

# **Modulation der Insulinsignalübertragung durch Proteinkinase C-katalysierte Phosphorylierung von Serin<sup>318</sup> im Insulinrezeptor-Substrat-1**

**Identifizierung und Charakterisierung von neuen  
Phosphorylierungsstellen durch massenspektrometrische,  
zellbiologische und immunchemische Untersuchungen**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard–Karls–Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt  
von  
Klaus Möschel

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 2004

Dekan: Prof. Dr. Hansgeorg Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wolfgang Voelter

2. Berichterstatterin: Privatdozentin Dr. Stanka Stoeva

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wolfgang Voelter in der Zeit von Februar 2000 bis Juni 2003 im Zentrallabor der Medizinischen Klinik, Abteilung IV Innere Medizin und Endokrinologie, und an der Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität Tübingen durchgeführt.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2000 bis Juni 2003 am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen und im Zentrallabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik, Abteilung Innere Medizin IV unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Dr. h.c. mult. **Wolfgang Voelter** und Herrn Dr. **Rainer Lehmann** durchgeführt.

Herrn Prof. **Wolfgang Voelter** danke ich für die interessante Aufgabenstellung, seine freundliche Unterstützung und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Professor Dr. **Hans-Ulrich Haering**, Herrn Professor Dr. **Erwin Schleicher** und Herrn Dr. Dr. **Besenthal** danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Zentrallabor der Medizinischen Klinik, für ihre Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Mein größter Dank gilt Herrn Dr. **Rainer Lehmann** für seine gute Betreuung, für zahlreiche fachliche Anregungen, aufmunternden Worte und guten Ideen sowie für die fachliche Durchsicht dieses Manuskriptes. Die mit ihm geführten wissenschaftlichen Gespräche haben mir immer wieder neue Anregungen für die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit gegeben. Er ermöglichte mir einen Auslandsaufenthalt bei Prof. Dr. **Peter Roepstorff** an der Universität in Odense/Dänemark und die Teilnahme an einer Vielzahl von wissenschaftlichen Kongressen, wo ich meine Arbeit vorstellen konnte und wo Kontakte für Kooperationen geschlossen werden konnten, durch die diese Arbeit vorangetrieben wurde.

Den MTAs des PCR Labors von Herrn Prof. Dr. **Machicao** danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Plasmidsequenzierungen. Frau Dr. **Cora Weigert** und ihrer Assistentin **Katrin Brodbeck** danke ich für die sehr gute Einführung und Unterstützung bei allen molekularbiologischen Methoden und für ihre ständige Diskussionsbereitschaft. Herrn Dr. **Alexander Beck** danke ich für seine Unterstützung bei allen massenspektrometrischen Analysen, für unzählige gute Tipps und für die gute Atmosphäre in unserem Büro.

## Danksagung

---

Herrn Dr. **Martin Deeg** möchte ich für seine Unterstützung bei den MS-Analysen am TSQ 700 Triple Quadrupol-MS im MS-Labor in Derendingen herzlich danken.

Bei allen Mitgliedern der beiden Arbeitsgruppen möchte ich mich für das freundliche und kameradschaftliche Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bedanken. Mein besonderer Dank gilt den MTAs **Gertrud Stanka, Myriam Schäuble, Roman Werner** und den Auszubildenden **Thorn Westphal, Siegfried Ebner und Sabine Kohrhummel**.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der benachbarten Arbeitsgruppen, die mir gerne mit fachlichen Ratschlägen, Chemikalien oder Geräten ausgeholfen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn PD Dr. **Reiner Lammers**, dessen unerschöpfliches Reservoir an Antikörpern und Chemikalien mir über jeden Engpass hinweggeholfen hat und Frau **Michaela Waldner**, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte. Dem Leiter der Laborwerkstatt Herrn **Peter Krebs**, sowie dem EDV-Techniker Herrn **Ulrich Opp** danke ich für so manche Reparatur und Hilfe bei Geräte- oder Computerproblemen.

Meiner Frau **Alexandra** und meinen Kindern **Jonas, Annika, Kyra** und **Maike** danke ich für ihre tägliche Unterstützung in allen Dingen, ihre Geduld und ihre Liebe.

Dem Land Baden-Württemberg (Landesschwerpunkt „functional proteomics“), dem innerklinischen fortune-Projekt und Herrn Prof. Dr. **Haering** danke ich für die Finanzierung meiner Arbeit.

meiner Frau Alexandra,  
meinen Kindern Maike, Kyra,  
Annika und Jonas

Es ist Gottes Ehre, eine Sache zu  
verbergen; aber der Könige Ehre ist es,  
eine Sache zu erforschen

Sprüche 25; 2

Im Zeitraum dieser Dissertation sind folgende Publikationen erschienen:

**Moeschel, K.**, Beck, A., Weigert, C., Lammers, R., Kalbacher, H., Voelter, W., Häring, H-U., Lehmann, R.

Protein kinase C- $\zeta$ -induced phosphorylation of Ser<sup>318</sup> in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1.

J Biol Chem (2004) In Revision.

Beck, A., **Moeschel, K.**, Deeg, M., Haering, H-U., Voelter, W., Schleicher, E.D., 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).

**Moeschel, K.**, Nouaimi, M., Steinbrenner, C., Bisswanger, H.

Immobilization of thermolysin to polyamide nonwoven materials.

Biotechnol. Bioeng. 82, 190-199 (2003).

Lehmann, R., Beck, A., **Moeschel, K.**, Schmidt, E.K., Deeg, M., Rapp, E., Sun, X.J., Kellerer, M., Voelter, W., Schleicher, D., Haering, H-U.

Protein kinase C- $\zeta$  phosphorylates serine/threonine residues at the C-terminal binding motif of the tyrosine phosphatase SHP-2 of insulin receptor substrate 1. Signal Transduction 2, 40-45 (2002).

Beck, A., Deeg, M., **Moeschel, K.**, Schmidt, E.K., Schleicher, E.D., Voelter, W., Haering, H-U., Lehmann, R.

Alkaline liquid chromatography/electrospray ionization skimmer collision-induced dissociation mass spectrometry for phosphopeptide screening.

Rapid Commun. Mass Spectrom. 15, 2324-2333 (2001).

Nouaimi, M., **Moeschel, K.**, Bisswanger, H.

Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers.

Enzyme and Microbial Technology 29, 567-574 (2001).

Bisswanger, H., Figura, R., **Moeschel, K.**, Nouaimi, M.

Enzymkinetik, Ligandenbindung und Enzymtechnologie Labor- und Praktikumsversuche. (Shaker-Verlag 2000, ISBN 3-8265-7175-4).

Im Zeitraum dieser Dissertation wurde die Arbeit auf folgenden Tagungen präsentiert:

a) Vortrag

38. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft 28.–31. Mai 2003, Bremen

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung einer Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle im Insulinrezeptor Substrat 1

**K. Moeschel**, A. Beck, C. Weigert, R. Lammers, R. Lehmann, E.D. Schleicher, H.-U. Haering

Diabetes und Stoffwechsel, Supplement-Heft 1, Band 12, 2003, V-6, S.2

b) Poster abstracts

GBM/ELSO 2003 Dresden, 20. – 24. 9.2003 Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) at serine<sup>318</sup> by Protein kinase C- $\zeta$  modulates the insulin induced tyrosine phosphorylation of IRS-1 and the interaction with the insulin receptor.

**Klaus Moeschel**, Alexander Beck, Cora Weigert, Myriam Schaeuble, Wolfgang Voelter, Erwin Schleicher, Hans-Ulrich Haering

IDF 24.-29.8.2003, Paris

Functional characterization of a PKC-dependent IRS-1 phosphorylation site using mass spectrometry

A. Beck, **K. Moeschel**, M. Deeg, E.D. Schleicher, R. Lehmann and H.-U. Häring. Medizinische Klinik, Abt. IV, Universität Tübingen, Germany

IDF 24.-29.8.2003, Paris

Phosphorylation of Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) at Ser<sup>318</sup> by Protein kinase C- $\zeta$  modulates the interaction with the insulin receptor and the activation of insulin signaltransduction -A contribution to cellular insulin resistance under hyperinsulinemic conditions-

Rainer Lehmann, **Klaus Moeschel**, Alexander Beck, Cora Weigert, Reiner Lammers, Erwin D. Schleicher, Hans-Ulrich Häring

46th Annual Meeting of the German Society of Endocrinology (DGE); 27.2-2.3.2002

Protein kinase C- $\zeta$  phosphorylates serine/threonine residues at the C-terminal binding motif of the tyrosine phosphatase SHP-2 of insulin receptor substrate 1 *in vitro*

Schleicher ED, Lehmann R, Beck A, **Moeschel K**, Schmidt EK, Deeg M, Kellerer M, Häring HU

Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, Abstracts 2002, Thieme Verlag; <http://www.thieme.de/abstracts/eced/abstracts2002/daten/p038.html>

ASMS 2.-6.6.2002, Orlando

Identification of an IRS-1 phosphorylation site using a negative-ion  $\mu$ LC/ESI-sCID-MS hybrid-scan method under alkaline conditions

A. Beck, **K. Moeschel**, M. Deeg, W. Voelter, H.U. Häring, E.D. Schleicher and R. Lehmann

ASMS 2.-6.6.2002, Orlando

A novel multidimensional reversed-phase capillary-HPLC/ESI-IT-MS strategy - an efficient tool for analysis of phosphorylation sites

Rainer Lehmann, **Klaus Moeschel**, Roman Werner, Wolfgang Voelter, Hans-Ulrich Häring, Erwin D. Schleicher, Alexander Beck

ASMS 27-31.5.2001, Chicago

On-line alkaline cRP-HPLC-skimmer-CID-ESI mass spectrometric screening for phosphopeptides

A. Beck, M. Deeg, E.K. Schmidt, **K. Moeschel**, E.D. Schleicher and R. Lehmann

VIII<sup>th</sup> International Symposium on Insulin Receptors and Insulin Action, 5.-9. Mai 2001, Genf

Identification of protein kinase C- $\zeta$  phosphorylation sites in the C-terminal part of insulin receptor substrate 1

Lehmann R., Beck A., **Moeschel K.**, Stanka G., Schmidt E.K., Deeg M., Rapp E., Sun X.J., Kellerer M., Voelter W., Häring H.U. and Schleicher E.D

4th STS Meeting: Signal Transduction-Receptors, Mediators and Genes 2.-4.11.2000, Weimar

On-line capillary LC- and off-line nano-spray-ESI-mass-spectrometric strategies in signal transduction research

Lehmann R., Beck A., **Moeschel K.**, Deeg M., Schmidt E.K., Lammers R., Voelter W., Häring H.U. and Schleicher E.D

GBM Jahrestagung 10.-13. Oktober 2000, München

Phosphorylation of model peptides and insulin receptor substrate IRS-1 by conventional, novel and atypical protein kinase C isozymes

**K. Moeschel**, A. Beck, G. Stanka, M. Deeg, E.K. Schmidt, M. Kellerer, H.-U. Häring, and R. Lehmann. Biol. Chem. Special Supplement 381, S. 257

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Hintergrund der Arbeit, Typ 2 Diabetes	1
1.2. Signaltransduktion	2
1.3. Signalweiterleitung durch Phosphorylierung	3
1.4. Die Insulinsignalweiterleitung	4
1.4.1. Der Insulinrezeptor	4
1.4.2. Bindungspartner des Insulinrezeptors	5
1.4.3. Insulinrezeptor-Substrate (IRS)	6
1.4.3.1. Insulinrezeptor-Substrate-5 und -6 (IRS-5, IRS-6)	7
1.4.3.2. Insulinrezeptor-Substrat-4 (IRS-4)	7
1.4.3.3. Insulinrezeptor-Substrat-3 (IRS-3)	8
1.4.3.4. Insulinrezeptor-Substrat-2 (IRS-2)	8
1.4.3.5. Insulinrezeptor-Substrat-1 (IRS-1)	8
1.4.4. Rolle des IRS-1 in der Insulinsignaltransduktion	9
1.4.5. Modulation von IRS-1 durch Ser/Thr-Phosphorylierung	12
1.4.5.1. Positive Modulation der Insulinsignalweiterleitung	14
1.4.5.2. Negative Modulation der Insulinsignalweiterleitung	14
1.4.6. Rolle des IRS-1 bei der Entstehung der Insulinresistenz und des Diabetes mellitus Typ2	16
1.4.7. Serin-/Thr-Phosphorylierung von IRS-1 durch PKC-Isoformen und ihre Rolle bei der Entwicklung von Insulinresistenz	17
1.4.8. Proteinkinase C	18
1.4.9. Substratspezifität von PKC-Isoformen	21
1.5. Detektion und Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen in Signaltransduktionsmolekülen	22
1.5.1. Klassische Methoden zur Detektion und Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen	22
1.5.2. Massenspektrometrische Methoden zur Detektion und Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen	24
1.6. Zielsetzung der Arbeit	25

