGA GTG GCT CCA GTG CCC GGC AAC CGC AAA GG-3'
MS P04 S612/620A rev	3'-CG ATG TAC GGG TAC CGA GGG CCT CAC CGA GGT CAC GGG CGG TTG GCG TTT CC-5'
MS P05 T604/S612A for	5'-CC AAC CTC CAC GCC GAT GAT GGC TAC ATG CCC ATG GCT CCC GGA GTG G-3'
MS P06 T604/S612A rev	3'-GG TTG GAG GTG CGG CTA CTA CCG ATG TAC GGG TAC CGA GGG CCT CAC C-5'
MS P07 S358A for	5'-CCC GGC TAC CGG CAT GCC TTC GTG CCC ACC-3'
MS P08 S358A rev	3'-GGG CCG ATG GCC GTA CGG CGG AAG CAC GGG TGG-5'

Die in Auftrag gegebenen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Alle Primer waren HPSF-gereinigt.



## 2.9 Chromatographie

Nucleogel SAX 1000-8/46, 50 x 4.6 mm	Macherey-Nagel, Düren
Nucleosil 300-5 C18, 250 mm x 2 mm, 5 µm Partikelgröße, 300 Å Porengröße	Macherey-Nagel, Düren
Glutathion Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Wheat Germ Agglutinin (Lectin von <i>Triticum vulgare</i> immobilisiert auf Agarose)	SIGMA, München

## 2.10 Transformation und Plasmidamplifikation in *E.coli*-Bakterien

Die Transformation der verwendeten chemisch kompetenten *E. coli*-Stämme One Shot TOP 10 (Invitrogen, Karlsruhe) und Epicurian coli BL21-CodonPlus (Stratagene, La Jolla, CA, USA) erfolgte jeweils nach den Angaben des Herstellers. Nach erfolgter Transformation der *E. coli*-Zellen durch einen definierten Hitzeschock wurden die Bakterien zur Antibiotika-Selektion auf LB-Agarplatten (1,5% (w/v) LB-Agar; 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und für 16 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Positive Klone wurden von den LB/Ampicillin-Platten selektiert, in 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium (LB-Broth, GibcoBRL) überführt und zur Plasmidamplifikation bei 37°C und 250 upm über Nacht inkubiert.

## 2.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 1,5 ml Zellsuspension einer 5 ml-Kultur, welche in selektivem LB-Medium über Nacht bei 37 °C angezogen wurde, und das Plasmidisolierungskit „QIAprep Spin Mini“ von Qiagen (Hilden) gemäß der Herstellerangaben verwendet.

## 2.12 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde über die Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. Ebenfalls wurde die Reinheit anhand des Verhältnisses  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  überprüft, eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist ein Verhältnis von 1,8 - 2,0 auf.

## 2.13 Restriktion von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung der DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firma Roche (Mannheim) bei einem Verhältnis von 10-20 U Restriktionsenzym pro µg Plasmid-DNA für eine Stunde bei 37°C.

## 2.14 Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen

Zur Analyse von Nukleinsäuren wurden diese in 0,5 - 1,5%igen Agarosegelen (Biozym, Hess. Oldendorf) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE-Puffer (50 x TAE: 2 mol/l Tris-HCl (pH 7,8); 5,7% (v/v) Essigsäure; 0,05 mol/l EDTA) verwendet. Die Proben wurden vor Beladung des Gels mit 1/10 Volumen Blaumarker (0.25% (w/v) Bromphenolblau; 1% (w/v) SDS; 1 mmol/l EDTA; 30% (w/v) Glycerol) versetzt. Als Längenstandard dienten eine 100 bp-DNA-Leiter und eine 1 kb-DNA-Leiter (beides New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Die Auftrennung im Gel erfolgte mit einer Feldstärke von 5 V/cm in einer horizontalen Elektrophoresekammer. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Nukleinsäuren im Gel in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) 15 min gefärbt und anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert.

## 2.15 Ortsspezifische Mutagenese

Die Mutagenese wurde mit dem „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Folgende Mutanten von rIRS-1<sup>449-664</sup> sollten erzeugt werden: S570A, S612A, S612/620A und T604/S612A. Das Plasmid mit dem Wildtyp-Gen (pGEX-5X-3-rIRS-1<sup>449-664</sup>) wurde dafür als DNA-Vorlage mit einem untereinander und zur Zielsequenz komplementären Primerpaar, welches eine gezielte ortsspezifische Mutation trug, in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Für eine Mutagenese wurden jeweils 20 ng des Vektors pGEX-5X-3-rIRS-1<sup>449-664</sup> mit 125 ng der einzelnen Mutagenese-Oligonukleotide (siehe Tabelle 4) eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte im Reaktionspuffer mit dNTPs und *PfuTurbo* DNA Polymerase unter folgenden Bedingungen:

**Tab. 6:** Reaktionsbedingungen bei der Polymerase-Kettenreaktion.

Zyklen	Zeit	Temperatur	Reaktionsschritt
1.	30 s	95°C	Denaturierung der DNA
2. 12-18x	30 s	95°C	Denaturierung der DNA
	1 min	55°C	Bindung der Primer an die DNA (Annealing)
	12 min	68°C	DNA-Synthese (Elongation)

Da DNA in *E. coli*-Zellen methyliert vorliegt, wurde anschließend die aus *E. coli* aufgereinigte parentale DNA-Vorlage mit der Wildtypsequenz gezielt durch Zugabe von *Dpn* I Endonuklease, die spezifisch für methylierte und halbmethylierte doppelsträngige DNA ist, gedaut. Mit den unmethylierten PCR-Amplifikaten erfolgte daraufhin eine Transformation von *E. coli*. Positive Klone wurden selektiert, die Plasmid-DNA amplifiziert (2.10) und der Austausch der Nukleotide durch Sequenzierung (2.16) überprüft.

Die mutierten Plasmide wurden pGEX-5X-3-rIRS-1<sup>449-664</sup>-S570A, pGEX-5X-3-rIRS-1<sup>449-664</sup>-S612A, pGEX-5X-3-rIRS-1<sup>449-664</sup>-S612/620A bzw. pGEX-5X-3-rIRS-1<sup>449-664</sup>-T604/S612A genannt.

## 2.16 DNA-Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Qiagen (Sequencing Service, Hilden) durchgeführt.

## 2.17 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Nach Transformation von *E. coli* mit einem pGEX-Expressionsvektor wurden 2–100 ml 2x YTA-Medium (Tryptone 16 g/l; Hefeextrakt 10 g/l; NaCl 5 g/l; 100 µg/ml Ampicillin) durch Picken einer einzelnen positiven Kolonie angeimpft und für 12–15 Stunden bei 37°C und 280 upm kultiviert. Die Kultur wurde anschließend mit frischem 2x YTA-Medium 1:100 verdünnt und durch Schütteln mit 280 upm bei 30°C kultiviert. Die optische Dichte und damit das Wachstum der Kultur wurde regelmäßig bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer kontrolliert. Bei einer Extinktion von 0,6–0,8

wurde durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 0,1 mmol/l die Expression der Fusionsproteine induziert und die Kultur für weitere 2–6 Stunden geschüttelt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden bis hier aseptisch durchgeführt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Mit einer 10 minütigen Zentrifugation bei  $7.700 \times g$  und 4°C wurden die *E. coli*-Zellen sedimentiert. Mit jeweils 50 µl eiskaltem PBS-Puffer (140 mmol/l NaCl; 2,7 mmol/l KCl; 10 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,3); mit Complete Proteasen-Inhibitoren-Cocktail) je ml der Kultur wurde das Pellet daraufhin resuspendiert und die Bakterien in kurzen Intervallen durch Ultraschall aufgeschlossen. Dem sonizierten Pellet wurde 20%iges Triton X-100 in einer finalen Konzentration von 1% hinzugegeben und dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, um die Solubilisierung der Fusionsproteine zu erleichtern. Wiederum bei 4°C wurde für 10 Minuten und  $12.000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Pro 100 ml des ursprünglich sonizierten Pellets wurden 2 ml Glutathion Sepharose 4B (50%, äquibriert mit PBS, Amersham Biosciences) zu dem Überstand gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ganze wurde auf eine Säule aufgetragen und die abgesetzte Sepharose mit dem 10 fachen Volumen PBS gewaschen. Zur Elution der Fusionsproteine wurde die Säule dreimal mit 1 ml Elutionspuffer (50 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0); 10 mmol/l Glutathion, reduziert) pro ml Säulenvolumen für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Eluate wurden zusammengeführt, die Proteinkonzentration bestimmt und für weitere Versuche bei –20°C gelagert (nach GST Gene Fusion System, Amersham Biosciences; Current Protocols in Mol. Biology und Smith et al., 1988).

## 2.18 Proteolytische Spaltung der GST-Fusionsproteine

Glutathion-S-transferase-Fusionsproteine können über den GST-Anteil dimerisieren. Um diese Dimerisierung in einigen weiterführenden Experimenten auszuschließen, wurde der GST-Anteil proteolytisch entfernt. Die hochspezifische Spaltung der Fusionsproteine wird durch Proteaseschnittstellen ermöglicht, die durch die pGEX-Vektoren vorgegeben sind und sich im exprimierten Fusionsprotein zwischen GST und dem inklonierten Protein befinden. So kodiert der für die IRS-1-Domänen verwendete Vektor pGEX-5X-3 eine Schnittstelle für die Protease Faktor Xa und der

für p85 $\alpha$ -GST verwendete Vektor pGEX-2T eine Schnittstelle für  $\alpha$ -Thrombin. Beides sind Enzyme der Blutgerinnungskaskade. Die GST-Fusionsproteine wurden durch eine Variation des Aufreinigungsprotokolls (2.17) gebunden an der Glutathion Sepharose-Säule von ihrem GST-Anteil getrennt. Dafür wurde nach dem Waschen der Säule die Protease in einem Volumen PBS entsprechend jeweils dem bei der Aufreinigung verwendeten Sepharose-Volumen auf die Säule gegeben. Pro zu erwartendem mg Fusionsprotein wurde 1 U Faktor Xa (Amersham Biosciences, Freiburg) bzw.  $\alpha$ -Thrombin (Upstate Biotech Inc., Lake Placid, NY, USA) eingesetzt. Es wurde für 1-16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Eluiert wurde anschließend das abgespaltene Protein zusammen mit der Protease, der GST-Anteil verblieb gebunden an der Säule. Zur Inaktivierung der Protease im Eluat wurde Complete Proteaseschutz (Roche, Mannheim) zugegeben. Alternativ wurde die Reaktion durch Zugabe von 6x Laemmli (0,35 mol/l Tris-HCl (pH 6,8); 10,28 % (w/v) SDS; 36 % (v/v) Glycerin; 0,6 mol/l DTT; 0,012 % (w/v) Bromphenolblau) und Kochen abgestoppt.

## 2.19 Partielle Aufreinigung des Insulinrezeptors

Der in den folgenden Versuchen verwendete Insulinrezeptor wurde aus der Leber von männlichen Wistar Ratten (gefüttert ad libidum, Gewicht 280–320 g, Harlan Winkelmann, Borcheln) aufgereinigt (nach Burant et al., 1984). Sofort nach der Eröffnung des Tieres wurde die Leber entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufreinigung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Die Leber wurde im ersten Arbeitsschritt mittels Ultra-Turrax und Elvehjem-Potter homogenisiert. Dabei wurde pro g Leber 3,5 ml Homogenisationspuffer (50 mmol/l HEPES (pH 7,4); 1% (v/v) Triton X-100; Complete Proteasen-Inhibitoren-Cocktail) zugegeben. Danach wurde für 10 Minuten mit  $10.000 \times g$  zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet verworfen und die im Überstand enthaltenen Zellmembranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur durch Drehen in einem Rundbodenröhrchen solubilisiert. Anschließend erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt für 90 Minuten bei  $100.000 \times g$ , um ungelöstes Material zu entfernen. Der Überstand wurde auf eine aus an Agarose gebundenem Weizenkeim-Agglutinin (wheat germ agglutinin, WGA, Lectine aus *Triticum vulgare*, SIGMA,

München) bestehende Säule gegeben. Für jeden ml des WGA-Säulenmaterials wurden etwa 3 g Leber aufgearbeitet. Bei diesem affinitätschromatographischen Aufarbeitungsschritt binden die Glykoproteine der vorher solubilisierten Membranen an die Lectine der Agarose. Die so beladene Säule wurde mit 75 ml je ml des WGA-Säulenmaterials gewaschen (50 mmol/l HEPES (pH 7,4); 0,1% (v/v) Triton X-100). Eluiert wurde mit dem Monosaccharid N-Acetylglucosamin. Der Waschpuffer wurde dafür um 0,3 mol/l N-Acetylglucosamin ergänzt. Dabei wurde für jedes g Leber mit 1 ml Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde in 0,5 ml großen Fraktionen gesammelt, die Proteinkonzentration bestimmt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **2.20 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinmengen wurden mit Hilfe eines Protein Assays der Firma Bio-Rad (München) quantifiziert. Der Test beruht auf der Verschiebung der maximalen Extinktion von 465 nm zu 595 nm des Coomassie Brilliant Blue G250-Farbstoffes nach Proteinbindung (Spector, 1978). Als Standard wurde Rinderserumalbumin (Behring, Marburg) verwendet.

## **2.21 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung der Proteine wurden zwei verschiedene Elektrophoresesysteme verwendet. Zum einen waren dies die Horizontalelektrophoresekammer Multiphor II und zum anderen das PhastSystem (beides Amersham Biosciences, Freiburg).

Zur Elektrophorese mit der Multiphor II-Kammer wurden 8–18%ige Gradientengele (ExcelGel SDS Gradient 8–18, Amersham Biosciences) oder selbst gegossene 10%ige homogene Gele in Kombination mit den entsprechenden Pufferstreifen (ExcelGel SDS Bufferstrips, Amersham Biosciences) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Temperatur von  $15^{\circ}\text{C}$  und einer konstanten Stromstärke von 25 mA für den Einlauf der Proben ins Gel und 50 mA bei der eigentlichen Auftrennung über eine Zeit von 2,5 Stunden.

Für die Auftrennung mit dem PhastSystem wurden homogene 12,5%ige Gele (PhastGel Homogeneous 12.5, Amersham Biosciences) mit den entsprechenden

Pufferstreifen (PhastGel SDS Bufferstrips, Amersham Biosciences) verwendet. Die Laufbedingungen für die etwa 20 Minuten dauernde Auftrennung betragen 250 V, 10 mA, 3 W sowie 15°C.

Die Proben wurden entsprechend ihrer Vorbehandlung mit 6fach konzentriertem Laemmli-Puffer (0,35 mol/l Tris-HCl (pH 6,8); 10,28% (w/v) SDS; 36% (v/v) Glycerin; 0,6 mol/l DTT; 0,012% (w/v) Bromphenolblau; nach Laemmli, 1970) und Wasser auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Daraufhin folgte eine Denaturierung der Proteine durch 5 minütiges Kochen bei 95°C. Die so behandelten Proben wurden anschließend zusammen mit Referenzproteinen (10 kDa Protein Ladder von GibcoBRL und Color Marker Wide Range von SIGMA) auf das Gel aufgetragen. Beim Multiphor-System geschah dies mit Hilfe von Filterplättchen, die Probenvolumina betragen 20 µl, das der Marker 8 µl. Der Probenauftrag beim PhastSystem findet automatisch über Probenapplikatoren statt. Das Probenvolumen betrug je nach Applikator 4 µl oder 1 µl.

## **2.22 Proteintransfer auf Membranen (Westernblot)**

Der Transfer der nach SDS-Polyacrylamid Elektrophorese im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte im Semidry-Verfahren mit einer Multiphor II NovaBlot-Einheit sowie dem PhastSystem (beides Amersham Biosciences, Freiburg). Bei beiden Systemen wandern die Proteine zwischen zwei Graphitelektrodenplatten entlang der Feldlinien der angelegten Spannung aus dem Gel auf die Membran.

Beim Multiphor II NovaBlot wurden dabei ein diskontinuierliches Puffersystem, bestehend aus Anodenlösung I und II sowie der Kathodenlösung, insgesamt 18 Filterpapiere (Elektroden Papier, Amersham Biosciences) und 1 Transfermembran aus Nitrocellulose verwendet. Zunächst wurden 6 Filterpapiere in der Anodenlösung I (0,3 mol/l Tris; 20% (v/v) Methanol) getränkt und auf der Anodengraphitplatte platziert. Das Gel wurde nach einer 5 minütigen Äquilibration in Anodenlösung II (25 mmol/l Tris; 20% (v/v) Methanol) von der Trägerfolie gelöst. Auf das Gel wurden die vorher ebenfalls in Anodenlösung II getränkte Transfermembran und 3 Filterpapiere positioniert und das ganze Paket auf den bereits auf der Anode liegenden Filterstapel gelegt. Die restlichen 9 Filterpapiere wurden nun in Kathodenlösung (40 mmol/l 6-



Aminohexansäure; 0,01% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol) getränkt und auf das oben liegende Gel übertragen. Der ganze Stapel wurde abschließend durch die Kathodengraphitplatte abgedeckt. Der Proteintransfer erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 40 min wobei die hierfür ausgewählten Parameter durch eine Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gel, einer variablen Spannung bis zu 20 V und einer variablen Leistung bis zu 5 W definiert waren.

Beim PhastSystem wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine das Gel von seiner Trägerfolie geschnitten und mit der Transfermembran sowie 3 Filterpapieren (PhastTransfer Filter Papier von Amersham Biosciences), alles zuvor in Transferpuffer (25 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3); 192 mmol/l Glycin; 20% (v/v) Methanol) getränkt, bedeckt und auf die Anode der PhastTransfer-Einheit platziert. Drei weitere mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere wurden auf das oben liegende Gel gelegt und anschließend mit der Kathode bedeckt. Transferiert wurde mit 20 V, 25 mA, 1 W und 15°C für 40 Minuten.

### **2.23 Immunodetektion mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL)**

Die Nitrocellulosemembranen wurden unmittelbar nach dem Proteintransfer bzw. nach dem Strippen (2.24) in Blockierlösung (siehe Tabelle 6) für 1 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Es folgte eine Inkubation der Membranen mit den in Blockierlösung gelösten, spezifischen Antiseren bei 4°C über Nacht. Daraufhin wurden die Membranen mit Waschlösung (Blockierlösung ohne dem blockierenden Zusatz) durch mehrfaches Wechseln des Puffers 1 h lang gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper in Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (Anti-Maus oder Anti-Kaninchen, beide von Promega Corp., Mannheim bzw. Anti-Ziege von Sigma, München). Dann wurden die Blotmembranen erneut für 1 h mehrfach mit Waschlösung gewaschen und schließlich für 10 min in einer Mischung aus ECL-Substrat- und Verstärkerlösung (Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert. Die Visualisierung und Quantifizierung der Signale erfolgte mit Hilfe eines Lumilmagers und entsprechender Software (Roche, Mannheim). Die Detektion der Tyrosinphosphorylierung der verschiedenen Proteine erfolgte mit Hilfe des

rekombinanten, monoklonalen Antikörpers RC20 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA). Bei Verwendung dieses Antikörpers entfiel die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, weil ersterer direkt mit der Peroxidase konjugiert ist.

**Tab. 7:** Verwendete Antiseren mit den entsprechenden Lösungen.

Antikörper	Blockierlösung	Verdünnung	2. Antikörper
Anti-GST	PBS; Tween 0,3%; 10% Milchpulver	1:1.000	Anti-Ziege (1:2.000)
Anti-IR- $\beta$	TBS; Tween 0,25%; 5% Milchpulver	1:1.000	Anti-Kaninchen (1:5.000)
Anti-IRS-1	TBS; Tween 0,25%; 5% Milchpulver	1:3.000	Anti-Kaninchen (1:10.000)
Anti-IRS-1 pS <sup>612</sup>	TBS; Tween 0,1%; 2% BSA	1:670	Anti-Kaninchen (1:5.000)
Anti-IRS-1 pS <sup>570</sup>	TBS; Tween 0,1%; 1% BSA	1:1.000	Anti-Kaninchen (1:5.000)
Anti-Myc	PBS; Tween 0,05%; 3% Milchpulver	1:1.000	Anti-Maus (1:2.000)
Anti-p85 $\alpha$	TBS; Tween 0,1%; 5% Milchpulver	1:5.000	Anti-Maus (1:5.000)
Anti-PY (RC20)	TBS; Tween 0,1%; 1% BSA	1:2.500	entfällt

## 2.24 Strippen von Blotmembranen

Ein „Restore Western Blot stripping buffer“ (Pierce, Rockford, IL, USA) ermöglichte die Wiederverwendung von bereits per ECL detektierten Membranen durch Abtrennung der Antikörper von den auf der Membran gebundenen Proteinen. Hierfür erfolgte eine Inkubation der Blotmembran mit der Stripping-Lösung für 15 - 25 min bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln. Anschließend wurde die Membran mehrfach für 15 min mit Waschlösung (TBS; Tween-20 0,05% (v/v)) gewaschen und dann für 30 min erneut mit Blockierlösung entsprechend dem gewählten Antikörper inkubiert. Daraufhin konnte die Membran für eine erneute Immunodetektion mittels ECL, wie in unter 2.23 erläutert, verwendet werden.

## 2.25 Färbetechniken

### 2.25.1 Ponceau S-Färbung

Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Nitrocellulosemembran zur Kontrolle der Transfereffizienz angefärbt. Dazu wurden die Membranstücke für mehr als 5 Minuten in Ponceau S-Lösung (0,1% (w/v) Ponceau S; 3% (w/v) Trichloressig-

säure) platziert und anschließend für etwa 2 Minuten mit Wasser wieder entfärbt. Nach erfolgter Färbung wurden die Membranstücke an der Luft getrocknet oder für eine Immunodetektion verwendet (nach Gallagher et al., Current Protocols in Molecular Biology, 1997).

### **2.25.2 Silberfärbung**

Die Silberfärbung der per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine erfolgte nach dem Verfahren von Heukeshoven und Dernick (1985), das eine Nachweisgrenze von 4 ng Protein pro Bande aufweist. Mit Hilfe dieses Protokolls wurden die aufgetrennten Proteine sowie die Markerproteine dauerhaft sichtbar gemacht und konserviert.

### **2.25.3 Coomassie Blue-Färbung**

Die Coomassie Blue-Färbung wurde nach den Herstellerangaben des „GelCode Blue Staining Reagent“ durchgeführt (Pierce, Rockford, IL, USA). Die Färbung basiert auf den kolloidalen Eigenschaften des Farbstoffes Coomassie G-250, der unspezifisch an Proteinen in Polyacrylamidgelen bindet. Der Hersteller gibt eine untere Nachweisgrenze von 8 ng Protein pro Bande an. Die Coomassie Blue-Färbung wurde dann als Färbemethode gewählt, wenn die aufgetrennten Proteine in weiterführenden Experimenten per HPLC analysiert oder per Massenspektrometrie sequenziert werden sollten.

## **2.26 Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel**

Für die Generierung tryptischer Peptide für die HPLC-Analyse wurden die entsprechenden Proteinbanden nach SDS-PAGE und der Visualisierung durch Coomassie Blue-Färbung aus dem Polyacrylamidgel geschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zunächst wurden die Banden für 10 min bei 30°C durch die Zugabe von Waschpuffer (50 mmol/l  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 7,8)) entfärbt, dann wurde

der Überstand entfernt und die Gelstücke mit Waschpuffer/Acetonitril (1:1) für weitere 10 min inkubiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Gelstücke für etwa 15 bis 20 min unter Vakuum (SpeedVac) getrocknet. Auf die so getrockneten Gelstücke wurde die Protease Trypsin (Roche, Mannheim; 0,1 mg/ml in 0,1 mol/l HCl, Verhältnis zu dauerndes Protein zu Enzym 1/20 bis 1/100) pipettiert. Nach 15 min wurden die Banden mit ausreichend Waschpuffer bedeckt und über Nacht bei 37°C inkubiert (nach Rosenfeld et al., 1992 und Hellman et al., 1995). Die Extraktion der Peptide erfolgte durch Beschallen im Ultraschallbad für 20 min. Das Beschallen wurde zweimal mit der Zugabe von Waschpuffer/Acetonitril wiederholt, die Überstände wurden jeweils zusammengeführt. Für die anschließende Verwendung in der HPLC wurde die Probe in der SpeedVac durch Anlegen eines Vakuums eingengt und mit dem Laufmittel A der ersten HPLC-Dimension aufgenommen.

## 2.27 Zweidimensionale HPLC-Analyse tryptischer Peptide

Die durch Proteolyse mit Trypsin generierten Peptide wurden mittels einer zweidimensionalen HPLC (High Performance Liquid Chromatography bzw. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) an einem Gold System der Firma Beckman (Krefeld) analysiert. Für die Chromatographie wurden tryptische Peptide aus 50 µg bzw. 250 µg (1 nmol bzw. 5 nmol) rIRS-1<sup>449-664</sup> eingesetzt. Vorausgegangen war jeweils die Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die PKC in Gegenwart von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (2.30.2). In der ersten Dimension erfolgte die Trennung der Peptide über eine Anionenaustauschersäule (Nucleogel SAX 8/46, 50 x 4,6 mm, Macherey-Nagel, Düren) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die mobile Phase setzte sich aus dem Laufmittel A 20 mmol/l Ammoniumacetat (pH 7,0) und dem Laufmittel B 1 mol/l Kaliumdihydrogenphosphat (pH 4,0) zusammen. Die Elution der Peptide erfolgte durch Anlegen eines zweistufigen linearen Gradienten (0-10 min: 0% B, 10-50 min: 10% B, 50-125 min: 50% B). Es wurden 0,5 ml große Fraktionen gesammelt und die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt. Die Fraktionen wurden bei -20°C gelagert oder direkt in der zweiten HPLC-Dimension, der Reversed Phase-HPLC (RP- oder Umkehrphasen-HPLC) eingesetzt.

Hierfür wurden ausgewählte Fraktionen mit messbarer Radioaktivität über eine C<sub>18</sub>-Säule (Nucleosil 300-5 C18, 250 mm x 2 mm, Macherey-Nagel, Düren) aufgetrennt. Eluiert wurde mittels eines linearen Gradienten mit dem Laufmittel A 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure und Laufmittel B 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure, 84% (v/v) Acetonitril (0-5 min: 0% B, 5-125 min: 100% B). Die Flussrate betrug dabei 0,33 ml/min. Nach Bestimmung der Radioaktivität der Fraktionen wurde das Lösungsmittel unter Vakuum (SpeedVac) entfernt und die Proben zum Abklingen bei -20°C gelagert. Zur Fraktionierung wurden grundsätzlich silanisierte Gefäße verwendet, um Verluste durch Adsorbieren der Peptide und Phosphopeptide zu vermindern.

## 2.28 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Als Ergänzung der aufwendigen HPLC-Analyse wurde zur Aufreinigung von Phosphopeptiden aus rIRS-1<sup>449-664</sup> die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) angewendet. Dabei wurde das „Phosphopeptide Isolation Kit“ der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) verwendet. Das Anreichern von Phosphopeptiden beruht hierbei auf der spezifischen Bindung der Phosphorylgruppen an dreiwertig geladenen Gallium-Ionen, die am Säulenmaterial immobilisiert sind (nach Posewitz et al., 1999). Das Verfahren hat den Vorteil, dass im Vergleich zur HPLC-Auftrennung auf ein radioaktives Markieren der Probe verzichtet werden kann. Für eine Aufreinigung wurden 250 pmol rIRS-1<sup>449-664</sup> mit PKC- $\zeta$  umgesetzt und anschließend über Nacht durch Zugabe von Trypsin proteolytisch gespalten. Die tryptischen Fragmente wurden dann gemäß der Herstellerangaben über eine Ga<sup>3+</sup>-Säule aufgereinigt. Die von der Säule eluierten Phosphopeptide wurden mittels Vakuum (SpeedVac) vom Lösungsmittel getrennt und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -20°C gelagert.

## 2.29 Massenspektrometrische Analyse

Eluate aus der IMAC-Aufreinigung und Fraktionen aus der RP-HPLC mit messbarer Radioaktivität wurden nach Abklingen in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sabine Metzger (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf) massenspektrometrischen untersucht. Der Probeninhalt wurde mit einem Elektrospray Ionisations-Flugzeitmassenspektrometer QSTAR Pulsar I der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) ausgestattet mit einer Nanospray-Ionenquelle von Protana (Odense, Denmark) analysiert. Ausgewählte Peptide wurden durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS-Analyse) näher charakterisiert. Aus den MS/MS-Spektren wurden die Sequenz der Peptide und posttranslationale Modifikationen durch manuelle Interpretation der Spektren abgeleitet.

## 2.30 *In vitro* Phosphorylierungsreaktionen

### 2.30.1 Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch den Insulinrezeptor

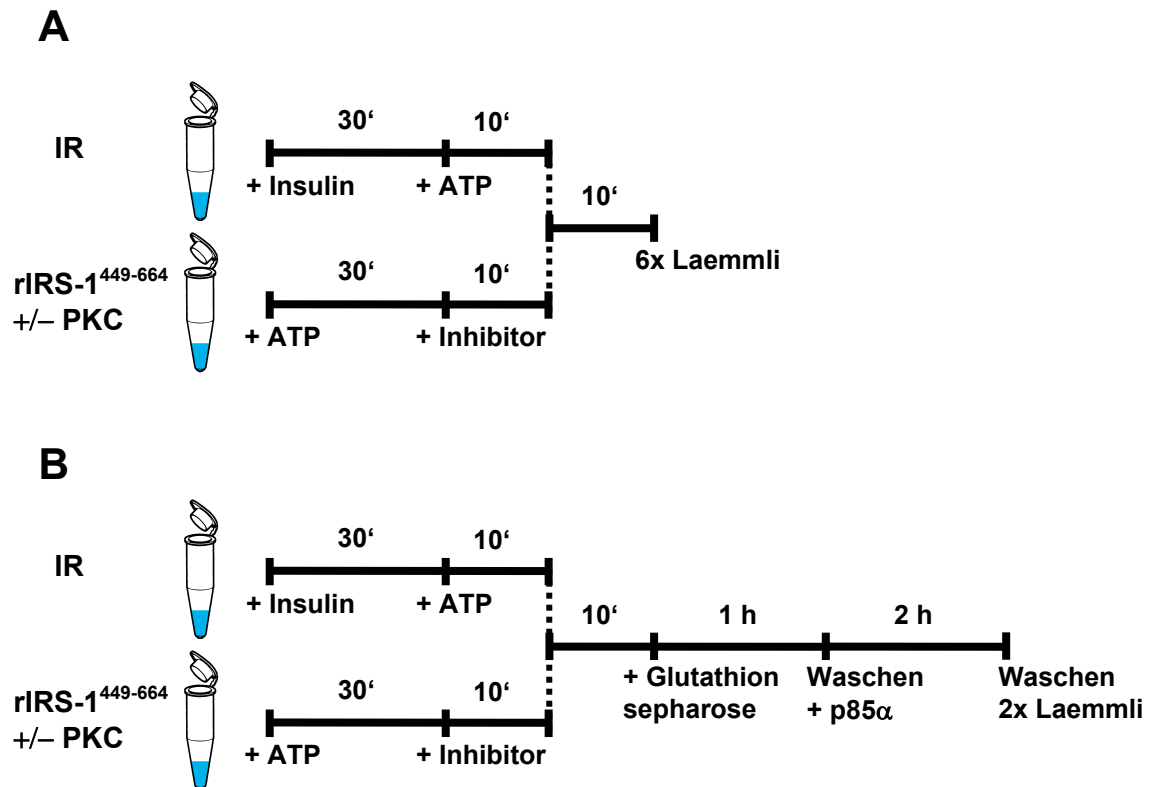
Bei dieser *in vitro* Phosphorylierung des rIRS-1<sup>449-664</sup>-Fusionsproteins durch den Insulinrezeptor betrug das Gesamtvolumen der Reaktion 50 µl. Jeweils 1–5 µg des WGA-gereinigten Insulinrezeptors in Phosphorylierungspuffer (20 mmol/l Hepes (pH 7,4); 1 mmol/l DTT; 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mg/ml BSA; 0,2 mmol/l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 50 µmol/l ATP; ± 1-5 µCi [<sup>32</sup>P]-ATP) wurden für 30 Minuten mit 100 nmol/l Insulin bei 30°C vorinkubiert. Für 10 weitere Minuten wurde nach Zugabe von ATP die Autophosphorylierung des Rezeptors initiiert. Parallel dazu wurde ein Ansatz ohne Insulin unter gleichen Bedingungen behandelt. Pro Ansatz wurden 25 µl in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Durch Zugabe von 1–5 µg Fusionsprotein in 25 µl Phosphorylierungspuffer mit ATP zu dem aktivierten Insulinrezeptor wurde die Substratphosphorylierung gestartet. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten durch Zugabe von 6x Laemmli gestoppt und für 5 Minuten gekocht. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE in 8–18%igen oder 10%igen Gelen aufgetrennt, entweder zur Immunodetektion auf Nitrocellulose transferiert oder mit Silber angefärbt und anschließend durch Autoradiographie mit dem FUJIX BAS 1000 Bioimage-System analysiert.

### 2.30.2 Serin/Threonin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die PKC

Ebenfalls wurde das Fusionsprotein rIRS-1<sup>449-664</sup> mit der Protein Kinase C *in vitro* inkubiert. Verwendet wurde ein Gemisch der Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$  aus dem Rattengehirn sowie die rekombinante humane Isoform  $\zeta$  (beide von Calbiochem, San Diego, USA). Jeweils 0,1–2  $\mu\text{g}$  PKC wurden in 20  $\mu\text{l}$  Phosphorylierungspuffer (20 mmol/l HEPES (pH 7,4); 1 mmol/l DTT; 10 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ ; 1,7 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ ; 0,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Phosphatidylserin; 50  $\mu\text{mol/l}$  ATP;  $\pm$  1-5  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP) zusammen mit 1  $\mu\text{g}$  rIRS-1<sup>449-664</sup> für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Gestartet wurde die Reaktion mit der Zugabe von ATP, gestoppt wurde mit 6x Laemmli und dann gekocht. Als Inhibitoren der PKC wurden Bisindolylmaleimid I bei den Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$  in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  und bei der Isoform  $\zeta$  ein Pseudosubstratpeptid in einer Konzentration von 400  $\mu\text{mol/l}$  eingesetzt.

### 2.30.3 Kombinierte Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup>

Um den Einfluss der PKC vermittelten Serin/Threonin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> auf dessen Funktion als Substrat für den Insulinrezeptor zu charakterisieren, wurde die im Folgenden beschriebene Reaktionsfolge verwendet, die eine Kombination der oben beschriebenen Reaktionen darstellt (2.30.1 und 2.30.2). Die Serin/Threonin-Phosphorylierung des Fusionsproteins rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die PKC und separat davon die Aktivierung des Insulinrezeptors wurden in zwei Reaktionsgefäßen mit einem Volumen von je 25  $\mu\text{l}$  gestartet und anschließend zusammengeführt. Je 0,5  $\mu\text{g}$  der PKC und 1  $\mu\text{g}$  Fusionsprotein wurden in Phosphorylierungspuffer vorgelegt. Die Reaktion wurde mit ATP gestartet und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Parallel dazu wurden 5  $\mu\text{g}$  WGA-gereinigter Insulinrezeptor mit oder ohne 100 nmol/l Insulin für 30 Minuten bei 30 °C vorinkubiert und durch Zugabe von ATP die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors für 10 Minuten gestartet. Nach dem Zusammenführen beider Reaktionen in ein Reaktionsgefäß wurde anschließend für 10 weitere Minuten inkubiert (s. Abb. 8 A). Die Reaktion wurde dann entweder durch Zugabe von 6x Laemmli und Kochen gestoppt oder auf Eis überführt, um in einem nachfolgenden GST-Pulldown Assay die Präzipitation von p85 $\alpha$  zu bestimmen (siehe 2.31).



