

## Michael Udelhoven: Identifikation und Charakterisierung eines Insulinrezeptorsubstrat-2 bindenden Proteins. 2001

Die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) bilden intrazelluläre Adaptorproteine, die nach der Phosphorylierung durch den Insulinrezeptor (IR) oder andere Rezeptortyrosinkinasen (RTK) phosphorylierungsabhängig nachgeschaltete Signalproteine koppeln. Dabei bilden sich Signalkomplexe aus, die zahlreiche Signaltransduktionswege aktivieren. Neben der hauptsächlich auftretenden Bindung an spezifische Tyrosinphosphorylierungsstellen der IRS-Proteine über SH2 Domänen wurden auch Interaktionspartner identifiziert, deren Bindungsart noch unbekannt ist. Da bis jetzt im Hinblick auf die vielen potentiellen Tyrosinphosphorylierungsstellen im C-Terminus der IRS-Proteine und der multiplen Insulinwirkungen erst relativ wenige IRS-Protein-Interaktionspartner gefunden wurden, wurde in dieser Arbeit versucht, neue phosphorylierungsabhängige Bindungspartner von IRS-2 in der IR-Signalkaskade zu finden. Zu diesem Zweck wurde der Weg des *Screenings* von l-Phagen-cDNA-Expressionsbanken gewählt. Dabei galt es zunächst basierend auf der murinen IRS-2 cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Subdomänen von mIRS-2 zu amplifizieren, in den pGEX-3X Expressionsvektor zu klonieren und anschließend als GST-Fusionsproteine zu exprimieren (N-Terminus 1; AS 1-358, N-Terminus 2 ; AS 353-563, Mittlere Domäne; AS 546-846, C-Terminus 1; AS 845-1098, C-Terminus 2; AS 1093-1322)

Zunächst wurden die exprimierten Subdomänen von mIRS-2 mit der rekombinanten Insulinrezeptorkinase phosphoryliert und als Sonde zum *Screening* von l-Phagen-cDNA-Expressionsbanken aus den insulinsensitiven Geweben Leber und Skelettmuskulatur in einem Phagen-Plaque-Assay eingesetzt. In diesem wurden die cDNA-Inserts der eingesetzten l-Phagen-Expressionsbanken nach Infektion von *E. Coli* auf Agarplatten exprimiert und auf Nitrozellulose-Filtern fixiert. Die IRS-2 Subdomänen wurden zunächst radioaktiv phosphoryliert, um einen möglichen Bindungspartner auf den Filtern sichtbar zu machen. Anschließend wurde auf einen Ansatz über die indirekte Erkennung der Sonde durch anti-Phosphotyrosin-Antikörper gewechselt, der sich als effektiver herausstellte.

Schließlich konnte nach dem *Screening* von 3,5 Mio Phagen-Plaques in der Skelettmuskelbank ein neuer mIRS-2 Bindungspartner identifiziert werden, dessen cDNA für ein 46 kDa großes Protein kodierte. Zudem wurde die Tyrosinkinase c-Fes gefunden. Zusätzlich konnten Fragmente der p85a und p55a Isoformen der regulatorischen Untereinheiten der PI-3 Kinase (PI-3K) gefunden werden; dies wurde als positiv-Kontrolle für die Funktionsfähigkeit des angewendeten Phagen-Plaque-Assays gewertet.

Das 46 kDa große Protein enthält zwei SH2-Domänen und eine inter SH2-Domäne, die homolog zu p85a sind. Jedoch enthält das Protein im Gegensatz zu p85a weder eine *breakpoint cluster region kinase* (bcr) homologe Region noch eine SH3-Domäne. Stattdessen besitzt es an seinem N-Terminus 6 AS, die nicht zu p85a homolog sind. Aufgrund dieser strukturellen Merkmale wurde es als das humane Homolog zu der in der Ratte gefundenen p50a Isoform der regulatorischen Untereinheit der PI-3K eingeordnet.

Über *Northern-Blot*-Analysen wurde danach die Verteilung der p46-PI-3K in humanen Geweben untersucht. Dabei zeigten sich die stärksten Signale in Skelettmuskel, Herz und Gehirn. Diese Ergebnisse differierten stark mit der schon bekannten Gewebeverteilung von p50a in der Ratte. Um die Bindung von p46-PI-3K an verschiedene IRS-Proteine weiter charakterisieren zu können, wurden *Far-Western* Experimente mit als GST-Fusionsprotein exprimiertem p46-PI-3K, sowie den GST-mIRS-2 Subdomänen und komplettem GST-rIRS-3 durchgeführt. In diesen konnte die phosphorylierungsabhängige Bindung der p46-PI-3K an die mIRS-2 Subdomänen verifiziert werden. Zudem trat eine phosphorylierungsabhängige Bindung an den rekombinanten Insulinrezeptor auf. Eine Bindung von phosphoryliertem rIRS-3 an die p46-PI-3K trat dagegen nicht auf.

Dabei bereitete die Expression des kompletten rIRS3 als GST-Fusionsprotein zunächst starke Probleme. Die Aufreinigung in homogener Form und hinreichender Menge war nicht möglich. Um

dieses Problem zu lösen, wurde ein Chaperonexpressions-System entwickelt, in dem das herzustellende GST-Fusionsprotein zusammen mit Chaperonen, die es bei seiner nativen Faltung unterstützen sollten, exprimiert wurde. Dazu wurden die Chaperone GroES, GroEL und Triggerfaktor aus bakterieller DNA amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert, der so umkonstruiert wurde, daß eine gleichzeitige Transformation mit dem pGEX Vektorsystem möglich war. Zudem war über diesen Vektor eine vom pGEX Vektor unabhängige Induktion der Chaperonexpression möglich. Schließlich konnte GST-rIRS-3 erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden, so daß es in den oben beschriebenen Experimenten eingesetzt werden konnte.