<b>2. Materialien, Software und Geräte</b>	<b>27</b>
2.1. Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren und Substrate	27
2.2. Antikörper	28
2.2.1. Antikörper gegen IRS-1	28
2.2.2. Antikörper gegen PKC	28
2.2.3. Antikörper gegen Signaltransduktionsmoleküle	28
2.2.4. Weitere Antikörper	29
2.2.5. Sekundäre Antikörper	29
2.3. Chemikalien und Lösungsmittel	29
2.3.1. Molekulargewichtsmarker	32
2.3.2. Lösungen und Puffer	32
2.3.3. Nährmedien und Antibiotika	35
2.3.4. Radioaktive Materialien	36
2.4. Verbrauchsmaterialien	37
2.5. Zellen und Bakterienstämme	38
2.5.1. Zellen	38
2.5.2. Bakterienstämme	38
2.6. Geräte	39
2.7. Software und Datenbanken	41
<b>3. Methoden</b>	<b>43</b>
3.1. Produktion und Reinigung von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	43
3.1.1. Transformation der Plasmide in <i>E. coli</i> -Stämme	44
3.1.2. Aufzucht der <i>E. coli</i>	44
3.1.3. Ernte und Lyse der <i>E. coli</i>	45
3.1.4. Reinigung der GST-Fusionsproteine	45
3.1.5. Konzentrationsbestimmung nach Bradford	46
3.1.6. Lagerung der Fusionsproteine	46
3.2. <i>In vitro</i> -Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen	46

3.2.1. Herstellung von Liposomen	46
3.2.2. Zusammensetzung der Puffer für die Kinase-Assays	47
3.2.3. Durchführung der Assays	48
3.3. Proteinbiochemische Methoden	49
3.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
3.3.2. Coomassie-Färbung von Proteinen	51
3.3.3. Färbung mit Simply Blue Safe Stain	51
3.3.4. Silberfärbung	51
3.3.5. Autoradiographie	52
3.3.6. Verdau der Proteine aus dem SDS-Gel	53
3.3.7. Verdaukontrolle durch HPLC-Trennung	55
3.3.8. Bestimmung der Phosphat-Einbaurrate im <i>in vitro</i> -Assay	56
3.3.9. Erstellen der Cerenkov-Pattern der GST-IRS-1-Fragmente	57
3.3.10. LC-MS-Kontrolle der Phosphorylierungsreaktion	58
3.3.11. Detektion von Phosphopeptiden durch alkalische Negativ-Ionen $\mu$ LC/ES-API-CID-MS-Hybrid Scan Technik	58
3.3.12. Sequenzierung von Phosphopeptiden durch offline Nanospray-Ionenfallenanalyse	59
3.4. Immunologische Methoden	60
3.4.1. Immunpräzipitation	60
3.4.2. Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen (Westernblot)	61
3.4.3. Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen mit Ponceau S®	62
3.4.4. Detektion der Proteine durch Antikörper	62
3.4.5. Entfernen („Strippen“) von Antikörpern von Nitrocellulosemembranen	63
3.5. Molekularbiologische Methoden	64
3.5.1. Zellkultivierung	64
3.5.2. Aufteilen („Splitten“) der Zellen	64
3.5.3. Bestimmung der Zellzahl	65
3.5.4. Transfektion	66
3.5.5. Stimulation und Lyse der Zellen	66
3.5.6. Statistische Auswertung	67

3.6. Standard DNA-Methoden	67
3.6.1. Analytische Plasmidreinigung, MiniPrep	67
3.6.2. Isolierung von Plasmid-DNA, MaxiPrep	68
3.6.3. Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA	68
3.6.4. Restriktionsanalyse der Plasmide	69
3.6.5. Agarose Gelelektrophorese	69
3.6.6. Kontroll-Sequenzierung der Plasmid-DNA	70
3.6.7. „Overlap extension“ PCR Mutagenese	71
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>75</b>
4.1. Entwicklung eines <i>in vitro</i> -PKC-Assays	75
4.1.1. Generierung, Expression und Reinigung von rekombinanten GST-Fragmenten von IRS-1	75
4.1.1.1. Überblick über verwendete Fusionsproteine	75
4.1.1.2. Zeitlicher Verlauf des Bakterienwachstums nach Expression von GST-Fusionsproteinen aus IRS-1 in <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	76
4.1.2. Reinigung der GST-Fusionsproteine	79
4.1.3. <i>In vitro</i> -Phosphorylierungskinetik	83
4.2. Bestimmung der ATP-Einbaurrate in GST-IRS-1-Fusionsproteine durch verschiedene PKC-Isoenzyme	88
4.3. Cerenkov-Pattern	91
4.3.1. Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>N1</sup>	92
4.3.2. Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>N2</sup>	94
4.3.3. Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>M</sup>	96
4.3.4. Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>C</sup>	99
4.4. Identifizierung von Serin <sup>318</sup> als <i>in vitro</i> -Phosphorylierungsstelle von IRS-1	102
4.4.1. Phosphorylierungskontrolle mit „MARCKS-PSD-Peptid“	103
4.4.2. Verdauungskontrolle	106
4.4.3. Detektion von Phosphopeptiden durch alkalische Negativ-Ionen $\mu$ LC/ES-API-CID-MS-Hybrid Scan Technik	107

4.4.4. Sequenzierung der tryptischen Phosphopeptide aus GST-IRS-1 <sup>N2</sup> , das mit PKC- $\zeta$ phosphoryliert wurde, durch Nanospray-Ionenfallen-MS-Analyse	109
4.5. Mutation des Serin <sup>318</sup> in GST-IRS-1 <sup>N2</sup> und in IRS-1 zu Alanin	113
4.5.1. Überprüfung der Mutation Ser <sup>318</sup> →Ala <sup>318</sup> durch DNA-Sequenzierung	115
4.5.2. Überprüfung der Mutation durch Erstellen der Cerenkov-Pattern	117
4.6. Generierung und Charakterisierung eines polyklonalen Antikörpers gegen IRS-1 pSer <sup>318</sup>	118
4.6.1. <i>In vitro</i> -Charakterisierung des Antikörpers gegen pSer <sup>318</sup> von IRS-1	118
4.6.2. Charakterisierung des Antikörpers gegen pSer <sup>318</sup> von IRS-1 in Zellkultur.	120
4.6.3. Die Phosphorylierung an IRS-1 S <sup>307</sup> wird nicht durch den Antikörper gegen IRS-1 pSer <sup>318</sup> erkannt.	122
4.7. Überprüfung der biologischen Relevanz der gefundenen Phosphorylierungsstelle	123
4.7.1. Untersuchung der Insulinsignaltransduktion in BHK-Zellen	124
4.7.2. Untersuchung der Insulinsignaltransduktion in BHK <sup>IR</sup> -Zellen	126
4.7.3. Einfluss der Mutation Ser <sup>318</sup> →Ala <sup>318</sup> in IRS-1 auf die Insulinsignalweiterleitung in BHK <sup>IR</sup> -Zellen	127
4.7.4. Wird IRS-1 an Ser <sup>318</sup> durch PKC- $\delta$ phosphoryliert und somit die Insulinsignalweiterleitung moduliert?	130
4.7.5. Wird IRS-1 an Ser <sup>318</sup> durch PKC- $\zeta$ phosphoryliert und somit die Insulinsignalweiterleitung moduliert ?	134
4.7.6. Die Phosphorylierung an IRS-1 Serin <sup>318</sup> durch PKC- $\zeta$ vermindert die Wechselwirkung mit dem Insulinrezeptor	137
4.7.7. Die Phosphorylierung an IRS-1 S <sup>318</sup> durch PKC- $\zeta$ hat keinen Einfluss auf die Aktivität der MAP-Kinase Erk1, jedoch einen aktivierenden Effekt auf die MAP-Kinase Erk2 nach 2 min Insulinstimulation	140
4.7.8. Die Phosphorylierung an IRS-1 durch PKC- $\zeta$ ist ein negativer Regulator der PKB-Aktivität	142
4.7.9. Die Phosphorylierung an IRS-1 S <sup>318</sup> in BHK <sup>IR</sup> -Zellen wird durch Insulin und TPA stimuliert.	144
4.8. Detektion sieben weiterer <i>in vitro</i> -Phosphorylierungsstellen in IRS-1 durch ESI-TOF	145

<b>5. Diskussion</b>	<b>149</b>
5.1. Entwicklung eines <i>in vitro</i> -PKC-Assays	149
5.2. Bestimmung der ATP-Einbaurrate in GST-IRS-1-Fusionsproteine durch verschiedene PKC-Isoenzyme	150
5.3. Cerenkov-Pattern der verschiedenen IRS-1-Fragmente	152
5.4. Detektion und Identifizierung von Serin <sup>318</sup> als <i>in vitro</i> -Phosphorylierungsstelle in IRS-1	153
5.4.1. Detektion von Phosphopeptiden durch alkalische Negativ-Ionen $\mu$ LC/ES-API-CID-MS-Hybrid Scan Technik	153
5.4.2. Sequenzierung tryptischer Phosphopeptide von PKC- $\zeta$ -phosphoryliertem GST-IRS-1 <sup>N2</sup> durch Nanospray-Ionenfallen-MS-Analyse	154
5.4.3. Detektion von sieben weiteren <i>in vitro</i> -Phosphorylierungsstellen in IRS-1 durch ESI-TOF	155
5.5. Generierung und Charakterisierung eines polyklonalen Antikörpers gegen IRS-1 pSer <sup>318</sup>	156
5.6. Überprüfung der biologischen Relevanz von Ser <sup>318</sup> in IRS-1	157
5.6.1. Beeinflussung der Insulinsignalweiterleitung durch PKC- $\delta$	158
5.6.2. Beeinflussung der Insulinsignalweiterleitung durch PKC- $\zeta$	159
5.7. Auswirkung der Phosphorylierung an IRS-1 S <sup>318</sup> durch PKC- $\zeta$ für die Signalweiterleitung	160
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>163</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>167</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>185</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis</b>	<b>189</b>
<b>10. Akademische Lehrer</b>	<b>191</b>

°C	Grad Celsius
a	Adenin
A	Alanin
AA	Aminosäure
AA	Acrylamid
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosin 5'-diphosphat
Ak	Antikörper
Akt	"viral oncoprotein homology"
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
API	"atmospheric pressure ionization"
aPKC	atypische Proteinkinase C
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
BBS	"BES buffered saline", Kochsalzlösung mit BES gepuffert
BES	(N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-Aminoethansulfonsäure)
Bis	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
BPC	Basis-Peak-Chromatogramm
BSA	Rinderserumalbumin
c	Cytosin
C	Cystein
cAMP	cyklisches Adenosin 5'-monophosphat
Cb1	Cannabinoidrezeptor 1
Ci	Curie
CID	Kollisions-induzierter Zerfall

cPKC	konventionelle oder klassische PKC
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute („counts per minute“)
Csk	c-Src spezifische Kinase
Cys	Cystein
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
ddNTPs	Didesoxynukleotide
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotide
DOG	1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	"Enhanced Chemiluminescence-System"
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol bis (-aminoethylether) N, N, N', N'-tetraacetat
ERK	"extracellular signal-regulated kinase"
F	Phenylalanin
Fc	Papain-Fragment eines Ak, das leicht kristallisiert werden kann
Fyn	eine Src-Tyrosinkinase
g	Guanin
G	Glycin
Gab1	"Grb2-associated binder 1"
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
G-Protein	guanylnucleotidbindendes Protein
Grb2	"growth factor receptor binding protein"
GSK	Glycogen-Synthase-Kinase

GST	Glutathion S-transferase
GST-IRS-1 <sup>N2</sup> A <sup>318</sup>	GST-N2-Fragment von IRS-1 mit Alanin an Position 318
GST-IRS-1 <sup>N2</sup> S <sup>318</sup>	GST-N2-Fragment von IRS-1 mit Serin an Position 318
h	Stunde(n)
H	Histidin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	Hochdruck Flüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettich Peroxidase ("horseradish peroxidase")
I	Isoleucin
I.D.	Innendurchmesser
idR	in der Regel
IGF	"insulin-like growth factor"
IgG	Immunglobulin G
Ile	Isoleucin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptor-Substrat
IRS-1 A <sup>318</sup>	Insulinrezeptor-Substrat-1 mit Alanin an Position 318
IRS-1 S <sup>318</sup>	Insulinrezeptor-Substrat-1 mit Serin an Position 318
JNK	"c-Jun N-terminal kinase"
K	Lysin
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilo Dalton
KHL	"keyhole limpet hemocyanin"
KTB	Klinik für Tumorbiologie
L	Leucin
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
Lys	Lysin

M	Methionin
MAPK	"mitogen activated protein-kinase"
MARCKS	"myristoylated alanine-rich C-kinase substrate"
MBq	Megabecquerel
MEK	MAPK Kinase
Met	Methionin
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
mU	"milli Units"
N	Asparagin
nPKC	"novel"(neue) Proteinkinase C
OD	optische Dichte
ODS	Octadecylsilica
p	Phospho-
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-PH	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Proteasehemmern
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK	Phosphoinositol-abhängige Proteinkinase-1
PEG	Polyethylenglykol
PH	Pleckstrin-Homologe-Domäne
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PH	Proteasehemmer
Phe	Phenylalanin
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP	Polypropylen
Pro	Prolin