**Abb. 8: Versuchsschema der kombinierten Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> (A), sowie der Erweiterung mit dem GST-Pulldown Assay zur Bestimmung der IRS-1-p85 $\alpha$ -Interaktion (B).**

### 2.30.4 Bestimmung des Phosphateinbaus

Die Menge der inkorporierten Radioaktivität nach Phosphorylierungsreaktionen wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung im Tritium-(<sup>3</sup>H) Fenster des  $\beta$ -Szintillationszählers ermittelt. Diese Messung beruht darauf, dass die Strahlung von  $\beta$ -Emittern mit einer Zerfallsenergie größer 0,5 MeV in Wasser Lichtblitze erzeugt, das sogenannte Cerenkov-Licht. Das in dieser Arbeit primär verwendete Isotop <sup>32</sup>P hat 80% seines Energiespektrums über diesem Schwellenwert und kann mit einer Effizienz von etwa 50% detektiert werden.

### 2.31 GST-Pulldown Assay

Im Anschluss an die kombinierte Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung wurde die Bindung von p85 $\alpha$  an rIRS-1<sup>449-664</sup> mittels eines GST-Pulldown Assays quantitativ erfasst. Dafür wurden 10  $\mu$ l Glutathion Sepharose 4B, äquiliibriert in



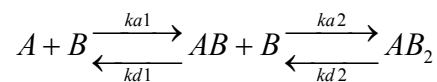
Phosphorylierungspuffer, je Reaktionsansatz hinzugegeben. Die Proben wurden dann 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit 1 ml Bindungspuffer (50 mmol/l Tris-HCl (pH 7,4); 150 mmol/l NaCl; 1% (v/v) NP-40; 1 mmol/l EDTA; 1 mmol/l NaF; 1 mmol/l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) je Reaktionsansatz gewaschen und für 5 min bei 4°C und 500 × g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde 0,5 µg p85α ohne GST-Anteil in 1 ml Bindungspuffer zugegeben und für 2 h im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde erneut 3 mal gewaschen, der Überstand abgenommen und durch 20 µl 2x Laemmli ersetzt. Die Proben wurden gekocht und durch SDS-PAGE und Immunodetektion analysiert (s. Abb. 8 B).

### 2.32 Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA)

Zur biomolekularen Interaktionsanalyse wurde das Gerät BIAcore X der Firma BIAcore AB (Uppsala, Schweden) verwendet. Die markierungsfreie Messung von Interaktionen zweier Bioanalyte in Echtzeit beruht hierbei auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR), einem quantenmechanischem Phänomen, das in Verbindung mit totaler Reflexion polarisierten Lichtes an der Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlicher optischer Dichte auftritt. Im BIAcore-System bilden das Glas des Sensorchips und ein dünner leitfähiger Goldfilm auf der Chipoberfläche diese Grenzfläche. Resonanzwechselwirkungen zwischen dem Licht und oszillierenden Elektronen (Plasmonen) im Metall verursachen ein Minimum in der Reflexionsintensität des Lichtes bei einem genau definierten Reflexionswinkel, dem so genannten Resonanzwinkel. Auf der unbeleuchteten Seite entsteht dabei ein evaneszentes Feld, welches abhängig von der verwendeten Wellenlänge einige nm in darunter liegende Schichten reicht. Durch Wechselwirkung von Materie mit dem evaneszenten Feld, beispielsweise verursacht durch Proteinanlagerungen, entsteht eine Änderung des Resonanzwinkels. Gemessen im Gerät wird die Änderung des Resonanzwinkels über die Zeit.

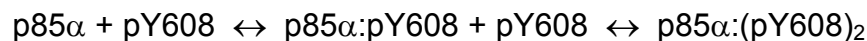
Analysiert werden sollte die Interaktion der regulatorischen Untereinheit p85α der PI 3-Kinase mit einem Peptid aus dem IRS-1, das die Aminosäuren 605–615 aus dem IRS-1 der Ratte repräsentiert. Das Peptid beinhaltet ein YMXM-Motiv, welches

hochspezifisch von den SH2-Domänen der p85 $\alpha$  gebunden wird (Felder et al. 1993, Ladbury et al., 1995). Der Einfluss verschiedener Phosphorylierungszustände des Peptids (Y608: DDGYMPMSPGV, pY608: DDGpYMPMSPGV, pS612: DDGYMPMpSPGV und pY608-pS612: DDGpYMPMpSPGV) auf die Interaktion mit p85 $\alpha$  sollte näher charakterisiert werden. Da die regulatorische Untereinheit der PI 3-Kinase sowohl eine N- als auch eine C-terminale SH2-Domäne besitzt, wurde eine zweistufige Reaktion gemäß folgender Gleichung angenommen:



(A = Analyt, B = Ligand, AB bzw AB<sub>2</sub> = Komplex aus Analyt und Ligand, k<sub>a</sub> = Assoziationsrate, k<sub>d</sub> = Dissoziationsrate)

oder auch beispielsweise



### 2.32.1 Immobilisierung der Peptide

Die verwendeten Peptide Y608, pY608, pS612 und pY608-p612 wurden mit einem Applied Biosystems Model 433 Peptidsynthesizer (Foster City, CA, USA) von Herrn Dr. Hoffmann im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf synthetisiert. Zur Immobilisierung der Peptide an einen Sensorchip CM5 (BIAcore AB, Uppsala, Schweden) wurde eine manuelle Standardaminkopplung nach Angaben des Geräteherstellers durchgeführt. Da der kalkulierte pI-Wert des Peptids Y608 (DDGYMPMSPGV) 3,56 beträgt und solche azide Liganden schwer durch Aminkopplung zu immobilisieren sind, wurden alle Peptide in einer Konzentration von 5 mg/ml in 100 mmol/l Borat (pH 8,5) gelöst. Zunächst wurde die Dextranmatrix des Sensorchips durch eine Modifikation der Carboxylgruppen mit einer Mischung aus 0,05 mol/l N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 0,2 mol/l N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) aktiviert. Daraufhin erfolgte eine manuelle Injektion der Peptide bei einer Flussrate von 1  $\mu$ l/min, bis eine Erhöhung der gemessenen Resonanzeinheiten (RU) um 20–100 erreicht war (1000

RU entsprechen 1 ng/mm<sup>2</sup> Sensoroberfläche). Im Anschluss wurden verbleibende aktivierte funktionelle Gruppen der Dextranmatrix durch Injektion von 1 mol/l Ethanolamin deaktiviert.

### 2.32.2 Bindungsanalyse

Zur Charakterisierung der p85 $\alpha$ -Peptid-Interaktionen wurde p85 $\alpha$  in Konzentrationen von 1–500 nmol/l in Laufpuffer (10 mmol/l HEPES (pH 7,4); 150 mmol/l NaCl; 3 mmol/l EDTA; 0,005% (v/v) Surfactant P20; von BIAcore AB, Uppsala, Schweden) aufgenommen und bei einer Flussrate von 5 - 25  $\mu$ l/min und einer Temperatur von 25°C in das BIAcore X injiziert. Nach einer Assoziation von 500 s an die auf dem Sensorchip CM5 immobilisierten Peptide erfolgte eine eben so lange Dissoziation, wobei die Probenlösung durch den Laufpuffer ersetzt wurde. Anschließend wurden gebundene Proteine durch eine 2 min Injektion von Regenerationslösung (6 mol/l Guanidiniumchlorid) von der Sensorchipoberfläche entfernt, wodurch die Ausgangsbasislinie wieder erreicht wurde. Die Auswertung erfolgte über die BIAevaluation Software Version 3.0 (BIAcore AB, Uppsala, Schweden).

### 2.32.3 Kompetitionsstudien

Zur Bestimmung der relativen Affinitäten (IC<sub>50</sub>) der Phosphopeptide pY608 und pY608-pS612 zu p85 $\alpha$  wurden Kompetitionsstudien durchgeführt (nach Vely et al., 2000). Dafür wurde eine konstante Konzentration von p85 $\alpha$  (100 nmol/l) in Laufpuffer mit variablen Konzentrationen eines kompetitierenden Phosphopeptids (0,05–10  $\mu$ mol/l) inkubiert, das identisch mit dem auf dem CM5 Sensorchipoberfläche immobilisierten war. Nach einer 1 h Vorinkubation bei Raumtemperatur wurden die verschiedenen Mixturen in einer zufälligen Reihenfolge bei einer Flussrate von 5  $\mu$ l/min bei 25°C injiziert. Die halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>) der Peptide wurden mit Hilfe der Programme BIAevaluation 3.1 und GraphPad Prism 4.0 (San Diego, CA, USA) durch Auftragen des SPR-Signals 440 s nach Injektion im Bereich des Äquilibrium gegen die eingesetzte Peptidkonzentration ermittelt.

### **2.33 Auswertung der Daten und Statistik**

Die Daten wurden grundsätzlich als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardabweichung der Mittelwerte) von jeweils mehreren unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen erfolgte nach dem t-Test nach Student für gepaarte bzw. ungepaarte Daten, dabei wurde das Computerprogramm „t-ease“ (ISI, Philadelphia, USA) verwendet. Die Signifikanzgrenze wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt. Die Quantifizierung und Auswertung der Autoradiogramme wurde mit Hilfe des FUJIX BAS 1000 Bioimage-Systems und dem Programm PCBAS Tina 2.09g (Fuji, Tokio, Japan) durchgeführt. Die Quantifizierung der durch ECL immunodetektierten Proteine wurde mit dem Programm LumiAnalyst 3.0 des Lumilmagers (Roche, Mannheim) analysiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

##### 3.1.1 Aufreinigung des GST-Fusionsproteins rIRS-1<sup>449-664</sup>

Für *in vitro* Untersuchungen der Protein-Protein-Interaktionen des IRS-1, dem Einfluss der Serin/Threonin-Phosphorylierung von IRS-1 auf diese Interaktionen sowie dessen Funktion als Substrat des Insulinrezeptors wurde ein rekombinantes IRS-1-Protein mit dem Glutathion-S-transferase-(GST)-Expressionssystem hergestellt. Das GST-Expressionssystem ermöglicht die Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *Escherichia coli*. Die pGEX-Vektoren dieses Systems sind konstruiert für eine induzierbare, hohe Expression von Genen oder Genfragmenten in Fusion mit GST. Die Glutathion-S-transferase aus *Schistosoma japonicum* ist ein 26 kDa Protein und bindet das Tripeptid Glutathion mit sehr hoher Affinität, wodurch die Fusionsproteine affinitätschromatographisch mit an einer Säule kovalent gebundenem Glutathion aufgereinigt werden können. Zusätzlich befindet sich in den pGEX-Expressionsvektoren zwischen GST und der Multiplen Klonierungsstelle (MCS) ein Sequenzabschnitt, der für die Erkennungssequenz von spezifischen Proteasen kodiert und somit eine gezielte Abspaltung des GST-Anteils vom Fusionsprotein ermöglicht.

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pGEX-5X-3 mit einer ausgewählten Sequenz von IRS-1 wurde von Herrn Dr. Zhihua Ran (DDFI) durch das Einklonieren von cDNA aus Kardiomyozyten der Ratte (*Rattus norvegicus*) hergestellt. Die einklonierte DNA-Sequenz kodiert für die IRS-1 Aminosäuren 449–664 und stammt aus dem mittleren Bereich des IRS-1, welcher maßgeblich über die Tyrosine 608 und 628 an der Interaktion mit der in der Insulinsignaltransduktion nachgeschalteten PI 3-Kinase beteiligt ist (Esposito et al., 2001). Die IRS-1-DNA wurde über Sal I- und Not I-Schnittstellen in die MCS des Expressionsvektors einkloniert und auf Richtigkeit per Sequenzierung durch die Firma Qiagen (Hilden) verifiziert (Daten nicht gezeigt). Das resultierende in *E. coli* exprimierte GST-Fusionsprotein wurde als rIRS-1<sup>449-664</sup> bezeichnet. Die Sequenz von 456 Aminosäuren ist in Abbildung 9 dargestellt. Das Fusionsprotein setzt sich aus 236 Aminosäuren der Glutathion-S-transferase und der einklonierten IRS-1 Sequenz zusammen. Das rechnerische Molekulargewicht beträgt

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

##### 3.1.1 Aufreinigung des GST-Fusionsproteins rIRS-1<sup>449-664</sup>

Für *in vitro* Untersuchungen der Protein-Protein-Interaktionen des IRS-1, dem Einfluss der Serin/Threonin-Phosphorylierung von IRS-1 auf diese Interaktionen sowie dessen Funktion als Substrat des Insulinrezeptors wurde ein rekombinantes IRS-1-Protein mit dem Glutathion-S-transferase-(GST)-Expressionssystem hergestellt. Das GST-Expressionssystem ermöglicht die Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *Escherichia coli*. Die pGEX-Vektoren dieses Systems sind konstruiert für eine induzierbare, hohe Expression von Genen oder Genfragmenten in Fusion mit GST. Die Glutathion-S-transferase aus *Schistosoma japonicum* ist ein 26 kDa Protein und bindet das Tripeptid Glutathion mit sehr hoher Affinität, wodurch die Fusionsproteine affinitätschromatographisch mit an einer Säule kovalent gebundenem Glutathion aufgereinigt werden können. Zusätzlich befindet sich in den pGEX-Expressionsvektoren zwischen GST und der Multiplen Klonierungsstelle (MCS) ein Sequenzabschnitt, der für die Erkennungssequenz von spezifischen Proteasen kodiert und somit eine gezielte Abspaltung des GST-Anteils vom Fusionsprotein ermöglicht.

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pGEX-5X-3 mit einer ausgewählten Sequenz von IRS-1 wurde von Herrn Dr. Zhihua Ran (DDFI) durch das Einklonieren von cDNA aus Kardiomyozyten der Ratte (*Rattus norvegicus*) hergestellt. Die einklonierte DNA-Sequenz kodiert für die IRS-1 Aminosäuren 449–664 und stammt aus dem mittleren Bereich des IRS-1, welcher maßgeblich über die Tyrosine 608 und 628 an der Interaktion mit der in der Insulinsignaltransduktion nachgeschalteten PI 3-Kinase beteiligt ist (Esposito et al., 2001). Die IRS-1-DNA wurde über Sal I- und Not I-Schnittstellen in die MCS des Expressionsvektors einkloniert und auf Richtigkeit per Sequenzierung durch die Firma Qiagen (Hilden) verifiziert (Daten nicht gezeigt). Das resultierende in *E. coli* exprimierte GST-Fusionsprotein wurde als rIRS-1<sup>449-664</sup> bezeichnet. Die Sequenz von 456 Aminosäuren ist in Abbildung 9 dargestellt. Das Fusionsprotein setzt sich aus 236 Aminosäuren der Glutathion-S-transferase und der einklonierten IRS-1 Sequenz zusammen. Das rechnerische Molekulargewicht beträgt

51,2 kDa. Die in dieser Arbeit bezifferten Aminosäuren aus dem IRS-1 Teil von rIRS-1<sup>449-664</sup> werden im Folgenden primär anhand ihrer Position im nativen IRS-1 bezeichnet, beispielsweise Serin 612 statt aus der Fusionssequenz abgeleitet Serin 400.

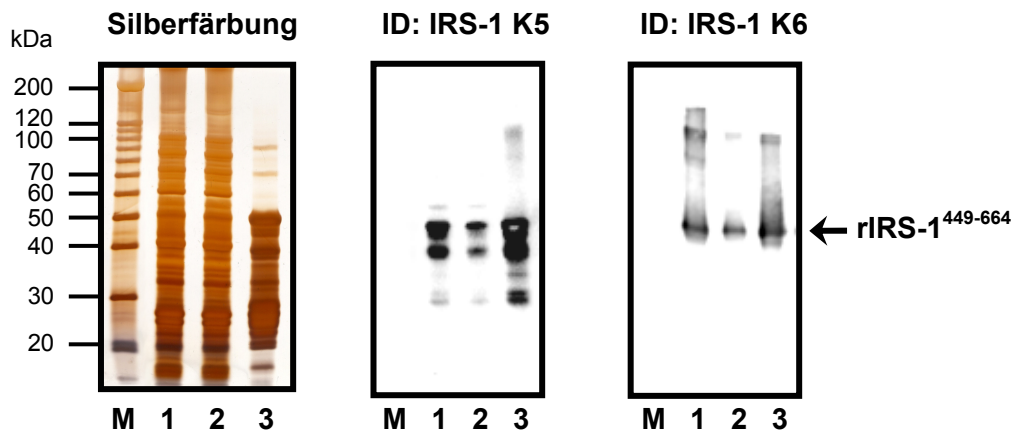
```

1      MSPILGYWKI KGLVQPTRLL LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID
61     GDVKLTQSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV
121    DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPKLVCFK
181    KRIEAIPOID KYLKSSKYIA WPLQGQWQATF GGGDHPPKSD LIEGRGIPRN SRVDHTPPAR
241    GEEELSNYIC MGGKGASTLT APNGHYILSR GGNGHRYIPG ATMGTSPALT GDEAAGAADL
301    DNRFRKRTHS AGTSPTISHQ KTPSQSSVVS IEEYTEMMPA AYPPGGGSGG RLPGYRHSFAF
361    VPTHSYPEEG LEMHHLERRG GHHRPDSSNL HTDDGYMPMS PGVAPVPSNR KGNGDYMPMS
421    PKSVSAPQOI INPIRRHPQR VDPNGYMMMS PSAAS

```

**Abb. 9: Aminosäuresequenz des GST-Fusionsproteins rIRS-1<sup>449-664</sup>.** Der grau hinterlegte Sequenzabschnitt gibt die Aminosäuren der Glutathion-S-transferase wieder (AS 1-236), die restliche Sequenz besteht aus den Aminosäuren 449-664 des IRS-1 aus *Rattus norvegicus*. Fett hervorgehoben sind die Aminosäuren, welche durch den Expressionsvektor pGEX-5X-3 und die gewählte Klonierungsstrategie bei der Herstellung dieses Konstruktes bedingt sind. Das Protein umfasst 456 Aminosäuren und hat ein rechnerisches Molekulargewicht von 51,2 kDa.

Die Aufreinigung von rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit von Sommerfeld (DDFI) etabliert. Zur Vermeidung einer Akkumulation der überexprimierten Proteine im Cytoplasma der Bakterien zu so genannten Einschlusskörperchen wurde die Expression in einem selektiven 2x YTA-Medium bei einer Temperatur von 30°C mit 0,1 mmol/l IPTG für 2 h induziert. Zusätzlich wurde der Protease defiziente *E. coli*-Stamm BL21 Codon Plus-RP (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet, der zudem ein Plasmid enthält, welches die in *E. coli* seltenen tRNAs für die Arginin-Codons AGA/AGG und das Prolin-Codon CCC kodiert. Ein Mangel an diesen tRNAs kann sonst in *E. coli* bei der Translation der einklonierten eukaryotischen IRS-1-Sequenz limitierend sein. In Abbildung 10 ist das Ergebnis einer Aufreinigung von rIRS-1<sup>449-664</sup> dargestellt. Es wurden im Mittel  $1,78 \pm 0,31$  mg/ml rIRS-1<sup>449-664</sup>-Protein auf diese Weise gewonnen (n = 17).

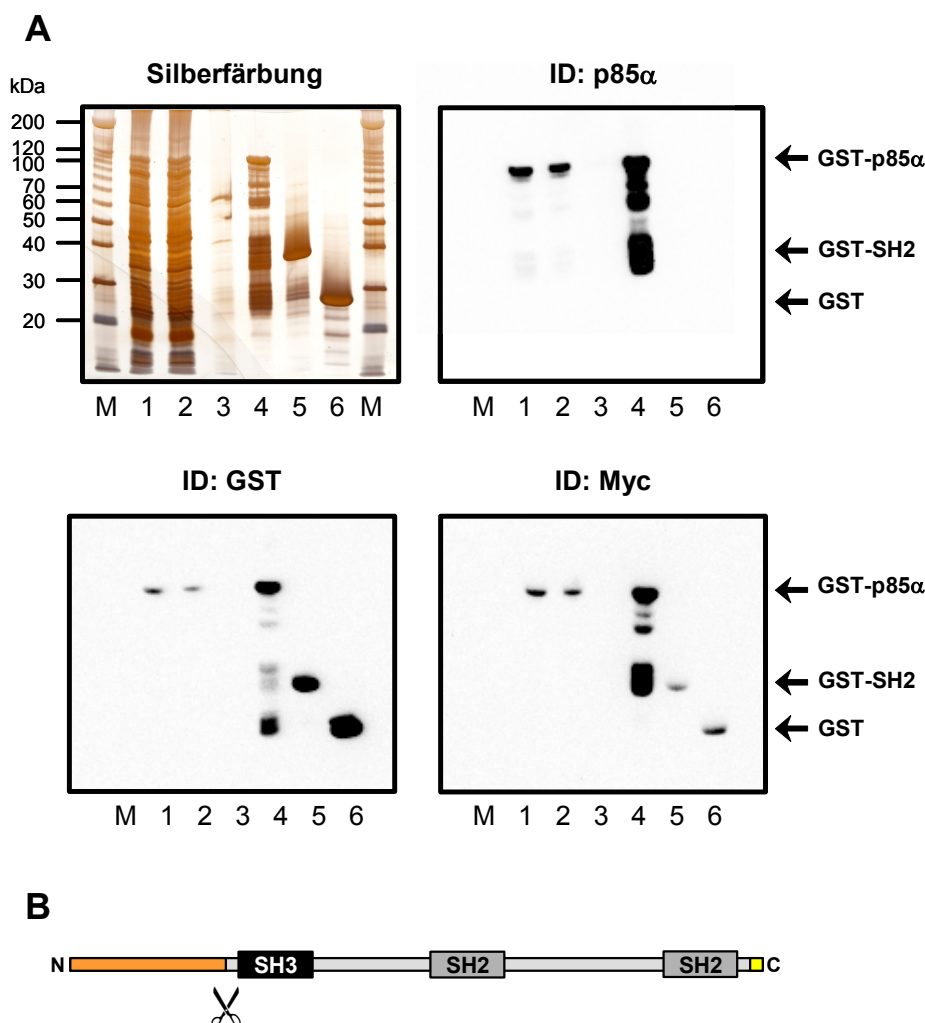


**Abb. 10: Aufreinigung von rIRS-1<sup>449-664</sup> aus *E. coli*.** Mit dem Expressionsvektor pGEX-5X-3-rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde *E. coli* transformiert und in 2x YTA-Medium bis zum exponentiellen Wachstum angezogen. Die Expression des GST-Fusionsproteins rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde dann durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Nach 2 h wurden die Zellen aufgeschossen und das Lysat auf eine Glutathion Sepharose 4B-Säule gegeben. Das an die Sepharose gebundene Fusionsprotein wurde mit 10 mM Glutathion in 50 mM Tris (pH 8,0) eluiert und die Proteine nach SDS-PAGE durch Silberfärbung und Immunodetektion mit zwei Antisera gegen IRS-1 (K5 und K6) analysiert (1 µg Protein je Spur, M: Marker, 1: *E. coli*-Lysat, 2: Durchfluss der Glutathion Sepharose-Säule, 3: Eluat).

### 3.1.2 Aufreinigung von GST-p85 $\alpha$

Für die Charakterisierung der Protein-Protein-Interaktion zwischen IRS-1 und der PI 3-Kinase wurde aus *E. coli* aufgereinigtes rekombinantes p85 $\alpha$  verwendet. Das Expressionsplasmid pGEX-2T mit der Sequenz der regulatorischen Untereinheit p85 $\alpha$  der PI 3-Kinase aus *Bos taurus* wurde freundlicherweise von Dr. Peter Shephard (London, UK) zur Verfügung gestellt. Nach der Transformation von BL21 Codon Plus-RP mit diesem Plasmid wurde das p85 $\alpha$  unter denselben Bedingungen wie bei rIRS-1<sup>449-664</sup> (3.1.1) exprimiert und aufgereinigt. Das resultierende GST-Fusionsprotein hat im SDS-Gel ein apparentes Molekulargewicht von 110 kDa und ist mit Antisera gegen p85 $\alpha$ , GST und Myc immunodetektierbar (Abb. 11 A). Im p85 $\alpha$ -Anteil sind neben einer N- und C-terminalen SH2-Domäne, eine SH3-Domäne sowie am C-Terminus ein Myc-Tag vorhanden. Durch den Expressionsvektor bedingt besitzt das Fusionsprotein zwischen GST und p85 $\alpha$  eine Schnittstelle der Protease  $\alpha$ -Thrombin (Abb. 11 B).



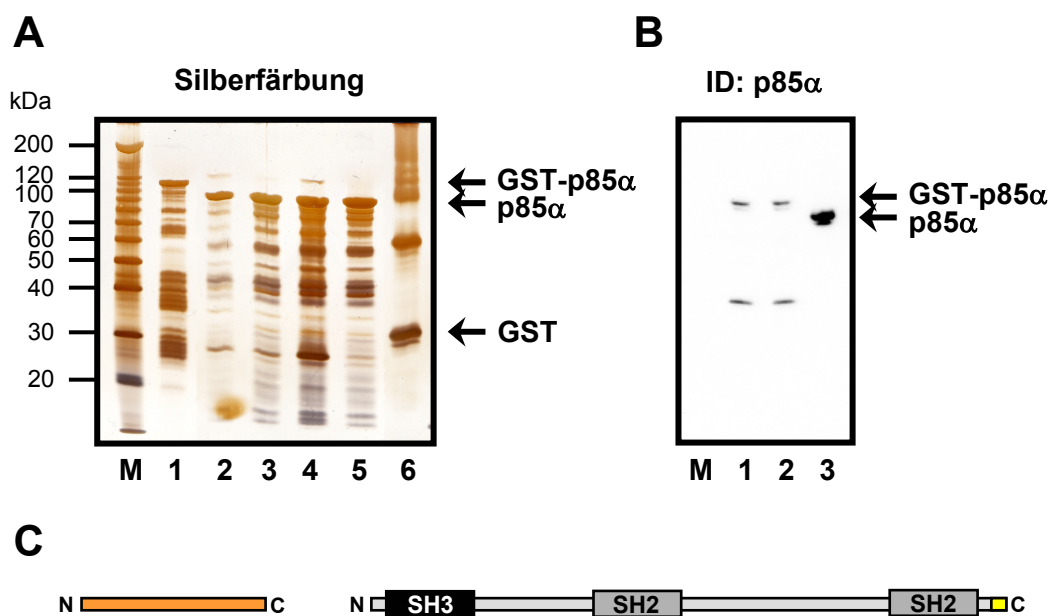


**Abb. 11: Aufreinigung von GST-p85 $\alpha$  aus *E. coli*.** (A) Silberfärbung und Immunodetektion einer Aufreinigung von GST-p85 $\alpha$  aus *E. coli* (1  $\mu$ g Protein je Spur, M: Marker, 1: *E. coli*-Lysat, 2: Durchfluss der Glutathion Sepharose-Säule, 3: Waschschrift der Säule, 4: Eluat, 5: GST-SH2 (c-terminale p85 $\alpha$ -SH2 Domäne in Fusion mit GST von Upstate Inc.), 6: GST). (B) Schematische Darstellung des GST-p85 $\alpha$ -Fusionsproteins, die Schere symbolisiert die Möglichkeit und den Ort der proteolytischen Spaltung von GST und p85 $\alpha$  (orange: GST, grau: p85 $\alpha$ , gelb: Myc-Tag).

### 3.1.3 Proteolytische Spaltung von GST-p85 $\alpha$

Da die Glutathion-S-transferase dimerisieren kann, war es für die geplanten Interaktionsstudien notwendig, den GST-Anteil vom GST-p85 $\alpha$ -Fusionsprotein proteolytisch zu entfernen. Dafür wurde das aufgereinigte Fusionsprotein mit der Protease  $\alpha$ -Thrombin im Verhältnis 1 U Protease pro mg Fusionsprotein für 1–16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ergebnis einer solchen Reaktion ist in Abbildung 12 A zu sehen. Nach 1–2 h konnte unter den gewählten Bedingungen bereits eine ausreichende Proteolyse beobachtet werden. In nachfolgenden Aufreinigungen wurde daher durch eine Variation des Protokolls das an die Glutathion-Säule

gebundene GST-p85 $\alpha$  nicht durch die Zugabe von Glutathion eluiert, sondern mit Thrombin proteolytisch gespalten. Dafür wurde nach dem Waschen der Säule die Protease in PBS auf die Säule gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das abgespaltene p85 $\alpha$  wurde im Eluat gesammelt und das ebenfalls im Eluat enthaltene  $\alpha$ -Thrombin durch Zugabe von Proteasehemmern inhibiert. In Abbildung 12 B ist das Ergebnis einer solchen Kombination aus Proteinaufreinigung und Proteolyse nach einer Immunodetektion gegen p85 $\alpha$  dargestellt. Die so modifizierte Aufreinigung resultierte im Mittel in  $0,34 \pm 0,12$  mg/ml p85 $\alpha$  ( $n = 8$ ). Das um den GST-Anteil reduzierte p85 $\alpha$  hat im Gel ein apparentes Molekulargewicht von 90 kDa (Abb. 12 A).

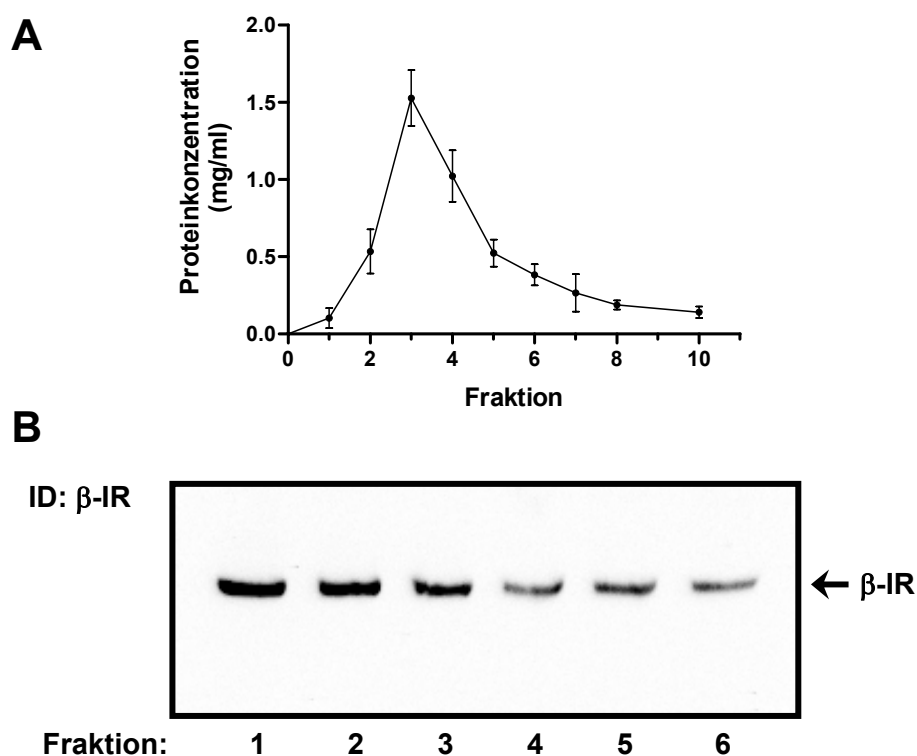


**Abb. 12: Proteolytische Spaltung von GST-p85 $\alpha$ .** (A) GST-p85 $\alpha$  wurde für 1–16 h mit  $\alpha$ -Thrombin bei Raumtemperatur inkubiert und dann nach Zugabe von Laemmli-Puffer gekocht. Die Proteine wurden im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silber angefärbt (Spur M: Marker, 1: GST-p85 $\alpha$ , 2: Inkubation von GST-p85 $\alpha$  mit Thrombin über 1 h, 3: 2 h, 4: 3 h, 5: 4 h, 6: GST). (B) Immunodetektion einer Aufreinigung von p85 $\alpha$  aus *E. coli*. Das an der Glutathion Sepharose-Säule gebundene GST-p85 $\alpha$  wurde durch eine 2 h Inkubation mit  $\alpha$ -Thrombin bei Raumtemperatur gespalten und im Eluat aufgefangen (1  $\mu$ g Protein je Spur, M: Marker, 1: Lysat, 2: Durchfluss, 3: Eluat nach Proteolyse = p85 $\alpha$ ). (C) Schematische Darstellung des gespaltenen GST-Fusionsproteins (orange: GST, grau: p85 $\alpha$ , gelb: Myc-Tag).

### 3.2 Aufreinigung des Insulinrezeptors

Für nachfolgende *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen wurde der Insulinrezeptor nach Burant et al. (1984) partiell aus der Leber von Ratten aufgereinigt. Nach der

mechanischen Homogenisation der Leber und Zentrifugation wurde der  $100.000 \times g$  Überstand auf eine Säule mit immobilisiertem Weizenkeimagglutinin (WGA) gegeben. Weizenkeimagglutinin ist ein Lektin, das mit hoher Affinität glykosylierte Membranproteine bindet. Nach ausgiebigem Waschen wurden die an das Lektin der Säule gebundenen Glykoproteine mit N-Acetylglucosamin eluiert. Die partielle Aufreinigung des Insulinrezeptors aus jeweils 5 g Rattenleber mittels Affinitätschromatographie über die WGA-Säule erbrachte durchschnittlich in Fraktion 3 mit  $1,53 \pm 0,18$  mg/ml ( $n = 15$ ) die höchsten Konzentrationen an Glykoproteinen (Abb. 13 A). Das Vorhandensein des Insulinrezeptors und dessen Funktionalität in den Eluaten wurde per Immunodetektion der  $\beta$ -Untereinheit (Abb. 13 B) und über Phosphorylierungsreaktionen überprüft. In den nachfolgenden Phosphorylierungsreaktionen wurde jeweils die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration verwendet. Die Eluate wurden nicht länger als 4 Wochen verwendet, da nach dieser Zeitspanne ein Ansteigen der basalen Aktivität und damit ein geringerer Insulineffekt des Insulinrezeptors beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt).

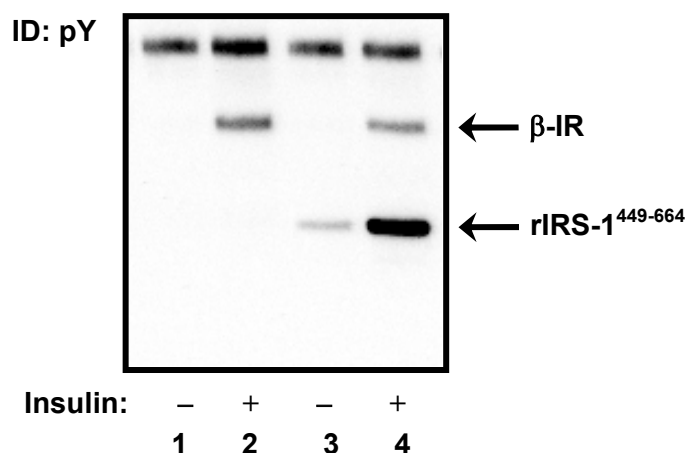


**Abb. 13: WGA-Aufreinigung des Insulinrezeptors.** (A) Zur Elution der an der WGA-Agarose gebundenen G-Proteine des  $100.000 \times g$ -Überstandes aus 5 g Rattenleber wurde  $0,3$  mol/l N-Acetylglucosamin auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde in  $0,5$  ml großen Fraktionen gesammelt und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 15$ ). (B) Das Vorhandensein des Insulinrezeptors in den Fraktionen wurde durch Immunodetektion der  $\beta$ -Untereinheit nach SDS-PAGE von  $2$   $\mu$ g Protein je Spur und Transfer auf Nitrocellulose überprüft.