Um das unterschiedliche Bindungsverhalten von mIRS-2 und rIRS-3 an die p46-PI-3K in einem *in vivo* System verifizieren zu können, wurde ein *mammalian two hybrid* System in HepG2 Zellen durchgeführt. In diesem kann die Interaktion durch Expression des einen Partners als Fusionsprotein mit einer DNA bindenden Domäne, sowie des anderen Partners als Fusionsprotein mit einer transkriptionsaktivierenden Domäne über ein Luziferase Assay bestimmt werden. Es zeigte sich auch hier eine Interaktion der p46-PI-3K mit mIRS-2, die durch Insulinstimulierung auf das Doppelte gesteigert werden konnte. Mit rIRS-3 trat dagegen nur eine schwächere Bindung auf, die sich auch nicht durch Insulinstimulierung verbessern ließ.

Zur Festigung der *in vivo* Ergebnisse wurde die p46-PI-3K in HepG2 Zellen über IRS-1, IRS-2 und IRS-3 koimmunopräzipitiert. Hierbei konnte eine Interaktion von IRS-1 und 2 mit der p46-PI-3K beobachtet werden, die durch Insulinzugabe geringfügig gesteigert werden konnte. Mit rIRS-3 trat dagegen wiederum fast gar keine Bindung auf.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß über das *Screening* von l-Phagen-cDNA-Expressionsbanken die humane Isoform p46 der regulatorischen Untereinheit der PI-3K als ein IRS-Protein Bindungspartner gefunden werden konnte. Dieses Protein bindet nach Insulinstimulierung an IRS-1 und 2, wogegen eine Interaktion mit IRS-3 nicht vorliegt. Aufgrund seiner Gewebeverteilung im Menschen, scheint es besonders wichtig für die Signalweiterleitung im Skelett- und Herzmuskel sowie im Gehirn zu sein. Dabei könnte es zu einer differenzierten Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen kommen, die auf das unterschiedliche Bindungsverhalten der p46-PI-3K zu den verschiedenen IRS-Proteinen begründet ist.

---

The insulin receptor initiates insulin action by phosphorylating the insulin receptor substrates (IRS) 1, -2, -3 and 4, as well as Gab-1 and -2. The IRS are intracellular adaptor proteins that bind downstream effectors in a phosphorylation-dependent manner. We aimed to find a new phosphorylation-dependent interaction partner of IRS-2 in the insulin receptor signaling cascade. To achieve this, we built subdomains of the entire mIRS-2 as GST-fusion-proteins in *E.Coli*. These represent two N-terminal and two C-terminal parts as well as the middle part of the protein. IRS-2 subdomains were phosphorylated by the recombinant insulin receptor kinase and used as probes to screen human l phage cDNA expression libraries derived from insulin-sensitive tissues. Bacteria were infected by the phage and spread out on agar plates. After forming plaques, translation of the different cDNA inserts was induced by overlaying the plates for 15 h with nitrocellulose filters that had been impregnated with IPTG. Every plaque then produced a different protein that would be fixed on the filter. In order to find a new binding partner of IRS-2, we incubated the filters with <sup>32</sup>P-labeled mIRS-2-GST-fusion-protein-subdomains. Positive plaque signals were identified by autoradiography. However, this approach did not work well, because there were high background signals and the procedure was very time-consuming. In a second trial we used antiphosphotyrosine antibodies to detect indirectly the phosphorylated probe. Using this method, positive plaque signals on the filters could be found much faster by chemiluminescence without disturbing background signals. After screening 3,500,000 plaques, we found a cDNA encoding a novel 46 kDa protein (p46) in a skeletal muscle library. In addition, diverse fragments of p85a and p55a and the c-fes kinase were found as positive controls for the assay system. The new p46 protein contains two SH2 domains and an inter-SH2 domain homologous to p85a. In contrast to p85a, it contains no bcr or SH3 domain and has

a unique 6-amino acid sequence at its amino terminus. On the basis of these structural features it seems to be the human homologue to rat p50a and we called it p46-PI-3K. Far-Western experiments with expressed p46-PI-3K GST-fusion-proteins indicated that all expressed subdomains, and particularly the middle domain of mIRS-2 but not recombinant entire rIRS-3, binds to p46 after phosphorylation by the recombinant insulin receptor kinase. rIRS-3 used in these experiments was expressed a GST-fusion-protein with assistance of a chaperone expression system, developed for this purpose. The *in vitro* observations were confirmed *in vivo* by using a mammalian two hybrid system in HepG2 cells. There was a phosphorylation-dependent interaction between p46-PI-3K and expressed mIRS-2 after insulin stimulation, but there was only a weak interaction with IRS-3. Consistent with these observations, another *in vivo* approach in HepG2 cells showed that p46-PI-3K could be coimmunoprecipitated with hIRS-1 and mIRS-2 but not with rIRS-3 after insulin stimulation. Our results provide evidence for the existence of a novel human regulatory subunit of PI-3K, called p46, which appears to interact differentially with IRS-proteins and therefore might play a role in insulin action and states of insulin resistance.