PS	Phosphatidylserin
psd	"phosphorylation site domain"
pSer	phosphoryliertes Serin
PTB	Phosphotyrosin-Bindungsdomäne
pThr	phosphoryliertes Threonin
Q	Glutamin
R	Arginin
Ras	Proteine, die "sarcoma-type" Tumore in Ratten auslösen
Raf	S/T-spezifische Kinase, codiert durch das Oncogen v-raf
rekomb	rekombinant
rpm	Umdrehungen pro Minute ("rounds per minute")
Rsk	"p90 ribosomal protein S6 kinase"
RT	Raumtemperatur
S	Serin
S.D.	Standardabweichung („standard deviation“)
S.E.M.	Standardfehler („standard error of the mean“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
Ser	Serin
SH2	Src-Homologe 2-Domäne
Shc	"src homology and collagen protein"
SHP-2	SH2-homologe Protein Tyrosin Phosphatase
SIRP	"signal related proteins"
SL	Stammlösung
Sos	"GTP-GDP exchange factor". (Abk. aufgrund der Homologie mit einem Protein aus Drosophila, das die Signaltransduktion des Gens "sevenless" reguliert ("son of sevenless")).
Src	"rous Asian sarcoma tyrosine kinase"
t	Thymin
T	Threonin
TCA	Trichloressigsäure

---

TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylethyldiamin
Th	Thomson
Thr	Threonin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
V	Valin
Val	Valin
v/v	Volumen pro Volumen
W	Tryptophan
w/v	Gewicht pro Volumen ("weight per volume")
X	beliebiger Aminosäurerest
Y	Tyrosin

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund der Arbeit, Typ 2 Diabetes

Diabetes mellitus (DM) umfasst verschiedene Stoffwechselerkrankungen unterschiedlichster Ursachen. Sie sind gekennzeichnet durch Hyperglykämie oder durch Glucosetoleranzstörung, das heißt, die Unfähigkeit Glucose in die Zellen aufzunehmen. DM wurde erstmals im 2. Jahrhundert nach Christi von Aretaios von Kappadokien als „Schmelzen von Gliedern zu Harn“ beschrieben, wobei er typische Symptome, wie z.B. vermehrte Flüssigkeitsausscheidung und Gewichtsverlust erkannte [1]. Der Begriff Diabetes wurde erst 15 Jahrhunderte später durch Arbeiten von Thomas Willis geprägt, der die Krankheit durch den „honigsüßen Uringeschmack“ beschrieb [2]. Das Wort „Diabetes“ wurde vom griechischen „diabainein“ abgeleitet, einem Wort, das „ausschreiten“ bedeutet und das „das Verhalten des Wassers im Körper eines (unbehandelten) Diabetikers beschreibt“. „*Mellitus*“ ist die lateinische Schreibweise des griechischen Wortes „mellitos“, was soviel wie „honigsüß“ bedeutet.

Diabetes mellitus ist heute die am weitesten verbreitete Krankheit in der westlichen Welt [3]. Lange Zeit wurde DM als weniger relevant für die Weltgesundheit betrachtet, doch durch die explosionsartige Zunahme in den letzten zwei Jahrzehnten gilt Diabetes als Hauptbedrohung der menschlichen Gesundheit im 21. Jahrhundert [4]. Inzwischen hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) DM als erste Erkrankung, die weder viral noch bakteriell verursacht wird, als Epidemie eingestuft. Nach Schätzungen der WHO wird sich die Anzahl der an DM und den Folgeerkrankungen wie chronischen Nierenschäden, Myokardinfarkt, Apoplex, und Visusverlust leidenden Menschen von 135 Millionen in 1995 auf 220 Millionen im Jahr 2010 und 300 Millionen im Jahr 2025 mehr als verdoppeln [5], wovon 75-90 % den Typ 2 DM betreffen.

Im Gegensatz zum DM Typ 1, dem Insulin-abhängigen Diabetes, bei dem es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt und es durch Zerstörung der  $\beta$ -Zellen zu einer verringerten Produktion oder Sekretion von Insulin kommt und dadurch der Blutzuckerspiegel nur noch ungenügend reguliert werden kann, manifestiert sich der Typ 2 als Summe mehrerer Defekte, wodurch der Organismus nicht mehr oder nur noch ungenügend auf sein eigenes Insulin reagieren kann [6]. Dadurch kommt es wie beim DM Typ 1 zu einem erhöhten Blutzuckerspiegel und die Triacylglyceridhydrolyse, die Bildung von Ketonkörpern, die Gluconeogenese und die Fettsäureoxidation laufen beschleunigt ab. Beim Typ 2 DM haben die Betroffenen normale oder erhöhte Insulinspiegel, die Zellen reagieren auf Insulin nicht normal und sind somit insulinresistent. Typ 2 DM wird besser durch den Ausdruck ‚metabolisches Syndrom‘ oder ‚Insulinresistenz Syndrom‘ bezeichnet [5]. Dieses Syndrom beschreibt das Zusammenspiel mehrerer kardiovaskulärer Risikofaktoren, assoziiert mit Insulinresistenz und Hyperinsulinämie.

## 1.2 Signaltransduktion

Die Kommunikation zwischen den Zellen eines vielzelligen Organismus ist Voraussetzung zur Steuerung von Wachstum und Zellteilung und zur Regulation von Entwicklung, Organen und Geweben. Durch die Signaltransduktion kann die einzelne Zelle ein extrazelluläres Signal bis in den Zellkern leiten. Für die Weiterleitung gibt es verschiedenen Grundmechanismen.

- Hydrophobe Substanzen, wie z.B. Steroidhormone können durch die äußere Membran diffundieren und im Cytosol an einen Liganden binden, wodurch eine Translokation des Substrat-Liganden-Komplexes in den Zellkern induziert wird.
- Hydrophile signalauslösende Substanzen, wie z.B. Peptidhormone (Insulin), Hormone, Wachstumsfaktoren oder Immunglobuline binden an einen spezifischen, membranständigen Rezeptor, der das Signal durch Konformationsänderung an seine zytoplasmatische Domäne, die häufig (auto-)katalytische Aktivität besitzt, ins Zellinnere weiterleitet. Dadurch kommt es

z.B. bei den Rezeptor-Tyrosinkinasen zur einer Oligomerisierung und zu Autophosphorylierungen, wodurch sie aktiviert werden.

- G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beeinflussen entweder aktivierend oder hemmend ein membrangebundenes Enzym oder einen Ionenkanal, wodurch es zur Freisetzung von „second messenger“, wie z.B.  $\text{Ca}^{2+}$  oder zyklisches ATP kommt. Die Weiterleitung der Signale erfolgt häufig über nicht-katalytisch aktive Adaptermoleküle, die das Signal meist auf Serin- und Threoninkinasen übertragen.

Die ersten Arbeiten über die Signaltransduktion gehen bis ins Jahr 1955 zurück, als Fischer, Krebs und Sutherland erste Ergebnisse ihrer Untersuchungen zum Cori-Zyklus publizierten [7;8]. Schon damals konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierungen die katalytische Aktivität von Enzymen steuern können. Mit der Entdeckung, dass Phosphorylase b über eine Phosphorylase-Kinase zu Phosphorylase a umgewandelt wird, wurde erstmals „Signaltransduktion“ gezeigt. Der Begriff Signaltransduktion wurde erst später geprägt, doch die ersten Arbeiten von Fischer und Krebs waren der bahnbrechende Anfang und wurden auch 1992 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet.

Bindet ein extrazellulärer Ligand, z.B. Insulin an seinen Rezeptor, so wird ein Signal ausgelöst, das in das Zellinnere weitergeleitet wird. Diese Signalweiterleitung wird als Signaltransduktion bezeichnet. Sie setzt eine Reihe von biochemischen Reaktionen in Gang, die biologische Antworten, wie z.B. Metabolismus, Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Teilung hervorrufen.

Ein Signaltransduktionsweg besteht aus vielen Schritten und diese Komplexität führt dazu, dass Zellen auf eine Kombination von Signalen variabel in Stärke und Dauer der zellulären Antwort reagieren können [9].

### **1.3 Signalweiterleitung durch Phosphorylierung**

Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren bewirken die Auslösung eines Signals, die Weiterleitung erfolgt entweder elektrophysiologisch durch

Potentialänderung über Ionenkanäle, sterisch durch Strukturänderungen oder chemisch durch Modifikationen der beteiligten Signalmoleküle. Die wichtigsten Komponenten der intrazellulären Signaltransduktion sind Proteinkinasen, Phosphatasen, regulatorische GTPasen und sogenannte Adaptermoleküle. Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten über Proteinkinase C-Isoenzyme (PKC) und Dephosphorylierung über Phosphatasen spielen dabei die wichtigste Rolle [10]. Durch eine Phosphorylierung ändert sich der Ladungszustand des Gesamtproteins, da unter physiologischen Bedingungen mindestens ein Sauerstoff im Phosphatrest deprotoniert und somit negativ geladen vorliegt. Dadurch kann sich die Gesamtstruktur und somit auch die Funktion des Proteins stark ändern, wie z.B. die biologische Aktivität oder die intrazelluläre Lokalisation. Es können auch neue Bindungsstellen für aktivierende oder inhibitorische Bindungspartner entstehen [11]. Die wichtige Rolle reversibler Phosphorylierungen als Steuermechanismus wurde inzwischen bei vielen Signaltransduktionswegen nachgewiesen [12;13].

## **1.4 Die Insulinsignalweiterleitung**

Das Peptidhormon Insulin besteht aus zwei Polypeptidketten (21 und 30 Aminosäurereste), die über zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Es wird in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas als Antwort auf erhöhte Blutzuckerwerte produziert und sekretiert [14] und steuert die Aufnahme von Zuckern, Ionen und Aminosäuren [15], den Glucose-Stoffwechsel, die Proteinexpression und das Zellwachstum [16].

### **1.4.1 Der Insulinrezeptor**

Die Insulinwirkung wird eingeleitet, indem Insulin an den Insulinrezeptor (IR) bindet. Der Insulinrezeptor kommt bei Vertebraten nahezu in allen Geweben vor. Erythrozyten besitzen etwa 40 Rezeptoren, Adipozyten und Hepatozyten nahezu

200.000 [17]. Er ist ein Transmembranglykoprotein mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität und der Zusammensetzung  $\alpha_2/\beta_2$ . Die  $\alpha$ -Untereinheit, die als Insulin-Bindungsstelle dient, ist komplett auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert. Die  $\beta$ -Untereinheit ist ein Transmembranprotein [18]. Etwa ein Drittel der 620 Aminosäurereste großen  $\beta$ -Untereinheit ist ebenfalls auf der extrazellulären Seite lokalisiert, 23 Aminosäurereste bilden den Transmembrananteil und die restlichen 403 Aminosäurereste den cytosolischen Teil mit der Tyrosinkinaseaktivität, einer ATP-Bindungsstelle, der Juxtamembran-Domäne und der C-terminalen Domäne [19].

Die  $\alpha$ -Untereinheit übt eine hemmende Funktion auf die Kinaseaktivität der  $\beta$ -Untereinheit aus, denn durch Deletion oder durch Mutation bestimmter Aminosäurereste der  $\alpha$ -Untereinheit kann die Kinase aktiviert werden [20;21]. Durch Bindung von Insulin kommt es zur Autophosphorylierung verschiedener Tyrosinreste in der  $\beta$ -Untereinheit [22]. Dazu gehören  $Y^{960}$  in der Juxtamembran-Domäne,  $Y^{1146}$ ,  $Y^{1150}$  und  $Y^{1151}$  in der katalytischen Domäne und  $Y^{1316}$  und  $Y^{1322}$  in der C-terminalen Domäne [23-27].

Neben einer Tyrosinkinase scheint der IR auch eine Serinkinase zu sein, denn nach Insulinstimulation kommt es in CHO-09 und NIH-3T3-Zellen zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors an  $S^{1275}$  und  $S^{1309}$ . Inzwischen wurden im Insulinrezeptor 11 zusätzliche Serinreste gefunden, die von verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden [28].

### 1.4.2 Bindungspartner des Insulinrezeptors

Durch die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors werden verschiedene Tyrosinreste im IR phosphoryliert und können so durch Proteine, die Phosphotyrosin Bindungsstellen (PTB-Domänen) enthalten, erkannt werden [29]. PTB-Domänen erkennen das Aminosäure-Motiv NPXpY des Rezeptors und binden daran. Ein Bindungspartner für den Insulinrezeptor ist die intrazelluläre tyrosinspezifische Proteinphosphatase SHP2, die über ihre beiden Src Homologen 2 (SH2)-Domänen an den Rezeptor bindet und durch ihn

phosphoryliert wird. Dadurch wird die katalytische Aktivität der SHP2 reguliert [30]. Weitere Substrate für den Insulinrezeptor sind die "src homology and collagen proteins" (Shc) [31], Gab1 ("Grb2-associated binder 1") [32], der Cannabinoidrezeptor CB1 [33] und Mitglieder der SIRP-Familie („signal related proteins“) [34].

Die Hauptsubstrate für den Insulinrezeptor sind die Insulinrezeptor-Substrate [17].