### 3.3 Phosphorylierungen

#### 3.3.1 Tyrosin-Phosphorylierung durch den Insulinrezeptor

Das IRS-1 war das erste identifizierte Substrat des Insulinrezeptors und wird nach einem Insulinstimulus durch den Transfer von Phosphorylgruppen auf Tyrosine in YMXM oder YXXM-Motiven modifiziert. Das IRS-1 fungiert dann als Adaptorprotein, das durch die Tyrosin-Phosphorylierung SH2-Domänen enthaltende Proteine wie die PI 3-Kinase, GRB-2, NCK, SHP-2 sowie andere bindet und zum Teil aktiviert (White, 2002). Das rekombinant hergestellte Fusionsprotein rIRS-1<sup>449-664</sup> mit den IRS-1 Aminosäuren 449–664 enthält 6 potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen und wurde bereits als funktionelles *in vitro* Substrat des Insulinrezeptors beschrieben und charakterisiert (Sommerfeld, Diplomarbeit am DDFI, 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die *in vitro* Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch Variation des Phosphorylierungspuffers optimiert werden. Ziel war es, eine Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung zu erreichen und eine Inkubation mit ausgewählten Serin/Threonin-Kinasen ohne Wechsel des Puffers durchführen zu können. Mit unterschiedlich zusammengesetzten Phosphorylierungspuffern wurden daher 5 µg WGA-Glykoproteine bei einer Temperatur von 30°C für 30 min mit oder ohne 100 nmol/l Insulin vorinkubiert. Die Autophosphorylierung und damit Aktivierung der Rezeptorkinase wurde dann für 10 min durch Addition von ATP initiiert. Nachfolgend wurde je Ansatz 1 µg des Substrates rIRS-1<sup>449-664</sup> hinzu gegeben. Nach 10 min wurde dann die Reaktion mit 6x Laemmli-Puffer und durch Kochen gestoppt. Die Proteine wurden in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran wurde das Ausmaß der Tyrosin-Phosphorylierung mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin durch Immunodetektion quantitativ erfasst. In Abbildung 14 ist das Ergebnis einer Phosphorylierungsreaktion mit dem in dieser Arbeit verwendeten Puffer dargestellt. Durch die Veränderung des Phosphorylierungspuffers wurden eine gesteigerte Insulinstimulierbarkeit des Insulinrezeptors und auch eine gesteigerte Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> erreicht. Zuvor wurde für die Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch den Insulinrezeptor nach Insulinstimulus eine Zunahme um das 2fache beschrieben (Sommerfeld, 1999), nun wurde ein Vielfaches dessen beobachtet (s. Abb. 15 B).

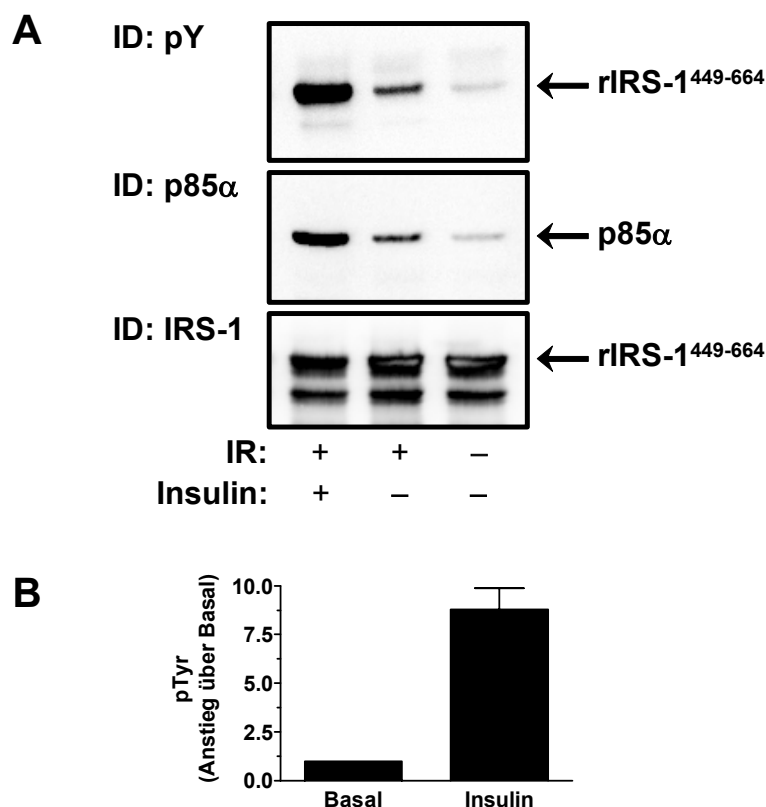


**Abb. 14: Insulinstimulierte *in vitro* Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch den Insulinrezeptor.** 5  $\mu$ g Glykoprotein aus der WGA-Aufreinigung wurden mit oder ohne 100 nM Insulin bei 30°C für 30 min vorkubiert, dann wurde über 10 min durch Zugabe von ATP die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors initiiert. Je Ansatz wurde anschließend 1  $\mu$ g rIRS-1<sup>449-664</sup> dem Rezeptor als Substrat angeboten. Nach 10 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von Laemmli-Puffer und Kochen gestoppt. Die Proteine wurden nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und das Ausmaß der Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> unter Verwendung eines gegen Phosphotyrosin gerichteten Antikörpers immunodetektiert. Dargestellt ist das Ergebnis einer repräsentativen Phosphorylierungsreaktion (Spur 1 & 2: nur IR, 3 & 4: IR + rIRS-1<sup>449-664</sup>).

### 3.3.2 GST-Pulldown Assay

Um die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen IRS-1 und PI 3-Kinase unter *in vitro* Bedingungen zu charakterisieren, wurde ein GST-Pulldown Assay etabliert. Auf Grund des GST-Anteils des Fusionsproteins rIRS-1<sup>449-664</sup> sollte mit Hilfe von Glutathion Sepharose 4B das Protein präzipitiert und anschließend durch Zugabe von p85 $\alpha$  die Bindung der PI 3-Kinase an rIRS-1<sup>449-664</sup> bestimmt werden. Wie zuvor beschrieben (3.3.1) wurde daher die Inkubation von rIRS-1<sup>449-664</sup> mit dem Insulinrezeptor nach einer 10 min Substratphosphorylierung nicht mit Laemmli-Puffer gestoppt, sondern die Reaktionsgefäße auf Eis überführt und dann je Ansatz 10  $\mu$ l Glutathion Sepharose 4B in ausreichend Puffer zugegeben. Die Bindung von rIRS-1<sup>449-664</sup> an die Sepharose erfolgte für 1 h bei 4°C, anschließend wurde mit eiskaltem Bindungspuffer ausgiebig gewaschen und 0,5  $\mu$ g rekombinantes p85 $\alpha$  ohne GST-Anteil hinzu gegeben. Nach einer Inkubation über 2 h wurde die Sepharose wiederum ausgiebig gewaschen und die an der Sepharose verbliebenen Proteine mit 2x Laemmli-Puffer und Kochen eluiert. Die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde wie zuvor beschrieben durch Immunodetektion erfasst, die Bindung von p85 $\alpha$  nach dem Entfernen der Phosphotyrosin-Antikörper durch Strippen der Membran und erneuter Immunodetektion. Die Auswertung der Signale erfolgte mit

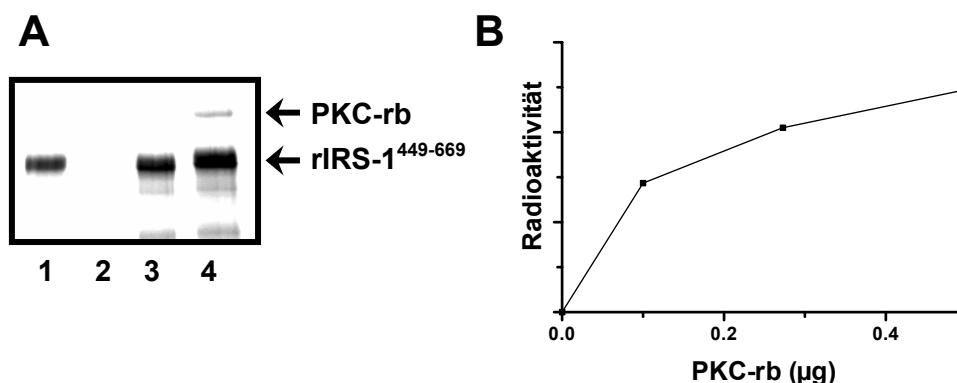
der Lumilmager Software. In Abbildung 15 A ist das Ergebnis eines repräsentativen Pulldown Assays zusammengefasst. Aus dem Blot mit Detektion gegen IRS-1 wird deutlich, dass vergleichbare Mengen an rIRS-1<sup>449-664</sup> aus jedem Ansatz mit der Sepharose präzipitiert wurden. Die bereits zuvor gezeigte insulinstimulierte Zunahme der Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch den Insulinrezeptor wurde auch nach der Präzipitation im gleichen Maße detektiert. Die Quantifizierung der Signalzunahme nach Stimulation mit Insulin über Basal ergab im Mittel  $8,8 \pm 1,1$  aus 9 separaten Experimenten (Abb. 15 B). Ebenso konnte eine deutlich Insulin-abhängige Bindung von p85 $\alpha$  an rIRS-1<sup>449-664</sup> gezeigt werden. Meist wurde nach der basalen Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> nahezu kein gebundenes p85 $\alpha$  im Blot detektiert (Daten nicht gezeigt), daher wurde auf eine quantitative Erfassung der Zunahme nach Insulin verzichtet.



**Abb. 15: Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> und Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit p85 $\alpha$  der PI 3-Kinase. (A)** 5  $\mu$ g IR wurde nach einer 30 min Vorinkubation mit oder ohne 100 nM Insulin für 10 min bei 30°C durch Zugabe von ATP autophosphoryliert. Die Substratphosphorylierung wurde anschließend durch die Addition von 1  $\mu$ g rIRS-1<sup>449-664</sup> initiiert. Nach 10 min wurde Glutathion Sepharose 4B zugegeben und die Proben bei 4 °C für 1 h auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde dreimal mit Bindungspuffer gewaschen, dann wurde 0,5  $\mu$ g rekombinantes p85 $\alpha$  hinzu gegeben und erneut für 2 h im Überkopfschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde das an der Sepharose gebundene Protein mit 2x Laemmli-Puffer eluiert und für 5 min gekocht. Die Proteine wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulose mit Antiseren gegen Phosphotyrosin, p85 $\alpha$  und IRS-1 immunodetektiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes. **(B)** Die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde mit Hilfe der Lumilmager Software quantifiziert und ist hier als Anstieg über den normierten Basalwert aufgeführt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM aus 10 separaten Experimenten.

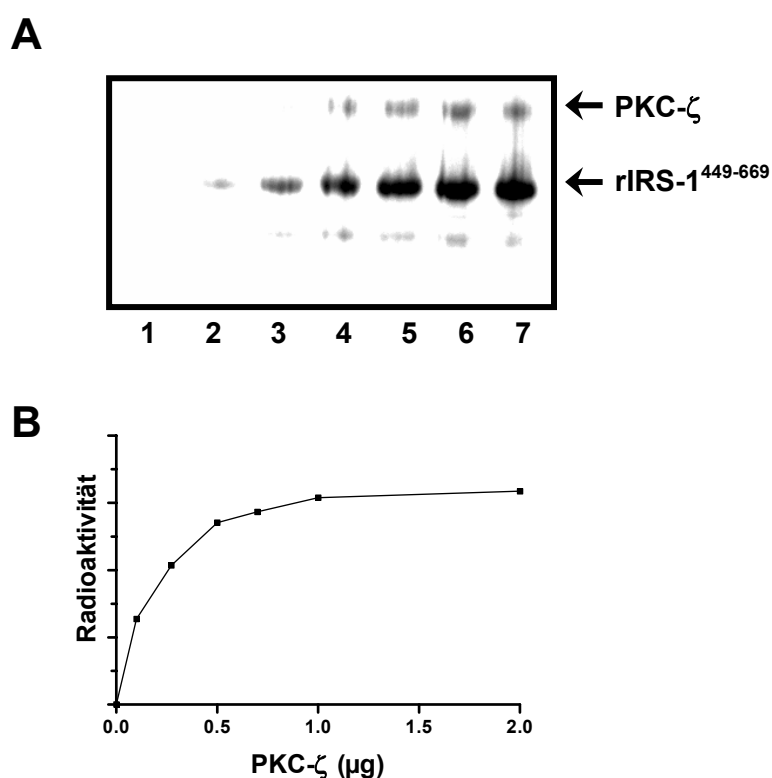
### 3.3.3 Serin/Threonin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die PKC

Für eine Vielzahl von Serin/Threonin-Kinasen wird in der Literatur beschrieben, dass sie das IRS-1 *in vitro* und zum Teil auch *in vivo* phosphorylieren können. Dies gilt für die MAP-Kinase, die Casein Kinase II, die PKC- $\zeta$ , mTOR, die IKK $\beta$  und die GSK-3 (De Fea et al., 1997B, Tanasijevic et al., 1993; Liu et al., 2001; Ravichandran et al., 2001; Gao et al., 2002; Eldar-Finkelmann et al., 1997). Deshalb wurde geprüft, ob die Protein Kinase C und insbesondere die Isoform  $\zeta$  das Fusionsprotein rIRS-1<sup>449-664</sup> mit den IRS-1 Aminosäuren 449–664 *in vitro* modifizieren kann. Dafür wurde je 1  $\mu\text{g}$  rIRS-1<sup>449-664</sup> mit unterschiedlichen Mengen der PKC aus dem Rattengehirn, welche die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$  umfasst, sowie mit der atypischen Isoform  $\zeta$  unter Verwendung von radioaktiv markiertem ATP für 30 min bei 30°C inkubiert. Zur Überprüfung der Spezifität der Reaktion wurden die Kinasen mit Bisindolylmaleimid I (BIM) gehemmt. Das Ergebnis wurde nach SDS-PAGE mit Hilfe der Autoradiographie analysiert. Repräsentative Ergebnisse sind in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt.



**Abb. 16: rIRS-1<sup>449-664</sup> ist ein Substrat der aus dem Rattengehirn aufgereinigten PKC Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$  (PKC-rb).** (A) Je 1  $\mu\text{g}$  rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde mit variabler Enzymmenge von PKC-rb für 30 min bei 30°C inkubiert, in einem Kontrollansatz wurde die Kinase mit 1  $\mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid I (BIM) gehemmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Laemmli-Puffer und Kochen gestoppt, die Proteine wurden dann per SDS-PAGE aufgetrennt. Das mit Silber gefärbte Gel wurde getrocknet und per Autoradiographie ausgewertet (Spur 1: 0,1  $\mu\text{g}$  PKC-rb, 2: 0,1  $\mu\text{g}$  PKC-rb + 1  $\mu\text{M}$  BIM, 3: 0,27  $\mu\text{g}$  PKC-rb, 4: 0,5  $\mu\text{g}$  PKC-rb). (B) Eine Dosis-Wirkungskurve wurde aus den quantifizierten Banden der Autoradiographie erstellt.

Das Fusionsprotein rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde deutlich Dosis abhängig von den verwendeten PKC Isoformen phosphoryliert. Bei einer Menge von 0,5 µg PKC wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen eine nahezu gesättigte Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> bestimmt (Abb. 16 B & 17 B), der Phosphateinbau betrug dabei im Mittel  $0,822 \pm 0,196$  mol/mol ( $n = 3$ ). In folgenden Versuchen wurde daher mit diesem rIRS-1<sup>449-664</sup> zu PKC Verhältnis gearbeitet. Der GST-Anteil wurde durch die verwendeten Isoformen nicht modifiziert (Daten nicht gezeigt).



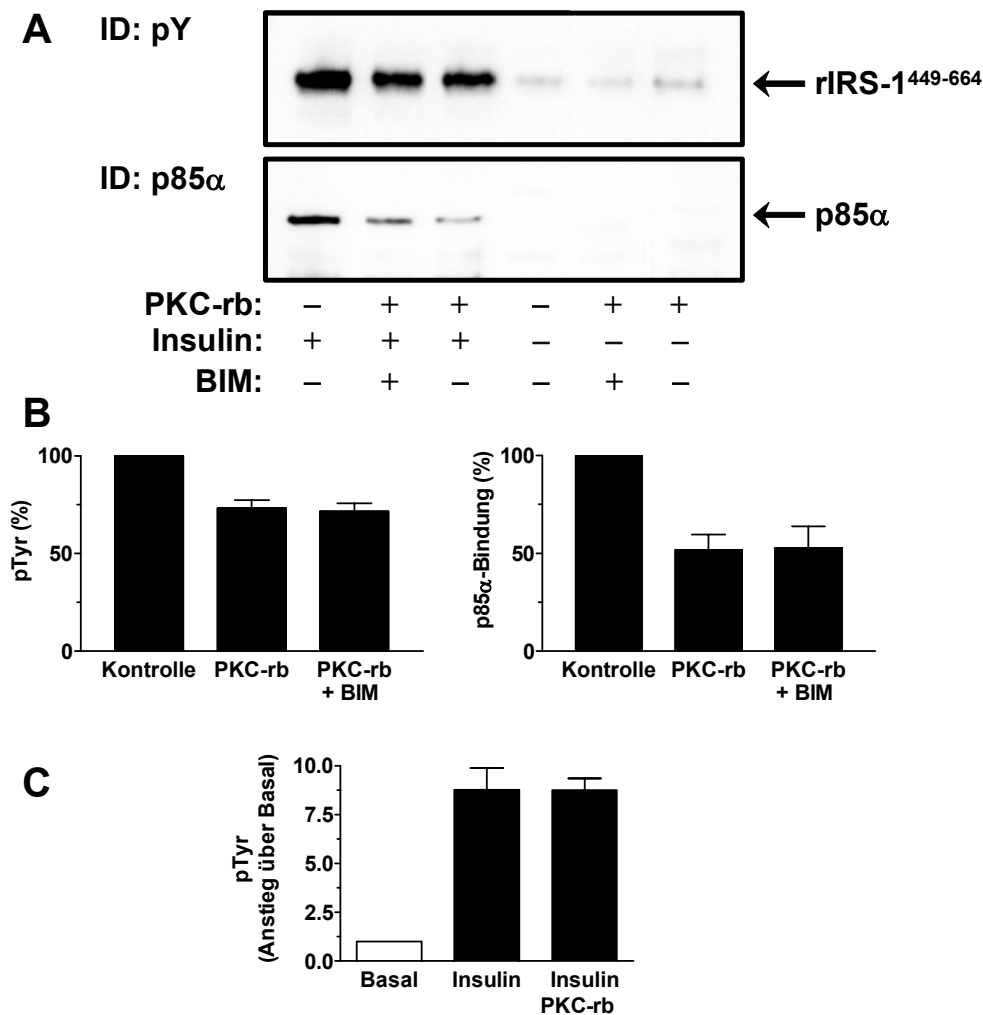
**Abb. 17: rIRS-1<sup>449-664</sup> ist ein Substrat der atypischen PKC Isoform ζ.** (A) rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde wie in Abb. 16 beschrieben mit unterschiedlichen Proteinmengen der humanen, rekombinant aus SF9-Zellen aufgereinigten Kinase PKC-ζ inkubiert und die Phosphorylierung mit Hilfe der Autoradiographie analysiert. Dargestellt ist eine repräsentative Autoradiographie einer solchen Phosphorylierungsreaktion (Spur 1: 0 µg PKC-ζ, 2: 0,1 µg PKC-ζ, 3: 0,27 µg PKC-ζ, 4: 0,5 µg PKC-ζ, 5: 0,7 µg PKC-ζ, 6: 1,0 µg PKC-ζ, 7: 2,0 µg PKC-ζ). (B) Dosis-Wirkungskurve nach Quantifizierung der Banden.



### 3.4.1 Einfluss der PKC aus dem Rattengehirn auf die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> und Assoziation von p85 $\alpha$

Um den Einfluss der Serin-Phosphorylierung auf die Funktion von IRS-1 modellhaft *in vitro* zu untersuchen, wurde das rIRS-1<sup>449-664</sup> mit der PKC vorinkubiert und mit dem zuvor etablierten GST-Pulldown Assay kombiniert. Bestimmt werden sollte so erneut das Maß der insulinstimulierten Tyrosin-Phosphorylierung durch den Insulinrezeptor und die Bindung von p85 $\alpha$ . Dafür wurde je 1  $\mu$ g rIRS-1<sup>449-664</sup> mit oder ohne 0,5  $\mu$ g PKC für 30 min bei 30°C inkubiert, dann zu dem bereits für 10 min autophosphorylierten Insulinrezeptor gegeben und für weitere 10 min inkubiert. Alternativ wurde die PKC vor der Zusammenführung für 10 min mit BIM gehemmt. Nach der Zugabe von Glutathion Sepharose wurde die Assoziation von p85 $\alpha$  im GST-Pulldown bestimmt (Versuchsschema in Abb. 8 B).

Die massive Modifikation von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die PKC aus dem Rattengehirn an Serinen/Threoninen resultierte nachfolgend in einer Abnahme der insulinstimulierten Tyrosin-Phosphorylierung und der Interaktion mit der p85 $\alpha$ , was aus Abbildung 18 hervor geht. Die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde um  $27 \pm 4\%$  reduziert ( $n = 9$ ), die Assoziation von p85 $\alpha$  war deutlich stärker inhibiert, sie wurde im Vergleich mit der nicht Serin phosphorylierten Kontrolle um  $49 \pm 8\%$  reduziert (Abb. 18 B). Die Inhibition der PKC nach der 30 min Serin/Threonin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die Addition von BIM zeigte keinen Einfluss auf dieses Ergebnis. Der Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> über Basal durch die Aktivierung des Rezeptors mit Insulin blieb trotz der Modifikation durch die PKC unverändert (Abb. 18 C), demnach waren sowohl die Basale als auch die insulinstimulierte Tyrosin-Phosphorylierung im gleichen Maß durch die PKC herabgesetzt.

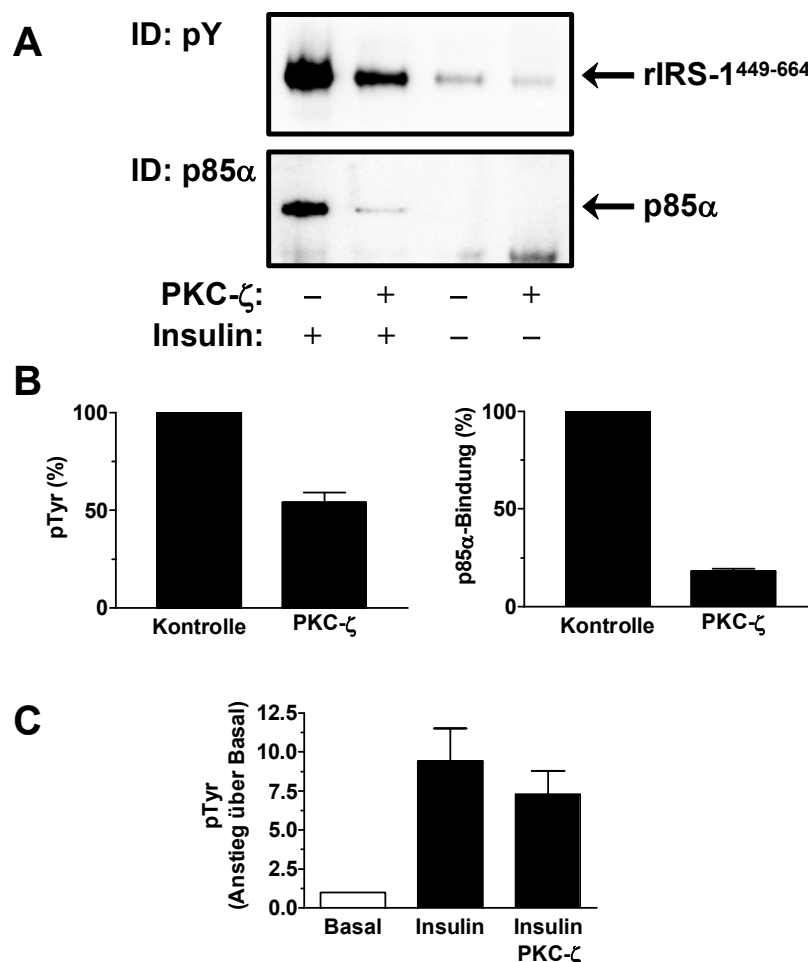


**Abb. 18: Effekt der PKC aus dem Rattengehirn auf die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> und die Interaktion mit p85 $\alpha$ .** (A) 1  $\mu$ g rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde mit 0,5  $\mu$ g PKC aus dem Rattengehirn (PKC-rb) für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde zum Teil die Aktivität der PKC-rb durch Zugabe von 1  $\mu$ M BIM für 10 min inhibiert. Das Serin-phosphorylierte rIRS-1<sup>449-664</sup> bzw. unmodifiziertes rIRS-1<sup>449-664</sup> wurden dann wie in Abb. 15 beschrieben, dem IR als Substrat angeboten und die Bindung von p85 $\alpha$  im GST-Pulldown Assay bestimmt. Die Proteine wurden nach der Auftrennung im SDS-Gel auf Nitrocellulose transferiert und dann mit Antisera gegen Phosphotyrosin und p85 $\alpha$  immunodetektiert. Repräsentative Blots sind dargestellt. (B) Die Signale wurden quantifiziert und auf den insulinstimulierten Kontrollwert bezogen, der gleich 100% gesetzt wurde. (C) Ebenfalls bestimmt wurde der insulinstimulierte Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung über Basal, normiert wurde daher auf den Basalwert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 6–9 Experimenten.

### 3.4.2 Einfluss der PKC- $\zeta$ auf die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> und Assoziation von p85 $\alpha$

Der Einfluss der PKC- $\zeta$  in diesem *in vitro* Modell wurde ebenfalls untersucht und war unter den gewählten Bedingungen wesentlich ausgeprägter als der der Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$ . Die Quantifizierung der Daten zeigte eine Inhibition der Tyrosin-

Phosphorylierung von  $46 \pm 5\%$  und eine um  $81 \pm 1\%$  ( $n = 3$ ) herabgesetzte  $p85\alpha$ -Bindung an  $rIRS-1^{449-664}$  (Abb. 19 A & B). Die Phosphorylierung von  $rIRS-1^{449-664}$  über Basal durch den Insulinrezeptor war im Vergleich mit der Kontrolle ohne PKC-Vorbehandlung reduziert, diese Änderung war aber nicht signifikant (Abb. 19 C).



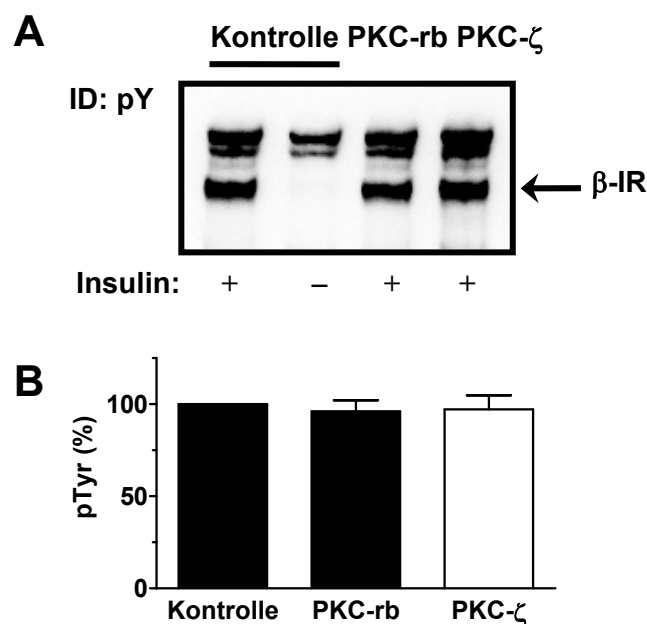
**Abb. 19: Effekt der PKC- $\zeta$  auf die Tyrosin-Phosphorylierung von  $rIRS-1^{449-664}$  und die Interaktion mit  $p85\alpha$ .** (A)  $rIRS-1^{449-664}$  wurde mit  $0,5 \mu\text{g}$  PKC- $\zeta$  für 30 min vorinkubiert. Die Tyrosin-Phosphorylierung durch den IR sowie die Interaktion mit  $p85\alpha$  wurden bestimmt durch Immunoblotting, wie bereits in Abb. 15 beschrieben. (B) & (C) Die Quantifizierung des Effektes der PKC- $\zeta$  wurde wie in Abb. 18 beschrieben durchgeführt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 separaten Experimenten.

### 3.4.3 Einfluss der PKC auf den Insulinrezeptor

Da die verwendeten Protein Kinase C Isoformen in dem beschriebenen Versuchssystem zusammen mit dem Insulinrezeptor inkubiert wurden und diesen theoretisch durch Serin/Threonin-Phosphorylierung modifizieren können, sollte

untersucht werden, ob die beobachtete Reduzierung der Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> nicht durch eine Modulierung der Insulinrezeptorkinase hervorgerufen wurde oder daran beteiligt war.

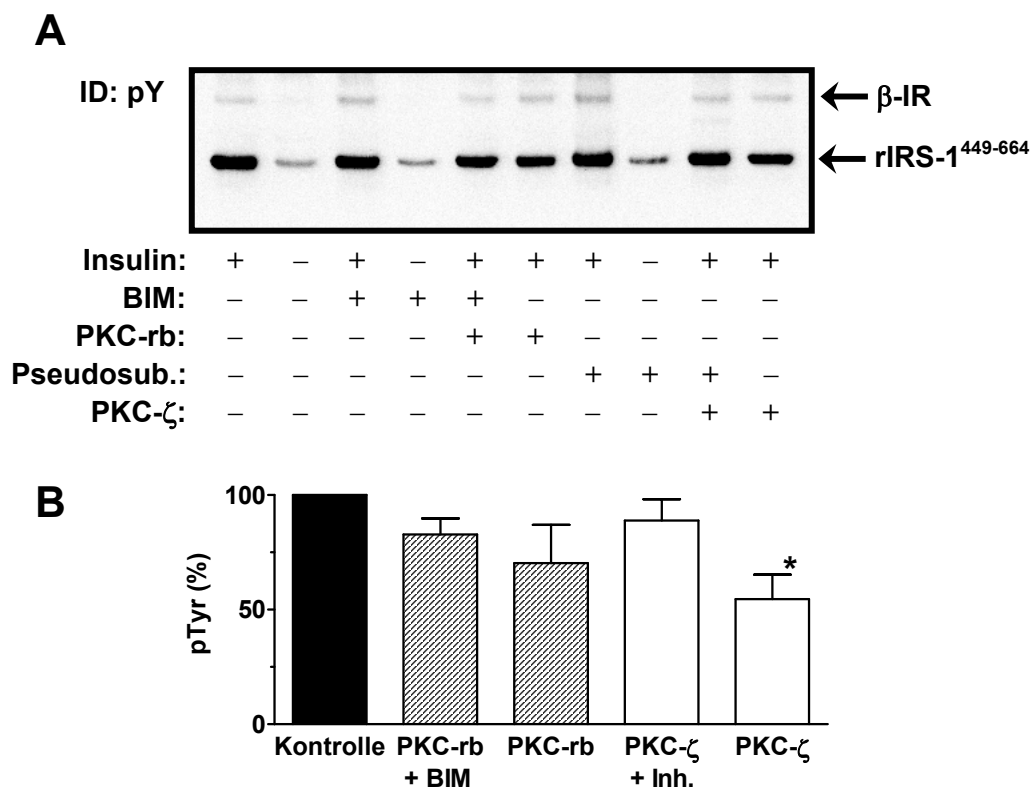
Der Insulinrezeptor ist ein Heterotetramer aus je zwei  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei  $\beta$ -Untereinheiten. Durch das Binden von Insulin an die  $\alpha$ -Untereinheiten kommt es zu Konformationsänderungen und dadurch zur Aktivierung der intrazellulären Kinasedomänen der  $\beta$ -Untereinheiten, was zur Autophosphorylierung an Tyrosinresten führt (Kasuga et al. 1983). Der Umfang der Autophosphorylierung der 95 kDa großen  $\beta$ -Untereinheit lässt sich daher quantitativ einfach mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin durch Immunodetektion erfassen. Die Analyse der Autophosphorylierung unter den zuvor beschriebenen Versuchsbedingungen (3.4.1) ergab, dass keine Veränderung in der Menge an Phosphotyrosin messbar war, wenn der bereits aktivierte Rezeptor für 10 min mit der PKC inkubiert wurde (Abb. 20 A & B).



**Abb. 20: Einfluss der PKC auf die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors.** (A) Eine 10 min Autophosphorylierung des IR wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Dann wurde entweder PKC-rb oder PKC- $\zeta$  zu dem Insulinrezeptor gegeben und für weitere 10 min inkubiert. Die Tyrosin-Phosphorylierung der IR  $\beta$ -Untereinheit wurde anschließend durch Immunoblotting analysiert. (B) Quantifizierung der detektierten Phosphotyrosinsignale, die Signalstärken sind in relativen Einheiten angegeben. Die unbehandelte Kontrolle wurde gleich 100 gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4–6 separat durchgeführten Experimenten.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der autoaktivierte Insulinrezeptor erneut für 10 min wie zuvor mit der PKC für 10 min inkubiert, dann aber wurde die PKC aus

dem Rattengehirn durch Zugabe von BIM und die PKC- $\zeta$  mit Pseudosubstrat für 10 min inhibiert. Anschließend wurde die Kinaseaktivität des Insulinrezeptor durch eine Inkubation für 10 min mit je 1  $\mu\text{g}$  des Substrats rIRS-1<sup>449-664</sup> überprüft. Als Maß der Rezeptorkinaseaktivität wurde die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch Immunodetektion bestimmt (Abb. 21 A). Die Quantifizierung der Signale ergab, dass die Inkubation der PKC zusammen mit dem aktivierten Insulinrezeptor über 10 min mit anschließender Hemmung nur in einer nicht signifikanten marginal geringeren Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> resultierte (Abb. 21 B). Die Kinaseaktivität des Rezeptors wurde also nahezu kaum negativ beeinflusst. Wurde die PKC nicht durch die Addition von BIM oder dem Pseudosubstrat gehemmt, wurde die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> signifikant im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, wie bereits in 3.4.1 und 3.4.2 gezeigt, deutlich herabgesetzt.



**Abb. 21: Effekt der PKC auf die Kinaseaktivität des Insulinrezeptors.** (A) Der autoaktivierte IR wurde für 10 min wie in Abb. 20 mit PKC für 10 min inkubiert, dann aber wurde die PKC durch Zugabe von BIM und PKC- $\zeta$ -Pseudosubstrat für 10 min inhibiert. Anschließend wurde mit 1  $\mu\text{g}$  rIRS-1<sup>449-664</sup> für weitere 10 min inkubiert. Bestimmt wurde das Maß der Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch Immunodetektion. (B) Quantifizierung von 3 separaten Experimenten, \* signifikant verschieden von den Signalstärken der Kontrolle mit  $p < 0,05$ .

### 3.5 Identifizierung von PKC-Phosphorylierungsstellen

Ziel der folgenden Versuche war es, PKC- $\zeta$  Phosphorylierungsstellen in rIRS-1<sup>449-664</sup> zu identifizieren und zu lokalisieren. Dazu wurden verschiedene Strategien verfolgt, zum einen theoretische Sequenzanalysen, unterschiedliche Ansätze mittels Massenspektrometrie sowie letztlich einer Kombination aus einer Phosphopeptidkartierung per HPLC mit der Massenspektrometrie. Die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen sollte als Grundlage dienen, um in weiterführenden Arbeiten den negativen Einfluss der PKC auf IRS-1 bzw. rIRS-1<sup>449-664</sup> als Signalträger in der Insulinsignalkaskade auf molekularer Ebene zu charakterisieren.

#### 3.5.1 Konsensus-Analyse von rIRS-1<sup>449-664</sup>

Da es sich bei rIRS-1<sup>449-664</sup> um ein rekombinantes Protein mit bekannter Sequenz handelt, wurde eine Software-basierte Analyse auf mögliche Phosphorylierungsstellen hin unternommen. Dafür wurde unter anderem der Webserver Netphos 2.0 des „Centers for Biological Sequence Analysis“ (CBS, Dänemark; Blom et al., 1999) verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt. Insgesamt wurden 12 Serine und 3 Threonine als mögliche Phosphosites ausgegeben, allerdings ohne genaue Angabe über die potentiellen Kinasen.

```

1      MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYID
61     GDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAELSMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFFTLKV
121    DFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFK
181    KRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLIEGRGIPRNSRDHTPPAR
241    GEEELSNIYICMGKGASTLTAPNGHYILSRGGNGHRYIPGATMGTSALTGDEAAGAADL
301    DNRFRKRTHSAGTSPTISHQKTPSQSVVSIEEYTEMMPAAAYPPGGGSGGRLPGYRHSFAF
361    VPTHSYPEEGLEMHHLERRGGHHRPDSNLHTDDGYMPMSPGVAPVPSNRKNGDYMPMS
421    PKSVSAPQQIINPIRRHPQRVDPNGYMMMSSPSAAAS

```

**Abb. 22: Bestimmung potentieller Phosphorylierungsstellen mit Netphos 2.0.** Die durch die Software vorausgesagten möglicherweise phosphorylierbaren 12 Serine und 3 Threonine sind hervorgehoben. Allerdings werden bei der Analyse keine Angaben zu den potentiellen Proteinkinasen angegeben. Grau unterlegt ist der Sequenzanteil von GST.