### 1.4.3 Insulinrezeptor-Substrate (IRS)

Tyrosinphosphorylierte Insulinrezeptor-Substrate spielen bei der Insulinsignalweiterleitung die Schlüsselrolle des „Signalverteilers“. Sie sind „multidocking“-Proteine für viele Effektormoleküle mit SH2-Domänen, wie z.B. die regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinase, die Src-Tyrosinkinase Fyn, die c-Src-spezifische Kinase (Csk), die tyrosinspezifische Proteinphosphatase SHP2 und kleinere Moleküle, wie z.B. das "growth factor receptor binding protein-2" (Grb2) oder die Adaptermoleküle Crk und Nck [35]. Die Aktivierung dieser Proteine mit SH2-Domänen setzt Signalkaskaden in Gang, die zur Aktivierung vieler „downstream“-Effektoren des Insulinsignals führen. Die Insulinrezeptor-Substrate besitzen eine aminoterminal Pleckstrin homologe (PH) Domäne, die an Phospholipide bindet, eine PTB-Domäne, die an der Erkennung von NPXpY-Motiven beteiligt ist und einen weniger konservierten C-Terminus, mit verschiedenen Phosphotyrosin (pY)-Motiven, an die SH2-Proteine binden können.

Bisher sind erst wenige Funktionen der IRS-Moleküle in der Insulinsignaltransduktion aufgeklärt. Obwohl sie phylogenetisch ähnlich sind und viele strukturelle Übereinstimmungen zeigen, gibt es Unterschiede in den Phosphorylierungsmotiven, in der gewebsspezifischen Verteilung, in ihrer subzellulären Lokalisierung, in ihrer Bindung an den Insulinrezeptor und in ihren SH2-Bindungspartnern [36]. Zur Zeit sind sechs Insulinrezeptor-Substrate publiziert.

### 1.4.3.1 Insulinrezeptor-Substrate-5 und -6 (IRS-5, IRS-6)

Vor kurzem erschien eine Arbeit über die Insulinrezeptor-Substrate 5 und 6 [37]. Über diese beiden Insulinrezeptor-Substrate gibt es erste Hinweise, dass sie in bestimmten Geweben eine aktive Rolle in der Insulinsignalweiterleitung spielen. Es gibt noch keine Antikörper gegen die beiden Proteine, doch aus Northern Blot-Resultaten konnte abgeleitet werden, dass IRS-5 in Niere und Leber vorkommt, aber in Spuren auch ubiquitär nachweisbar ist. IRS-6 wird hauptsächlich im Skelettmuskel exprimiert. Beide Insulinrezeptor-Substrate werden nach Insulinstimulation tyrosinphosphoryliert. Während für IRS-6 noch keine Assoziationen „downstream“ gezeigt werden konnten, ist IRS-5 nach Tyrosinaktivierung durch den Insulinrezeptor oder den IGF-1 („insulin like growth Faktor“)-Rezeptor, mit Ras, Src, Crk und Fyn, jedoch nicht mit Grb2, SHP-2, Nck („non catalytic region of tyrosin kinase“) und der PI3-Kinase assoziiert.

### 1.4.3.2 Insulinrezeptor-Substrat-4 (IRS-4)

IRS-4 wurde erstmals 1998 als 160 kDa großes Protein aus HEK-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) isoliert [38]. Die Sequenzhomologie zu IRS-1 beträgt nur 27 %. IRS-4 wird nach Insulinstimulation sehr schnell tyrosinphosphoryliert und bindet *in vitro* an die PI3-Kinase und Grb2. IRS-4 scheint an der Plasmamembran assoziiert zu sein und wird v.a. in Gehirn, Thymus und Niere exprimiert [39]. Vermutlich spielt es eine geringe Rolle in der Insulinsignaltransduktion, doch es konnte durch Überexpression in Rattenadipozyten gezeigt werden, dass IRS-4 die Translokation von Glucosetransporter 4 (GLUT4) zur Zelloberfläche stimuliert [40]. Bisher konnte jedoch noch nicht gezeigt werden, dass IRS-4 ohne in Kombination mit IRS-1 und/oder IRS-2 zu agieren, einen Einfluss auf die Insulinsignalweiterleitung hat.

### **1.4.3.3 Insulinrezeptor-Substrat-3 (IRS-3)**

Das erstmals aus insulinstimulierten Rattenadipozyten isolierte IRS-3 ist mit 60 kDa wesentlich kleiner als die anderen fünf IRS-Moleküle, doch in den funktionellen Domänen (PH, PTB, C-Terminus) zeigt es etwa 50 % Sequenzhomologie zu IRS-1 und IRS-2 [41]. Bisher konnte gezeigt werden, dass IRS-3 an die PI3-Kinase, SHP2, Nck und Shc bindet [42]. Es wird bei „Tieren“ hauptsächlich in adipösen Geweben exprimiert, aber man findet es auch in anderen Geweben, wie z.B. Lunge, Leber, Niere oder Fibroblasten. In humanen Zellen konnte IRS-3 bisher noch nicht nachgewiesen werden.

### **1.4.3.4 Insulinrezeptor-Substrat-2 (IRS-2)**

IRS-2 wurde erstmals in Mäusen gefunden, denen das IRS-1-Gen fehlte [43;44]. Die Sequenzhomologie zu IRS-1 ist 43 %, doch in den funktionellen Domänen beträgt die Homologie bis zu 75 % [45]. Im mittleren Teil (AS 591-786) enthält IRS-2 einen Abschnitt, der nahezu keine Homologie zu IRS-1 zeigt. Dieser Abschnitt bindet bei Insulinstimulation an die regulatorische Schleife der  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors [46]. Diese Region dürfte für die spezifische Signalweiterleitung in IRS-2 verantwortlich sein. Beide Moleküle scheinen eigene Signaltransduktionswege zu steuern, da sie sich in ihrer gewebespezifischen Verteilung, subzellularen Lokalisation, Mechanismen der Aktivierung und Deaktivierung und in ihrer Interaktion mit Adapterproteinen unterschiedlich verhalten [36]. IRS-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Glucoseproduktion in der Leber, bei der Regulation und Differenzierung von  $\beta$ -Zellen im Pankreas und bei der Lipolyse [47].

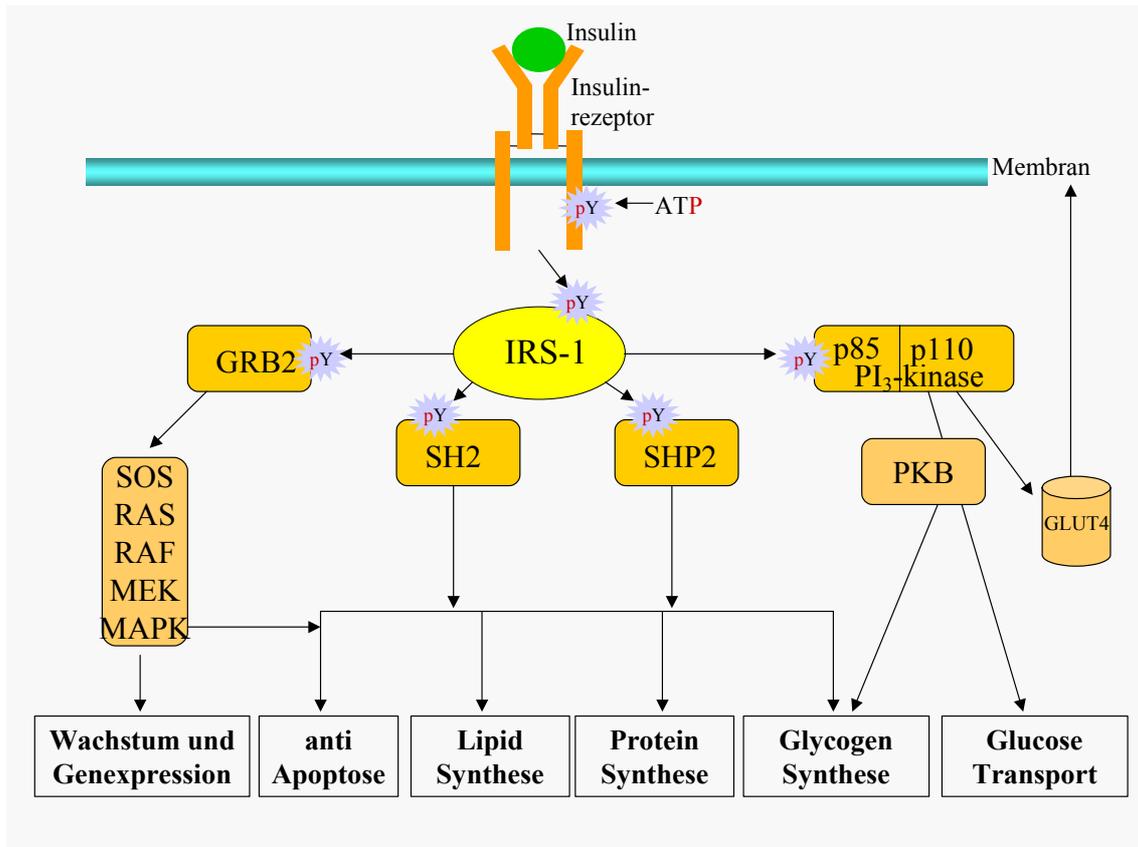
### **1.4.3.5 Insulinrezeptor-Substrat-1 (IRS-1)**

IRS-1 wurde erstmals in insulinstimulierten Rattenleberzellen identifiziert [48;49] und ist das am besten untersuchte Insulinrezeptor-Substrat. Sein

Molekulargewicht beträgt 131 kDa, doch aus Zellen isoliert migriert es je nach Zelltyp zwischen 165 und 170 kDa, nach Insulinstimulation zwischen 175 und 180 kDa. Der Grund dafür ist, dass IRS-1 im Basalzustand an Serinresten und vereinzelt auch an Threoninresten phosphoryliert und glycosyliert ist und nach Insulinstimulation findet eine starke Tyrosinphosphorylierung statt [50]. Es spielt eine sehr wichtige Rolle beim Glucosetransport im Muskel [44], bei der Differenzierung brauner Adipozyten [51] und bei der Insulin-induzierten Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen [52]. Die Bindungspartner von IRS-1 und ihre Rolle bei der Insulinsignalweiterleitung sind in Kapitel 1.4.4 zusammengefasst. IRS-1 aus der Ratte (*rattus norvegicus*) enthält 1235 Aminosäurereste (AS), das entsprechende Molekül aus dem Menschen 1242. Die Sequenzhomologie zwischen beiden beträgt 90 %. In der Sequenz befinden sich 34 Tyrosinreste, 63 Threoninreste und 181 Serinreste; somit enthält nahezu jeder vierte Aminosäurerest eine OH-Gruppe und kann theoretisch phosphoryliert werden. Von den Tyrosinresten liegen 21 in potentiellen Erkennungssequenzen für Tyrosinkinase [53;54]. Durch Edman-Sequenzierung nach radioaktiver Markierung wurde gezeigt, dass IRS-1 an mindestens 8 Tyrosinresten insulinabhängig phosphoryliert wird [55]. IRS-1 enthält über 50 Konsensusstellen für Proteinkinase [56], wovon 16 Erkennungsstellen für Proteinkinase C-Isoformen (PKC) sind (bestimmt anhand der Prosite-Datenbank unter [www.expasy.org/tools/](http://www.expasy.org/tools/)).

#### **1.4.4 Rolle des IRS-1 in der Insulinsignaltransduktion**

Obwohl jedes an IRS-1 assoziierte Protein eine wichtige Rolle spielt, lässt sich durch Untersuchungen an transgenen Mäusen zeigen, dass über die Insulinrezeptor-Substrate 1 und 2 die meisten Insulinantworten gesteuert werden [57]. Die Schlüsselrolle des IRS-1 in der Insulinsignaltransduktion zeigt Abbildung 1.1 schematisch.



**Abb. 1.1: Schlüsselrolle des IRS-1 in der Insulinsignaltransduktion** (vereinfacht, wobei pY eine Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung bedeutet). Es sind die zwei Hauptwege über die PI3-Kinase/PKB und über Grb2/MAPK, der Weg über SHP-2 und über weitere SH2-Proteine skizziert.

Vom IRS-1 zweigen zwei Hauptsignalwege, der Signalweiterleitungsweg zur „mitogen activated protein kinase“ (MAPK) und der Weg über die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) ab [58]. Der MAPK-Weg wird aktiviert, indem Grb-2 an tyrosinphosphoryliertes IRS-1 oder an Shc bindet. SOS („son of sevenless“), das mit Grb-2 assoziiert ist, katalysiert den Austausch von an Ras gebundenes GDP zu GTP [59;60]. Dadurch wird Ras aktiviert, wodurch es an den aminoterminalen Teil von Raf binden und dieses dadurch translozieren kann [61]. Gleichzeitig dissoziieren 14-3-3 Proteine, die an Raf gebunden sind, wodurch dieses durch verschiedene Ser-/Thr-Kinasen phosphoryliert werden kann [62]. Als Serinkinase phosphoryliert es nun die Kinase MAPK/ERK-Kinase-1 (MEK1) und dieses wiederum die "extracellular signal-regulated kinases" 1 und 2 (Erk1 und Erk2) an Tyrosin- und Threoninresten [63;64]. Erk 1 und 2, die meist als MAP-Kinase bezeichnet werden, sind zwei Vertreter der

Familie der MAP-Kinasen, zu denen u.a. auch die Stress aktivierten Proteinkinasen (SAP), die c-Jun aminoterminalen Kinasen (JNK) und die p38 Proteine gehören [65]. Über aktivierte MAP-Kinasen werden z.B. die p90 ribosomale S6Kinase (p90<sup>rsk</sup>), Phospholipase A oder Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Elk-1 phosphoryliert, wodurch Genexpression induziert wird [66]. Über die Mechanismen und die unterschiedlichen Wirkungen von Erk1 und Erk2 ist noch sehr wenig bekannt. Für Erk2 konnte gezeigt werden, dass es nach der Phosphorylierung durch MEK dimerisiert und in den Nukleus transloziert [67].

Der zweite Hauptweg beginnt, indem aktiviertes IRS-1 die p85 Untereinheit der PI3-Kinase tyrosinphosphoryliert. Die PI3-Kinase wurde als erster Bindungspartner von IRS-1 nachgewiesen [49]. Die katalytische Untereinheit p110 katalysiert die Phosphorylierung von Phosphoinositen an der D3-Position des Inositolrings. Das wichtigste Produkt ist dabei Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) [68]. PIP3 bindet an die PH-Domäne der Phosphoinositol-abhängigen Kinase-1 (PKB) [69] und an Proteinkinase B (PKB), wodurch PDK-1 aktiviert wird, die nun PKB aktiviert. Die Stimulation erfolgt durch Phosphorylierung an PKB Thr<sup>308</sup> durch PDK-1 und an Ser<sup>473</sup> vermutlich durch PDK-2 [70]. PKB ist eine weitere Schaltstelle in der Insulinsignaltransduktion. Über PKB führen Signalwege zur Proteinsynthese und Genexpression über die p70 ribosomale S6Kinase (mTOR), zur Glykogensynthese (Glykogensynthase-Kinase, GSK 3), zur Glucoseaufnahme über GLUT 4 (z.B. atypische PKC-Isoenzyme), zur Antilipolyse und zur Antiapoptose [66].

SHP2 ist nach Insulinstimulation ebenfalls mit IRS-1 assoziiert [71]. Die genaue Rolle des Proteins in der Insulinsignaltransduktion ist noch nicht völlig aufgeklärt. SHP2 hat einen Einfluss auf die insulinstimulierte Transkription der MAPK [72] und sie scheint eine Rolle bei der Glucoseaufnahme zu spielen [73]. Ein weiterer direkter Bindungspartner von IRS-1 ist das "growth Faktor receptor binding protein" 2 (Grb 2), dessen Funktion bereits am Anfang dieses Kapitel näher erläutert wurde.

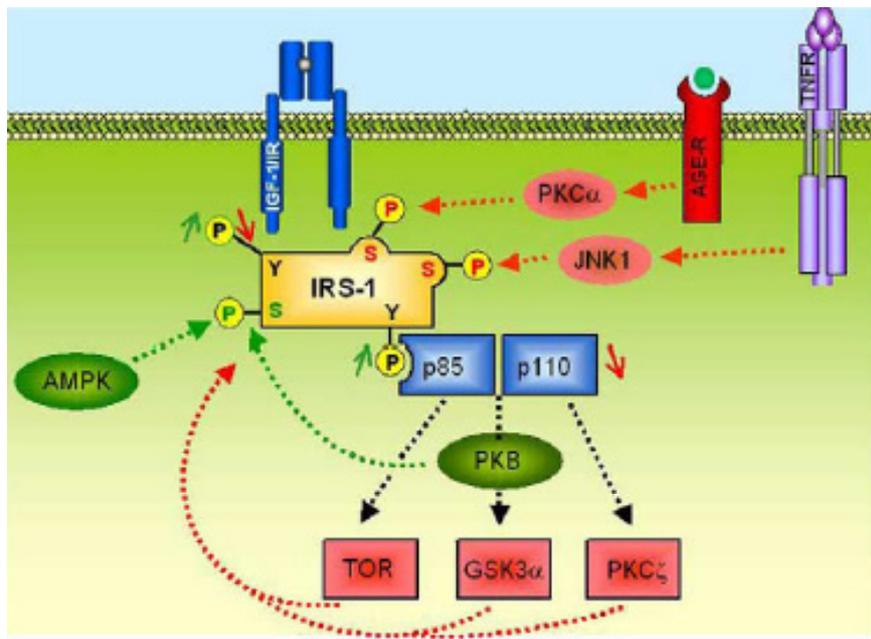
Nach Insulinstimulation ist IRS-1 auch mit mehreren Tyrosinkinase assoziiert, deren Rolle bisher nur wenig aufgeklärt werden konnte. Dazu gehören die carboxyl-terminale Kinase (Csk), Fyn und Nck [15;74].

### **1.4.5 Modulation von IRS-1 durch Ser/Thr-Phosphorylierung**

Die beiden Hauptwege der Insulinsignaltransduktion werden durch die Insulinrezeptor-Substrate koordiniert. Die Phosphorylierung an Tyrosinresten in Bindungsmotiven von Molekülen, die SH2-Domänen enthalten, ist für die biologische Rolle des IRS-1 essentiell. Die Modulation dieser Schlüsselrolle in der Insulinsignaltransduktion erfolgt entweder durch Tyrosin-Dephosphorylierung oder durch Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten [75-78]. IRS-1 enthält über 50 Serin- und Threoninreste in Konsensus-Phosphorylierungsstellen für Serin- und Threoninkinasen, wie z.B. die Caseinkinase II, PKB, Proteinkinase C-Isoformen, MAPK, Glycogen-Synthase-Kinase oder die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). Die Rolle der bereits erwähnten basalen Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten konnte bisher nicht aufgeklärt werden [50], es gibt jedoch Hinweise, dass basale Serin- und Threoninphosphorylierungen an IRS-1 eine verstärkende Rolle, Hyperphosphorylierungen jedoch eine hemmende Rolle auf die Weiterleitung des Insulinsignals ausüben. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass durch alkalische Phosphatase vollständig dephosphoryliertes, rekombinantes IRS-1 nur noch dürftig durch den Insulinrezeptor phosphoryliert wird. [56]. Nach Behandlung mit Okadeinsäure, einem Inhibitor für Threonin- und Serinphosphatasen wird in 3T3 Adipozyten und in isolierten Muskeln die Insulinsignalweiterleitung gehemmt. Unter diesen Bedingungen bleibt die Insulinrezeptoraktivität unverändert, die IRS-1 abhängige PI3-Kinaseaktivität und der Glucosetransport sind jedoch vermindert [79]. In CHO-Zellen mit stabil transfiziertem Insulinrezeptor wurde durch Transfektion von PKC die Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 vermindert und auch seine Bindungsfähigkeit an die PI3-Kinase abgeschwächt [80].

Bisher konnten in IRS-1 *in vitro*, in Zellkultur und *in vivo* mehrere Serin- und Threoninphosphorylierungen gefunden werden, deren biologische Relevanz nur in wenigen Fällen aufgeklärt werden konnte [81]. In unserer Arbeitsgruppe wurde im C-terminalen Teil des IRS-1 (Ratte) ein Multiphosphorylierungsmotiv gefunden, das *in vitro* durch PKC- $\zeta$  an den Serinresten 1215, 1216 und 1220 und am Threoninrest 1221 phosphoryliert wird [82]. Da Tyr<sup>1222</sup> eine der beiden Bindungsstellen für SHP-2 ist, könnte die PKC- $\zeta$  durch diese Phosphorylierungen die Insulinsignalweiterleitung beeinflussen.

Die Caseinkinase II phosphoryliert IRS-1 (Maus) an Ser<sup>99</sup> und an Threonin<sup>502</sup> *in vitro* und in überexprimierten Sf9-Zellen [83]. Die Bedeutung dieser Phosphorylierungen ist ebenfalls noch unklar. Abbildung 1.2 zeigt einen schematischen Überblick über positive und negative Modulation von IRS-1 durch Ser- und Thr-Phosphorylierungen.



**Abb. 1.2: Positive und negative Modulation von IRS-1 durch Ser- und Thr-Phosphorylierungen.** Die positiven Effekte auf die Signalweiterleitung sind mit grünen Pfeilen, die negativen mit roten Pfeilen eingezeichnet (aus [81]). Positive Modulation des Insulinsignals wird über Proteinkinase B und AMP-Kinase, negative Modulation über PKC- $\alpha$ , JNK, PKC- $\zeta$ , GSK und TOR vermittelt (nähere Erläuterungen im Text). AGE-R=Rezeptor für „advanced glycated endproducts“, TNFR=Rezeptor für Tumor Nekrosefaktoren, IGFR=„insulin-like growth factor“-Rezeptor.

### 1.4.5.1 Positive Modulation der Insulinsignalweiterleitung

Die Überexpression von PKB führt in CHO-T-Zellen nach verlängerter Insulinstimulation zu einer verzögerten Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 [84]. Nach Mutation der Serinreste 265, 302, 325 und 358 in der PTB-Domäne des IRS-1 (Maus) zu Alanin, findet eine beschleunigte Dephosphorylierung an Tyrosinresten statt [85]. Da diese Serinreste in Konsensusstellen für PKB liegen, folgerten die Autoren, dass die Phosphorylierung von IRS-1 durch PKB die Insulinsignalweiterleitung positiv beeinflusst. Bisher konnte jedoch die direkte Phosphorylierung dieser Stellen nicht gezeigt werden. Serin<sup>789</sup> von IRS-1 (Ratte) wurde 2001 als AMP-Kinase-katalysierte Phosphorylierungsstelle *in vitro* und in C2C12 Myotuben beschrieben [86]. Diese Phosphorylierung wurde inzwischen auch *in vivo* an zwei verschiedenen insulinresistenten Rattenstämmen gezeigt, jedoch konnte die Kinase nicht bestätigt werden und es wurden negative Effekte auf die Insulinsignalweiterleitung gezeigt [87].

### 1.4.5.2 Negative Modulation der Insulinsignalweiterleitung

Sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine Hyperphosphorylierung an Serin- und Threoninresten im IRS-1 mit Insulinresistenz assoziiert ist [77;88]. Negative Beeinflussung des Insulinsignals durch Serin-/Threoninphosphorylierungen von IRS-1 wurde seit 1993 an einigen Beispielen -meist indirekt- durch Mutationen gezeigt. Inzwischen konnten mehrere Phosphorylierungsstellen von IRS-1 mit negativem Einfluss auf die Signalweiterleitung detektiert werden.

Durch die Mutation von vier Serinresten zu Alanin konnte gezeigt werden, dass IRS-1 (Ratte) an den Serinresten 612, 632, 662 und 731 phosphoryliert wird. Da diese Stellen in Konsensusstellen für die MAPK, also in YMXMSP-Motiven liegen, wurde gefolgert, dass diese Stellen auch durch die MAPK phosphoryliert werden [75]. Nach Stimulation mit TPA konnte in humanen embryonalen Nierenzellen 293T gezeigt werden, dass überexprimiertes IRS-1 (Ratte) an

Serin<sup>612</sup> phosphoryliert vorliegt. Da dieser Serinrest nicht in einer PKC-Konsensusstelle liegt, wurde von den Autoren gefolgert, dass durch PKC vermutlich die MAPK aktiviert wird, die wiederum IRS-1 phosphoryliert und damit auf dessen Tyrosinphosphorylierung einen negativen Einfluss ausübt [89]. Auf der Suche nach der Kinase, die die Phosphorylierung der Serinreste 612, 632, 662 und 731 im IRS-1 katalysiert, wurde festgestellt, dass PKB ebenfalls die Phosphorylierung dieser Stellen beeinflusst. Da es sich nicht um Konsensusstellen handelt, wurde auch hier vermutet, dass PKB weitere Kinasen aktiviert, wie z.B. mTOR („mammalian target of rapamycin“) [90]. Inzwischen konnte massenspektrometrisch gezeigt werden, dass die Serinreste 636 und 639 (Ratte) von IRS-1 nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  durch mTOR phosphoryliert werden. Die in einem Review publizierte Phosphorylierung von IRS-1 S<sup>612</sup> durch PKC- $\alpha$  [81] (Abbildung 1.2) konnte im später erschienenen Originalartikel nicht bewiesen werden [91]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass PKC- $\alpha$  durch glykiertes Albumin aktiviert und über einen unbekanntem Mechanismus noch nicht identifizierte Serinreste von IRS-1 phosphoryliert.

Die am besten untersuchte Serinphosphorylierungsstelle von IRS-1 ist Serin<sup>307</sup> (Ratte). Diese Stelle wurde im Jahr 2000 von der Gruppe um Morris White als TNF $\alpha$ -induzierte und durch die JNK-katalysierte Phosphorylierungsstelle publiziert [92] und wird seitdem intensiv untersucht. Die hemmende Wirkung auf die Insulinsignaltransduktion konnte inzwischen *in vitro*, in Zellkulturmodellen und *in vivo* gezeigt werden [93;94]. Die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>307</sup> scheint duale Funktion zu besitzen. In transfizierten H4IIE-Zellen wurde gezeigt, dass die Hemmung des Abbaus von IRS-1 durch die Hemmung des PI3-Kinase-Wegs direkt mit der Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>307</sup> korreliert [95].