Eine weitere Analyse der rIRS-1<sup>449-664</sup>-Sequenz ebenfalls per Software (CBS, Dänemark) mit dem PKC-Konsensusmotiv (S/T)-X-(R/K) ergab folgende Voraussage für potentielle Phosphorylierungsstellen der PKC:

T-117	DFE <b>T</b> LKV	(GST)
S-195	YLK <b>S</b> SKY	(GST)
S-408	PVP <b>S</b> NRK	(S-620 in IRS-1)
S-420	MPM <b>S</b> PKS	(S-632 in IRS-1)

Zwei Übereinstimmungen mit der Netphos 2.0 Analyse fanden sich, das Threonin 117 im GST-Teil des Fusionsproteins und das Serin 420, äquivalent zu Serin 632 im IRS-1 der Ratte. Die verbleibenden zwei potentiellen Sites, das Serin 195 aus dem GST und Serin 408 bzw. 620 im IRS-1 wurden dagegen von Netphos nicht als solche vorausgesagt. Das verwendete Konsensus-Motiv (S/T)-X-(R/K) findet sich in der Datenbank PROSITE (<http://us.expasy.org/prosite/>) für die PKC unter dem Eintrag PDOC00005, beschreibt die Realität aber sicher nur eingeschränkt, denn bei der Durchsicht der Literatur finden sich eine Vielzahl weiterer möglicher Motive. Dies sind beispielsweise die Konsensus-Motive X-R-X-X-(**S/T**)-X-R-X (Graff et al., 1989), (R/K)<sub>1-3</sub>-(X)<sub>2-0</sub>-(**S/T**)-(X)<sub>2-0</sub>-(R/K)<sub>1-3</sub> (Kennely et al., 1991) und (R/K)(R/K)X(**S/T**)X(R/K)(R/K) (Pinna et al., 1996). Die Spezifität der einzelnen PKC-Isoformen wurde bei diesen Konsensus-Motiven nicht berücksichtigt. Die Autoren Nishikawa et al. (1996) untersuchten daher die Spezifität der 9 PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$  und  $\zeta$  mit einer Peptidbibliothek. Ein generelles PKC-Phosphorylierungsmotiv wird von den Autoren mit R-X-X-(**S/T**)-X-R-X vorgeschlagen, allerdings fanden sich durchaus sehr unterschiedliche Substratspezifitäten für die einzelnen Isoformen. So wurde für die atypische PKC- $\zeta$  ermittelt, dass diese Kinase Substrate mit basischen Resten an den Positionen -6, -4 und -2 und hydrophobe Reste an den Positionen +1, +2 und +3 der Phosphosite bevorzugt. Die beschriebene optimale Substratsequenz ist in Abbildung 23 dargestellt.

#### Position der Aminosäure

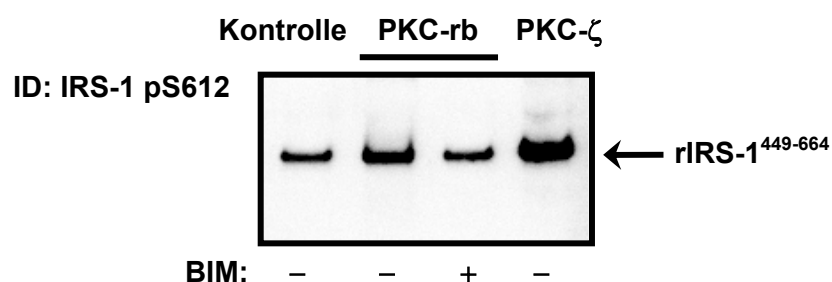
-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5
R	R/K	<b>F</b>	K	<b>R</b>	Q/K	G	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	Y/F	F	F
		L/R	F		Y	K/M/Y		<b>M</b>	<b>M</b>	K	Y/K	K/Y

**Abb. 23: Konsensus-Motiv der PKC- $\zeta$  nach den Autoren Nishikawa et al. (1996).** Angegeben sind die bevorzugten Aminosäuren in der jeweiligen Position ausgehend von der Phosphosite. Fettgedruckte Buchstaben geben besonders bevorzugte Aminosäuren an.

Dieses von der PKC- $\zeta$  bevorzugte Motiv unterscheidet sich von dem für die PKC-Familie postulierte, besonders durch die hydrophoben Aminosäuren stromabwärts der Phosphosite, was die Schwierigkeit der Sequenzanalyse nach diesen Konsensus-Motiven aufzeigt.

### 3.5.2 Detektion von pS612 mittels Antiserum

In den Arbeiten von Mothe et al. (1996) und De Fea & Roth (1997 A & B) wird das IRS-1 Serin 612 als potentielle Phosphorylierungsstelle beschrieben. Das Serin 612 wurde von den Autoren ausgewählt, da es dem theoretischen Konsensus-Motiv der MAP-Kinase (PXSP) entspricht und sich in unmittelbarer Nähe zum Tyrosin 608 (YMPMSP) findet, einer der Hauptbindungsstellen der PI 3-Kinase an das IRS-1. Durch Mutationsanalysen konnte diese vorausgesagte Phosphorylierungsstelle validiert werden, als verantwortliche Kinase wurde die MAP-Kinase beschrieben. Auf Grund dieser Literaturdaten und da das Serin 612 in der Sequenz von rIRS-1<sup>449-664</sup> enthalten ist, sollte unter der Verwendung eines kommerziell erhältlichen spezifischen Antiserums der Firma Biosource (Camarillo, CA, USA) gegen die Phosphoform des IRS-1 Serins 612 überprüft werden, ob dieses Serin von der PKC modifiziert wird. Dafür wurden je Reaktionsansatz 1 µg rIRS-1<sup>449-664</sup> für 30 min mit 0,5 µg PKC-ζ oder 0,5 µg PKC aus dem Rattengehirn ohne oder mit 1 µmol/l BIM bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden anschließend nach Zugabe von Laemmli-Puffer und Kochen per SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Membran wurde dann mit Hilfe des Antiserums gegen die Phosphoform des Serins 612 von IRS-1 immunodetektiert. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abbildung 24 wiedergegeben. In Gegenwart der PKC ist deutlich ein stärkeres Signal im Vergleich mit der Kontrolle ohne Enzym immunodetektierbar. Die Inhibition der PKC aus dem Rattengehirn mit BIM resultiert in einem Signal mit der gleichen Intensität wie das der Kontrolle. Diese Ergebnisse lassen auf eine Modifikation des Serins 612 in rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die PKC schließen.



**Abb. 24: Serin 612 wird von der PKC durch die Übertragung einer Phosphorylgruppe kovalent modifiziert.** 1 µg rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde für 30 min mit je 0,5 µg PKC-rb oder PKC-ζ bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Membran wurde dann mit Hilfe eines Antiserums gegen die Phosphoform des Serins 612 von IRS-1 immunodetektiert.



Eine Datenbankanalyse (Blast EMBnet-CH/SIB) der umgebenden Sequenz von Serin 612 ergab, dass dieses Serin und die umgebenden Aminosäuren in den IRS-1 Proteinen verschiedener Spezies hoch konserviert ist (Abb. 25).

```

IRS1_Ratte      GLEMHHLERRGGHHRPDSSNLHTDDG YMPMSPGVAPVPSNRKNGD YMPMSPKSVSAPQQ (582-641)
IRS1_Maus      GLEMHHLERRGGHHRPDTSNLHTDDG YMPMSPGVAPVPSNRKNGD YMPMSPKSVSAPQQ (582-641)
IRS1_Cos       GLEMHPLERRGGHHRPDSSTLHTDDG YMPMSPGVAPVPSSRKGSGD YMPMSPKSVSAPQQ (586-645)
IRS1_human     GLEMHPLERRGGHHRPDSSTLHTDDG YMPMSPGVAPVPSGRKGSGD YMPMSPKSVSAPQQ (586-645)
IRS1_Gallus    GLEMHPLERRAGRTSPDSSTLHTDDG YMPMSPGWPPVSGRKNGD YMPMSPKSVTPQQ (584-643)
IRS1lp_Xeno    HKDDG YMPMSPGVAPVSTKTN...D YMPMSPKSVSAPQQ (359-394)

IRS2_human     GSHRSSSSNLGADDG YMPMTPGAAFAGS.GSGSCRSDD YMPMSPASV (638-684)
IRS2_Mus      GSHKSSSSNLGADDG YMPMTPGAALRSGGPNSCKSD.D YMPMSPTSVSA (634-681)
IRS2_Ratte    GSHKSSSSNLGADDG YMPMTPGAALRSGGPNSCKSD.D YMPMSPTSVSA (613-660)

```

**Abb. 25: Sequenzvergleich von Serin 612.** Die identifizierte PKC Phosphorylierungsstelle Serin 612 wurde per Datenbankanalyse mit anderen bekannten Proteinsequenzen verglichen. Die Site und die umgebende Sequenz sind konserviert nur für IRS-1. Es finden sich homologe Sequenzen im IRS-2, allerdings ist in der entsprechenden Position des Serins 612 stattdessen ein Threonin (S612 ist rot hervorgehoben, blau dargestellt sind abweichende Aminosäuren ausgehend von der Sequenz der Ratte, grün sind Tyrosinphosphosites, Cos: Cercopithecus aethiops (grüne Meerkatze), IRS1lp\_Xeno: IRS1-like protein Xenopus laevis (Afrikanischer Krallenfrosch)).

### 3.5.3 Massenspektrometrische Analyse von PKC- $\zeta$ Phosphorylierungsstellen in rIRS-1<sup>449-664</sup>

Mögliche weitere PKC- $\zeta$  Phosphorylierungsstellen in rIRS-1<sup>449-664</sup> sollten unter der Verwendung der Massenspektrometrie identifiziert werden. Verschiedene Vorgehensweisen wurden dabei verfolgt. Auf Grund einer Kooperation mit der Firma Aventis Pharma Deutschland GmbH wurde in Frankfurt in einem ersten Versuch 100 pmol rIRS-1<sup>449-664</sup> durch 2,6  $\mu$ g PKC- $\zeta$  phosphoryliert und dieser Gesamtansatz nach Zugabe von Trypsin gespalten. Dieses Gemisch wurde dann mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer Biflex der Firma Bruker (Bremen) analysiert, dabei wurde keine Phosphorylierungsstelle bestimmt (Daten nicht gezeigt).

In weiteren Versuchen wurden wiederum 100 pmol rIRS-1<sup>449-664</sup> mit 2,6  $\mu$ g PKC- $\zeta$  nicht radioaktiv sowie auch radioaktiv unter der Verwendung von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP inkubiert. Die Proben wurden anschließend jeweils im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Blue angefärbt. Die Gele wurden dann in Kooperation mit Herrn Prof. H. Meyer (Bochum) weiter bearbeitet und nach tryptischer Spaltung von rIRS-1<sup>449-664</sup> per HPLC gekoppelt an ein ESI-TOF-

Massenspektrometer untersucht. Auch hierbei konnte keine Phosphorylierungsstelle bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).

Da diese Vorgehensweisen nicht zum Erfolg führten, sollten daher durch die Etablierung einer Phosphopeptidkartierung mittels zweidimensionaler hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (HPLC) Phosphopeptide aus rIRS-1<sup>449-664</sup> nach PKC- $\zeta$  Phosphorylierung möglichst hoch aufgereinigt werden. Diese sollten dann in Kooperation mit Frau Dr. Sabine Metzger (BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) massenspektrometrisch analysiert werden.

Für die geplante MS-Analyse wurden in einem präparativen Ansatz 5 nmol rIRS-1<sup>449-664</sup> mit 0,5 nmol PKC- $\zeta$  bei 30°C für 60 min in Gegenwart von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP inkubiert, nach Zugabe von 6x Laemmli-Puffer gekocht und in 8-18%igen SDS-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie Blue angefärbt, die rIRS-1<sup>449-664</sup>-Banden ausgeschnitten und in Reaktionsgefäße zur proteolytischen Spaltung überführt.

#### **3.5.4 Tryptische Spaltung von rIRS-1<sup>449-664</sup> im SDS-Gel**

Zur Proteolyse von rIRS-1<sup>449-664</sup> im SDS-Gel wurde Trypsin der Firma Roche (Mannheim) verwendet, welches durch Modifikation wesentlich stabiler gegen Autoproteolyse ist, um eine unvollständige Spaltung von rIRS-1<sup>449-664</sup> auszuschließen. Die Gele wurden unmittelbar nach dem Visualisieren der Proteinbanden mit Coomassie Blue nass weiterverarbeitet, da bei der Verwendung getrockneter Gele bei der HPLC-Auftrennung Artefakte auftraten und die Reproduzierbarkeit gering war (Daten nicht gezeigt). Eine vollständige tryptische Spaltung von rIRS-1<sup>449-664</sup> liefert theoretisch 53 Peptide mit Massen von 147,0 Da bis 4061,7 Da [M+H]<sup>+</sup>. Nach der Spaltung der Proteine im Gel wurden die Peptide durch Ultrabeschallung aus dem Gel eluiert. Dabei wurde durchschnittlich mehr als 97% der Radioaktivität pro rIRS-1<sup>449-664</sup>-Bande aus dem Gel eluiert.

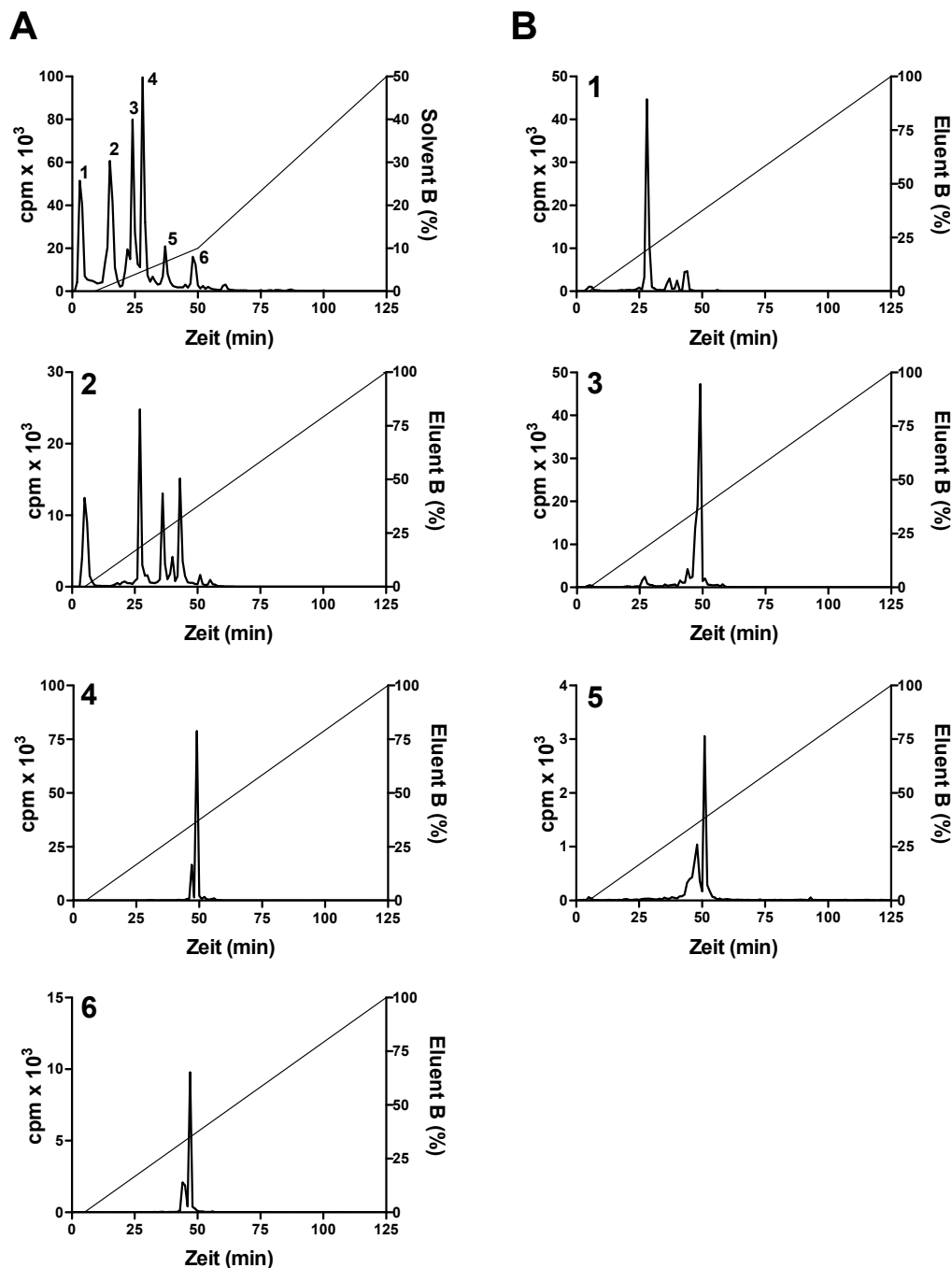
### 3.5.5 Phosphopetidkartierung

Die durch tryptische Spaltung gewonnenen Peptide wurden in einer zweidimensionalen hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einem Gold System von Beckman aufgetrennt und analysiert (nach Al-Hasani, 1995 und Lehr et al., 1999). Da als messbarer Marker für die PKC- $\zeta$  Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> das Phosphorisotop <sup>32</sup>P verwendet wurde, wurde die Radioaktivität der gesammelten Fraktionen über die Cerenkov-Strahlung im Beta-Counter bestimmt. Auf die photometrische Aufzeichnung der Peptid-Auftrennung wurde verzichtet, da das Photometer des Gold Systems Metallrohre besitzt und Phosphopeptide bevorzugt an Metalloberflächen adsorbieren.

In der ersten Dimension erfolgte die Trennung der Peptide über einen zweistufigen Salzgradienten mit einer Anionenaustauschersäule (Nucleogel SAX 8/46). Für die nachfolgend geplante massenspektrometrische Analyse wurden Peptide aus 5 nmol rIRS-1<sup>449-664</sup> verwendet, sonst wurde in kleineren Ansätzen jeweils ein Fünftel der zuvor genannten Menge analysiert (1 nmol rIRS-1<sup>449-664</sup>). Das Resultat der Anionenaustauscher-Auftrennung waren 6 Radioaktivität enthaltende Hauptpeaks (Abb. 26 A). Die Menge an inkorporierter Radioaktivität pro Peak bezogen auf die gesamt eluierte wurde aus dem Elutionsprofil abgeleitet und war dabei wie folgt: 12,9% Peak 1, 20,7% Peak 2, 21,2% Peak 3, 18,8% Peak 4, 5,8% Peak 5 und 4,8% Peak 6 (siehe auch Tabelle 8).

Um komigrierende Peptide unter den reproduzierbar eluierenden Peaks auszuschließen und eine größere Auftrennungsleistung zu erreichen, wurden diese 6 Peaks in einer zweiten Dimension per Reversed Phase-(RP)-HPLC mit einer C18-Säule (Nucleosil 300-5) an einem linearen Acetonitril-Gradienten aufgetrennt. Dazu wurden die Radioaktivität enthaltenden Fraktionen jedes einzelnen Peaks zusammengeführt, das Lösungsmittel nach Einengen im Vakuum gegen das Laufmittel A der RP-HPLC ersetzt und dann rechromatographiert. Dabei wurden erst durch die Verwendung silanisierter Reaktionsgefäße bei allen Arbeitsschritten ausreichende Ausbeuten und reproduzierbare Ergebnisse erreicht. Zuvor traten große Verluste durch Adsorption der Peptide (Radioaktivität) an der Gefäßwand auf. Die Rechromatographierung der vereinigten Fraktionen der 6 Peaks ergab, dass sich aus Fraktion 2 fünf neue Peaks auftrennen ließen, die restlichen Fraktionen eluierten ohne Aufspaltung (Abb. 26 B 1–6). Die Fraktionen jedes bei der RP-HPLC

identifizierten radioaktiven Peaks wurden vereinigt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Die Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zum Abklingen der Radioaktivität gelagert. Anschließend wurden die Fraktionen massenspektrometrisch analysiert.



**Abb. 26: Zweidimensionale HPLC-Auftrennung tryptischer Peptide von rIRS-1<sup>449-664</sup> nach PKC- $\zeta$  Phosphorylierung.** Für diese 2D HPLC-Analyse wurden 5 nmol rIRS-1<sup>449-664</sup> mit 0,5 nmol PKC- $\zeta$  für 60 min bei  $30^{\circ}\text{C}$  in Gegenwart von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  inkubiert. Die Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Gel tryptisch gespalten. Die eluierten Phosphopeptide wurden dann per Anionenaustausch-HPLC aufgetrennt (A). Die Radioaktivität der gesammelten Fraktionen wurde durch Messen der Cerenkov-Strahlung bestimmt. Die Fraktionen der identifizierten Peaks 1–6 wurden jeweils vereinigt und dann in einer Reversed Phase-HPLC mit einer C18-Säule rechromatographiert (B).

### 3.5.6 Massenspektrometrische Analyse der RP-HPLC-Fraktionen

Die massenspektrometrische Analyse der Fraktionen erfolgte mit einem Elektrospray Ionisations-Flugzeitmassenspektrometer QSTAR Pulsar I der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) ausgestattet mit einer Nanospray-Ionenquelle in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sabine Metzger. Die einzelnen Signale der Peptide wurden durch MS/MS-Analyse näher charakterisiert. Aus den MS/MS-Spektren wurden die Sequenz der Peptide und posttranslationale Modifikationen durch manuelle Interpretation der Spektren abgeleitet. Mittels massenspektrometrischer Analyse konnten in den RP-HPLC-Fraktionen 11 Peptide identifiziert werden, was die theoretische Sequenz von rIRS-1<sup>449-664</sup> bestätigte. Insgesamt betrug die Sequenzabdeckung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die identifizierten Peptide 47,2% (Abb. 27).

1	MSPILGYWKI	KGLVQPTRL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL	EFPNLPYYID
61	GDVKLTQSM	IIRYIADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL	DIRYGVSR	IA YSKDFETLKV
121	DFLSKLPEML	KMFEDRLCHK	TYLNGDHVTH	PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK
181	KRIEAIPOID	KYLKSSKYIA	WPLQGWQATF	GGGDHPPKSD	LIEGRGIPRN	SRVDHTPPAR
241	GEEELSNYIC	MGGKGASTLT	APNGHYILSR	GGNGHRYIPG	ATMGTSPALT	GDEAAGAADL
301	DNRFRKRTHS	AGTSPTISHQ	KTPSQSSVVS	IEEYTEMMPA	AYPPGGGSGG	RLPGYRHS
361	VPTHSYPEEG	LEMHHLERRG	GHHRPSSNL	HTDDGYMPMS	PGVAPVPSNR	KGNGDYMPMS
421	PKSVSAPQQI	INPIRRHPQR	VDPNGYMMMS	PSAAAS		

**Abb. 27:** In den HPLC-Eluaten per Massenspektrometrie identifizierte Peptide aus rIRS-1<sup>449-664</sup>. Hell- und dunkelgrau unterlegt sind die Sequenzen der Peptide, die in den HPLC-Fraktionen der Reversed Phase-Chromatographie per ESI-MS/MS identifiziert werden konnten. Die identifizierten Peptide decken 47,2 % der Proteinsequenz von rIRS-1<sup>449-664</sup> ab.

Bezogen auf die Sequenz der IRS-1-Aminosäuren 449–664 finden sich 86,1% dieser Aminosäuren wieder. Dem GST-Anteil konnten nur zwei Peptide zugeordnet werden. In Tabelle 8 sind die Sequenzdaten der identifizierbaren Peptide aus der RP-HPLC-Auftrennung und die Zuordnung dieser Peptide zu den Fraktionen der Anionenaustausch-HPLC zusammengefasst. Aufgrund dieser Daten ist eine Peptidkartierung der PKC- $\zeta$  Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> entstanden, die Zuordnung der Peptidsequenzen zu den einzelnen Elutionspeaks der Anionenaustausch-HPLC diente daher als Referenz in den nachfolgenden Versuchen.

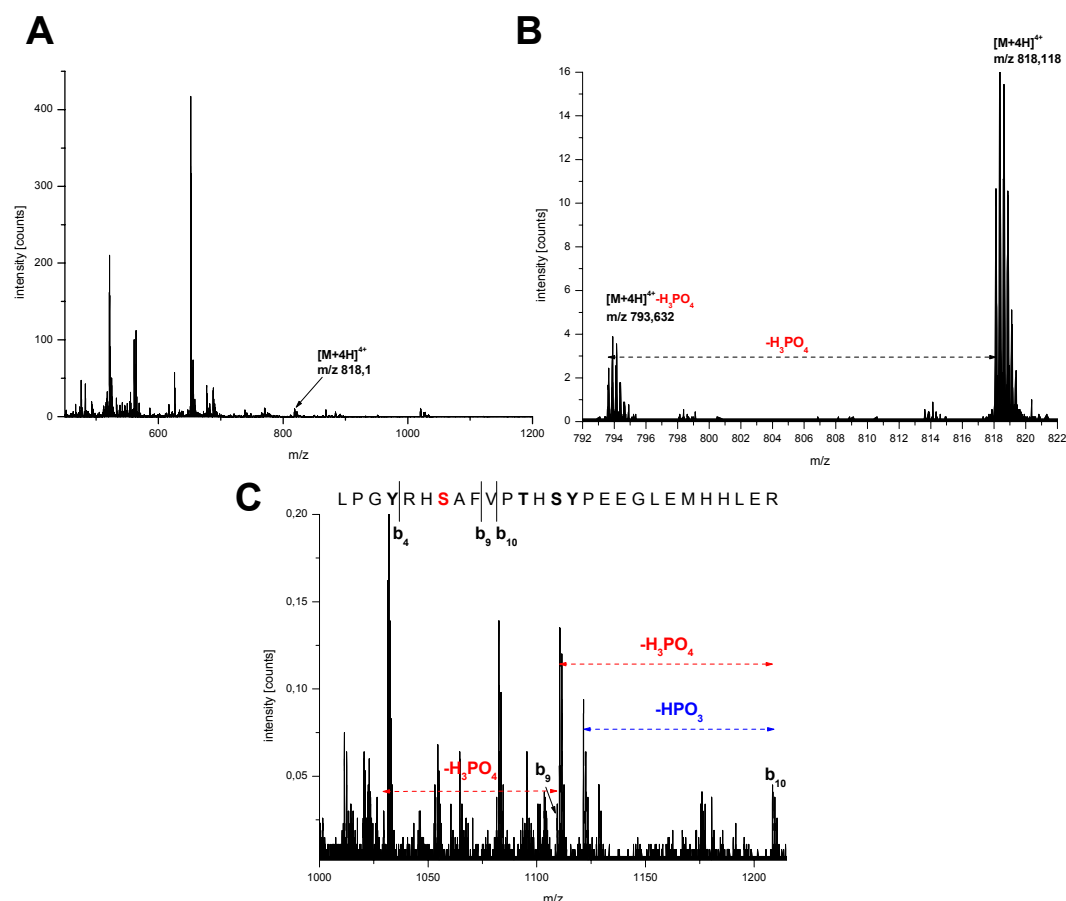
**Tab. 8:** Ergebnis der massenspektrometrischen Sequenzanalyse der rIRS1<sup>449-664</sup> Phosphopeptide<sup>a</sup>.

Aminosäuresequenz der identifizierten Peptide	AS in rIRS1 <sup>449-664</sup> <sup>b</sup>	phosphorylierte AS	Peak <sup>c</sup>	Menge an <sup>32</sup> P (%) <sup>d</sup>
LTQSMAIR	65-73		1	12,9
IAYSKDFETLK	112-119		1	12,9
VAHTPPARGEEELSNYICMGK	233-254		4 & 2 (7)	
GASTLTAPNGHYILSR	255-270		2	20,7
YIPGATMGTPSPALTGDEAAGAADLDNR	277-303	S286	5 & 6	10,6
THSAGTSPTISHQK	308-321		1	12,9
TPSQSSVVSIEEYTEMMPAAYPPGGGSGGR	322-351		3	21,2
LPGYRHSAFVPTHSYPEEGLEMHHLER	352-378	S358	4	18,8
GGHHRPSSNLHTDDGYMPMSPGVAPVPSNR	380-410		2	20,7
SVSAPQQIINPIR	425-435		1	12,9
VDPNGYMMSPSAAAS	441-456		2	20,7

<sup>a</sup> Tryptische Peptide von rIRS-1<sup>449-664</sup> wurden per Anionenaustausch-HPLC und Reversed Phase-HPLC aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Phosphorylierte Serinreste sind durch Fettschrift hervorgehoben. <sup>b</sup> Die Nummerierung berücksichtigt eine zusammengesetzte Sequenz aus Glutathion-S-transferase plus die IRS-1 Aminosäuren 449-664. <sup>c</sup> Die Nummerierung bezieht sich auf die detektierten Peaks der Anionenaustausch-HPLC (Abb. 26 A). <sup>d</sup> Die Gesamtradioaktivität inkorporiert in die identifizierten Phosphopeptide wurde auf 100% gesetzt und die angegebenen Prozente repräsentieren jeweils die integrierte Peakfläche.

Aus den MS/MS-Spektren konnten die genauen Positionen zweier Phosphoserine abgeleitet werden. Das Phosphoserin mit der Position 286 im rIRS-1<sup>449-664</sup> konnte im Peptid mit der Sequenz YIPGATMGTP**S**PALTGDEAAGAADLDNR (277–303) aus den Peaks 5 und 6 der Anionenaustausch-HPLC identifiziert werden und das Phosphoserin 358 im Peptid LPGYRH**p**SFVPTHSYPEEGLEMHHLER (352–378) aus dem Peak 4 (Abb. 28). Die Phosphopeptide wurden im MS-Spektrum durch die Abspaltung von H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (–98 Da) und HPO<sub>3</sub> (–80 Da) des Vorläufer-Ions identifiziert (Abb. 28 B). Diese Dephosphorylierung durch eine β-Elimination ist für Phosphoserine und Phosphothreonine charakteristisch. Die genaue Peptidsequenz und die Lage der phosphorylierten Aminosäure wurden aus dem MS/MS-Spektrum der Fragment-Ionen bestimmt (Abb. 28 C). Die Serine 286 und 358 entsprechen übertragen auf die Sequenz des nativen IRS-1 der Ratte den Positionen 498 und 570.

Weitere Phosphoaminosäuren konnten in den verbleibenden 9 Peptiden nicht identifiziert werden, obwohl die in der HPLC-Auftrennung detektierte Radioaktivität auf Phosphorylierungen schließen lässt. Unter der Berücksichtigung, dass die verwendete ESI-MS Analyse nur eine qualitative, aber nicht eine quantitative Analyse des Phosphateinbaus erlaubt, wurden die identifizierten Peptide mit der Menge an inkorporierter Radioaktivität pro Peak in der Anionenaustausch-HPLC kombiniert (Tab. 8).



**Abb. 28: ESI-MS Analyse von HPLC-Fraktion 4.** Nach einer *in vitro* Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die PKC- $\zeta$  wurde das Protein im Gel tryptisch gedaut, die resultierenden Peptide per 2D HPLC aufgetrennt und dann mittels ESI-MS analysiert. (A) Übersichtsspektrum der in Fraktion 4 enthaltenen Peptide. (B) Vergrößerte Darstellung des Peptidsignals  $[M+4H]^{4+} = 818,11$  mit dem Verlust von Phosphorsäure, was auf eine Phosphorylierungsstelle schließen lässt. (C) ESI-MS/MS-Spektrum des Ions  $m/z = 818,11$  mit Dephosphorylierung der Fragment-Ionen  $b_9$  und  $b_{10}$  (Spektren von Dr. Metzger, BMFZ Düsseldorf). Angegeben ist die aus den Signalen abgeleitete Sequenz des Peptids mit den Aminosäuren 352–378.

Ein Homologievergleich der umgebenden Sequenz um das Serin 286/498 und 358/570 mit bekannten Proteinsequenzen über eine Datenbankanalyse (Blast EMBnet-CH/SIB) ergab, dass die identifizierten PKC- $\zeta$ -Phosphorylierungsstellen in verschiedenen Spezies hoch konserviert nur in den IRS-1 Proteinen sind (Abb. 29). Weiterhin liegt das Serin 358/570 zwischen den zwei potentiellen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen Y546 und Y578.

#### Serin 498

IRS1_Ratte	MGGKGASTLTAPNGHYILSRGGNGHRYIPGATMGTSPAL TGDEAAGAADLDNRFRKRTHS (463–522)
IRS1_Maus	MGGKGASTL <b>A</b> APNGHYILSRGGNGHRYIPGAN <b>L</b> GT <b>S</b> PAL <b>P</b> GDEAAGAADLDNRFRKRTHS (463–522)
IRS1_Cos	MGGKG <b>P</b> STLTAPNGHYILSRGGNGHRYTPGT <b>G</b> LGT <b>S</b> PAL <b>A</b> GDEA <b>S</b> SAADLDNRFRKRTHS (468–527)
IRS1_Human	MGGKG <b>P</b> STLTAPNGHYILSRGGNGHR <b>C</b> TPGT <b>L</b> GT <b>S</b> PAL <b>A</b> GDEA <b>S</b> AADLDNRFRKRTHS (468–527)
IRS1_Gallus	MGGKG <b>P</b> STLTAPNGHYILSRG <b>A</b> NGHR <b>C</b> TPGT <b>L</b> GT <b>S</b> PAL <b>A</b> GDE <b>Q</b> TSAADLDNRFRKRTHS (466–525)

**Serin 570**

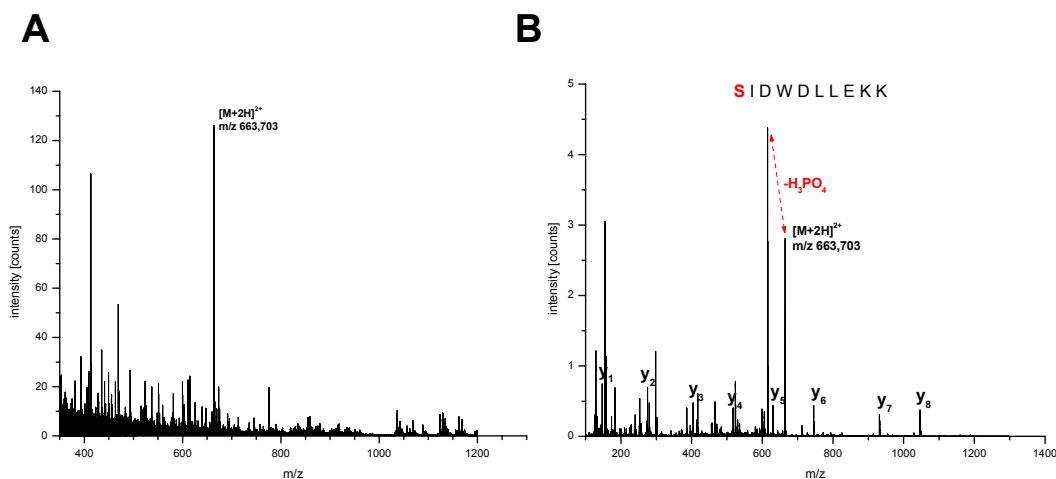
IRS1_Ratte	SIEEYTEMMPAAYPPGGGSGGRLPGYRHS <b>AFVPTHS</b> Y <b>PEE</b> GLEMHHLERRGGHHRPDS	(542-600)
IRS1_Maus	SIEEYTEMMPAAYPPGGGSGGRLPGYRHS <b>AFVPTHS</b> Y <b>PEE</b> GLEMHHLERRGGHHRPDT	(543-597)
IRS1_Cos	SIEEYTEMMPA.YPPGGGSGGRLPG <b>HRHS</b> AFVPTHSY <b>PEE</b> GLEMHPLERRGGHHR	(547-600)
IRS1_human	SIEEYTEMMPA.YPPGGGSGGRLPG <b>HRHS</b> AFVPT <b>RS</b> Y <b>PEE</b> GLEMHPLERRGGHHR	(547-600)
IRS1_Gallus	SIEEYTEMMPA.YPPGGGSGGR <b>AWPGRLS</b> AFVPT <b>RS</b> Y <b>PEE</b> GLEMHPLERR <b>AGRTS</b> PD	(545-600)
IRS1lp_Xeno	SIEEYTEMMP..... <b>THPVRLTS</b> <b>FRHS</b> AFVPT <b>YS</b> Y <b>PEE</b> CLDLHLEGS <b>RANHK</b>	(314-360)
IRS2_Maus	SLDEYTEM <b>RRATFSGSS</b> GRLCP <b>SFPAS</b> ..SPKVAYNP <b>YPEE</b> YGDIEI	(589-633)

**Abb. 29: Sequenzvergleich der IRS-1 Serine 498 und 570.** Die identifizierten PKC- $\zeta$  Phosphorylierungsstellen Serin 498 und 570 wurden mit anderen bekannten Proteinsequenzen Datenbank-gestützt verglichen (Blast EMBnet-CH/SIB). Die Sites und die umgebende Sequenz sind hoch konserviert nur für IRS-1 (S570 ist rot hervorgehoben, blau dargestellt sind abweichende Aminosäuren ausgehend von der Sequenz der Ratte, grün sind potentielle Tyrosinphosphosites; Cos: Cercopithecus aethiops (grüne Meerkatze), IRS1lp\_Xeno: IRS1-like protein Xenopus laevis (Afrikanischer Krallenfrosch)).