Serin-/Threoninphosphorylierungsstellen an IRS-1 mit gezeigten negativen Effekten auf die Insulinsignaltransduktion katalysiert durch die MAPK, GSK-3, PKC- $\zeta$  und Rho-Kinase  $\alpha$  konnten bisher nicht identifiziert werden (Übersicht in [81]).

### **1.4.6 Rolle des IRS-1 bei der Entstehung der Insulinresistenz und des Diabetes mellitus Typ 2**

In den vorherigen Kapiteln wurde bereits beschrieben, wie IRS-1 als Adapterprotein die Insulinsignalweiterleitung moduliert. Als Modelle zur Untersuchung metabolischer Effekte dienen sogenannte „knockout“-Mäuse, in denen die Expression bestimmter Proteine durch gezielte Genmutation vollständig unterdrückt wird. IRS-1 „knockout“-Mäuse (IRS-1<sup>-/-</sup>) zeigen reduziertes Gewicht, Resistenz in der insulinabhängigen Glucoseaufnahme [43], Bluthochdruck, erhöhte Triglyceridwerte im Plasma, verminderte Lipase-Aktivität und reduzierte endothelabhängige vaskuläre Relaxation [96]. Sie entwickeln einen prädiabetischen, insulinresistenten Phänotyp, der dem menschlichen metabolischen Symbol entspricht. Die Entwicklung einer Insulinresistenz, aber keines Diabetes mellitus bei diesen Mäusen könnte durch Kompensation durch IRS-2 und erhöhte Insulinproduktion und Sekretion erklärt werden [97]. Die Insulinresistenz spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des DM Typ 2 und ist beteiligt an der Entstehung von Dyslipidämie, Bluthochdruck und Artherosklerose [98].

Insulinresistenz bei Typ 2 DM wurde schon 1965 gezeigt [99] und inzwischen gibt es zahlreiche Untersuchungen, die zeigen, dass Insulinresistenz in allen Zielgeweben von Insulin, wie z.B. dem Skelettmuskel, der Leber und adipösen Geweben, auftritt [100;101]. Anhand biochemischer Studien an Muskelgeweben konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von Insulinresistenz mit der Beeinträchtigung der Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors assoziiert ist [102]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass es unterhalb des Insulinrezeptors zur Signalabschwächung kommt, obwohl die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors nicht beeinträchtigt war [103]. In 3T3-L1 Adipozyten konnte unter hyperinsulinämischen Bedingungen eine Abnahme der IRS-1-Proteinmenge, ausgelöst durch Serin- und Threoninphosphorylierung von IRS-1, festgestellt werden [104].

Die Rolle des IRS-1 bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 ist noch nicht endgültig geklärt. Es gibt Hinweise auf metabolische Effekte, doch das

Zusammenspiel zwischen genetischer Prädisposition, wie z.B. der Polymorphismus Gly<sup>972</sup> → Arg<sup>972</sup> von IRS-1, Umwelteinflüssen, wie z.B. Ernährungs- und Bewegungsgewohnheiten, metabolische Faktoren, wie z.B. Hyperglykämie und molekularbiologischen Veränderungen in der Insulinsignaltransduktion ist nur teilweise aufgeklärt. Ein Schlüssel zur Aufklärung dieses Zusammenspiels ist die Erforschung der Modulation der Insulinsignalweiterleitung durch Serin- und Threoninphosphorylierungen an den Insulinrezeptor-Substraten, wobei IRS-1 das wichtigste Adaptermolekül im Skelettmuskel ist.

#### **1.4.7 Serin-/Thr-Phosphorylierung von IRS-1 durch PKC-Isoformen und ihre Rolle bei der Entwicklung von Insulinresistenz**

Ser-/Thr-Phosphorylierung an IRS-1 oder anderen Signaltransduktionsmolekülen spielen häufig eine negative regulierende Rolle in der Insulinsignalweiterleitung. So konnte z.B. in „chinese hamster ovary“ Zellen (CHO) durch Überexpression von PKC-Isoformen die Insulinsignalweiterleitung gehemmt werden [105;106].

Die Insulinsignalweiterleitung wird durch Hyperinsulinämie, Hyperglykämie, erhöhte Fettsäurewerte, aber auch durch Phorbolster oder Cytokine, wie z.B. TNF- $\alpha$  beeinflusst [107]. Gleichzeitig kann meist eine erhöhte Ser-/Thr-Phosphorylierung von IRS-1 beobachtet werden und es wurde mehrfach gezeigt, dass diese Substanzen als Aktivatoren für PKC-Isoenzyme wirken [108;109]. Durch TPA werden die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  und  $\eta$  aktiviert, durch TNF- $\alpha$  die Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  [110]. Erhöhte freie Fettsäuren aktivieren vor allem die PKC-Isoformen  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\theta$  [111;108], Hyperglykämie die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\delta$  und  $\epsilon$  [112], und Hyperinsulinämie aktiviert die PKC-Isoformen  $\beta$ ,  $\delta$  und  $\zeta$  [113;114]. Die Rolle der Proteinkinasen C bei der Entstehung der Insulinresistenz konnte durch pharmakologische Studien gezeigt werden. Dabei bewirkt TPA, ein PKC-Aktivator, eine Hemmung der Insulinsignalübertragung, wohingegen durch PKC-Inhibitoren die Signalweiterleitung verbessert wird [29].

### 1.4.8 Proteinkinase C

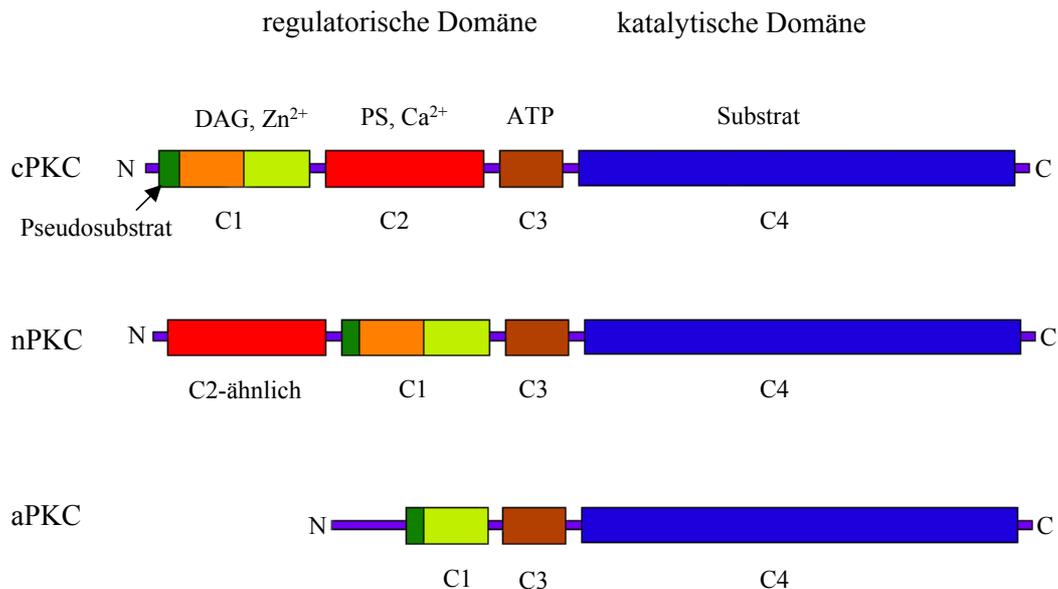
Proteinkinase C konnte erstmals 1977 isoliert werden [115] und durch kinetische Untersuchungen wurde gezeigt, dass Proteinkinase C durch tumorfördernde Phorbolster, Phosphatidylserin, Calcium und Diacylglyceride aktiviert werden kann [116]. Die Klonierung der c-DNA Genbank aus dem Gehirn bestätigte die Vermutung, dass es sich bei der isolierten Aktivität um verschiedene Isoformen handelte [117;118]. Inzwischen wurden 11 PKC-Isoformen identifiziert, die, basierend auf ihrer Aktivierbarkeit bzw. ihrer Struktur in drei Untergruppen eingeteilt werden können [119]:

1. Die Gruppe der klassischen oder konventionellen PKC-Isoformen (cPKC) umfasst die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$ , wobei es sich bei den Isoformen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  um alternative Spleißvarianten handelt. Diese Gruppe benötigt zur Aktivierung Calciumionen, Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylserin.
2. Die Gruppe der neuen PKC-Isoformen (nPKC) umfasst die Isoenzyme PKC- $\delta$ ,  $-\epsilon$ ,  $-\theta$  und  $-\eta$ , die als Cofaktoren DAG und Phosphatidylserin benötigen.
3. Die Gruppe der atypischen PKC-Isoformen (aPKC) umfasst PKC- $\zeta$ ,  $-\iota$  und  $-\lambda$ , wobei PKC- $\lambda$  das Rattenhomolog der humanen PKC- $-\iota$  ist. Diese Isoenzyme benötigen zur Aktivierung kein Calcium oder DAG, sie sind aber phospholipidabhängig.

Die ursprünglich zur Gruppe der atypischen Isoformen gerechnete PKC- $\mu$  wird inzwischen wegen ihres stark abweichenden strukturellen Aufbaus nicht mehr zu den PKC-Isoformen gerechnet und als PKD bezeichnet [120].

Die Aktivierung der konventionellen und neuen PKC-Isoenzyme kann anstatt durch DAG auch durch Phorbolster erfolgen, wobei die Aktivierung durch Phorbolster sehr viel stärker ist [121].

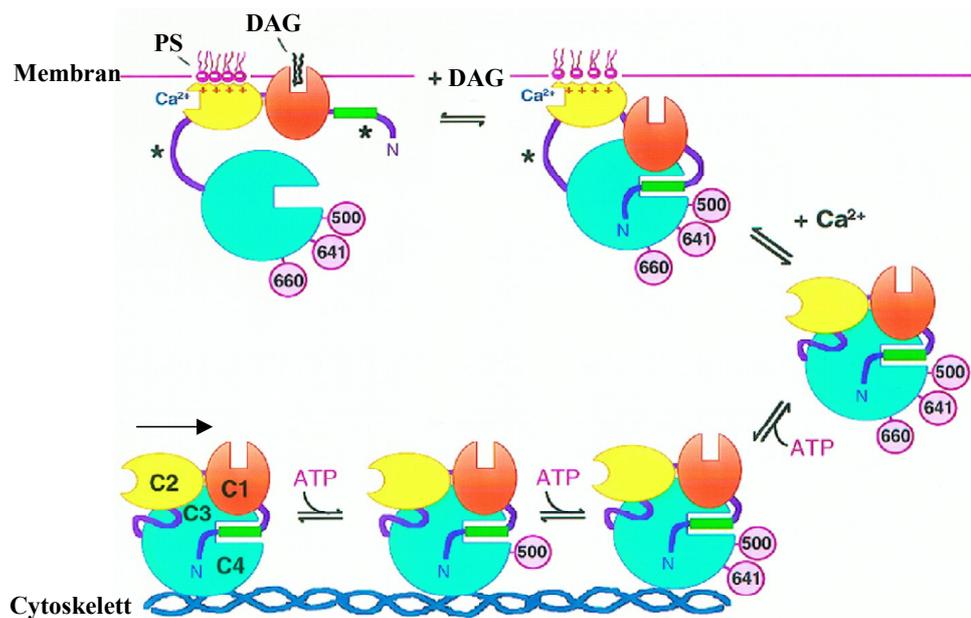
Die Proteinkinasen C setzen sich aus einer katalytischen und einer regulatorischen Domäne zusammen (siehe Abbildung 1.3), die über eine „hingeregion“ miteinander verbunden sind. Die Substrukturen wurden aus einem Sequenzvergleich der konventionellen PKC-Isoenzyme abgeleitet [117], wobei die vier konservierten Bereiche mit C1-C4 bezeichnet werden.



**Abb. 1.3: Einteilung der PKC-Isoformen** (nach [122]). Die katalytische Domäne (C4) und die ATP-Bindungsstelle der regulatorischen Domäne (C3) sind in allen PKC-Isoformen homolog. Die regulatorische Domäne der konventionellen PKC-Isoformen (cPKC) setzt sich aus einer Pseudosubstratbindungsstelle, einer C1-Domäne (Bindungsstelle für DAG und Zn<sup>2+</sup>), einer C2-Domäne (Bindungsstelle für Phosphatidylserin und Ca<sup>2+</sup>) und der ATP-Bindungsstelle zusammen. Den neuen PKC-Isoenzymen (nPKC) fehlt die C2-Domäne, sie besitzen jedoch am N-Terminus eine C2-ähnliche Domäne. Die atypischen PKC-Isoenzyme besitzen keine C2-Domäne, also keine Bindungsstellen für Phosphatidylserin und Calciumionen.

Die C1-Region setzt sich aus zwei nahezu identischen Zinkfinger-Motiven zusammen, an die DAG bzw. Phorbolster binden. Auf der aminoterminalen Seite dieser Domäne befindet sich das Pseudosubstrat, das im inaktiven Zustand an die Substratbindungsstelle des Enzyms bindet [123]. An die C2-Domäne, die aus fünf konservierten Aspartatresten besteht, bindet Calcium und Phosphatidylserin [124]. An die C3 Domäne bindet ATP und an die C4-Domäne das Substrat. Die C2-ähnliche Domäne der neuen PKC-Isoenzyme befindet sich auf der aminoterminalen Seite der C1-Region. Ihr fehlen die Aspartatreste, die zur Calciumbindung notwendig sind. Den atypischen PKC-Isoenzymen fehlt die C2-Region gänzlich und in der C1-Region haben sie nur ein Zinkfingermotiv, so dass DAG nicht an diese Region binden kann.

Die Aktivierung der konventionellen PKC-Isoformen erfolgt durch die Bindung von PS, DAG und Calciumionen (Abbildung 1.4, exemplarisch für PKC-β2).



**Abb. 1.4: Aktivierung von konventionellen PKC-Isoformen am Beispiel von PKC- $\beta$ 2 durch Phosphorylierung, Translokation, Membranbindung und Freisetzung des Pseudosubstrats** (nach [122]). Die Aktivierung der PKC-Isoenzyme erfolgt durch Phosphorylierung an drei Aminosäureresten, wodurch die PKC vom Cytoskelett ins Cytosol freigegeben wird. Die Translokation zur Membran wird durch die Bindung von DAG an die C1-Domäne und von Phosphatidylserin an die C2-Domäne bewirkt. Calciumionen erhöhen die Affinität der PKC-Isoform zu den sauren Lipiden. Nach der Freisetzung des Pseudosubstrates kann das Substrat in die freie Bindungstasche aufgenommen werden. Die Sterne markieren die freigelegten Scharnier-Regionen, die sehr anfällig gegen einen proteolytischen Abbau sind.

Die im Cytoskelett lokalisierte PKC-Isoform wird durch eine PKC-Kinase an einem Threoninrest phosphoryliert, wodurch es zu Autophosphorylierungen an einem weiteren Threonin- und einem Serinrest im C-terminalen Teil des Enzyms kommt. Die PKC liegt jedoch weiterhin inaktiv und gefaltet vor, die Substratbindungsstelle ist durch das Pseudosubstrat blockiert. Durch die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum, das sich an Aspartatreste der C2-Domäne anlagert, findet eine Konformationsänderung statt, wodurch das basische Rückgrad der PKC freigelegt wird und somit mit den sauren Kopfgruppen der Phospholipide interagieren kann (Abbildung 1.4). DAG und PS wirken dabei wie hydrophobe Anker mit deren Hilfe die PKC über die C1- bzw. C2-Domäne an der Membran fixiert wird. Dabei wird das Pseudosubstrat aus der Bindungstasche entlassen und die PKC-Isoform in den

aktiven Zustand überführt. Die aktivierte PKC-Isoform ist sehr anfällig gegen proteolytischen Abbau, v.a. an den exponierten Scharnier-Regionen.

### 1.4.9 Substratspezifität von PKC-Isoformen

Anhand von *in vitro*-Untersuchungen mit Peptidbanken konnten PKC-spezifische Konsensusstellen ermittelt werden. Ausgehend von einer Serinphosphorylierung an der Stelle 0 wird die Carboxyrichtung mit positiven, die Aminorichtung mit negativen Vorzeichen versehen. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten [125]:

- alle PKC-Isoenzyme bevorzugen an +1 einen hydrophoben Aminosäurerest, wie z.B. Val, Leu oder Ile
- alle PKC-Isoenzyme bevorzugen an -2, -3, -4 und -6 einen basischen Aminosäurerest, wie z.B. Arg oder Lys
- PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\gamma$  und - $\eta$  bevorzugen an +2, +3 und +4 einen basischen Aminosäurerest
- PKC- $\delta$ , - $\epsilon$  und - $\zeta$  bevorzugen an +2, +3 und +4 einen hydrophoben Aminosäurerest.

Diese Regeln geben einen Anhaltspunkt, doch die PKC-Isoformen wirken nicht hochspezifisch, sondern phosphorylieren auch nicht-Konsensusmotive, bzw. werden Konsensusmotive nicht phosphoryliert [125]. Dadurch wird die Analyse der durch PKC-Isoformen phosphorylierten Substrate erheblich erschwert.

## 1.5 Detektion und Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen in Signaltransduktionsmolekülen

Neben der relativ unspezifischen Phosphorylierung durch PKC-Isoenzyme und dem „multiphosphorylierbaren“ Substrat IRS-1 erschweren noch weitere Faktoren die Detektion und Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen in Signaltransduktionmolekülen:

- Für Serin- oder Threonin-modifizierte Aminosäurereste ist es nicht möglich generelle Antikörper herzustellen, da die Phosphoaminosäure ein zu schwaches Epitop ist und somit nicht durch einen Antikörper erkannt wird.
- Signaltransduktionsmoleküle liegen meist in sehr niedriger Kopienzahl in der Zelle vor
- Der Phosphorylierungsgrad ist häufig sehr gering
- Meist sind Signaltransduktionmoleküle an mehreren Stellen phosphoryliert [12].

### **1.5.1 Klassische Methoden zur Detektion und Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen**

Proteinphosphorylierungen wurden bis vor wenigen Jahren ausschließlich durch den metabolischen Einbau von radiomarkierten, anorganischen Orthophosphat untersucht. Neben der aufwändigen Durchführung, bedingt durch den Einsatz von hohen Mengen von  $^{32}\text{P}$ , ist es sehr schwierig, die Ergebnisse richtig zu interpretieren. Die  $^{32}\text{P}$ -Einbaurate hängt stark vom Phosphatumsatz des Proteins ab. Je niedriger die Phosphataseaktivität gegen phosphorylierte Stellen des Proteins ist, desto geringer ist auch die Chance, dass das eingebaute Phosphat gegen das markierte Phosphat ausgetauscht wird. Metabolischer Einbau von Orthophosphat gibt somit nur einen ungefähren Hinweis über den Phosphorylierungsgrad des Proteins. Proteine, die an verschiedenen Positionen phosphoryliert werden können, machen eine Aussage über den tatsächlichen Phosphorylierungszustand einzelner Aminosäurenreste nahezu unmöglich.

Eine Methode, um qualitative Aussagen zu bekommen, ist die 2-dimensionale Phosphoaminosäurenanalyse. Nach der Phosphorylierungsreaktion wird das Protein elektrophoretisch gereinigt und auf eine PVDF-Membran überführt. Nach Totalhydrolyse der ausgeschnittenen Bande findet eine 2-dimensionale Trennung statt. In der ersten Dimension erfolgt eine Hochspannungselektrophorese, in der zweiten eine Dünnschichtchromatographie. Die phosphorylierten Amino-

säurereste können nun autoradiographisch durch einen Vergleich mit Referenzamino­säuren detektiert werden.

Immunochemische Methoden sind eine weitere Möglichkeit Änderungen im Phosphorylierungsgrad von Proteinen annähernd quantitativ zu bestimmen. Antikörper sind meist hochspezifisch und selektiv. Für modifizierte Tyrosinreste gibt es verschiedene Antikörper, mit denen es einfach möglich ist, tyrosinphosphorylierte Proteine zu detektieren, oder durch Immunpräzipitation zur weiteren Untersuchung aufzureinigen. Für Proteine, die an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert sind, ist es bisher noch nicht gelungen, generelle Antikörper herzustellen. Zur Herstellung eines Antikörpers müssen die benachbarten Aminosäurereste in das Epitop mit einbezogen werden.

Durch enzymatische Techniken ist es möglich, den Phosphorylierungs­zustand von Proteinen zu bestimmen. Durch Behandlung mit Phosphatasen werden die Phosphatgruppen hydrolysiert. Bei der Verwendung von unspezifischen, tyrosin­spezifischen und von serinspezifischen Phosphatasen mit  $^{32}\text{P}$ -markierten Proteinen, kann aus den Differenzen der freigesetzten Radioaktivität der Phosphorylierungsgrad der einzelnen Aminosäurereste bestimmt werden.

Phosphorylierte Aminosäurereste in Proteinen können durch den Edman-Abbau bestimmt werden. Dazu werden die Proteine tryptisch verdaut, chromatographisch aufgetrennt und dann einer Edman-Analyse unterworfen. Bei  $^{32}\text{P}$ -markierten Proben wird nach jedem Abbauschritt die Radioaktivität bestimmt, wodurch die Position der Phosphoamino­säure eindeutig zugeordnet werden kann. Dadurch können phosphorylierte Aminosäurereste im subpicomolaren Bereich detektiert werden [126]. Eine Sequenzierung gelingt beim Radio-Edman jedoch nicht, so dass noch zusätzlich eine Phosphoamino­säureanalyse durchgeführt werden muss.

Eine weitere Möglichkeit zur indirekten Detektion phosphorylierbarer Aminosäurereste in Proteinen ist die Mutagenese potentieller Kandidaten. Die ersten Untersuchungen zur Detektion von Phosphorylierungen in IRS-1 wurden durch punktgerichtete Mutationen an potentiellen Konsensuspositionen der PKB durchgeführt [85]. Es konnte gezeigt werden, dass durch Mutation der Serinreste

265, 302, 325 und 358 eine beschleunigte Dephosphorylierung von IRS-1 stattfindet (siehe 1.4.5). Diese Methode kann Erfolg bringen, wenn man den Sequenzbereich kennt, in dem die Phosphorylierungen stattfinden.

### **1.5.2 Massenspektrometrische Methoden zur Detektion und Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen**

In den letzten Jahren entwickelte sich die Massenspektrometrie zu einem Werkzeug, mit dem die Einschränkungen der oben erwähnten Methoden weitgehend ausgeräumt werden können. Die Massenspektrometrie ist für schnelle und sensitive Analysen posttranslationaler Modifikationen das ideale Werkzeug [127]. Durch die Sensitivität und Empfindlichkeit dieser Methodik, muss auf die Probenvorbereitung viel Wert gelegt werden. Da Proteine meist nur zu einem geringen Anteil phosphoryliert werden, ist es notwendig, sie anzureichern und von den nicht-phosphorylierten Proteinen abzutrennen, zum Beispiel durch Affinitätschromatographie mit immobilisierten Eisen-, Gallium- oder Kobaltionen [128], Immunpräzipitation mit phosphospezifischen Antikörpern oder durch zweidimensionale Elektrophoresetechniken.

Beim Phosphopeptid-„mapping“ werden die phosphorylierten Proteine nach gelelektrophoretischer Reinigung mit spezifischen Proteasen meist aus dem Gel gespalten. Die resultierenden Peptide werden anschließend ein- oder zweidimensional getrennt und direkt („online“) oder nach Fraktionierung („offline“) massenspektrometrisch analysiert. Die Phosphopeptide werden durch den Vergleich mit theoretisch berechneten Massen oder über Datenbankauswertungen bestimmt. Die Sequenzierung der Phosphopeptide erfolgt dann mit Hilfe von Tandem-MS/MS-Techniken.

Beim kollisionsinduzierten Zerfall von Phosphopeptiden kommt es zur Ausbildung genau definierter Fragmentionen, mit deren Hilfe die Phosphopeptide identifiziert und die genaue Position der Phosphorylierung bestimmt werden kann [129]. Durch die Kollisionsinduktion kommt es bei einfach geladenen Phosphopeptiden zu einem Neutralverlust von 98 Da ( $H_3PO_4$ )

oder zu einem Verlust von 80 Da ( $\text{HPO}_3$ ) [130]. Das durch den Neutralverlust gebildete Dehydroalanin ist somit ein Beweis für das ursprüngliche Vorhandensein eines phosphorylierten Serinrestes, der Nachweis von Dyhydroamino-2-Buttersäure weist auf einen vorhandenen phosphorylierten Threoninrest hin .

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Diabetes mellitus Typ 2 ist heute die am weitesten verbreitete Krankheit in der westlichen Welt, doch über die Ursachen weiß man noch sehr wenig. Man kennt genetische Defekte, die im Zusammenspiel mit Umwelteinflüssen und der Regulation durch posttranslationale Modifikationen auf Proteinebene schließlich über die Insulinresistenz zu Diabetes mellitus Typ 2 führen.

Die Rolle posttranslationaler Modifikationen bei der Entstehung der Insulinresistenz ist nur zu einem geringen Teil aufgeklärt. Doch zum Verständnis dieser Krankheit und als Ansatzpunkt für denkbare pharmakologische Therapien ist es notwendig, die molekularbiologischen Ursachen dieser Erkrankung aufzuklären. Insulinrezeptor-Substrat-1 ist das wichtigste Adapterprotein in der Insulinsignaltransduktion und könnte ein Schlüssel zur Erforschung der Pathobiochemie dieser Erkrankung sein. In der Primärstruktur von IRS-1 findet man über 50 Phosphorylierungsmotive und durch die geringe Spezifität vieler Kinasen könnte theoretisch jede der 278 Aminosäurereste mit einer Hydroxylgruppe phosphoryliert werden. Dies erschwert die Analyse posttranslationaler Modifikationen durch klassische Methoden, so ist z.B. die Erfassung aller Phosphorylierungsstellen durch Mutationsanalysen nicht durchführbar.