### 3.5.7 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Alternativ zu der aufwendigen Anreicherung der Phosphopeptide von rIRS-1<sup>449-664</sup> über eine zweidimensionale HPLC wurde die Technik der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) angewendet. In einem nicht radioaktiven Ansatz wurden 250 pmol rIRS-1<sup>449-664</sup> mit 25 pmol PKC- $\zeta$  umgesetzt und anschließend über Nacht durch Zugabe von Trypsin proteolytisch gespalten. Das Peptidgemisch wurde dann auf eine mit Gallium<sup>3+</sup>-Ionen vorbeladene Säule der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) gegeben. Die Anreicherung der an das Gallium<sup>3+</sup> bindenden Phosphopeptide und deren Elution erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers. Das Eluat wurde erneut per ESI-MS analysiert. Bei der ESI-MS Untersuchung konnten keine Phosphopeptide aus rIRS-1<sup>449-664</sup> detektiert werden. Das stärkste Signal im ESI-Übersichtsspektrum mit der Masse  $m/z = 663,703$   $[M+2H]^{2+}$  entsprach einem Phosphopeptid mit der Sequenz **pSIDWDLLEKK** (520-529) aus der PKC- $\zeta$  (Abb. 30 A). Die Sequenz und die Position des Phosphoserins 520 ließen sich aus dem MS/MS-Spektrum des Mutter-Ions  $m/z = 663,703$  ableiten (Abb. 30 B). Mit der Identifizierung des phosphorylierten Serins 520 konnte eine in der Literatur nicht beschriebene PKC- $\zeta$  Autophosphorylierungsstelle identifiziert werden. Der IMAC-Versuchsansatz wurde nicht weiterverfolgt.





**Abb. 30: ESI-MS-Analyse des IMAC-Eluates.** 250 pmol rIRS-1<sup>449-664</sup> wurden *in vitro* mit 25 pmol PKC- $\zeta$  für 30 min bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von Trypsin wurden die phosphorylierten Proteine dann über Nacht gedaut. Aus dem Peptidgemisch wurden anschließend über eine Ga<sup>3+</sup>-Säule die Phosphopeptide angereichert und dann mittels ESI-MS analysiert. **(A)** Übersichtsspektrum des von der Ga<sup>3+</sup>-Säule eluierten Peptidgemisches. **(B)** ESI-MS/MS-Spektrum des Phosphopeptids m/z = 663,703 [M+2H]<sup>2+</sup>. Aus dem Spektrum konnte die PKC- $\zeta$  Sequenz **pSIDWDLLEKK** (520-529) abgeleitet werden, ein Teil der y-Ionen Serie (C-terminale Fragmentierung) ist im Spektrum zu sehen. Der Verlust von Phosphorsäure weist auf das Serin 520 als einzig mögliche Phosphoaminosäure hin.

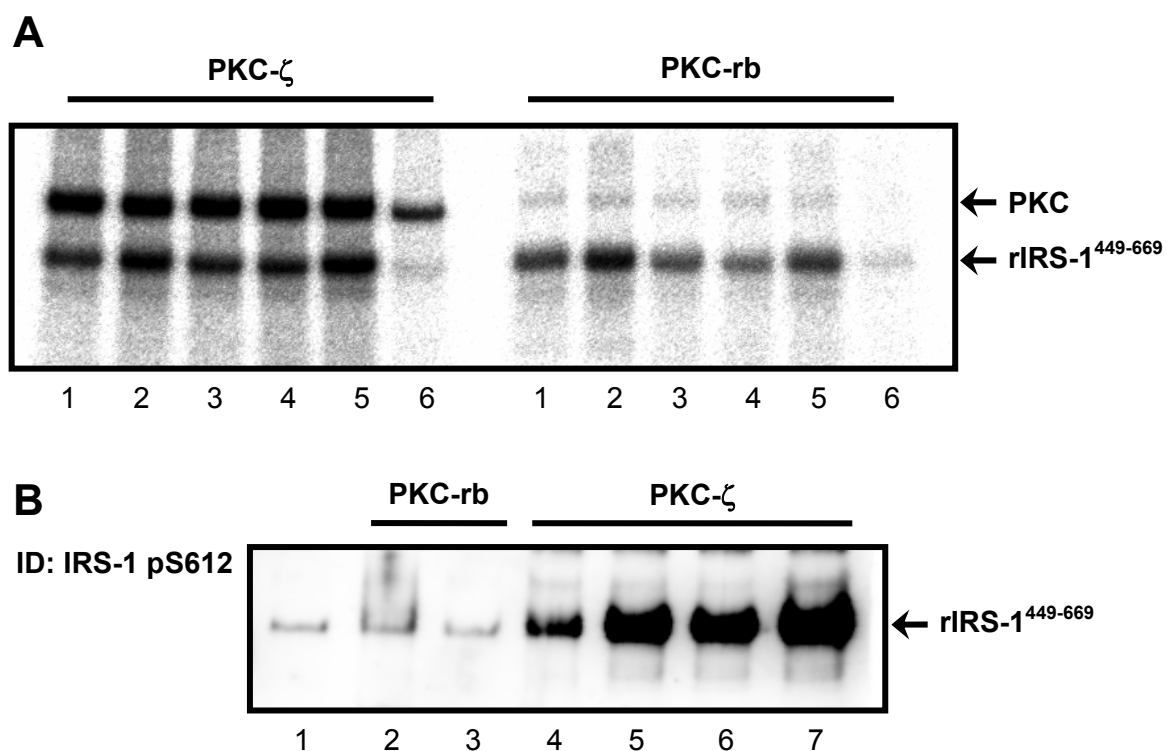
### 3.6 Analyse von rIRS-1<sup>449-664</sup>-Mutanten

#### 3.6.1 *In vitro* Phosphorylierung von S570A, S612A, S612/620A und T604/S620A

Auf Grund der per Immunodetektion und LC-MS Analyse identifizierten PKC- $\zeta$  Phosphorylierungsstellen Serin 498, 570 und 612 in rIRS-1<sup>449-664</sup> und nach theoretischen Sequenzanalysen wurden die genannten Aminosäuren sowie das Threonin 604 und das Serin 620 durch Ortsspezifische Mutagenese ausgehend von der Wildtyp-Vorlage pGEX-5X-3-rIRS-1<sup>449-664</sup> in ein Alanin ausgetauscht. Mit Hilfe dieser Mutationen sollten die ermittelten Phosphorylierungsstellen validiert und untersucht werden. Das Plasmid pGEX-5X-3-rIRS-1<sup>449-664</sup>-S498A wurde von Frau Magdalene Stosik (DDFI) angefertigt. Mit den so generierten Plasmiden wurden *E. coli* BL21 Codon Plus Zellen transformiert und die mutierten GST-Fusionsproteine aufgereinigt. Die eingefügten Mutationen wurden jeweils per Sequenzanalyse der Plasmid-DNA, die von der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt wurden, durch Restriktionskartierung und über Silberfärbung der SDS-Gele sowie Immunodetektion der aufgereinigten Proteine auf ihre Richtigkeit hin überprüft (Daten nicht gezeigt).

Die aufgereinigten Mutanten von rIRS-1<sup>449-664</sup> wurden zusammen mit dem Wildtyp zunächst unter den bereits beschriebenen Bedingungen von den PKC Isoformen aus dem Rattengehirn und der PKC- $\zeta$  *in vitro* phosphoryliert (3.3.3) und der Einbau von Phosphat per Autoradiographie und Immunodetektion analysiert. In Abbildung 31 A ist eine repräsentative Autoradiographie einer solchen *in vitro* Phosphorylierung dargestellt. Der Austausch von Serin 570 sowie von Threonin 604 und Serin 612 in der Doppelmutante gegen ein Alanin resultierten im Vergleich zum Wildtyp in einer Verdopplung des Phosphateinbaus. Dagegen führte der Austausch von Serin 612 alleine und von Serin 612 zusammen mit Serin 620 zu keinem signifikanten Unterschied.

Die Analyse der Mutanten mittels Immunodetektion mit dem Antiserum gegen die Phosphoform von Serin 612 erbrachte kein verwertbares Ergebnis, da der Antikörper bei den mit Serin 612 zu Alanin mutierten Fusionsproteinen eine besonders hohe Affinität zeigte (Abb. 31 B).



**Abb. 31:** *In vitro* Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup>-Mutanten durch die PKC. Je 1  $\mu$ g von rIRS-1<sup>449-664</sup> und Mutanten wurden mit 0,5  $\mu$ g PKC- $\zeta$  oder PKC-rb für 30 min bei 30°C in Gegenwart von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP umgesetzt. Inhibiert wurde die PKC mit 1  $\mu$ M BIM oder 400  $\mu$ M PKC- $\zeta$  Pseudosubstrat. Die Proben wurden nach Zugabe von Laemmli-Puffer gekocht und per SDS-PAGE in einem 8-18%igen Gel aufgetrennt. (A) Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt, getrocknet und dann mittels Autoradiographie ausgewertet (Spur 1: Wildtyp, 2: S570A, 3: S612A, 4: S612/620A, 5: T604/S612A, 6: Wildtyp + Inhibitor). (B) Weiterhin wurden die Proteine nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antiserum gegen die Phosphoform des IRS-1 Serins 612 immunodetektiert (Spur 1: Wildtyp, 2: Wildtyp, 3: Wildtyp + BIM, 4: Wildtyp, 5: S612A, 6: S612/620A, 7: T604/S612A).

### 3.6.2 Vergleichende Phosphopeptidkartierung der rIRS-1<sup>449-664</sup>-Mutanten S498A, S570A und S612A

Nachfolgend wurden die rIRS-1<sup>449-664</sup>-Mutanten S498A, S570A und S612A mit Hilfe der Phosphopeptidkartierung mit einander verglichen. Dafür wurden wie bereits in 3.5.5 beschrieben je 1 nmol rIRS-1<sup>449-664</sup>-S498A, rIRS-1<sup>449-664</sup>-S570A und rIRS-1<sup>449-664</sup>-S612A mit 0,1 nmol PKC- $\zeta$  in Gegenwart von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP umgesetzt, per SDS-PAGE aufgetrennt und dann im Gel tryptisch gespalten. Der Phosphateinbau in rIRS-1<sup>449-664</sup> und Mutanten betrug dabei etwa nur ein zehntel im Vergleich mit der *in vitro* Phosphorylierung im kleinen Maßstab (Tab. 9 & 3.3.3). Interessanterweise resultierte der Austausch der Serine zu Alanin unter den oben genannten Bedingungen nicht in einer wie zuvor beobachteten Verdopplung des Phosphateinbaus (s. Abb. 31).

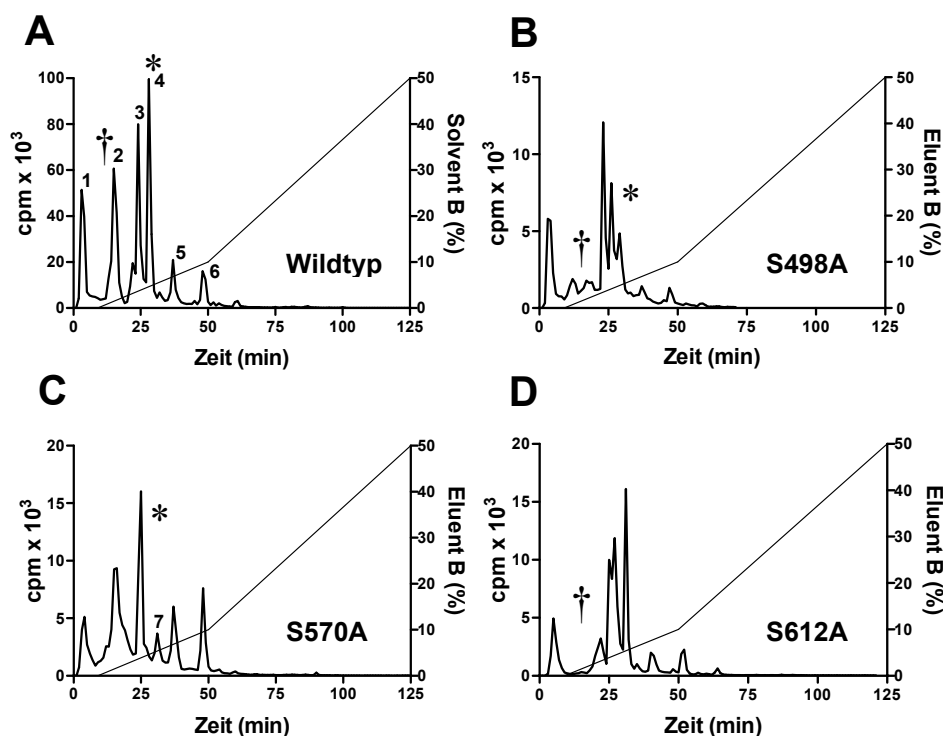
**Tab. 9:** Phosphateinbau unter HPLC-Bedingungen.

	Phosphateinbau (mol/mol)	
Wildtyp	0,086 ± 0,017	(n = 5)
S570A	0,095 ± 0,028	(n = 2)
S612A	0,092	(n = 1)

Für die HPLC-Analysen wurden jeweils viermal 250 pmol rIRS-1<sup>449-664</sup> mit 2,5 U PKC- $\zeta$  für 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und die rIRS-1<sup>449-664</sup>-Gelbanden ausgeschnitten. Der Phosphateinbau jeder Bande wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung quantifiziert.

Die Peptide wurden mit einer Anionenaustauscher-Säule aufgetrennt und deren Elution durch Messen der Radioaktivität in den gesammelten Fraktionen analysiert (Abb. 32 A-D und Abb. 33). In den Elutionsprofilen der Mutanten finden sich im Vergleich zum Wildtyp Unterschiede. So sind im Phosphorylierungsmuster von rIRS-1<sup>449-664</sup>-S498A die Peaks 2 und 4 aufgespalten in je zwei neue (Abb. 32 B). In der MS wurde das Peptid 277–303 mit dem phosphorylierten Serin 498 in Peak 5 und 6 identifiziert, im Elutionsprofil der Mutante findet sich bei diesen Peaks allerdings kein Unterschied zum Wildtyp. Der Austausch von Serin 570 zu Alanin dagegen führte zu dem Verlust von Peak 4 (Abb. 32 C). Ein zuvor nach Peak 4 eluierender, nahe dem Hintergrund liegender Peak wurde größer und wurde daher als Peak 7 bezeichnet, der Anteil an der Gesamtradioaktivität betrug nun 6,7%. Der Inhalt wurde per ESI-MS analysiert, es fand sich das Peptid mit der Sequenz VAHTPPARGEEELSNYICMGGK. Dieses Peptid wurde zuvor beim Wildtyp auch im Peak 4 identifiziert, vermutlich durch Überlappung der beiden Peaks. Durch den Austausch von Serin 570 zu Alanin haben die Peaks 5 und 6 deutlich an Höhe und

Umfang gewonnen, in Zahlen ausgedrückt 4,8% und 5,8% beim Wildtyp zu 9,3% und 9,8% der S570A-Mutante (Tab. 10). Die Mutation von Serin 612 führte zu einer Abnahme und Verschiebung von Peak 2 im Elutionsprofil, konsistent mit dem Ergebnis der ESI-MS-Analyse, wo in einem der in Peak 2 identifizierten 4 Peptide das Serin 612 enthalten ist (Abb. 32 D). Beim Wildtyp betrug die Menge an inkorporierter Radioaktivität in Peak 2 20,7%, bei der S612A-Mutante sind es dagegen 10,5%. Dagegen hat Peak 3 deutlich an Menge zugenommen (21,2% zu 35,4%), der Rest blieb unverändert (Tab. 10).



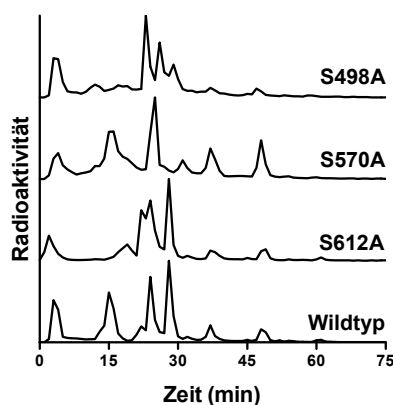
**Abb. 32: Anionenaustausch-Chromatographie tryptischer Phosphopeptide der rIRS-1<sup>449-664</sup>-Mutanten S498A, S570A und S612A.** Für eine vergleichende Phosphopeptidkartierung wurden nach *in vitro* Phosphorylierung durch die PKC- $\zeta$  die tryptischen Peptide generiert aus je 1 nmol Wildtyp rIRS-1<sup>449-664</sup> (A), der Mutante rIRS-1<sup>449-664</sup>-S498A (B), der Mutante rIRS-1<sup>449-664</sup>-S570A (C) und der Mutante rIRS-1<sup>449-664</sup>-S612A (D) mittels Anionenaustausch-HPLC aufgetrennt. Repräsentative HPLC Elutionsprofile sind dargestellt. Die Symbole † und \* weisen auf Peaks hin, die durch das Mutieren der entsprechenden Serine zu Alanin reduziert wurden oder komplett verschwunden sind.

Im Mittel fanden sich  $83,7 \pm 0,8\%$  der in der Anionenaustausch-Chromatographie eluierten Radioaktivität in den 6 untersuchten Hauptpeaks, die von der PKC- $\zeta$  auf rIRS-1<sup>449-664</sup> und die untersuchten Mutanten übertragene relative Menge an Phosphat blieb gleich. Es wurde stattdessen eine Verschiebung zwischen den Peaks bzw. Phosphorylierungsstellen beobachtet (Tab. 10).

**Tab. 10:** Vergleich der inkorporierten Menge an  $^{32}\text{P}$  von Wildtyp und Mutanten in der Anionenaustausch-Chromatographie.

	Peak (Menge $^{32}\text{P}$ in %) <sup>a</sup>							Σ
	1	2	3	4	5	6	7	
Wildtyp	12,9	20,7	21,2	18,8	5,8	4,8	-	84,2
S498A	15,3	15,2	19,7	26,0	3,4	3,0	-	82,6
S570A	10,5	28,5	23,0	-	9,8	9,3	6,7	81,8
S612A	11,2	10,5	35,4	19,4	5,5	4,5	-	86,5
Wildtyp + PKC-rb	11,2	18,4	35,9	10,6	4,1	3,1	-	83,3

<sup>a</sup>Peakzuordnung der Abbildung 32 entnehmen.



**Abb. 33:** Vergleichende Darstellung der Anionenaustausch-Chromatographie der rIRS-1<sup>449-664</sup>-Mutanten nach PKC-ζ Phosphorylierung.

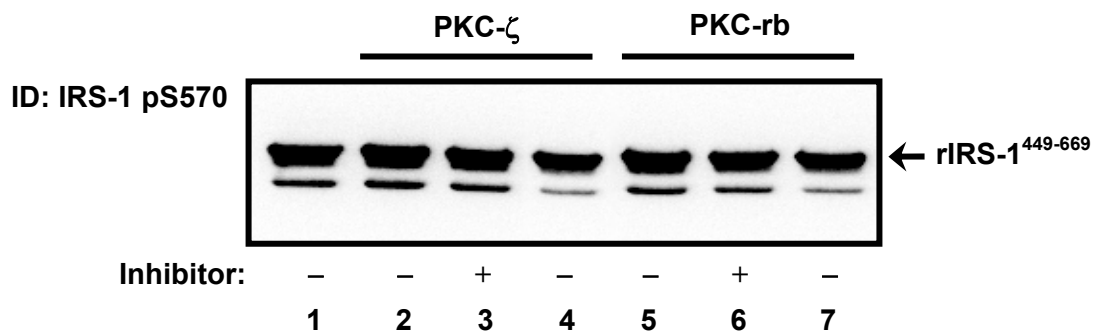
### 3.6.3 Mutationsanalyse von Peptid 322–351 aus Peak 3

Keine Phosphosite konnte per ESI-MS in dem Peptid 322–351 mit der Aminosäuresequenz TPSQSSVVSIEEYTEMMPAAYPPGGSGGR aus Peak 3 identifiziert werden. Dieses Peptid deckt ebenfalls wie das Peptid 352–378 aus Peak 4 mit der durch Mutagenese validierten Phosphosite 358/570 in etwa ein Fünftel der Radioaktivität in der Anionenaustausch-Chromatographie ab und sollte somit eine zweite PKC-ζ Hauptphosphorylierungsstelle beinhalten. Da das Peptid 322–351 mit 2 Threoninen und 5 Serinen 7 mögliche Akzeptoren für eine Phosphorylgruppe aufweist, wurde daher zunächst die Aminosäuresequenz gemäß dem Konsensus-Motiv der PKC-ζ auf mögliche Sites hin analysiert. Das Threonin 322 (HQT**S**Q) und Serin 348 (GGG**S**GGR) wurden als hoffnungsvollste Kandidaten einer potentiellen Phosphorylierungsstelle ausgewählt und durch Ortspezifische

Mutagenese von Frau Stosik (DDFI) zu Alanin mutiert. Die aufgereinigten mutierten Proteine wurden dann per Anionenaustausch-Chromatographie analysiert. Durch den Austausch von Threonin 322 und Serin 348 in ein Alanin wurde in der HPLC-Analyse im Elutionsprofil kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt (Daten nicht gezeigt). Weitere Mutationsanalysen des verbleibenden Threonins und der 4 Serine zur Identifizierung der beteiligten Aminosäuren wurden nicht durchgeführt.

### 3.6.4 Austesten von Antiseren gegen pS570

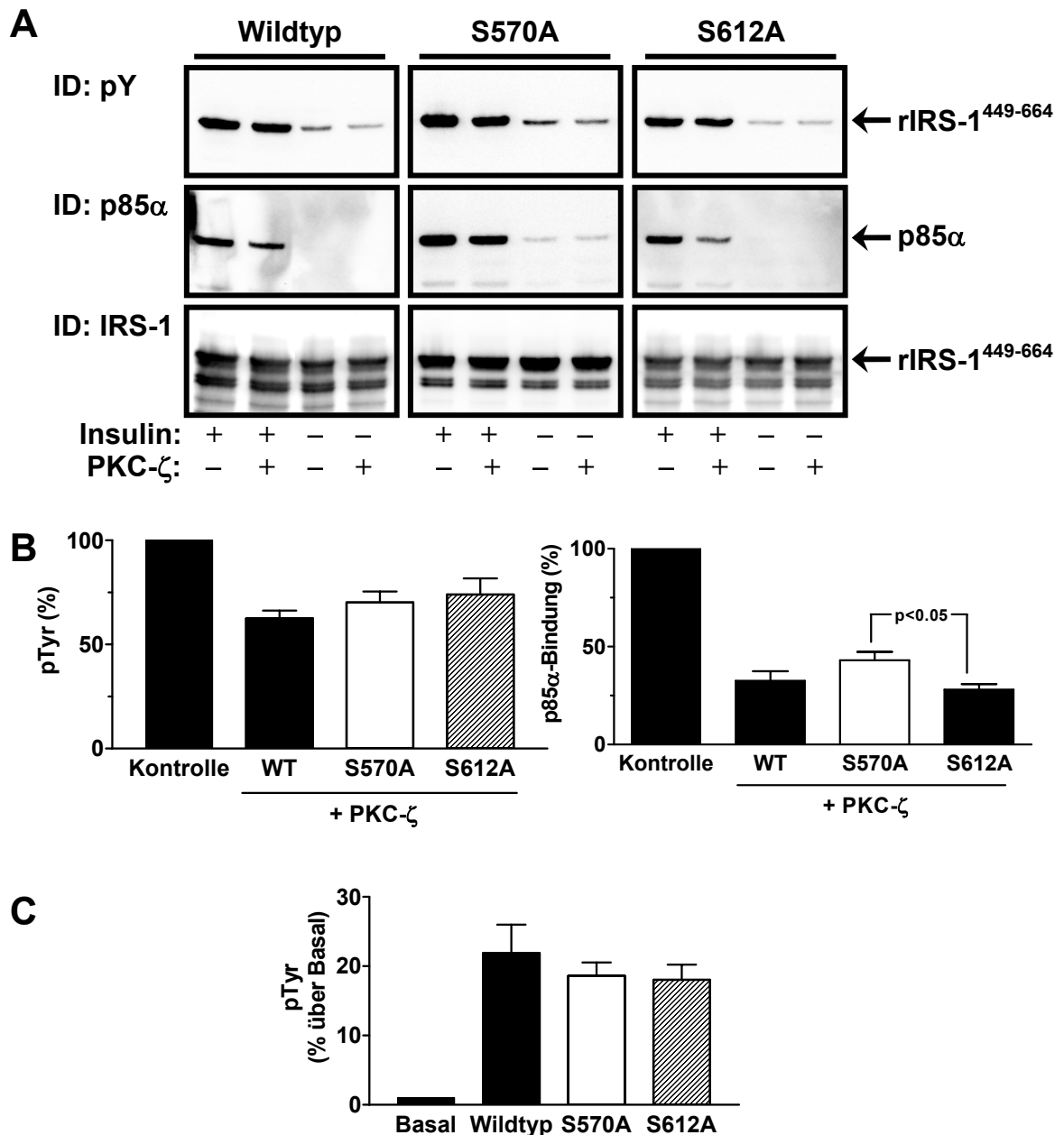
Auf Grund der durch MS- und Mutationsanalyse in rIRS-1<sup>449-664</sup> validierten PKC-Phosphorylierungsstelle Serin 570 wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Firma Aventis Pharma Deutschland GmbH durch Herrn Dr. Norbert Tennagels die Generierung von Antiseren gegen die Phosphoform von Serin 570 bei der Firma Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX, USA) in Auftrag gegeben. Das Immunisieren von Kaninchen erfolgte mit einem Peptid, das die Phosphoform dieser Aminosäure trägt. Die über eine Sepharose 4B Säule affinitätsgereinigten Antiseren von 4 Tieren wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Tennagels zur Verfügung gestellt und durch die *in vitro* Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> mit der PKC ausgetestet. Wie in 3.3.3 beschrieben, wurde je 1 µg rIRS-1<sup>449-664</sup> oder 1 µg der Mutante rIRS-1<sup>449-664</sup>-S570A mit 0,5 µg PKC phosphoryliert und nach SDS-PAGE auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Die Membranen wurden dann mit den 4 Seren in Verdünnungen von 1 : 500–1.000 in TBS Tween 0,1% mit 1% BSA inkubiert und per ECL-Detektion analysiert (Abb. 34). Im Western Blot zeigten die Antiseren unter den gewählten Versuchsbedingungen eine spezifische Bindung des Fusionsproteins rIRS-1<sup>449-664</sup>, allerdings war kein signifikanter Unterschied der Signalstärken nach PKC-Phosphorylierung im Vergleich zur unmodifizierten Kontrolle messbar.



**Abb. 34: Überprüfung eines im Kaninchen generierten Antiserums gegen die Phosphoform des IRS-1 Serins 570.** Zum Austesten der freundlicherweise von Herrn Dr. Norbert Tennagels zur Verfügung gestellten 4 Antiseren gegen die Phosphoform von Serin 570 wurde je 1  $\mu\text{g}$  rIRS-1<sup>449-664</sup> oder die Mutante rIRS-1<sup>449-664</sup>-S570A für 30 min mit je 0,5  $\mu\text{g}$  PKC-rb oder PKC- $\zeta$  bei 30°C inkubiert. Nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulose wurde dann mit den Antiseren immunodetektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot mit dem Antiserum von Tier 8098, eingesetzt in einer Verdünnung von 1 : 1.000 in TBS Tween 0,1% mit 1% BSA (alle Spuren mit je 1  $\mu\text{g}$  rIRS-1<sup>449-664</sup> außer Spur 4 & 7: 1  $\mu\text{g}$  rIRS-1<sup>449-664</sup>-S570A).

### 3.6.5 Untersuchungen der Mutanten S570A und S612A im GST-Pulldown Assay

Um den Anteil der PKC-Phosphorylierungsstellen Serin 570 und Serin 612 an dem zuvor beschriebenen negativen Einfluss der PKC auf die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> und die Interaktion mit der PI 3-Kinase zu charakterisieren, wurden die rIRS-1<sup>449-664</sup>-Mutanten S570A und S612A im GST-Pulldown Assay eingesetzt und mit dem Wildtyp verglichen. Wie in 3.4.1 beschrieben wurden daher je 1  $\mu\text{g}$  des Wildtyps, der Mutante S570A oder der Mutante S612A durch 0,5  $\mu\text{g}$  PKC- $\zeta$  phosphoryliert, um dann nach Inkubation mit dem Insulinrezeptor und GST-Pulldown durch Immunodetektion das Ausmaß der Tyrosin-Phosphorylierung und Bindung von p85 $\alpha$  zu bestimmen. In Abbildung 35 sind repräsentative Ergebnisse aus 3–6 Einzelexperimenten dargestellt. Nach einer Vorbehandlung der Mutanten mit der PKC- $\zeta$  wurde aus den quantifizierten Phosphosignalen des rIRS-1<sup>449-664</sup> eine im Vergleich mit dem Wildtyp leicht geringere Inhibition beobachtet, die aber nicht signifikant war (Abb. 35 B). Die Bindung von p85 $\alpha$  an die Serin-phosphorylierten rIRS-1<sup>449-664</sup>-Mutanten war, wie zuvor beim Wildtyp bestimmt, ebenfalls massiv gestört, nur der Austausch von Serin 570 zu Alanin führte zu einer signifikanten Besserung dieser Störung um etwa 10%.



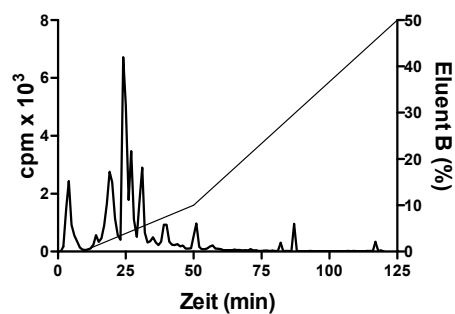
**Abb. 35: Funktionelle Analyse von Serin 570 und Serin 612.** (A) rIRS-1<sup>449-664</sup> und die Mutanten S570A und S612A wurden mit PKC-ζ vorinkubiert, anschließend durch den IR an Tyrosinen phosphoryliert und die Interaktion mit p85α im GST-Pulldown Assay bestimmt, wie bereits in Abb. 18 beschrieben. Abgebildet sind repräsentative Westernblots. (B) Unter Verwendung der Lumilmager Software wurden die Signale quantifiziert und auf den insulinstimulierten Kontrollwert bezogen, der gleich 100% gesetzt wurde. (C) Ebenfalls bestimmt wurde der insulinstimulierte Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung über Basal der jeweiligen Kontrolle ohne PKC-ζ Vorinkubation, hier aufgeführt nach Normierung auf den Basalwert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM aus 3–6 Experimenten.

### 3.7 Phosphorylierungsmuster der PKC Isoformen aus dem Rattengehirn

Da in den zuvor beschriebenen Phosphorylierungsreaktionen (3.3.3) gezeigt werden konnte, dass neben der PKC-ζ auch das Isoformengemisch α, β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub> und γ aus dem



Gehirn der Ratte das Fusionsprotein rIRS-1<sup>449-664</sup> als Substrat erkennt und durch die Übertragung von Phosphorylgruppen kovalent modifiziert, sollte das Phosphorylierungsmuster von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch diese Kinasen mit Hilfe der HPLC-Phosphopeptidkartierung untersucht werden. Dafür wurde 1 nmol rIRS-1<sup>449-664</sup> mit 1,3 U des PKC-Isoformengemisches aus dem Rattengehirn für 60 min in Gegenwart von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP bei 30°C inkubiert und dann nach SDS-PAGE und tryptischer Spaltung mittels Anionenaustausch-HPLC analysiert. In Abbildung 36 ist ein repräsentatives Elutionsprofil dargestellt. Die Peptide eluierten ebenfalls wie nach der Phosphorylierung durch die PKC- $\zeta$  in 6 ausgeprägten Radioaktivität enthaltenden Peaks. Im Vergleich zum PKC- $\zeta$  Elutionsprofil (Abb. 32 A) gab es allerdings eine deutliche Bevorzugung des Peptids 322–351 in Peak 3, der Anteil an der Gesamtradioaktivität betrug 35,9% (Tab. 10). Das für Peak 4 verantwortliche Peptid 352–378 mit dem Serin 358/570 wurde in wesentlich geringerem Umfang phosphoryliert, so betrug der Anteil an inkorporiertem Phosphat nur 10,6%. Die restlichen Peaks waren in Menge an Radioaktivität und Verhältnis zueinander direkt mit dem PKC- $\zeta$ -Elutionsprofil vergleichbar.

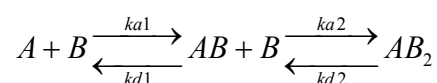


**Abb. 36: Phosphopeptidkartierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> nach Phosphorylierung durch die PKC aus dem Rattengehirn.** 1 nmol rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde mit 1,3 U der PKC Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$  aus dem Gehirn der Ratte für 1 h bei 30°C inkubiert, anschließend per SDS-Gel aufgetrennt und tryptisch im Gel gespalten. Das Phosphopeptidmuster wurde dann nach der Elution der Peptide aus dem Gel mittels Anionenaustausch-HPLC bestimmt.

### 3.8 Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA)

Das Ziel der folgenden Versuche war es, den Einfluss des Phosphoserins 612 auf die Interaktion zwischen IRS-1 und der PI 3-Kinase mit Hilfe einer biomolekularen Interaktionsanalyse basierend auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz zu charakterisieren. Zuvor konnte unter Verwendung eines spezifischen Antiserums gezeigt werden, dass das Serin 612 in rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die PKC *in vitro* phosphoryliert wird (Abb. 24). Das Serin 612 liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem der primären Bindungsstellen der regulatorischen Untereinheit p85 $\alpha$  der PI 3-Kinase an das IRS-1, dem YMXM-Motiv um Tyrosin 608 von IRS-1 (Esposito et al., 2001). Die Bindung der regulatorischen Untereinheit p85 $\alpha$  an dieses Motiv erfolgt hochspezifisch über seine SH2-Domänen, wenn das Tyrosin in seiner Phosphoform vorliegt. Da das Serin 612 nur 4 Aminosäuren stromabwärts liegt (YMPMS), ergab sich die Frage, inwiefern die Phosphoform dieses Serins die genannte Bindung beeinflusst.

Zur Umsetzung dieser Fragestellung sollte mit einem BIAcore X der Firma BIAcore AB (Uppsala, Schweden) die Interaktion von rekombinant hergestelltem p85 $\alpha$  mit den unterschiedlichen Phosphorylierungsformen eines Peptids der Sequenz DDGYMPMSPGV bestimmt werden. Das Peptid repräsentiert die Aminosäuren 605–615 aus dem IRS-1 der Ratte. Vier verschiedene Versionen dieses Peptids wurden auf ihre Affinität zu p85 $\alpha$  hin untersucht. Die Peptide wurden mit Y608 (DDGYMPMSPGV), pY608 (DDGpYMPMSPGV), pS612 (DDGYMPMpSPGV) und pY608-pS612 (DDGpYMPMpSPGV) bezeichnet. Das p85 $\alpha$  wurde als GST-Fusionsprotein aus *E. coli* aufgereinigt, der GST-Anteil wurde anschließend proteolytisch entfernt, um die in der Literatur beschriebene Dimerisierung über das GST auszuschließen (Ladbury et al., 1995). Da das p85 $\alpha$  sowohl eine N- als auch eine C-terminale SH2-Domäne besitzt, wurde eine zweistufige Reaktion gemäß folgender Reaktionsgleichung angenommen:

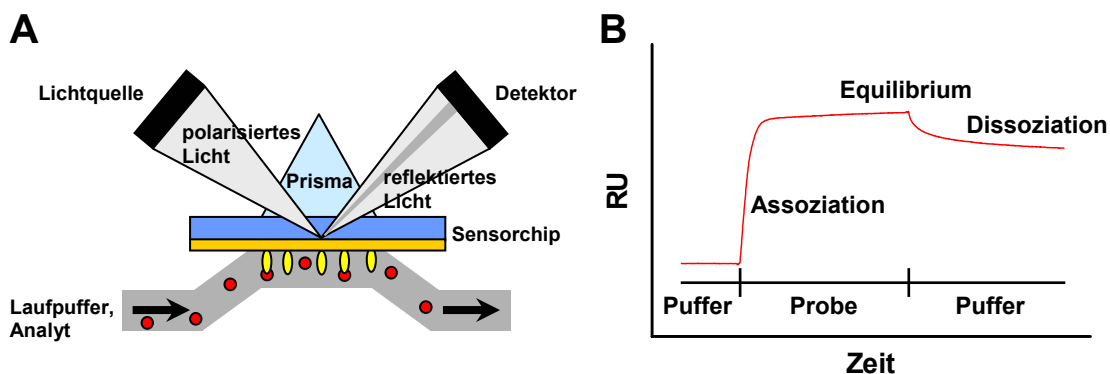


(A = Analyt, B = Ligand, AB bzw. AB<sub>2</sub> = Komplex aus Analyt und Ligand, k<sub>a</sub> = Assoziationsrate, k<sub>d</sub> = Dissoziationsrate)

### 3.8.1 Interaktionsanalysen mit dem BIAcore X

Die kontaktlose Echtzeitmessung von Interaktionen im BIAcore X beruht auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz, die bei Totalreflexion von Licht an einer leitenden Oberfläche entsteht. Gemessen wird hierbei die Masseänderung auf einem speziellen Sensorchip. Auf dem Sensorchip wird ein Bindungspartner (Ligand) immobilisiert, über den anschließend Laufpuffer oder der zweite Bindungspartner (Analyt) in Laufpuffer geleitet wird. Die dabei vom Gerät gemessene Massezu- oder -abnahme wird als so genanntes Sensorgramm ausgegeben. Wird ein Analyt in einem diskreten Puls über eine Ligandenoberfläche injiziert, kann man das resultierende Sensorgramm in drei Phasen teilen (Abb. 37):

- Die Assoziation des Analyten an den Liganden während der Injektion,
- das Equilibrium oder die Gleichgewichtsphase, wo sich das Binden des Analyten mit dessen Dissoziation im Gleichgewicht befindet und
- die Dissoziation des Analyten von der Chipoberfläche nach Umschalten auf den Laufpuffer.

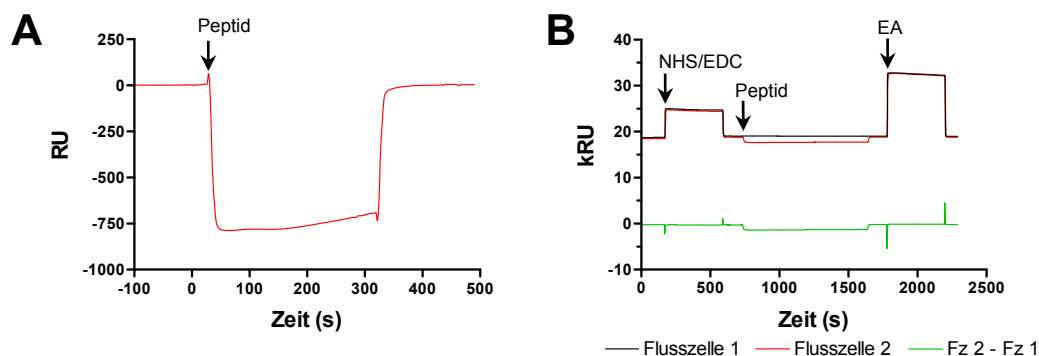


**Abb. 37: Messsystem und Sensorgramm im BIAcore X.** (A) Schematische Darstellung des Messsystems im BIAcore X. Die Echtzeitmessung von biomolekularen Interaktionen beruht im BIAcore X auf dem physikalischen Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz. Das Anlagern bzw. Ablösen von Material in der Messzelle wird kontaktlos gemessen und in relativen Einheiten (RU = Relative Units) gegen die Zeit als sogenanntes Sensorgramm dargestellt (B). Die Messkurve einer Bindungsanalyse kann in drei Phasen eingeteilt werden: Die Assoziation, das Equilibrium oder auch Gleichgewicht und die Dissoziation. Aus den gemessenen Kurven lassen sich die Bindungsraten und Affinitäten der Bindung ableiten.

Die Phasen der Assoziation und Dissoziation enthalten Informationen von der Kinetik der Analyt-Ligand-Interaktion (Raten der Komplexbildung und Auflösung). Die Equilibrium-Phase beinhaltet Informationen über die Affinität einer Analyt-Ligand-Interaktion (die Stärke einer Bindung).

### 3.8.2 Immobilisierung der Peptide Y608, pY608, pS612 und pY608-pS612

Die Messungen am BIAcore X wurden mit dem Sensorchip CM5 durchgeführt, dessen Oberfläche aus einer carboxymethylierten Dextranmatrix an einem Goldfilm auf einem Glasträger besteht. Die Peptide Y608, pY608, pS612 und pY608-pS612 wurden über freie Aminogruppen unter Verwendung der Standard-Aminkopplung an die Dextranmatrix kovalent gebunden. Dafür wurde in einem ersten Schritt die unspezifische Anlagerung der Peptide an die Dextranmatrix des Sensorchips ausgetestet (Abb. 38 A). Diese unspezifische Bindung über elektrostatische Wechselwirkungen ist abhängig vom pI-Wert des Peptids und dem pH-Wert der Lösung. Eine Vorkonzentration des zu koppelnden Liganden ist notwendig, um bei der eigentlichen Immobilisierung ausreichende Mengen kovalent binden zu können. Der pI-Wert von Y608 beträgt rechnerisch 3,56. Da die gewählte Aminkopplung allerdings bei einem pH-Wert kleiner 3,5 schlecht bis gar nicht funktioniert, wurden die Peptide in einer Konzentration von 5 mg/ml in 100 mmol/l Borat mit einem pH von 8,5 gelöst. Der pH-Wert von 8,5 stellt das pH-Optimum der Aminkopplung dar. Unter diesen Bedingungen konnte eine ausreichende Vorkonzentration der Peptide gemessen werden und so wurden durchschnittlich eine Masse der Peptide zwischen 5–50 RU immobilisiert (Abb. 38 B). Dies entsprechen etwa 5–50 pg Peptid/mm<sup>2</sup> Flusszelle bzw. 4–37 fmol/mm<sup>2</sup> und bei einer Gesamtfläche einer Flusszelle von insgesamt 1,2 mm<sup>2</sup> je 5–44 fmol. Es wurde jeweils nur die Oberfläche von Flusszelle 2 durch das Immobilisieren der Peptide modifiziert, Flusszelle 1 blieb als Kontrolle unverändert.



**Abb. 38: Immobilisierung des Peptids pY608 an einen Sensorchip CM5.** (A) Vorbereitend zur kovalenten Aminkopplung des Peptids pY608 wurde zunächst dessen Bindung über elektrostatische Wechselwirkungen an die Dextranmatrix eines Sensorchip CM5 überprüft. Das Peptid wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml in 100 mmol/l Borat (pH 8,5) injiziert. Dabei kam es zu einem sogenannten Puffersprung in der Messkurve, verursacht durch die Änderung des pH-Wertes. Da daraufhin eine deutliche Anlagerung durch eine Zunahme an RU bei den gewählten Pufferbedingungen beobachtet wurde, wurde anschließend das Peptid über eine manuelle Aminkopplung kovalent in Flusszelle 2 immobilisiert (B). Phasen der Immobilisierung sind die Aktivierung der Carboxylgruppen der Dextranmatrix mit NHS/EDC, das manuelle Injizieren und Koppeln des Peptids sowie die Deaktivierung freier aktiver Gruppen mit Ethanolamin (EA).

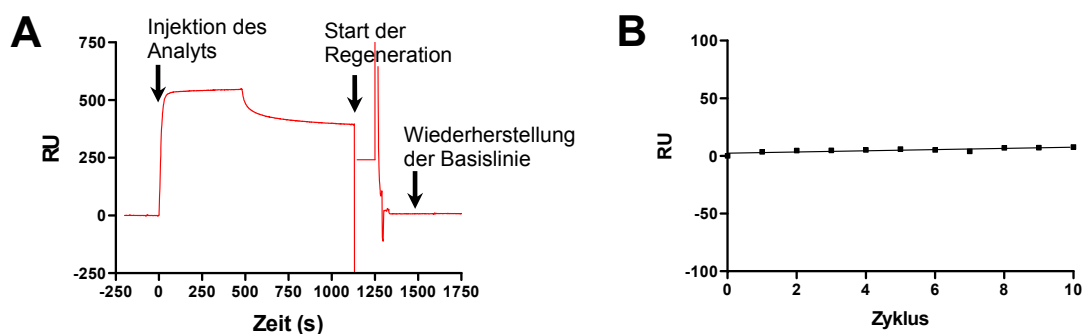
### 3.8.3 Regeneration der Chipoberfläche

Für wiederholte Messungen mit demselben Chip ist die komplette Regeneration der Chipoberfläche essentiell, um für jede Interaktionsmessung die gleichen Bedingungen zu gewährleisten. Dabei gilt es folgendes zu beachten:

- Der Ligand darf durch die Regenerationsmethode nicht verändert werden, sprich seine Funktion verlieren.
- Eine unspezifische Anlagerung von Material auf der Oberfläche gilt es zu vermeiden.
- Eine unvollständige Regeneration führt zu einer Abnahme der freien Anzahl an Bindungsstellen und damit zu verfälschten Messungen.

Regeneriert wurde in den beschriebenen Versuchen nach jeder Interaktionsmessung mit einem Impuls einer 6 M Guanidiniumchlorid-Lösung über zwei Minuten. Kontrolliert wurde nach jedem Zyklus aus Analyt- und Regenerationsinjektion die Basislinie. In Abbildung 39 sind die ausgelesenen Werte von einem CM5-Chip mit immobilisiertem pY608 über mehrere Zyklen aufgetragen. Das Ablösen des Analyten war unter den gewählten Bedingungen vollständig und erfolgte praktisch ohne

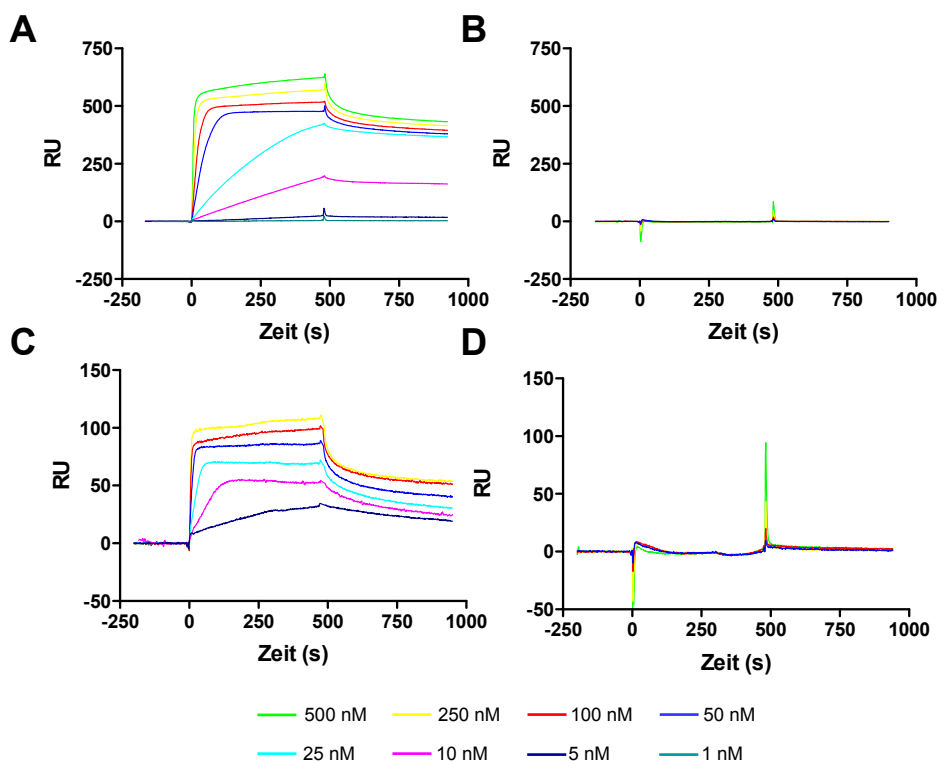
Signalverlust, nur eine sehr geringe Zunahme von Material auf der Chipoberfläche nach jeder Regeneration war zu beobachten.



**Abb. 39: Regeneration der Chipoberfläche.** (A) Zur Regeneration der Chipoberfläche und Wiederherstellung der Basislinie nach jeder Interaktionsmessung mit p85 $\alpha$  wurde eine Lösung aus 6 M Guanidiniumchlorid für 2 min injiziert. Zur Kontrolle der Regenerationseffizienz wurde anschließend die Basislinie vermessen. (B) Die ausgelesenen Werte wurden gegen die Regenerationszyklen aufgetragen.

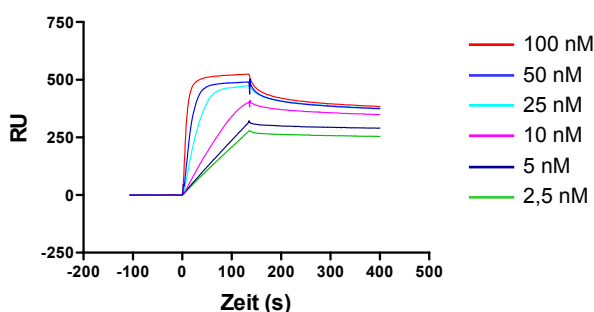
### 3.8.4 Analyse der p85 $\alpha$ -Peptid Interaktionen

Die Analyse der Bindung von p85 $\alpha$  mit den unterschiedlichen Phosphoformen des Peptids mit den Aminosäuren 605–615 des IRS-1 wurde bei einer Temperatur von 25°C und einer Flussgeschwindigkeit von 5  $\mu$ l/min durchgeführt. p85 $\alpha$  wurde für die Bindungsstudien in Laufpuffer aufgenommen und in Konzentrationen von 1–500 nmol/l in das BIAcore X injiziert. Die aufgezeichneten Bindungskurven dieser Interaktionen sind in Abbildung 40 zusammengefasst. Die Bindung von p85 $\alpha$  an das Peptid pY608 zeigte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Bindungsreaktion (Abb. 40 A). Eine Erhöhung der injizierten p85 $\alpha$ -Konzentration führte zu einer höheren Signalantwort, also mehr gebundener Masse an das immobilisierte Peptid pY608. Ohne das Vorhandensein des Phosphotyrosins 608 wurde bei den beiden Peptiden Y608 und pS612 keine messbare Bindung festgestellt (Abb. 40 B & D). Dagegen war die Bindung von p85 $\alpha$  an das Peptid pY608-pS612 wieder deutlich konzentrationsabhängig (Abb. 40 C).



**Abb. 40: Sensorgramme der Interaktionen von p85 $\alpha$  mit den Peptiden pY608 (A), Y608 (B), pY608-pS612 (C) und pS612 (D).** Die Bindung von p85 $\alpha$  mit den unterschiedlichen Phosphoformen des Peptids mit den Aminosäuren 605–615 (DDGYMPMSPGV) des IRS-1 der Ratte wurde bei einer Temperatur von 25°C und einer Flussgeschwindigkeit von 5  $\mu$ l/min durchgeführt. p85 $\alpha$  wurde für diese Bindungsstudien in Laufpuffer aufgenommen und in Konzentrationen von 1–500 nM in das BIAcore X injiziert. Es waren durchschnittlich etwa 5–50 RU des jeweiligen Peptids auf einen Sensorchip CM5 immobilisiert. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf p85 $\alpha$ .

Die p85 $\alpha$ -pY608-Interaktion wurde ebenfalls bei einer höheren Flussgeschwindigkeit von 40  $\mu$ l/min bestimmt. Die aufgezeichneten Messkurven sind in Abbildung 41 zusammengefasst.



**Abb. 41: Sensorgramm der Interaktion von p85 $\alpha$  mit pY608 bei erhöhter Flussgeschwindigkeit.** Das Binden von p85 $\alpha$  an pY608 wurde ebenfalls bei einer erhöhten Flussgeschwindigkeit von 40  $\mu$ l/min und einer Temperatur von 25°C bestimmt.

### 3.8.5 Bestimmung der Affinitäten

Aus den gemessenen Bindungskurven jeder einzelnen Interaktion lassen sich durch eine nicht-lineare Regression die Bindungsraten und Affinitäten der Reaktion ableiten. Die Auswertung der Bindungskurven wurde mit dem Programm BIAevaluation 3.1 durchgeführt. Die mathematische Näherung an die Kurven erfolgte dabei nach dem ‚Langmuir 1:1 Bindungsmodell‘. Dieses Modell beschreibt die Bindung eines Analyten, der an ein immobilisiertes Ligandenmolekül binden kann. Das Binden des Liganden wird dabei mit einem Satz Ratenkonstanten ( $k_a$ ,  $k_d$ ) beschrieben.

Gleichungen des Modells ‚Langmuir 1:1 Bindungsmodell‘:

$$A = Conc$$

$$B[0] = R \max$$

$$\frac{dB}{dt} = -(k_a \cdot A \cdot B - k_d \cdot AB)$$

$$AB[0] = 0$$

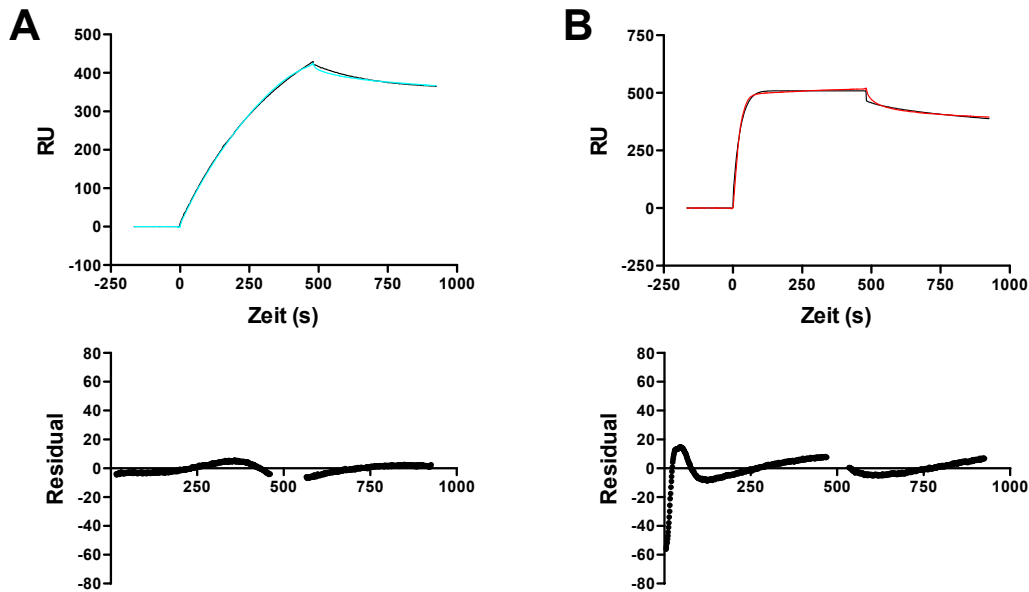
$$\frac{dAB}{dt} = (k_a \cdot A \cdot B - k_d \cdot AB)$$

Total Response :

$$AB + RI$$

Ein globales also gleichzeitiges Auswerten aller gemessenen Kurven mit diesen Gleichungen führte zu keinen sinnvollen Ergebnissen. Daher wurde jede Bindungskurve einzeln gefittet, die Ergebnisse sind in Tabelle 11 für das Peptid pY608 und in Tabelle 12 für das Peptid pY608-pS612 zusammengefasst. In Abbildung 42 sind exemplarisch die Regressionen der Bindungskurven von 25 nmol/l und 100 nmol/l p85 $\alpha$  an pY608 bei einer Flussgeschwindigkeit von 5  $\mu$ l/min dargestellt. Die Beurteilung der Qualität einer Regression erfolgte über den visuellen Vergleich der berechneten mit der gemessenen Kurve, über die Darstellung der Abweichungen jedes Messpunktes zur berechneten Kurve (Residuals) sowie über  $\chi^2$ .





**Abb. 42: Beispiele für die Auswertung gemessener Interaktionen.** Die Auswertung der Sensorgramme erfolgte mit der Software BIAevaluation 3.1, hier beispielhaft an den Kurven von 25 nM p85 $\alpha$  (**A**) und 100 nM p85 $\alpha$  (**B**) an pY608 bei 5  $\mu$ l/min gezeigt. Gefittet wurde nach dem Modell des Bivalenten Analyten. Die berechnete, gefittete Kurve (in schwarz) wurde über die experimentell gemessene gelegt. Zusätzlich dargestellt ist die Abweichung (Residual) der berechneten Kurve zur tatsächlich gemessenen Kurve, was eine weitere Aussage über die Qualität der mathematischen Näherung erlaubt.

**Tab. 11: Ergebnisse der Kurvenauswertung von p85 $\alpha$  an pY608 bei 5  $\mu$ l/min mit dem Modell ‚Langmuir 1:1 Bindung‘.**

Analyt (nM)	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_A$ ( $M^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$R_{max}$ (RU) <sup>a</sup>	$\chi^2$
5	zu große Fehler wegen zu niedriger Konzentration					
10	$2,19 \cdot 10^4$	$2,69 \cdot 10^{-4}$	$8,13 \cdot 10^7$	$1,23 \cdot 10^{-8}$	1920	6,99
25	$9,24 \cdot 10^4$	$2,64 \cdot 10^{-4}$	$3,52 \cdot 10^8$	$2,84 \cdot 10^{-9}$	637	24,2
50	$4,05 \cdot 10^5$	$3,52 \cdot 10^{-4}$	$1,15 \cdot 10^9$	$8,71 \cdot 10^{-10}$	442	115
100	$3,73 \cdot 10^5$	$3,51 \cdot 10^{-4}$	$1,06 \cdot 10^9$	$9,41 \cdot 10^{-10}$	457	92,3
250	$2,17 \cdot 10^5$	$4,01 \cdot 10^{-4}$	$5,4 \cdot 10^8$	$1,85 \cdot 10^{-9}$	486	291
500	$2,06 \cdot 10^5$	$3,99 \cdot 10^{-4}$	$5,16 \cdot 10^8$	$1,94 \cdot 10^{-9}$	506	292
<b>Mittelwert</b>	$2,19 \cdot 10^5$	$3,40 \cdot 10^{-4}$	$6,17 \cdot 10^8$	$3,46 \cdot 10^{-9}$	505,6	
<b>SEM</b>	$0,61 \cdot 10^5$	$2,45 \cdot 10^{-5}$	$1,69 \cdot 10^8$	$1,79 \cdot 10^{-9}$	34,7	

<sup>a</sup>  $R_{max}$  ist die berechnete maximale Menge an Analyt, die gebunden werden kann.

**Tab. 12:** Ergebnisse der Kurvenauswertung von p85 $\alpha$  an pY608-pS612 bei 5  $\mu$ l/min mit dem Modell ‚Langmuir 1:1 Bindung‘.

Analyt (nM)	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_A$ ( $M^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$R_{max}$ (RU) <sup>a</sup>	$\chi^2$
5	$6,99 \cdot 10^5$	$9,28 \cdot 10^{-3}$	$7,53 \cdot 10^8$	$1,33 \cdot 10^{-9}$	44,1	1,15
10	$1,31 \cdot 10^6$	$1,59 \cdot 10^{-3}$	$8,25 \cdot 10^8$	$1,21 \cdot 10^{-9}$	52,8	6,02
25	$1,41 \cdot 10^6$	$1,52 \cdot 10^{-3}$	$9,26 \cdot 10^8$	$1,08 \cdot 10^{-9}$	56,6	5,37
50	$1,24 \cdot 10^6$	$1,12 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^9$	$9,05 \cdot 10^{-10}$	63,9	9,04
100	$9,93 \cdot 10^5$	$7,91 \cdot 10^{-4}$	$1,26 \cdot 10^9$	$7,97 \cdot 10^{-10}$	70,3	11,3
250	$5,03 \cdot 10^5$	$7,40 \cdot 10^{-4}$	$6,8 \cdot 10^8$	$1,47 \cdot 10^{-9}$	72,1	11,5
<b>Mittelwert</b>	$1,03 \cdot 10^6$	$1,12 \cdot 10^{-3}$	$9,26 \cdot 10^8$	$1,13 \cdot 10^{-9}$	60,0	
<b>SEM</b>	$0,15 \cdot 10^6$	$1,50 \cdot 10^{-4}$	$9,06 \cdot 10^7$	$1,04 \cdot 10^{-10}$	4,4	

<sup>a</sup>  $R_{max}$  ist die berechnete maximale Menge an Analyt, die gebunden werden kann.

Die aus den Bindungsraten der Interaktion von p85 $\alpha$  mit den Peptiden pY608 und pY608-pS612 ermittelten Affinitäten sind noch einmal in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tab. 13:** Ermittelte Affinitäten der Interaktion von p85 $\alpha$  mit pY608 und pY608-pS612.

	$K_A$ ( $M^{-1}$ )	$K_D$ (M)
<b>pY608</b>	$6,17 \pm 1,69 \cdot 10^8$	$3,46 \pm 1,8 \cdot 10^{-9}$
<b>pY608-pS612</b>	$9,26 \pm 90,6 \cdot 10^8$	$1,13 \pm 0,1 \cdot 10^{-9}$

In einer weiteren Auswertung wurden aus den SPR-Signalen im Equilibrium der Bindungskurven die Affinitäten abgeleitet. Diese sind in Tabelle 14 aufgelistet.

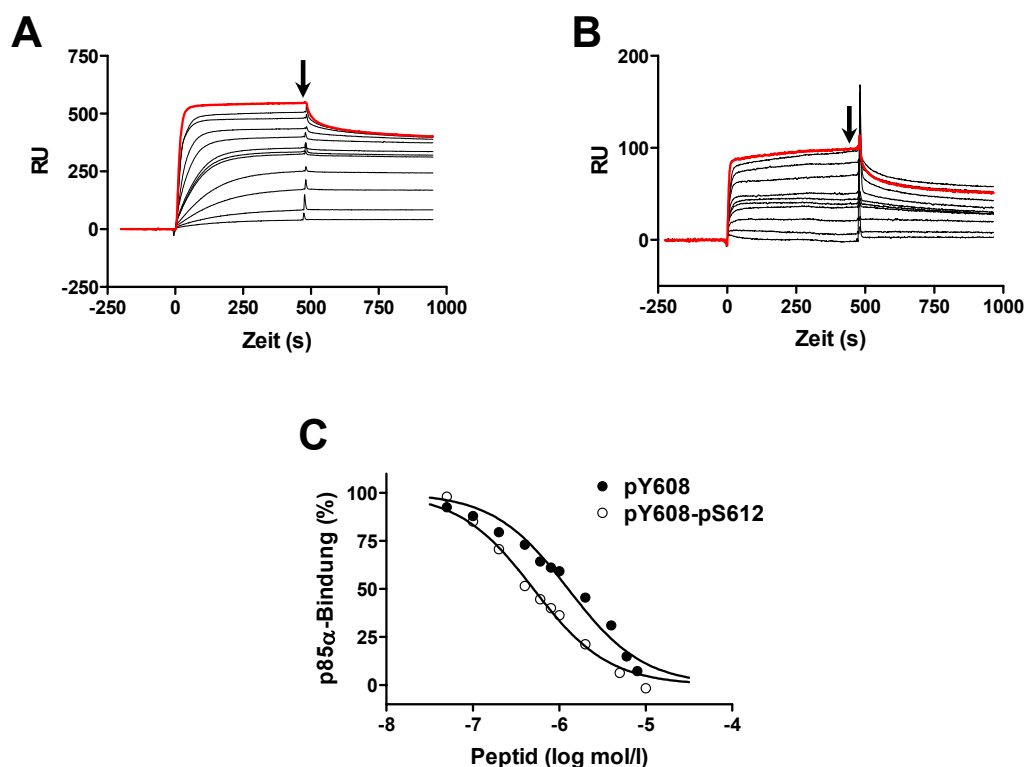
**Tab. 14:** Equilibriumanalyse.

	$K_A$ ( $M^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$\chi^2$
<b>pY608</b>	$4,46 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^{-8}$	2760
<b>pY608-pS612</b>	$7,69 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^{-8}$	11,4

### 3.8.6 Wettbewerbsstudien

In einem weiteren Ansatz sollten die relativen Affinitäten, der so genannte  $IC_{50}$ -Wert der beiden Phosphopeptide pY608 und pY608-pS612 zu p85 $\alpha$  in Wettbewerbsstudien bestimmt werden (nach Vely et al., 2000). Dafür wurde das jeweils auf dem Chip immobilisierte Peptid ebenfalls frei in Lösung in variabler Konzentration mit einer konstanten Konzentration von p85 $\alpha$  vorinkubiert und dann in das BIAcore injiziert. Das freie Peptid wettbewerbt dabei mit dem Peptid auf der Chipoberfläche um die freien Bindungsstellen des p85 $\alpha$ . Der daraus abgeleitete  $IC_{50}$ -Wert gibt die halb-maximale inhibitorische Konzentration des wettbewerbenden Peptids an. Bei dem Vergleich zweier Peptide ist das Ratio ihrer Dissoziationskonstanten  $K_D$  gleich dem der  $IC_{50}$ -Werte der Hemmung.

Zunächst wurde jeweils 100 nmol/l p85 $\alpha$  mit Peptidkonzentrationen von 0,05–10  $\mu$ mol/l bei Raumtemperatur 1 Stunde vorinkubiert. Die Lösungen wurden dann bei einer Flussgeschwindigkeit von 5  $\mu$ l/min und einer Temperatur von 25°C in das BIAcore X injiziert. Die aufgezeichneten Bindungskurven sind in Abbildung 43 A und B dargestellt. Im Gleichgewichtsbereich der aufgezeichneten Bindungskurven wurden die SPR-Signale 440 s nach der Injektion ausgelesen und gegen die verwendete Inhibitorenkonzentration graphisch aufgetragen. Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4.0 wurden dann die  $IC_{50}$ -Werte mit einem ein Bindungsstellen-Wettbewerbsmodell (One Site Competition) ermittelt (Abb. 43 C).



**Abb. 43: Bestimmung des  $IC_{50}$  mittels Wettbewerbsversuche.** Durch kompetitiver Hemmung der  $p85\alpha$ -Bindung wurden die halb-maximalen inhibitorischen Konzentrationen ( $IC_{50}$ ) der Peptide pY608 (A) und pY608-pS612 (B) bestimmt. Dafür wurde  $p85\alpha$  in einer Konzentration von 100 nM in Laufpuffer mit unterschiedlichen Konzentrationen löslichem Peptid pY608 oder pY608-pS612 für 1 h vorinkubiert und dann bei 25°C und 5  $\mu$ l/min Flussgeschwindigkeit in das BIAcore X injiziert. Die Peptide in Lösung waren ebenfalls gekoppelt auf dem Sensorchip CM5. Die rot hervorgehobene Kurve zeigt die ungehemmte Interaktion von 100 nM  $p85$  mit dem jeweiligen Peptid an. (C) Die  $IC_{50}$ -Werte wurden durch das Auftragen des SPR-Signals in der Equilibriumphase (440 s nach der Injektion) gegen die logarithmische Peptidkonzentration mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4.0 ermittelt.

Unter den gewählten Bedingungen wurde eine vollständige Inhibition der Bindung von  $p85\alpha$  bei Peptidkonzentrationen von  $\sim 10 \mu$ M erreicht. Die Auswertung der ermittelten Kurven ergab die in Tabelle 15 aufgeführten  $IC_{50}$ -Werte. Die Werte für das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  wurden zusätzlich angegeben, sie erlauben eine Aussage über die Qualität der nicht-linearen Regression.

**Tab. 15:** Ermittelte  $IC_{50}$ -Werte aus den Wettbewerbsversuchen.

	$IC_{50}$ (M)	$r^2$
pY608	$1,27 \cdot 10^{-6}$	0,9683
pY608-pS612	$0,51 \cdot 10^{-6}$	0,9859

## 4. Diskussion

Die Dysregulation des Insulin-Signalsystems ist ein multifaktorieller Prozess, der zu Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes führt, wobei in der Zelle die IRS-Proteine möglicherweise eine Hauptrolle spielen. Grund für diese Hypothese ist die Beobachtung, dass die kovalente Modifikation von IRS-1 durch den Transfer von Phosphorylgruppen auf Serine und Threonine mit einer herabgesetzten Insulin-induzierten Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1 durch den Insulinrezeptor assoziiert ist. Die reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1 resultiert in einer verminderten Aktivierung der PI 3-Kinase und dadurch in einer herabgesetzten Stimulation des Glucosetransports und weiterer Insulineffekte. Der Serin-Phosphorylierung der IRS-Proteine wird daher eine Beteiligung an der Entwicklung der zellulären Insulinresistenz zugesprochen. Unter normalen physiologischen Bedingungen scheint diese Modifikation der IRS-Proteine an der Terminierung des Insulinsignals durch eine negative Rückkopplung von Proteinkinasen beteiligt zu sein.

Im Rahmen dieses Hintergrundes konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Entwicklung eines *in vitro* Modells bestätigt werden, dass die Serin-Phosphorylierung von IRS-1 durch die Protein Kinase C dessen Funktion als Substrat des Insulinrezeptors und die IRS-1/PI 3-Kinase-Interaktion vermindert. Weiterhin konnten mit den IRS-1-Serinen 498, 570 und 612 drei Phosphorylierungsstellen der PKC identifiziert werden. Das Serin 570 scheint zumindest partiell an dem beobachteten negativen Einfluss beteiligt zu sein.

### 4.1 Etablierung eines *in vitro* Modells

Ein zentraler Mechanismus zur Übermittlung von Signalen in der eukaryontischen Zelle ist die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch die Phosphorylierung der Hydroxyaminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin. Proteine können durch diese Phosphorylierung in reversibler Weise aktiviert oder inaktiviert werden. Bestimmt wird der Phosphorylierungsstatus eines Proteins durch den Einfluss von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen. Der erste Schritt in den Signaltransduktionswegen der Zelle, die durch die Bindung des Peptidhormons Insulin an seinen Rezeptor aktiviert

werden, besteht in der Phosphorylierung des Adaptorproteins IRS-1 durch den Insulinrezeptor an Tyrosinen. Durch die eingebrachten Ladungsträger der Phosphorylgruppen binden SH2-Domänen enthaltende Proteine wie Grb2, SHP2 oder die PI 3-Kinase an das IRS-1. Über diese SH2-Proteine werden dann Signalwege aktiviert, die zur raschen Glucoseaufnahme in die Zelle führen und Metabolismus, Zellwachstum und Differenzierung induzieren (White, 1997).

Verschiedene Mechanismen werden derzeit diskutiert, die die Signaltransduktion von Insulin in der Zelle auf der Ebene des IRS-1 modulieren können. Diese Mechanismen sind die Degradation des Proteins bzw. die Regulation der Expression, die Dephosphorylierung der Phosphotyrosine durch Phosphatasen sowie die Serin-Phosphorylierung durch Serinkinasen (s. Abb. 5) (Najjar, 2001; White, 2002). In den Mittelpunkt des Interesses ist hier die Serin-Phosphorylierung gerückt. IRS-1 wird in der Zelle konstitutiv an Serinen phosphoryliert (Sun et al., 1991; Araki, et al., 1994). Diese basale Serin-Phosphorylierung ist vermutlich notwendig, denn eine Dephosphorylierung durch Phosphatasen *in vitro* führt zu einer herabgesetzten Phosphorylierbarkeit von IRS-1 durch den Insulinrezeptor an Tyrosinresten (Greene & Garofalo, 2002). Andererseits ist eine gesteigerte Serin-Phosphorylierung mit einer verringerten Tyrosin-Phosphorylierung und einer verringerten Aktivierung der nachgeschalteten PI 3-Kinase assoziiert. Induzierbar ist die Serin-Phosphorylierung von IRS-1 durch eine ganze Reihe von Faktoren, sowohl durch Insulin und andere Hormone als auch durch das proinflammatorische Zytokin  $TNF\alpha$ , durch die Inhibition von Phosphatasen und durch zellulären Stress. Aufgrund der Induzierbarkeit durch Insulin entstand das Modell der ‚negativen Rückkopplung‘. Es wird vermutet, dass die Serin-Phosphorylierung als Abschaltmechanismus einen integralen Bestandteil der Insulin-Signalkaskade darstellt. Bei der Insulinresistenz ist die Serin-Phosphorylierung von IRS-1 gesteigert und ihr wird daher eine Schlüsselrolle bei der verminderten Signalweiterleitung im Typ 2 Diabetes zugesprochen (Birnbaum, 2001; Zick, 2001; White, 2002).

Aufgrund der in der Zelle beteiligten Vielzahl an Proteinen in unterschiedlichen Signalwegen, den möglichen Quervernetzungen und der vielfältigen Wirkung der Serin-Phosphorylierung induzierenden Agenzien sollte in der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Modell entwickelt werden. Untersucht werden sollte damit der isolierte Einfluss einzelner, ausgesuchter Proteinkinasen auf die Funktion von IRS-1 als Signalträger auf molekularer Ebene.

Zur Realisierung eines *in vitro* Modells wurden die notwendigen Proteine entweder rekombinant mit Hilfe von *Escherichia coli* hergestellt, partiell aufgereinigt oder käuflich erworben. Aus *E. coli* wurden durch Verwendung des pGEX-Expressionssystems (Smith & Johnson, 1988) eine ausgewählte Sequenz aus dem IRS-1 und die regulatorische Untereinheit p85 $\alpha$  der PI 3-Kinase in Fusion mit der Glutathion-S-transferase (GST) hergestellt und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine zeigten im SDS-Gel die zu erwartenden Größen und waren durch Immunodetektion mit den entsprechenden Antisera nachweisbar (Abb. 10 & 11). Das in dieser Arbeit verwendete GST-Fusionsprotein rIRS-1<sup>449-664</sup> umfasst die IRS-1-Aminosäuren 449 bis 664 von *Rattus norvegicus*. Diese 216 Aminosäuren beinhalten 6 potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in YMXM- oder YXXM-Motiven, darunter die maßgeblich für die Bindung der PI 3-Kinase verantwortlichen Tyrosine 608 und 628 (Esposito et al., 2001). Die Verwendung eines Teilstückes von IRS-1 statt des nativen, vollständigen Proteins hatte verschiedene Gründe. Das Expressionssystem *E. coli* ist einfach in der Handhabung und erlaubt die schnelle Produktion von großen Mengen rekombinanten Protein. Leider lässt sich das IRS-1 in seiner gesamten Sequenz von 1235 Aminosäuren nicht aus diesem Wirt aufreinigen. In der Literatur beschriebene Quellen für das native IRS-1 sind die Überexpression in Zellkultur und Präzipitation daraus (Aguirre et al., 2000; Ravichandran et al., 2001) sowie die Verwendung des SF9-Expressionssystems mit *Spodoptera frugiperda*-Zellen (Greene & Garofalo, 2002). Die Verwendung von rekombinant in *E. coli* hergestellten Teilsequenzen von IRS-1 findet sich in einer Reihe von Arbeiten (Siemeister et al., 1995; DeFea & Roth, 1997b; Qiao et al., 1999; Aguirre et al., 2000; Qiao et al., 2002; Beck et al., 2003). Qiao und Mitarbeiter (1999) verwendeten beispielsweise partiell aufgereinigte Zelllysate aus Leber und Muskel von adipösen JCR:LA-cp-Ratten sowie aus chronisch mit Insulin behandelten CHO-Zellen und 3T3-L1 Adipocyten als Kinasequelle, um IRS-1-GST-Proteine *in vitro* zu phosphorylieren. Diese Zelllysate phosphorylierten ein GST-Protein mit den IRS-1-Aminosäuren 526–859 deutlich an Serinresten. Unbehandelte Kontrollen zeigten keine Kinaseaktivität und GST-Proteine mit N- und C-terminalen Sequenzabschnitten von IRS-1 wurden durch die Zelllysate nicht phosphoryliert. Aufgrund dieser Befunde und der Lage der Bindungsstelle der PI 3-Kinase im mittleren Sequenzbereich von IRS-1 wurde in dieser Arbeit das GST-Fusionsprotein rIRS-1<sup>449-664</sup> verwendet.

Die regulatorische Untereinheit p85 $\alpha$  der PI 3-Kinase aus *Bos taurus* wurde bei der Aufreinigung proteolytisch vom GST-Anteil befreit (Abb. 12). Charakterisiert werden sollte die Interaktion von p85 $\alpha$  über seine zwei SH2-Domänen mit rIRS-1<sup>449-664</sup>, eine Dimerisierung der beiden Proteine über die Glutathion-S-transferase (Ladbury et al., 1995) war daher unerwünscht und wurde durch die Proteolyse ausgeschlossen. Der Insulinrezeptor wurde partiell aus Rattenlebern nach Burant und Mitarbeitern (1984) aufgereinigt. Durch eine Lektin-Chromatographie wurden solubilisierte Glykoproteine der Leber angereichert (Abb. 13 A). Die Fraktion mit dem höchsten Proteingehalt wurde jeweils verwendet. Das Vorhandensein des Insulinrezeptors wurde durch Immunodetektion sichergestellt (Abb. 13 B). Die Spezifität in den nachfolgenden Phosphorylierungsreaktionen wurde durch die Verwendung von Insulin als Aktivator der Insulinrezeptorkinase erreicht. Die in dieser Arbeit verwendeten Protein Kinase C-Enzyme wurden kommerziell erworben. Zum einen war dies eine Präparation aus dem Gehirn der Ratte, die primär ein Gemisch der klassischen Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$  enthält (Kikkawa et al., 1986; Kikkawa et al., 1987) sowie die rekombinant hergestellte und aus *Spodoptera frugiperda*-Zellen (SF9) aufgereinigte humane atypische PKC- $\zeta$ .

Die Funktionalität von rIRS-1<sup>449-664</sup> als Substrat des partiell aufgereinigten Insulinrezeptors wurde bereits in der Diplomarbeit von Sommerfeld gezeigt (1999). Durch eine Änderung des Reaktionspuffers wurde eine Steigerung der zuvor beschriebenen 2fachen Insulin-stimulierten Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch den Insulinrezeptor (Sommerfeld, 1999) auf 8–9fach erreicht (Abb. 14 & 15). Der veränderte Reaktionspuffer war so gewählt, dass neben der Tyrosin-Phosphorylierung durch den Rezeptor auch eine Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die Serinkinase PKC im gleichen Puffer erfolgen konnte. Nach der Inkubation mit dem Insulinrezeptor wurde rIRS-1<sup>449-664</sup> über seinen GST-Anteil an Glutathion Sepharose präzipitiert und durch Zugabe von p85 $\alpha$  die in der Signalkaskade nachgeschaltete Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen IRS-1 und der PI 3-Kinase erfolgreich unter *in vitro* Bedingungen nachgestellt (Abb. 15). Die Bindung von p85 $\alpha$  an rIRS-1<sup>449-664</sup> erfolgte nach einem Insulinstimulus um ein deutlich Vielfaches.

Das somit realisierte *in vitro* Modell der IRS-1-Funktion zur quantitativen Erfassung der Tyrosin-Phosphorylierung und Bindung der PI 3-Kinase setzt sich aus der



Kombination der Inkubation von rIRS-1<sup>449-664</sup> mit dem Insulinrezeptor gefolgt von einer Co-Präzipitation der regulatorischen Untereinheit p85 $\alpha$  zusammen.

Für eine ganze Reihe von Serinkinasen wurde bisher gezeigt, dass sie IRS-1 *in vivo* und/oder *in vitro* phosphorylieren können (s. Tab. 1). Um den Einfluss der Serin-Phosphorylierung von IRS-1 mit dem zuvor beschriebenen *in vitro* Modell zu untersuchen, wurden ausgewählte Isoformen der Protein Kinase C verwendet.

Ausgewählt wurde diese Serinkinase aus folgenden Gründen: Die durch Insulin induzierte Serin-Phosphorylierung von IRS-1 in der Zelle ist durch Inhibitoren der PI 3-Kinase hemmbar (Rui et al., 2001; Greene et al., 2003). Die an diesem Prozess beteiligten, negativ rückwirkenden Kinasen liegen folglich in der Signalkaskade unterhalb der PI 3-Kinase. Die atypischen Isoformen PKC- $\zeta$  und - $\lambda$  entsprechen diesen Kriterien, da sie durch Insulin aktiviert werden und in der Insulinkaskade flussabwärts der PI 3-Kinase liegen (Standaert et al., 1997; Standaert et al., 1999a; Standaert et al., 1999b). Weiterhin wurde eine 2fach gesteigerte Co-Immunopräzipitation der PKC- $\zeta$  an IRS-1 in frisch präparierten Adipocyten der Ratte nach einem Insulinstimulus beobachtet (Ravichandran et al., 2001). In Fao-Zellen wurde von den Autoren Liu et al. (2001) ein negativer Einfluss durch die adenovirale Überexpression der PKC- $\zeta$  auf IRS-1 beschrieben, eine Überexpression der Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\eta$  dagegen zeigten keinen Effekt. Eine Stimulation der klassischen PKC-Isoformen durch Phorbol-ester (Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat) in humanen Nierenfibroblasten (293 Zellen) führte ebenfalls zu einer gesteigerten Serin-Phosphorylierung und herabgesetzten Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1 (DeFea & Roth, 1997a). Die Autoren führten diesen Effekt jedoch kurze Zeit später auf eine indirekte Wirkung der PKC über die MAPK zurück, da der MAPK-Inhibitor PD98059 den Phorbol-ester-Effekt auf IRS-1 blockierte (DeFea & Roth, 1997b). In weiteren Arbeiten konnten Änderungen der PKC-Aktivität in Leber, Muskel und Fettgewebe mit der Insulinresistenz assoziiert werden, unter anderem im Alterungsprozess (Qu et al., 1999a), bei Adipositas (Qu et al., 1999b), durch Fruktose- und Fettdiät (Donnelly et al., 1994; Schmitz-Peiffer et al., 1997) und durch Muskeldenervation (Heydrick et al., 1991). Diese Aspekte lassen vermuten, dass eine oder mehrere Isoformen der PKC an der negativen Modulation der IRS-1-Signalfunktion durch die Modulation von Serinen beteiligt sein könnten.

Zunächst wurde daher durch eine Inkubation von rIRS-1<sup>449-664</sup> mit den klassischen PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$  und der atypischen PKC- $\zeta$  überprüft, ob das GST-Fusionsprotein *in vitro* ein Substrat dieser Enzyme ist. Diese Experimente resultierten in einer deutlichen Dosis abhängigen und hemmbaren Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> (Abb. 16 & 17). Das verwendete Fusionsprotein ist also ein Substrat dieser Kinasen. Der GST-Anteil von rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde dabei durch die verwendeten Isoformen nicht modifiziert. Die Autoren Ravichandran et al. (2001) und Beck et al. (2003) berichten ebenfalls, dass die PKC-Isoform  $\zeta$  *in vitro* IRS-1 zu phosphorylieren vermag. Nachfolgend wurde durch Dosis-Wirkungsversuche eine maximale Serin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> durch die PKC etabliert. Die bei einer Phosphateinbaurrate von 0,8 mol/mol gesättigt phosphorylierten Proteine wurden dann im *in vitro* Modell eingesetzt und dem Insulinrezeptor als Substrat angeboten. Die Quantifizierung der Phosphotyrosin-Menge des zuvor durch die PKC modifizierten rIRS-1<sup>449-664</sup> ergab eine deutliche Reduktion um 30–50% im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollsituation (Abb. 18 & 19). Die Bindung von p85 $\alpha$  an das Serin-phosphorylierte rIRS-1<sup>449-664</sup> zeigte eine drastische Reduzierung um 50–80%. Der negative Effekt der Isoform  $\zeta$  war dabei wesentlich ausgeprägter als der der klassischen Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$ .

Da die verwendeten Protein Kinase C-Isoformen in dem beschriebenen Versuchssystem zusammen mit dem Insulinrezeptor inkubiert wurden und diesen durch Serin-Phosphorylierung modifizieren könnten, sollte untersucht werden, ob die beobachtete Reduzierung der Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> nicht durch eine Modulierung der Insulinrezeptorkinase hervorgerufen wurde oder daran beteiligt war. So haben denn auch verschiedene Studien gezeigt, dass insbesondere die PKC-Isoformen  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\theta$  die Insulin-Signaltransduktion auf Ebene des Insulinrezeptors negativ beeinflussen können (Bassenmaier et al., 1997; Strack et al., 2000; Rosenzweig et al., 2002). In dem in dieser Arbeit etablierten *in vitro* Modell dagegen ist eine signifikante negative Wirkung der PKC auf die aktivierte Insulinrezeptorkinase auszuschließen. Zum einen lässt sich dies aus der Verwendung des Inhibitors Bisindolylmaleimid I (BIM) ableiten. Denn unabhängig davon, ob die klassischen PKC-Isoformen aus dem Rattengehirn nach der Serin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> mit BIM inaktiviert wurden oder ungehemmt auf den Insulinrezeptor einwirken konnten, wurde kein Einfluss beobachtet (Abb. 18 & 21). Die Inaktivierung der PKC- $\zeta$  durch ein spezifisches Pseudosubstrat machte

ebenfalls deutlich, dass diese Isoform einzig durch die Serin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> dessen Funktion als Substrat des Rezeptors massiv stört und nicht auf den Insulinrezeptor einwirkt (Abb. 21). In den zuvor genannten Arbeiten inhibierte die Aktivierung der PKC in Zellen die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors und somit auch dessen Tyrosinkinaseaktivität. In dem *in vitro* Modell dieser Arbeit wurde der Insulinrezeptor dagegen erst nach der Autophosphorylierung durch einen Insulinstimulus der PKC ausgesetzt, der einmal autoaktivierte Rezeptor scheint unter den gewählten *in vitro* Bedingungen vor der Wirkung dieser Serinkinase geschützt zu sein. So finden sich auch auf der Ebene der Autophosphorylierung des aktivierten Insulinrezeptors, die durch die Bindung von Insulin in der Phosphorylierung der Tyrosine 1146, 1150 und 1151 der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne und damit in einer Steigerung der Kinaseaktivität um das 10–20fache resultiert (White, 1997), keine Veränderungen (Abb. 20). Eine negative Wirkung der PKC auf den nicht aktivierten Rezeptor wurde nicht untersucht und ist daher aufgrund der Literaturdaten nicht auszuschließen.

Die Daten des *in vitro* Modells sind eine weitere Bestätigung der in der Literatur beschriebenen negativen Wirkung der Serin-Phosphorylierung von IRS-1 auf molekularer Ebene. Besonders hervorzuheben ist, dass in diesem Modellsystem die negative Regulation durch die PKC unabhängig des IRS-1 Serins 307 verläuft, welches nicht in rIRS-1<sup>449-664</sup> enthalten ist. Aguirre und Mitarbeiter (2000) haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von Serin 307 die Interaktion der PTB-Domäne von IRS-1 mit dem aktivierten Insulinrezeptor inhibiert. Diese Aminosäure wird in Muskelzellen nach einem Insulinstimulus phosphoryliert (Rui et al., 2001) und die c-Jun aminoterminal Kinase 1 (JNK1) wird hierfür verantwortlich gemacht (White, 2002; Lee et al., 2003). Hieraus resultiert die Frage, ob der in dieser Arbeit beobachtete Effekt der PKC auf die IRS-1-Aminosäuren 449–664 möglicherweise auch im nativen IRS-1 allein oder zusammen mit Serin 307 einen Anteil an der Störung der Insulinwirkung beisteuert.

## 4.2 Identifizierung von PKC-Phosphorylierungsstellen

Die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in IRS-1 ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zum Verständnis des in der Literatur beschriebenen und in dieser Arbeit mit Hilfe des *in vitro* Modells bestätigten negativen Regulationsmechanismus der Insulin-Signaltransduktion durch die Serin-Phosphorylierung auf molekularer Ebene. Mittels unterschiedlicher biochemischer Methoden konnten im Rahmen dieser Arbeit mit den Serinen 498, 570 und 612 drei Phosphorylierungsstellen der PKC identifiziert werden. Damit reihen sich diese phosphorylierten Aminosäurereste in eine Vielzahl bekannter ein (s. Tab. 1).

Eine Analyse der IRS-1-Aminosäuresequenz bezüglich der Phosphorylierungsmuster bekannter Kinasen, den so genannten Konsensus-Motiven, lässt je nach verwendeter Software oder Autor auf etwa 30–70 Phosphorylierungsstellen schließen (Sun et al., 1991; Tanasijevic et al., 1993; Mothe & VanObberghen, 1996; Aguirre et al., 2000). Allerdings entsprechen viele in der Literatur bekannte Phosphorylierungsstellen diverser Proteine nicht den allgemein gefassten Konsensus-Motiven der Kinasen, daher ist diese Vorgehensweise nur eingeschränkt erfolgreich und wird daher oft mit der biochemischen Analyse kombiniert. Weiterhin enthält die IRS-1-Aminosäuresequenz 181 Serine und 63 Threonine, die zusammen bereits etwa 20% der Gesamtsequenz ausmachen, was die Schwierigkeit einer Konsensus-Analyse für das IRS-1 verdeutlicht. In dem GST-Fusionsprotein rIRS-1<sup>449-664</sup> ist das Verhältnis ähnlich, allein der IRS-Anteil zählt 23 Serine und 12 Threonine. So wurde denn auch der Großteil der in der Literatur bekannten Phosphorylierungsstellen von IRS-1 durch die Kartierung tryptischer Peptide mittels HPLC in Kombination mit Edman-Sequenzierung oder Massenspektrometrie identifiziert und nicht durch die Konsensus-Analyse (Tanasijevic et al., 1993; Aguirre et al., 2000; Ozes et al., 2001; Jakobsen et al., 2001; Qiao et al., 2002). Erst kürzlich wurde durch Beck und Mitarbeiter (2003) eine PKC- $\zeta$ -Phosphorylierungsstelle in IRS-1 beschrieben. Die Autoren identifizierten das Serin 318 in einem GST-Fusionsprotein mit den IRS-1-Aminosäuren 265–522 durch  $\mu$ LC-ESI-MS.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Lokalisierung von PKC-Phosphorylierungsstellen in rIRS-1<sup>449-664</sup> ebenfalls biochemische Analysemethoden angewendet. Zunächst wurde aufgrund der Verfügbarkeit eines spezifischen Antiserums gegen die Phosphoform des IRS-1-Serins 612 mittels Immunodetektion überprüft, ob die

verwendeten PKC-Isoformen diese Aminosäure durch den Transfer einer Phosphorylgruppe kovalent modifizieren können. Die Inkubation von rIRS-1<sup>449-664</sup> mit den klassischen Isoformen der PKC und der atypischen Isoform  $\zeta$  resultierten in einer deutlichen Phosphorylierung dieses Serins (Abb. 24). Das Serin 612 wurde erstmals nach Konsensus-Analyse von IRS-1 als potentielle MAPK-Site von den Autoren Mothe und VanObberghen (1996) diskutiert. Erst die Autoren DeFea & Roth (1997a) brachten durch Mutationsanalyse den Beweis für die Phosphorylierung dieser Aminosäure in 293 Zellen nach deren Behandlung mit Phorbolestern. Verantwortlich für die Modifikation dieses Serinrestes wurde von den Autoren ebenfalls die MAPK gemacht, da ein MAPK-Inhibitor den Phorbol ester-Effekt blockierte. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass verschiedene Isoformen der Protein Kinase C das Serin 612 zumindest *in vitro* phosphorylieren können.

Mittels Kombination von Phosphopeptidkartierung und Massenspektrometrie konnten desweiteren mit den Serinen 498 und 570 zwei in der Literatur unbekannte PKC- $\zeta$ -Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Tab. 8, Abb. 28). Durch den Austausch von Serin 570 in ein Alanin und erneuter Phosphopeptidkartierung des so mutierten rIRS-1<sup>449-664</sup> konnte diese Phosphorylierungsstelle eindeutig validiert werden (Abb. 32 C). Das Serin 570 umfasst 20% der in rIRS-1<sup>449-664</sup> inkorporierten Radioaktivität und kann daher als eine Hauptphosphorylierungsstelle der PKC- $\zeta$  betrachtet werden. Die Mutation von Serin 612 zu Alanin in rIRS-1<sup>449-664</sup> und Kartierung dessen Phosphopeptidmusters bestätigte die zuvor durch Immunodetektion identifizierte Phosphorylierungsstelle (Abb. 32 D). Die Phosphorylierung von Serin 498 konnte zwar in der MS-Analyse eindeutig ausgemacht werden, der Austausch von Serin 498 zu Alanin führte jedoch in der HPLC-Kartierung zu einem wenig interpretierbaren Elutionsprofil, obwohl signifikante Veränderungen zum Wildtyp beobachtet wurden (Abb. 32 B). Im Weiteren muss berücksichtigt werden, dass bei der MS-Analyse vermutlich nicht alle Phosphorylierungen aufgedeckt wurden, denn im Großteil der insgesamt 11 identifizierten Peptide wurde keine Phosphoaminosäure gefunden. Gemäß der in der HPLC-Auftrennung gemessenen Radioaktivität kann aber eine Phosphorylierung nicht ausgeschlossen werden. So lässt auch die Autoradiographie verschiedener rIRS-1<sup>449-664</sup>-Mutanten auf weitere nicht identifizierte Phosphorylierungsstellen schließen (Abb. 31).

Das durch die Inkubation mit der atypischen PKC- $\zeta$  generierte Phosphopeptidmuster von rIRS-1<sup>449-664</sup> ist direkt mit dem durch die klassischen Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$

generierte Muster vergleichbar, wobei das Serin 570 durch die PKC- $\zeta$  deutlich stärker modifiziert wird (Abb. 32 & 36). Bestätigt wird diese Beobachtung durch Daten aus einer Immunodetektion mit einem mittlerweile in der Arbeitsgruppe Eckel verfügbaren Antiserum gegen das Phosphoserin 570. Hier zeigt sich lediglich nach der Inkubation von rIRS-1<sup>449-664</sup> mit der PKC- $\zeta$  eine Phosphorylierung von Serin 570 (persönliche Mitteilung Magdalene Stosik). Das mag eine mögliche Erklärung für die unterschiedlich ausgeprägte Reduktion der Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1<sup>449-664</sup> im *in vitro* Modell zu sein, wo die PKC- $\zeta$  einen größeren negativen Einfluss zeigte. Interessanterweise entspricht das Serin 570 der von Nishikawa et al. (1996) beschriebenen optimalen Substratsequenz der PKC- $\zeta$ . Hingegen entsprechen die Aminosäuresequenzen um Serin 498 und 612 weder dem generellen Konsensus-Motiv der PKC noch dem optimalen der Isoform  $\zeta$ . Die drei identifizierten PKC-Phosphorylierungsstellen finden sich in hoch konservierten Motiven aller bekannten IRS-1-Homologe aus verschiedenen Spezies.

### 4.3 Einfluss einzelner Phosphoserine

Um die Relevanz der ermittelten Phosphorylierungsstellen auf die Funktion von IRS-1 zu charakterisieren, wurden verschiedene Vorgehensweisen gewählt. Mittels Oberflächenplasmonresonanz wurde der Einfluss von Serin 612 analysiert. Früh entstand die Vermutung, dass Serine in direkter Nachbarschaft zu den YMXMS-S-Motiven von IRS-1 durch eine Phosphorylierung einen negativen Einfluss auf die Funktion von IRS-1 haben könnten (Mothe & VanObberghen, 1996). Die in dieser Arbeit identifizierte Phosphorylierungsstelle der PKC, das Serin 612, findet sich nahe dem Tyrosin 608 in solch einem Motiv, welches maßgeblich an der Bindung der PI 3-Kinase beteiligt ist (Esposito et al., 2001). Aus diesem Grund wurde die Protein-Protein-Interaktion von IRS-1 und PI 3-Kinase mit dem BIAcore X-System untersucht. Bestimmt wurden hierbei die Affinitäten der Bindung der regulatorischen Untereinheit p85 $\alpha$  der PI 3-Kinase über seine zwei SH2-Domänen an ein Peptid mit den IRS-1-Aminosäuren 605–615 (DDGYMPMSPGV). In verschiedenen Studien wurden bereits die Affinitäten einzelner SH2-Domänen von p85 an solche Peptide ohne Berücksichtigung der Serin-Fragestellung analysiert (Felder et al., 1993; Ladbury et al., 1995; Baynes et al., 2000; Vely et al., 2000).

Bei der Analyse der genannten Proteinwechselwirkung wurde keine Bindung von p85 $\alpha$  an das unphosphorylierte Peptid beobachtet. Lag das Tyrosin 608 jedoch in der Phosphoform vor, konnte eine hochaffine Interaktion aufgezeichnet werden (Abb. 40). Diese Befunde entsprechen denen der Autoren Felder et al. (1993) und dem allgemeinem Verständnis der Bindung von SH2-Domänen an phosphorylierte YMXM-Motive (Shepherd et al., 1995). Die Bestimmung der Bindungsraten der Interaktion von p85 $\alpha$  an das Peptid mit Phosphotyrosin ergab überraschenderweise eine höhere Affinität in Gegenwart des Phosphoserins 612 (**pYMPMpS**) verglichen mit der dephosphorylierten Form (**pYMPMS**). Die in dieser Arbeit ermittelte Dissoziationskonstante  $K_D$  des Phosphotyrosinpeptids liegt mit  $3,5 \pm 1,8$  nM im Rahmen der in der Literatur aufgeführten Dissoziationskonstanten von 0,3–3 nM (Felder et al., 1993) bzw. 300 nM (Ladbury et al., 1995). Die von den Autoren Felder et al. (1993) beschriebenen Dissoziationskonstanten sind am ehesten mit den hier ermittelten vergleichbar, da die von Felder et al. verwendeten SH2-Domänen wegen ihres GST-Anteils dimerisieren und damit ähnlich dem in dieser Arbeit verwendeten p85 $\alpha$  mit zwei SH2-Domänen ein bivalentes Binden sowie eine gesteigerte Affinität bewirken. Die Dissoziationskonstante der Bindung von p85 $\alpha$  an das Peptid in Gegenwart des Phosphoserins (**pYMPMpS**) beträgt  $1,1 \pm 0,1$  nM. Der kleinere Wert ist ein Maß für den stabileren Komplex dieser Interaktion. Die Daten lassen vermuten, dass die Phosphorylierung von Serin 612, obwohl in direkter Nachbarschaft zur PI 3-Kinase-Bindungsstelle, eben diese Bindung nicht negativ beeinflusst.

Durch die gezielte Mutagenese der Serine 570 und 612 zu Alanin in rIRS-1<sup>449-664</sup> wurde der funktionelle Einfluss dieser Aminosäuren erneut mit dem *in vitro* Modell untersucht (Abb. 35). Der Austausch von Serin 612 zu Alanin in rIRS-1<sup>449-664</sup> resultierte hierbei in keinem signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Serin 612 hat scheinbar keinen Einfluss auf die untersuchten Funktionen von rIRS-1<sup>449-664</sup>. Konsistent sind diese Daten mit dem zuvor unter Verwendung der Oberflächenplasmonresonanz festgestellten leicht positiven Effekt dieses Serinrestes auf die IRS-1/PI 3-Kinase-Interaktion. Dagegen führt der Austausch von Serin 570 in Alanin zu einer leichten Besserung der p85 $\alpha$ -Bindung an das IRS-1-GST-Fusionsprotein bei einer unveränderten Reduktion der Tyrosin-Phosphorylierung nach Vorbehandlung mit der PKC- $\zeta$ . Die nur leichte Besserung mag an einer Limitation des verwendeten

*in vitro* Modells liegen und/oder lässt auf weitere beteiligte phosphorylierte Serine schließen. Das Serin 570 mag daher zumindest partiell eine inhibitorische Rolle auf die Bindung der SH2-Domänen von p85 $\alpha$  an die Phosphotyrosine von IRS-1 spielen. Ähnlich ist die von Aguirre et al. (2002) beschriebene funktionelle Rolle von Serin 307, welches die Interaktion von IRS-1 mit dem phosphorylierten Insulinrezeptor inhibiert. Indessen wird die Rolle von Serin 612 in der Literatur unterschiedlich diskutiert. Die Reduktion der Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1 durch die Aktivierung der klassischen PKC und infolge dessen der MAPK in 293 Zellen mit Phorbol ester ist durch den Austausch von Serin 612 in ein Alanin vollständig aufhebbar (DeFea & Roth, 1997a). Die Inhibition von Phosphatasen durch Okadainsäure im gleichen Zellsystem führt ebenso zu einer gesteigerten Serin-Phosphorylierung und Funktionsstörung von IRS-1, das Serin 612 scheint hier allerdings keine Rolle zu spielen (Mothe & VanObberghen, 1996). Der in dieser Arbeit beobachtete starke negative Effekt der PKC auf die Funktion von IRS-1 entsteht ebenfalls unabhängig von Serin 612.

Als mögliche Mechanismen, die durch die Serin-Phosphorylierung zu einer herabgesetzten Phosphotyrosin-Menge führen und die Funktion von IRS-1 als Signalträger vermindern, werden die Störung der Insulinrezeptor/IRS-1-Interaktion bzw. die Inhibition der Insulinrezeptorkinase sowie die Störung der Assoziation mit SH2-Proteinen wie der PI 3-Kinase diskutiert (Aguirre et al., 2002; Eldar-Finkelman & Krebs, 1997; Mothe & VanObberghen, 1996). Die Daten dieser Arbeit lassen vermuten, dass die phosphorylierten Serine sowohl die Interaktion des Insulinrezeptors mit IRS-1 als auch unabhängig davon die Assoziation von IRS-1 zur PI 3-Kinase stören können.

Physiologisch ist die negative Regulation von IRS-1 durch Serin-Phosphorylierung vermutlich im zeitlichen Kontext zu sehen: Der Insulinrezeptor autophosphoryliert durch eine Konformationsänderung nach der Bindung von Insulin. Daraufhin bindet IRS-1 über seine PTB-Domäne an den Rezeptor und wird von diesem an Tyrosinen phosphoryliert. An die Phosphotyrosine in YMXM-Motiven binden SH2-Proteine wie die PI 3-Kinase, die dadurch aktiviert werden. Ebenfalls aktiviert werden auch nachgeschaltete Serinkinasen, die IRS-1 an spezifischen Serinen phosphorylieren, wodurch sich der Proteinkomplex, das ‚Signalosom‘ durch die eingebrachten Ladungen der Phosphorylgruppen vom Rezeptor löst und umorganisiert. Die intrazelluläre Lokalisation und Zusammensetzung des Proteinkomplexes ändern



sich, die PI 3-Kinase dissoziiert ab. IRS-1 wird für PTPasen zugänglich und/oder diese binden erst aufgrund der Phosphoserine. Die PTPasen dephosphorylieren die modifizierten Tyrosine in IRS-1 und das Insulinsignal wird damit auf der Ebene des ersten zentralen Substrates heruntergeregelt. Bei der großen Zahl an Serinkinasen, die IRS-1 phosphorylieren können und in der Insulin-Signalkaskade aktiviert werden, wirken vermutlich mehrere jeweils partiell und auch zeitlich bzw. räumlich unterschiedlich auf das Adaptorprotein. So zeigten die Autoren Gual et al. (2003) erstmals einen unterschiedlichen Zeitverlauf der Phosphorylierung von Serin 307, 612 und 632 in 3T3-L1 Adipocyten nach einem Insulinstimulus. Auch werden diese Aminosäuren scheinbar durch unterschiedliche Signalwege angesprochen, was die Verwendung von MAPK- und mTOR-Inhibitoren deutlich machte.

Um den Anteil der einzelnen Signalwege und Kinasen zu bestimmen, müssten alle bedeutenden Phosphorylierungsstellen in IRS-1 identifiziert werden. Durch die Verwendung von Kinaseinhibitoren, Mutagenese und Phospho-spezifischen Antikörpern könnte dann der jeweilige Einfluss der Signalwege in der Zelle genauer charakterisiert werden und die verantwortlichen Kinasen identifiziert werden. Das in dieser Arbeit vorgestellte *in vitro* Versuchssystem könnte durch Übertragung auf weitere potentiell beteiligte Serinkinasen dabei einen Beitrag leisten.

Eine spannende Frage für folgende Studien bleibt, ob Kinasen aus der Insulin-Signalkaskade bei der Insulinresistenz durch eine Vernetzung mit anderen Signalwegen dauerhaft aktiviert werden oder ob fremde Kinasen, wie beispielsweise die Stresskinase JNK1 (Aguirre et al., 2000) durch Adipositas und andere Faktoren stimuliert, auf das IRS-1 negativ modulierend wirken.

## 5. Zusammenfassung

Diabetes mellitus wurde lange als Krankheit mit geringer Bedeutung für die Weltgesundheit eingeschätzt. Über die letzten beiden Dekaden wurde jedoch eine explosive Zunahme an diagnostizierten Diabetespatienten weltweit beobachtet, derzeit nimmt diese Krankheit daher einen Platz als eine der Hauptbedrohungen für die menschliche Gesundheit im 21. Jahrhundert ein. Etwa 95% aller Patienten weltweit leiden an Typ 2 Diabetes, welcher durch eine verminderte Insulinwirkung, der so genannten Insulinresistenz peripherer Gewebe und einer abnormalen kompensatorischen Insulinsekretion charakterisiert ist. Für die Entwicklung neuer Therapieansätze des Typ 2 Diabetes ist daher das genaue Verständnis der molekularen Mechanismen der Insulinwirkung und deren Veränderungen bei der Insulinresistenz in der Zelle essentiell.

Eine Hauptrolle in der Signalweiterleitung des Insulinsignals und möglicherweise an dessen Dysregulation in der Zelle spielen die Insulinrezeptorsubstrat-(IRS)-Proteine. Grund für diese Hypothese ist die Beobachtung, dass die kovalente Modifikation von IRS-1 durch die Addition von Phosphorylgruppen an Serinen und Threoninen mit einer herabgesetzten Insulin-induzierten Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1 durch den Insulinrezeptor assoziiert ist. Die reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1 resultiert in einer verminderten Aktivierung der PI 3-Kinase und dadurch in einer herabgesetzten Stimulation des Glucosetransports in die Zelle. Unter normalen physiologischen Bedingungen scheint diese Modifikation der IRS-Proteine an der Terminierung des Insulinsignals durch eine negative Rückkopplung von Proteinkinasen beteiligt zu sein.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der funktionellen Konsequenzen der Serin/Threonin-Phosphorylierung auf die Funktion des Signalträgers IRS-1 auf molekularer Ebene. Aufgrund der in der Zelle beteiligten Vielzahl an Proteinen in unterschiedlichen Signalwegen, den möglichen Quervernetzungen und der vielfältigen Wirkung der Serin-Phosphorylierung induzierenden Agenzien sollte in der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Modell entwickelt werden.

Unter der Verwendung eines rekombinanten GST-Fusionsproteins, welches die IRS-1-Aminosäuren 449 bis 664 umfasst, konnte erfolgreich die Insulin-stimulierte Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1 durch den Insulinrezeptor und die in der

Signalkaskade nachgeschaltete Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit p85 $\alpha$  der PI 3-Kinase unter *in vitro* Bedingungen nachgebildet werden. Untersucht wurde anschließend der isolierte Einfluss der Protein Kinase C auf dieses *in vitro* Modell. Eingesetzt wurden hier eine Mischung der klassischen Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$  sowie die atypische Isoform  $\zeta$ . Ausgewählt wurden diese Serinkinasen, da die atypischen Isoformen PKC- $\zeta$  und - $\lambda$  durch Insulin aktiviert werden, in der Insulinkaskade flussabwärts der PI 3-Kinase liegen und demnach dem Modell der negativ rückwirkenden Kinasen entsprechen. Eine Stimulation der klassischen PKC-Isoformen in Zellen führt zu einer gesteigerten Serin-Phosphorylierung und herabgesetzten Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1.

Die Vorinkubation des IRS-1-GST-Fusionsproteins mit der PKC resultierte in einer deutlichen Reduktion des durch den Insulinrezeptor medierte Phosphat einbaus in Tyrosine um 30–50% im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollsituation. Die Bindung von p85 $\alpha$  an das Serin-phosphorylierte Fusionsprotein ergab eine drastische Reduzierung um 50–80%. Der negative Effekt der Isoform  $\zeta$  war dabei wesentlich ausgeprägter als der der klassischen Isoformen. Die Daten des *in vitro* Modells sind somit eine Bestätigung der in der Literatur beschriebenen negativen Wirkung der Serin-Phosphorylierung von IRS-1 auf molekularer Ebene.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung von Phosphorylierungsstellen. Mit den IRS-1-Serinen 498, 570 und 612 konnten drei neue Phosphorylierungsstellen der PKC identifiziert werden. Die Phosphorylierung von Serin 612, obwohl in direkter Nachbarschaft zu einer Hauptbindungsstelle der PI 3-Kinase, scheint nicht an dem in dieser Arbeit beobachteten stark negativen Effekt der PKC auf die Funktion von IRS-1 beteiligt zu sein. Dagegen übt das phosphorylierte Serin 570 zumindest partiell eine inhibitorische Rolle auf die Bindung der SH2-Domänen von p85 $\alpha$  an die Phosphotyrosine von IRS-1 aus. Es wird diskutiert, dass weitere, nicht identifizierte phosphorylierte Serine oder Threonine an dem Prozess der negativen Regulation von IRS-1 beteiligt sind.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *J. Biol. Chem.* **275**, 9047–9054 (2000)
- 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.* **277**, 1531–1537 (2002)
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15**, 6541–6551 (1996)
- Alessi DR, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 55–62 (1998)
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$ . *Curr. Biol.* **7**, 261–269 (1997)
- Al-Hasani H. Inauguraldissertation an der Universität zu Köln (1995)
- Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet. Med.* **14**, Suppl 5:S1–85 (1997)
- Antonetti DA, Algenstaedt P, Kahn CR. Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2195–2203 (1996)
- Araki E, Haag BL III, Kahn CR. Cloning of the mouse insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene and complete sequence of mouse IRS-1. *Biochim. Biophys. Acta* **1221**, 353–356 (1994)
- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* **372**, 186–190 (1994)
- Arrandale JM, Gore-Willse A, Rocks S, Ren JM, Zhu J, Davis A, Livingston JN, Rabin DU. Insulin signalling in mice expressing reduced levels of Syp. *J. Biol. Chem.* **271**, 21353–21358 (1996)
- Backer JM, Myers MG Jr, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* **11**, 3469–3479 (1992)
- Backer JM, Schroeder GG, Kahn CR, Myers MG Jr, Wilden PA, Cahill DA, White MF. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity maps to insulin receptor regions required for endogenous substrate phosphorylation. *J. Biol. Chem.*

**267**, 1367–1374 (1992)

Baehr M, Spelleken M, Bock M, von Holtey M, Kiehn R, Eckel J. Acute and chronic effects of troglitazone on isolated rat ventricular cardiomyocytes. *Diabetologia* **39**, 766–774 (1996)

Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert ML, Quon MJ, Lea-Currie R, Sen A, Farese RV. PKC-zeta mediates insulin effects on glucose transport in cultured preadipocyte-derived human adipocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 716–723 (2002)

Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert ML, Quon MJ, Reed BC, Dikic I, Farese RV. Glucose activates protein kinase C-zeta /lambda through proline-rich tyrosine kinase-2, extracellular signal-regulated kinase, and phospholipase D: a novel mechanism for activating glucose transporter translocation. *J. Biol. Chem.* **276**, 35537–35545 (2001)

Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP, Karnitz LM, Cong L, Quon MJ, Farese RV. Dependence of Insulin-Stimulated Glucose Transporter 4 Translocation on 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 and Its Target Threonine-410 in the Activation Loop of Protein Kinase C- $\zeta$ . *Mol. Endocrinol.* **13**, 1766–1772 (1999)

Bandyopadhyay G, Standaert ML, Zhao LM, Yu B, Avignon A, Galloway L, Kamam P, Moscat J, Farese RV. Activation of protein kinase C ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\zeta$ ) by insulin in 3T3/L1 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 2551–2558 (1997)

Barthel A, Nakatani K, Dandekar AA, Roth RA. Protein kinase C modulates the insulin-stimulated increase in Akt1 and Akt3 activity in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 509–513 (1998)

Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, Bickel PE, Pessin JE, Saltiel AR. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* **407**, 202–207 (2000)

Baynes KC, Beeton CA, Panayotou G, Stein R, Soos M, Hansen T, Simpson H, O'Rahilly S, Shepherd PR, Whitehead JP. Natural variants of human p85 alpha phosphoinositide 3-kinase in severe insulin resistance: a novel variant with impaired insulin-stimulated lipid kinase activity. *Diabetologia* **43**, 321–331 (2000)

Beck A, Moeschel K, Deeg M, Häring HU, Voelter W, Schleicher ED, Lehmann R. Identification of an In Vitro Insulin Receptor Substrate-1 Phosphorylation Site by Negative-Ion  $\mu$ LC/ES-API-CID-MS Hybrid Scan Technique. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **14**, 401–405 (2003)

Birnbaum MJ. Turning down insulin signaling. *J. Clin. Invest.* **108**, 655–659 (2001)

Blackmore PF, Strickland WG, Exton JH. Phosphorylation of glycogen synthase by protein kinase C. *Biochem. J.* **237**, 235–242 (1986)

Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**, 1351–1362 (1999)

Bollag GB, Roth RA, Beaudoin J. PKC directly phosphorylates the insulin receptor *in vitro* and reduces its protein-tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5822–5824 (1986)

Bossenmaier B, Mosthaf L, Mischak H, Ullrich A, Haring HU. Protein kinase C isoforms beta-1 and beta-2 inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. *Diabetologia* **40**, 863–866 (1997)

Braiman L, Alt A, Kuroki T, Ohba M, Bak A, Tennenbaum T, Sampson SR. Activation of protein kinase C zeta induces serine phosphorylation of VAMP2 in the GLUT4 compartment and increases glucose transport in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7852–7861 (2001)

Burant CF, Treutelaar MK, Landreth GE, Buse M. Phosphorylation of insulin receptors solubilized from rat skeletal muscle. *Diabetes* **33**, 704–708 (1984)

Busch AK, Castan I, Degerman E. Protein kinase C mediates hyperglycaemia-induced insulin resistance through serine phosphorylation of IRS-1. *Diabetologia* **41**(suppl. 1), A10 (1998)

Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two New Substrates in Insulin Signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *Biol. Chem.* **278**, 25323–25330 (2003)

Cengel KA, Kason RE, Freund GG. Phosphatidylinositol 3-kinase associates with an IRS-1 serine kinase distinct from its intrinsic serine kinase. *Biochem. J.* **355**, 397–404 (1998)

Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* **410**, 944–948 (2001)

Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti JF, Behrends J, Pesesse X, Sasaki T, Penninger J, Doherty M, Malaisse W, Dumont JE, Le Marchand-Brustel Y, Erneux C, Hue L, Schurmans S. The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* **409**, 92–97 (2001)

Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**, 14843–14846 (1995)

Cohen P, Alessi DR, Cross DA. PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Lett.* **410**, 3–10 (1997)

Considine RV, Caro JF. Protein kinase C: mediator or inhibitor of insulin action. *J. Cell. Biochem.* **52**, 8–13 (1993)

Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated protein kinase B. *Nature* **378**, 785–787 (1996)

- DeFea K, Roth RA. Modulation of Insulin Receptor Substrate-1 Tyrosine Phosphorylation and Function by Mitogen-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 31400–31406 (1997)
- DeFea K, Roth RA. Protein Kinase C Modulation of Insulin Receptor Substrate-1 Tyrosine Phosphorylation Requires Serine 612. *Biochemistry* **36**, 12939–12947 (1997)
- DeFronzo RA, Ferrannini E. Regulation of intermediary metabolism during fasting and feeding. In: *Endocrinology*, edited by DeGroot LJ and Jameson JL. Philadelphia, PA: Saunders, 737–755 (2001)
- Dekker LV, Parker PJ. Protein kinase C: a question of specificity. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 73–77 (1994)
- Delahaye L, Mothe-Satney I, Myers MG, White MF, VanObberghen E. Interaction of IRS-1 with Phosphatidylinositol 3-Kinase: Effect of Substitution of Serine for Alanine in Potential IRS-1 Serine Phosphorylation Sites. *Endocrinology* **139**, 4911–4919 (1998)
- Dhe-Paganon S, Ottinger EA, Nolte RT, Eck MJ, Shoelson SE. Crystal structure of the pleckstrin homology-phosphotyrosine binding (PH-PTB) targeting region of insulin receptor substrate 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8378–8383 (1999)
- Dong LQ, Zhang RB, Langlais P, He H, Clark M, Zhu L, Liu F. Primary Structure, Tissue Distribution, and Expression of Mouse Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1, a Protein Kinase That Phosphorylates and Activates Protein Kinase C $\zeta$ . *J. Biol. Chem.* **274**, 8117–8122 (1999)
- Donnelly R, Reed M, Azhar S, Reaven GM. Expression of the major isoenzyme of PKC in skeletal muscle: PKC- $\theta$  varies with fibre-type composition and in response to fructose-induced insulin resistance. *Endocrinology* **135**, 2369–2374 (1994)
- Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin degradation: progress and potential. *Endocrine Reviews* **19**, 608–624 (1998)
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**, 1544–1548 (1999)
- Eldar-Finkelman H, Krebs E. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 by glycogen synthase kinase-3 impairs insulin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9660–9664 (1997)
- Esposito DL, Li Y, Cama A, Quon MJ. Tyr612 and Tyr632 in Human Insulin Receptor Substrate-1 Are Important for Full Activation of Insulin-Stimulated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity and Translocation of GLUT4 in Adipose Cells. *Endocrinology* **142**, 2833–2840 (2001)
- Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate

- 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**, E127–E133 (2000)
- Felder S, Zhou M, Hu P, Urena J, Ullrich A, Chaudhuri M, White MF, Shoelson SE, Schlessinger J. SH2 domains exhibit high-affinity binding to tyrosine-phosphorylated peptides yet also exhibit rapid dissociation and exchange. *Mol. Cell Biol.* **13**, 1449–1455 (1993)
- Frattali AL, Treadway JL, Pessin JE. Transmembrane signaling by the human insulin receptor kinase. Relationship between intramolecular beta subunit trans- and cis-autophosphorylation and substrate kinase activation. *J. Biol. Chem.* **267**, 19521–19528 (1992)
- Fruman DA, Cantley LC, Carpenter CL. Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics* **37**, 113–121 (1996)
- Gale NW, Kaplan S, Lowenstein EJ, Schlessinger J, Bar-Sagi D. Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* **363**, 88–92 (1993)
- 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.* **277**, 48115–48121 (2002)
- Gao Z, Zuberi A, Quon MJ, Dong Z, Ye J. Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J. Biol. Chem.* **278**, 24944–24950 (2003)
- Goldstein BJ, Bittner-Kowalczyk A, White MF, Harbeck M. Tyrosine Dephosphorylation and Deactivation of Insulin Receptor Substrate-1 by Protein-tyrosine Phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* **275**, 4283–4289 (2000)
- Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J. Clin. Invest.* **95**, 2195–2204 (1995)
- Graff JM, Stumpo DJ, Blackshear PJ. Characterization of the phosphorylation sites in the chicken and bovine myristoylated alanine-rich C kinase substrate protein, a prominent cellular substrate for protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **264**, 11912–11919 (1989)
- Greene MW, Garofalo RS. Positive and Negative Regulatory Role of Insulin Receptor Substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) Serine/Threonine Phosphorylation. *Biochemistry* **41**, 7082–7091 (2002)
- Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA. Modulation of Insulin-stimulated Degradation of Human Insulin Receptor Substrate-1 by Serine 312 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 8199–8211 (2003)



Gual P, Gremeaux T, Gonzalez T, LeMarchand-Brustel Y, Tanti JF. MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia* **46**, 1532–1542 (2003)

Hellman U, Wernstedt C, Gonez J, Heldin CH. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.* **224**, 451–455 (1995)

Hemmings BA. Akt signalling Linked membrane events to life and death decisions. *Science* **275**, 628–630 (1997)

Heydrick SJ, Ruderman NB, Kurowski TG, Adams HB, Chen KS. Enhanced stimulation of diacylglycerol and lipid synthesis by insulin in denervated muscle. *Diabetes* **40**, 1707–1711 (1991)

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central Role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333–336 (2002)

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665–668 (1996)

Idris I, Gray S, Donnelly R. Insulin Action in Skeletal Muscle Isozyme-Specific Effects of Protein Kinase C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **967**, 176–182 (2002)

Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* **44**, 659–673 (2001)

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.* **276**, 46912–46916 (2001)

Johnston AM, Pirola L, Van Obberghen E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *FEBS Lett.* **546**, 32–36 (2003)

Kahn CR. Diabetes: Causes of insulin resistance. *Nature* **373**, 384–385 (1995)

Kasuga M, Hedo JA, Yamada KM, Kahn CR. Structure of the insulin receptor and its subunits. *J. Biol. Chem.* **257**, 10392–10399 (1982)

Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000 dalton  $\beta$ -subunit of its own receptor. *Science* **215**, 185–187 (1983)

Kennelly JP, Krebs EG. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15555–15558 (1991)

Kerouz NJ, Horsch D, Pons S, Kahn CR. Differential regulation of insulin receptor

- substrates-1 and-2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (*ob/ob*) mouse. *J. Clin. Invest.* **100**, 3164–3172 (1997)
- Kikkawa U, Go M, Koumoto J, Nishizuka Y. Rapid purification of protein kinase C by high performance liquid chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 636–643 (1986)
- Kikkawa U, Ono Y, Ogita K, Fujii T, Asaoka Y, Sekiguchi K, Kosaka Y, Igarashi K, Nishizuka Y. Identification of the structures of multiple subspecies of protein kinase C expressed in rat brain. *FEBS Lett.* **217**, 227–231 (1987)
- Kimura A, Baumann CA, Chiang SH, Saltiel AR. The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9098–9103 (2001)
- King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* **21**, 1414–1431 (1998)
- Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, Konishi H, Matsuzaki H, Kikkawa U, Ogawa W, Kasuga M. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6286–6296 (1999)
- Klarlund JK, Cherniack AD, Conway BR, VanRenterghem B, Czech MP. Mechanisms of insulin action. In: Porte, D., Sherwin, R.S., (eds) Ellenberg & Rifkin's Diabetes mellitus. Appleton & Lange, Stamford, 5th ed. 75–93 (1997)
- Kovacina KS, Roth RA. Identification of SHC as a substrate of the insulin receptor kinase distinct from the GAP-associated 62 kDa tyrosine phosphoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 1303–1311 (1993)
- Ladbury JE, Lemmon MA, Zhou M, Green J, Botfield MC, Schlessinger J. Measurement of the binding of tyrosyl phosphopeptides to SH2 domains: a reappraisal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3199–3203 (1995)
- Lam K, Carpenter CL, Ruderman NB, Friel JC, Kelly KL. The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by Wortmannin. *J. Biol. Chem.* **269**, 20648–20652 (1994)
- Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.* **272**, 21403–21407 (1997)
- Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.* **272**, 11439–11443 (1997)
- Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell. Sci.* **114**, 2903–2910 (2001)

Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J. Biol. Chem.* **278**, 2896–2902 (2003)

Lehr S, Kotzka J, Herkner A, Klein E, Siethoff C, Knebel B, Noelle V, Brüning JC, Klein HW, Meyer HE, Krone W, Müller-Wieland D. Identification of Tyrosine Phosphorylation Sites in Human Gab-1 Protein by EGF Receptor Kinase in Vitro. *Biochemistry* **38**, 151–159 (1999)

Lehr S, Kotzka J, Herkner A, Sickmann A, Meyer HE, Krone W, Müller-Wieland D. Identification of Major Tyrosine Phosphorylation Sites in the Human Insulin Receptor Substrate Gab-1 by Insulin Receptor Kinase in Vitro. *Biochemistry* **39**, 10898–10907 (2000)

Li J, De Fea K, Roth RA. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 9351–9356 (1999)

Liebl A, Neiss A, Spannheimer A, Reitberger U, Wagner T, Görtz A. Kosten des Typ-2-Diabetes in Deutschland: Ergebnisse der CODE-2-Studie. *Dtsch. med. Wschr.* **126**, 585–589 (2001)

Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, Lambright DG. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol. Cell* **6**, 385–394 (2000)

Liu SCH, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Insulin receptor substrate-3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* **274**, 18093–18099 (1999)

Liu YF, Paz K, Herschkovitz A, Alt A, Tennenbaum T, Sampson SR, Ohba M, Kuroki T, LeRoith D, Zick Y. Insulin stimulates PKC $\zeta$ -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 14459–14465 (2001)

Malmqvist M, Karlsson R. Biomolecular interaction analysis: affinity biosensor technologies for functional analysis of proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 378–383 (1997)

Miele C, Riboulet A, Maitan MA, Oriente F, Romano C, Formisano P, Giudicelli J, Beguinot F, Van Obberghen E. Human Glycated Albumin Affects Glucose Metabolism in L6 Skeletal Muscle Cells by Impairing Insulin-induced Insulin Receptor Substrate (IRS) Signaling through a Protein Kinase C $\alpha$ -mediated Mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**, 47376–47387 (2003)

Moscat J, Diaz-Meco MT. The atypical protein kinase Cs. *EMBO Reports* **1**, 399–403 (2000)

Mothe I, Van Obberghen E. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J. Biol.*

*Chem.* **271**, 11222–11227 (1996)

Myers MG Jr Backer JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, White MF. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10350–10354 (1992)

Nave BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem. J.* **344**, 427–431 (1999)

Newton AC. Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *J. Biol. Chem.* **270**, 28495–28498 (1995)

Nishikawa K, Toker A, Johannes FJ, Songyang Z, Cantley LC. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 952–960 (1996)

Ogg S, Ruvkun G. The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol. Cell* **2**, 887–893 (1998)

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.* **98**, 84640–84645 (2001)

Paz K, Liu YF, Shorer H, Hemi R, LeRoith D, Quan M, Kanety H, Segeri R, Zick Y. Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) by Protein Kinase B Positively Regulates IRS-1 Function. *J. Biol. Chem.* **274**, 28816–28822 (1999)

Pearson RB, Kemp BE. Design and use of peptide substrates for protein kinases. *Methods. Enzymol.* **200**, 62–81 (1991)

Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Pawson T, Pelicci PG. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* **70**, 93–104 (1992)

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**, 165–169 (2000)

Pinna LA, Ruzzene M. How do protein kinases recognize their substrates? *BBA* **1314**, 191–225 (1996)

Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fisher TL, Myers MG Jr, Sun XJ, White MF. The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4453–4465 (1995)

Posewitz MC, Tempst P. Immobilized gallium (III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Anal. Chem.* **71**, 2883–2892 (1999)

- Qiao LY, Goldberg JL, Russell JC, Sun XJ. Identification of Enhanced Serine Kinase Activity in Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* **274**, 10625–10632 (1999)
- Qiao LY, Zhande R, Jetton TL, Zhou G, Sun XJ. *In Vivo* Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 at Serine 789 by a Novel Serine Kinase in Insulin-resistant Rodents. *J. Biol. Chem.* **277**, 26530–26539 (2002)
- Qu X, Seale JP, Donnelly R. Tissue and isoform-selective activation of protein kinase C in insulin-resistant obese Zucker rats-effects of feeding. *J. Endocrinol.* **162**, 207–214 (1999)
- Qu X, Seale JP, Donnelly R. Tissue- and isoform-specific effects of ageing in rats on protein kinase C in insulin-sensitive tissues. *Clin. Sci.* **97**, 355–361 (1999)
- Ratzmann KP. Eine Analyse von alters- und geschlechtsspezifischer Diabetesprävalenz sowie Behandlungsart: die Berlin-Studie. *Akt. Endokr. Stoffw.* **12**, 220–223 (1991)
- Ravichandran LV, Esposito DL, Chen J, Quon MJ. Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J. Biol. Chem.* **276**, 3543–3549 (2001)
- Reuther GW, Der CJ. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**, 157–165 (2000)
- Ribon V, Herrera R, Kay BK, Saltiel AR. A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. *J. Biol. Chem.* **273**, 4073–4080 (1998)
- Ribon V, Johnson JH, Camp HS, Saltiel AR. Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14751–14756 (1998)
- Ribon V, Saltiel AR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* **324**, 839–845 (1997)
- Rondinone CM, Wang LM, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U. Insulin receptor substrate-1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4171–4175 (1997)
- Rordorf-Nikolic T, Van Horn DJ, Chen D, White MF, Backer JM. Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85 kDa regulatory subunit. *J. Biol. Chem.* **270**, 3662–3666 (1995)
- Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **203**, 173–179 (1992)

Rosenzweig T, Braiman L, Bak A, Alt A, Kuroki T, Sampson SR. Differential effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on protein kinase C isoforms  $\alpha$  and  $\delta$  mediate inhibition of insulin receptor signaling. *Diabetes* **51**, 1921–1930 (2002)

Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, Dunaif A, White MF. Insulin/IGF-1 and TNF- $\alpha$  stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J. Clin. Invest.* **107**, 181–189 (2001)

Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, White MF, Van Obberghen E. Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acid 591–786. *J. Biol. Chem.* **271**, 5980–5983 (1996)

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211–225 (2000)

Schmitz-Peiffer C, Browne CL, Oakes ND, Watkinson A, Chisholm DJ, Kraegen EW, Biden TJ. Alterations in the expression and cellular localisation of protein kinase C isozymes  $\epsilon$  and  $\theta$  are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat fed rat. *Diabetes* **46**, 169–178 (1997)

Schmitz-Peiffer C. Protein Kinase C and Lipid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **967**, 146–157 (2002)

Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC Jr. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7772–7777 (1998)

Seeger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726–735 (1995)

Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* **15**, 2099–2111 (2001)

Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem. J.* **305**, 25–28 (1995)

Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* **333**, 471–490 (1998)

Shmueli E, Alberti KGM, Record CO. Diacylglycerol/protein kinase C signalling: a mechanism for insulin resistance? *J. Intern. Med.* **234**, 397–400 (1993)

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**, 171–176 (2000)

Siemeister G, Al-Hasani H, Klein HW, Kellner S, Streicher R, Krone W, Müller-Wieland D. Recombinant Human Insulin Receptor Substrate-1 Protein. *J. Biol.*

*Chem.* **270**, 4870–4874 (1995)

Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, Vicentini LM, Zhou M, Daly R, Myers MJ Jr, Backer JM, Ullrich A, White MF. The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine- phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *Embo. J.* **12**, 1929–1936 (1993)

Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31–40 (1988)

Sommerfeld M. Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten IRS-1-Fusionsproteinen. Diplomarbeit an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (1999)

Standaert M, Bandyopadhyay G, Galloway L, Soto J, Ono Y, Kikkawa U, Farese RV, Leitges M. Effects of knockout of the protein kinase C- $\beta$  gene on glucose transport and glucose homeostasis. *Endocrinology* **140**, 4470–4477 (1999)

Standaert M, Bandyopadhyay G, Perez L, Price D, Galloway L, Poklepovic A, Sajan MP, Cenni V, Sirri A, Moscat J, Toker A, Farese RV. Insulin activates protein kinases C- $\zeta$  and - $\lambda$  by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 25308–25316 (1999)

Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. Protein kinase C- $\zeta$  as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J. Biol. Chem.* **272**, 30075–30082 (1997)

Standaert ML, Ortmeyer HK, Sajan MP, Kanoh Y, Bandyopadhyay G, Hansen BC, Farese RV. Skeletal muscle insulin resistance in obesity-associated type 2 diabetes in monkeys is linked to a defect in insulin activation of protein kinase C-zeta/lambda/iota. *Diabetes* **51**, 2936–2943 (2002)

Strack V, Hennige AM, Krutzfeldt J, Bossenmaier B, Klein HH, Kellerer M, Lammers R, Haring HU. Serine residues 994 and 1023/25 are important for insulin receptor kinase inhibition by protein kinase C isoforms  $\beta 2$  and  $\theta$ . *Diabetologia* **43**, 443–449 (2000)

Straus DS. Regulation by insulin of cellular growth and proliferation: Relationship to the insulin-like growth factors. In: Draznin B, Melmed S, LeRoith D. (eds) *Insulin Action*. A.R. Liss, New York:143 (1989)

Summers SA, Kao AW, Kohn AD, Backus GS, Roth RA, Pessin JE, Birnbaum MJ. The role of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in insulin-stimulated glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* **274**, 17934–17940 (1999)

Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG Jr, Miralpeix M, White MF. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7418–7428 (1993)

Sun XJ, Goldberg JL, Qiao LY, Mitchell JJ. Insulin induced insulin receptor

substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes* **48**, 1359–1364 (1999)

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* **352**, 73–77 (1991)

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* **377**, 173–177 (1995)

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* **372**, 182–186 (1994)

Tanasijevic MJ, Myers MG, Thoma R, White MF, Sacks DB. Phosphorylation of the Insulin Receptor Substrate IRS-1 by Casein Kinase II. *J. Biol. Chem.* **268**, 18757–18766 (1993)

Tanti JF, Gremeaux T, Obberghen EV, Marchand-Brustel YL. Serine/ threonine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 modulates insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **269**, 6051–6057 (1994)

Treadway JL, Morrison BD, Soos MA, Siddle K, Olefsky J, Ullrich A, McClain DA, Pessin JE. Transdominant inhibition of tyrosine kinase activity in mutant insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 214–218 (1991)

Vely F, Trautmann A, Vivier E. BIAcore analysis to test phosphopeptide-SH2 domain interactions. *Methods Mol. Biol.* **121**, 313–321 (2000)

Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **103**, 931–943 (1999)

Wada T, Sasaoka T, Ishiki M, Hori H, Haruta T, Ishihara H, Kobayashi M. Role of the Src homology 2 (SH2) domain and C-terminus tyrosine phosphorylation sites of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) in the regulation of insulin-induced mitogenesis. *Endocrinology* **140**, 4585–4594 (1999).

Watson RT, Shigematsu S, Chiang SH, Mora S, Kanzaki M, Macara IG, Saltiel AR, Pessin JE. Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J. Cell Biol.* **154**, 829–840 (2001)

White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **283**, E413–E422 (2002)

White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* **40**, S2–S17 (1997)

White MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* **182**, 3–11 (1998)



Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **391**, 900–904 (1998)

Zhande R, Mitchell JJ, Wu J, Sun XJ. Molecular Mechanism of Insulin-Induced Degradation of Insulin Receptor Substrate 1. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1016–1026 (2002)

Zick Y. Insulin Resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signal transduction. *Trends Cell. Biol.* **11**, 437–441 (2001)

Zimmet P. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the Doomsday scenario be averted? *J. Intern. Med.* **247**, 301–310 (2000)

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Überblick über die Insulin-Signaltransduktion	4
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur der PI 3-Kinase-Untereinheiten	5
Abb. 3:	Phylogenetische Analyse der IRS-Proteine aus Mensch und Maus	9
Abb. 4:	Dreidimensionale Struktur einzelner Domänen von IRS-1	10
Abb. 5:	Modulationen der Signaltransduktion auf Ebene des IRS-1	12
Abb. 6:	Schematische Struktur der klassischen, neuen und atypischen Protein Kinase C	16
Abb. 7:	Genkarte der Glutathion-S-transferase-Fusionsvektoren pGEX-2T und pGEX-5X-3	23
Abb. 8:	Versuchsschema der kombinierten Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup>	39
Abb. 9:	Aminosäuresequenz des GST-Fusionsproteins rIRS-1 <sup>449-664</sup>	45
Abb. 10:	Aufreinigung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> aus <i>E. coli</i>	46
Abb. 11:	Aufreinigung von GST-p85 $\alpha$ aus <i>E. coli</i>	47
Abb. 12:	Proteolytische Spaltung von GST-p85 $\alpha$	48
Abb. 13:	WGA-Aufreinigung des Insulinrezeptors	49
Abb. 14:	Insulinstimulierte <i>in vitro</i> Phosphorylierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> durch den Insulinrezeptor	51
Abb. 15:	Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> und Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit p85 $\alpha$ der PI 3-Kinase	52
Abb. 16:	rIRS-1 <sup>449-664</sup> ist ein Substrat der aus dem Rattengehirn aufgereinigten PKC Isoformen $\alpha$ , $\beta_1$ , $\beta_2$ und $\gamma$ (PKC-rb)	53
Abb. 17:	rIRS-1 <sup>449-664</sup> ist ein Substrat der atypischen PKC Isoform $\zeta$	54
Abb. 18:	Effekt der PKC aus dem Rattengehirn auf die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> und die Interaktion mit p85 $\alpha$	56
Abb. 19:	Effekt der PKC- $\zeta$ auf die Tyrosin-Phosphorylierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> und die Interaktion mit p85 $\alpha$	57
Abb. 20:	Einfluss der PKC auf die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors	58
Abb. 21:	Effekt der PKC auf die Kinaseaktivität des Insulinrezeptors	59
Abb. 22:	Bestimmung potentieller Phosphorylierungsstellen mit Netphos 2.0	60
Abb. 23:	Konsensus-Motiv der PKC- $\zeta$ nach den Autoren Nishikawa et al. (1996)	61
Abb. 24:	Serin 612 wird von der PKC durch die Übertragung einer Phosphorylgruppe kovalent modifiziert	62
Abb. 25:	Sequenzvergleich von Serin 612	63
Abb. 26:	Zweidimensionale HPLC-Auftrennung tryptischer Peptide von rIRS-1 <sup>449-664</sup> nach PKC- $\zeta$ Phosphorylierung	66
Abb. 27:	In den HPLC-Eluaten per Massenspektrometrie identifizierte Peptide aus rIRS-1 <sup>449-664</sup>	67
Abb. 28:	ESI-MS Analyse von HPLC-Fraktion 4	69
Abb. 29:	Sequenzvergleich der IRS-1 Serine 498 und 570	70

Abb. 30:	ESI-MS-Analyse des IMAC-Eluates	71
Abb. 31:	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> -Mutanten durch die PKC	72
Abb. 32:	Anionenaustausch-Chromatographie tryptischer Phosphopeptide der rIRS-1 <sup>449-664</sup> -Mutanten S498A, S570A und S612A	74
Abb. 33:	Vergleichende Darstellung der Anionenaustausch-Chromatographie der rIRS-1 <sup>449-664</sup> -Mutanten nach PKC- $\zeta$ Phosphorylierung	75
Abb. 34:	Überprüfung eines im Kaninchen generierten Antiserums gegen die Phosphoform des IRS-1 Serins 570	77
Abb. 35:	Funktionelle Analyse von Serin 570 und Serin 612	78
Abb. 36:	Phosphopeptidkartierung von rIRS-1 <sup>449-664</sup> nach Phosphorylierung durch die PKC aus dem Rattengehirn	79
Abb. 37:	Messsystem und Sensorgramm im BIAcore X	81
Abb. 38:	Immobilisierung des Peptids pY608 an einen Sensorchip CM5	83
Abb. 39:	Regeneration der Chipoberfläche	84
Abb. 40:	Sensorgramme der Interaktionen von p85 $\alpha$ mit den Peptiden pY608 (A), Y608 (B), pY608-pS612 (C) und pS612 (D)	85
Abb. 41:	Sensorgramm der Interaktion von p85 $\alpha$ mit pY608 bei erhöhter Flussgeschwindigkeit	85
Abb. 42:	Beispiele für die Auswertung gemessener Interaktionen	87
Abb. 43:	Bestimmung des IC <sub>50</sub> mittels Wettbewerbsversuche	90

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Serinkinasen, die IRS-1 <i>in vitro</i> und/oder <i>in vivo</i> phosphorylieren	14
Tab. 2:	Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme	21
Tab. 3:	Sequenzen der für die Interaktionsstudien verwendeten Peptide	22
Tab. 4:	In dieser Arbeit verwendete Plasmide	22
Tab. 5:	In dieser Arbeit verwendete Mutageneseprimer	23
Tab. 6:	Reaktionsbedingungen bei der Polymerase-Kettenreaktion	27
Tab. 7:	Verwendete Antiseren mit den entsprechenden Lösungen	33
Tab. 8:	Ergebnis der massenspektrometrischen Sequenzanalyse der rIRS1 <sup>449-664</sup> Phosphopeptide	68
Tab. 9:	Phosphateinbau unter HPLC-Bedingungen	73
Tab. 10:	Vergleich der inkorporierten Menge an <sup>32</sup> P von Wildtyp und Mutanten in der Anionenaustausch-Chromatographie	75
Tab. 11:	Ergebnisse der Kurvenauswertung von p85 $\alpha$ an pY608 bei 5 $\mu$ l/min mit dem Modell ‚Langmuir 1:1 Bindung‘	87
Tab. 12:	Ergebnisse der Kurvenauswertung von p85 $\alpha$ an pY608-pS612 bei 5 $\mu$ l/min mit dem Modell ‚Langmuir 1:1 Bindung‘	88
Tab. 13:	Ermittelte Affinitäten der Interaktion von p85 $\alpha$ mit pY608 und pY608-pS612	88
Tab. 14:	Equilibriumanalyse	88
Tab. 15:	Ermittelte IC <sub>50</sub> -Werte aus den Wettbewerbsversuchen	90

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

Düsseldorf, den 18.02.2004

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Eckel, da er es mir ermöglichte, diese interessante Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut durchzuführen. Ihm danke ich für die intensive Unterstützung, seine stete Diskussionsbereitschaft, sein entgegengebrachtes Interesse an meiner Arbeit und seine hilfreichen Ratschläge. Außerdem ermöglichte er mir durch die Teilnahme an einer Reihe von Kongressen Anregungen und Ideen für die vorliegende Arbeit zu sammeln.

Herrn Prof. Dr. Detlev Riesner möchte ich für die Übernahme des Korreferats und das Interesse an der Arbeit danken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Frau Dr. Metzger, durch die die massenspektrometrische Analyse der Phosphopeptide entstand, ohne die große Teile dieser Arbeit nicht realisierbar gewesen wären.

Allen Mitgliedern der AG Eckel - Alex, Anja, Barbara, Daniela, Daniela, Irini, Jörg, Karin, Lars, Magda, Marlis, Matthias, Miriam, Olaf, Robert, Sonja, Stefanie und Waltraud - möchte ich für das ausgesprochen gute Arbeitsklima, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und für die Hilfe bei der Bewältigung der vielen kleinen und großen Probleme des Laboralltags danken.

Allen übrigen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt auch Markus, Karolina und Nasser.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt meinen Eltern und meiner Schwester Antje für die unermüdliche Unterstützung in allen Lebenslagen.