Die Phosphorylierung von IRS-1 durch Proteinkinase C-Isoformen moduliert das Insulinsignal, doch bisher konnte noch keine dieser qualitativ mehrfach gezeigten Phosphorylierungsstellen detektiert werden.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist somit die Identifizierung und Charakterisierung von neuen Phosphorylierungsstellen im Insulinrezeptor-

Substrat-1 durch massenspektrometrische, zellbiologische und immunchemische Untersuchungen.

- Um die Komplexität des Ansatzes zu reduzieren, sollte ein System entwickelt und etabliert werden zur PKC-katalysierten *in vitro*-Phosphorylierung von GST-IRS-1-Fusionsproteinen, die in größeren Mengen in *E. coli* exprimiert werden können. Dazu gehört die Aufzucht der Bakterien, die Expression und Reinigung der Fusionsproteine.
- Es sollten durch die Phosphorylierung von Fusionsproteinen aus IRS-1 mit PKC-Isoformen Cerenkov-Pattern erstellt werden, um abzuschätzen, wie viel Phosphorylierungsstellen im IRS-1 vorhanden sind und welche PKC-Isoform den besten Phosphateinbau zeigt.
- Im Arbeitskreis bereits vorhandene Methoden zur Probenvorbereitung für die MS-Analyse sollten so modifiziert werden, dass phosphorylierte Fusionsproteine massenspektrometrisch analysiert werden können (Reinigung, Gelverdau, HPLC).
- Im Arbeitskreis gibt es bereits etablierte massenspektrometrische Analysemethoden zur Reinigung und Sequenzierung von  $^{32}\text{P}$ -markierten Fusionsproteinen [131]. Durch die Entwicklung einer alkalischen Negativionen  $\mu\text{LC/ES-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Technik}$ , könnte die Detektion der phosphorylierten Proben auch ohne Radioaktivität gelingen.
- Die im *in vitro-Assay* gefundenen Phosphorylierungsstellen sollten mutiert und auf weiteren Phosphateinbau untersucht werden.
- Die Phosphorylierungsstellen sollten im Zellkultorexperiment auf biologische Relevanz in der Insulinsignaltransduktion untersucht werden. Dazu sollten von den gefundenen Stellen Mutanten hergestellt werden, um Effekte festzustellen, die durch Elimination der Phosphorylierungsstelle bewirkt werden.
- Gegen biologisch relevante Phosphorylierungsstellen sollten Antikörper generiert und charakterisiert werden.

## 2 Materialien, Software und Geräte

### 2.1 Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren und Substrate

alkalische Phosphatase	
Dnase I, Rnase-frei	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Ligase	
Ligasepuffer	
Lysozym	ICN Biomedicals Inc, USA
MARCKS PSD-Derived Peptide	Calbiochem, Bad Soden
Plasmid-DNA IRS-1 (Ratte)	Moris White, Boston, USA
Plasmid-DNA: IR (Mensch), PKC- $\zeta$ (Mensch), PKC- $\delta$ (Maus), pcDNA3, PRK5	Katrin Brodbeck, Tübingen Dr. Cora Weigert, Tübingen Dr. Reiner Lammers, Tübingen
pGEX-2T	Amersham Biosciences
Sequenzierungs-Primer	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
PWO Polymerase	peqLab GmbH, München
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim
RNaseA	Quiagen, Hilden
DNA-Sequenzier Premix	Perkin Elmer, Überlingen
Trypsin, sequencing grade	Roche, Mannheim
GST-PKC- $\alpha$ (Maus, rekomb.)	
GST-PKC- $\beta$ 1 (Mensch, rekomb.)	
GST-PKC- $\beta$ 2 (Mensch, rekomb.)	
GST-PKC- $\theta$ (Mensch, rekomb.)	
GST-PKC- $\iota$ (Mensch, rekomb.)	
GST-PKC- $\zeta$ (Mensch, rekomb.)	
PKC- $\beta$ 1 (Mensch, rekomb.)	
PKC- $\varepsilon$ (Mensch, rekomb.)	Calbiochem, Bad Soden
PKC- $\delta$ (Mensch, rekomb.)	
PKC- $\zeta$ (Mensch, rekomb.)	
PKD (Mensch, rekomb.)	F.-J. Johannes, Universität Stuttgart

## 2.2 Antikörper

### 2.2.1 Antikörper gegen IRS-1

A19, Kaninchen, polykl., gegen N-Term.	Santa Cruz Biotechnology, USA
Kaninchen, polyklonal, gegen C-Terminus	Upstate Ltd, Wolverton, UK
12H8, Maus, monoklonal gegen M-Bereich	nanotools, Teningen
Kaninchen, polyklonal, gegen PH-Domäne	Upstate Ltd, Wolverton, UK

### 2.2.2 Antikörper gegen PKC

anti-PKC- $\zeta$ , Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-PKC- $\zeta$ , Kaninchen, polyklonal	Upstate Ltd, Wolverton, UK
anti-PKC- $\delta$ , Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA

### 2.2.3 Antikörper gegen Signaltransduktionsmoleküle

anti-Phospho-PKB/Akt (Thr 308), Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology™
anti-Phospho-PKB/Akt (Ser 473)	Upstate Ltd, Wolverton, UK
anti-PKB/Akt, Schaf, polyklonal	Upstate Ltd, Wolverton, UK
anti-GSK-3 $\beta$ , Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-Phospho-GSK-3 $\alpha/\beta$ (Ser 21/9), Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology™
anti-MAPK 1/2 (Erk1/2-CT), polyklonal, Kaninchen	Upstate Ltd, Wolverton, UK
anti-PI3-Kinase p85, polyklonal, Kaninchen	Upstate Ltd, Wolverton, UK
anti-Insulinrezeptor 8314, monoklonal, Maus	Dr. R. Lammers, Tübingen
anti-Insulinrezeptor $\beta$ , polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, USA

### 2.2.4 Weitere Antikörper

anti-GST (monoklonal, Maus)	
anti-phospho-Tyrosin 4G10 (monoklonal, Maus)	Upstate Ltd, Wolverton, UK

### 2.2.5 Sekundäre Antikörper

anti-rabbit IgG-HRP , Ziege	
anti-mouse IgG-HRP, Ziege	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-goat IgG-HRP, Affe	
anti-sheep IgG-HRP, Ziege	Bio-Rad, München

## 2.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden in p.a. Qualität oder besser eingesetzt.

4- Vinylpyridin	Sigma, Deisenhofen
<u>A</u> cetonitril	Merck, Darmstadt
Advanced Protein Assay Reagent	Cytoskeleton, Denver, USA
Agarose, peqGold	peqLab GmbH, München
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniak 25%	Merck, Darmstadt
Ammoniumbicarbonat	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
ATP	Sigma, Deisenhofen
<u>β</u> -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
β-Glycerophosphat	Sigma, Deisenhofen
BES (N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-Aminoethansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
BSA, Bovine serum albumin	Roche, Mannheim

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
<u>C</u> aCl <sub>2</sub>	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G-250®	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R-250®	Serva, Heidelberg
<u>D</u> i-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DOG (1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol)	Calbiochem, Bad Soden
Dulbeccos-PBS	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
<u>E</u> DTA	Sigma, Deisenhofen
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
<u>F</u> ormaldehyd	Aldrich, Steinheim
FuGENE 6	Roche, Mannheim
<u>G</u> elatine	Merck, Darmstadt
Glutathion-Sepharose™ 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Glycin	Bio-Rad, München
Glycerin	Merck, Darmstadt
<u>H</u> EPES	Sigma, Deisenhofen
HPLC-Wasser(LiChrosolv <sup>R</sup> , 18,2MΩxcm <sup>-1</sup> )	Merck, Darmstadt
<u>I</u> nsulin aus Rinderpankreas	Sigma, Deisenhofen
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid)	peqLab GmbH, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
<u>K</u> odak X-Omat LE, Entwickler- und Fixierlösung	Kodak, Stuttgart
<u>L</u> -α-Phosphatidyl-L-Serin 98 % in Chloroform/Methanol	Sigma, Deisenhofen
Luminol (3-Aminophtalhydrazid)	Aldrich, Steinheim

<u>M</u> agnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
<u>N</u> atriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Sigma, Deisenhofen
Natriumthiosulfat x 5 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Natronlauge 1 N	Merck, Darmstadt
Natronlauge 2 N	Merck, Darmstadt
<u>P</u> EG (15-20.000)	Sigma, Deisenhofen
p-Jodphenol	Aldrich, Steinheim
Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden
Ponceau S-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Phorbol-12-Myristate-13-Acetat, für die Zellkultur	Sigma, Deisenhofen
Phorbol-12-Myristate-13-Acetat, für <i>in vitro</i> -Assays	Calbiochem, Bad Soden
Proteasehemmer-Tabletten, EDTA-frei	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Protein A-Sepharose (Suspension)	Amersham Biosciences, Freiburg
Protein G-Sepharose (Suspension)	Amersham Biosciences, Freiburg
ProtoGel, ultrapure, 30 % Acrylamid /0,8 % (w/v) Bisacrylamid, Stocklösung (37,5:1)	National Diagnostic, USA
<u>R</u> ottlerin, SL 2,5 mM	Katrin Eitel, Tübingen
<u>S</u> alzsäure (konzentriert, 37 %)	Appllichem, Darmstadt
Salzsäure 1 N	Merck, Darmstadt
Salzsäure 2 N	Merck, Darmstadt
Salzsäure 25 %	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Sigma, Deisenhofen
SDS ultrapure	Roth, Karlsruhe

SimplyBlue™ SafeStain	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
<u>T</u> etramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, ultrapur	ICN Biomedicals Inc, USA
Triton® X-100 (t-Octylphenoxy-polyethoxyethanol)	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Biochrom, Berlin
<u>W</u> asserstoffperoxid, 30 %ige Lösung	Aldrich, Steinheim
<u>X</u> ylencyanol	Sigma, Deisenhofen

### 2.3.1 Molekulargewichtsmarker

„prestained“ Protein-Marker	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
“All Blue Precision Plus” Protein Standard	BioRad, München
“Low Molecular Weight” Marker	Amersham Biosciences, Freiburg
“High Molecular Weight” Marker	Amersham Biosciences, Freiburg
DNA-Längenstandard X	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim

### 2.3.2 Lösungen und Puffer

Alle Puffersubstanzen und Lösungsmittel wurden in p.a. Qualität oder besser verwendet. Wasser wurde entweder als Milli Q oder HPLC-Wasser eingesetzt.

Elektrophorese-Laufpuffer: (0,025 M Tris; 0,19 mol Glycin; 0,1% SDS; pH 8,3).

Es wurde ein 10 x Laufpuffer hergestellt, der kurz vor Gebrauch mit Wasser 1:10 verdünnt wurde.

10 x Laufpuffer: 30,3 g Tris; 144 g Glycin; 10 g SDS wurden in 1 L H<sub>2</sub>O gelöst

Trenngelpuffer: (1,5 M Tris; 2 % SDS; pH 8,8): 90,8 g Tris und 10 g SDS wurden in 500 mL H<sub>2</sub>O gelöst. Der pH wurde mit 25 %iger HCl eingestellt.

Sammelgelpuffer (0,5 M Tris; 2 % SDS; pH 6,8): 30,3 g Tris und 2 g SDS wurden in 500 mL H<sub>2</sub>O gelöst. Der pH wurde mit 25 %iger HCl eingestellt.

APS-Lösung: 1 g Ammoniumpersulfat wurde in 10 mL H<sub>2</sub>O gelöst.

1 x Laemmli-Probenpuffer: 2,5 mL Sammelgelpuffer, 1 g SDS, 10 mg Bromphenolblau und 20 mL Glycerin wurden mit H<sub>2</sub>O auf 100 mL aufgefüllt. Kurz vor Verwendung wurden zu 990 µL Probenpuffer noch 10 µL DTT (200 mg/mL) dazugegeben.

5 x Laemmli-Probenpuffer: 0,6 mL 1 M Tris HCl pH 6,8; 5 mL 50 % Glycerin; 2 mL 10 % SDS; 0,5 mL β-Mercaptoethanol und 1 mL 1 % Bromphenolblaulösung wurden mit H<sub>2</sub>O auf 10 mL aufgefüllt.

Probenpuffer für die Agarosegelelektrophorese: 0,1 % Bromphenolblau und 0,1 % Xylencyanol wurden in 30 % Glycerin gelöst.

Blotpuffer: 10 x Blotpuffer: (480 mM Tris; 390 mM Glycin; 0,4 % SDS). 100 mL dieses 10 x Puffers werden mit 200 mL Methanol und 700 mL H<sub>2</sub>O zur gebrauchsfertigen 1 x Blotlösung gemischt. Für 2 L 10 x Blotpuffer werden 116,25 g Tris, 58,6 g Glycin und 8 g SDS benötigt.

10 x NET“G“ (1,5 M NaCl; 50 mM EDTA; 500 mM Tris; 2,5 % Gelatine). Für 1 L 10 x NET“G“ wurden 25 g Gelatine in etwa 500 mL H<sub>2</sub>O bei 37 °C im Wasserbad gelöst und 87,66 g NaCl, 19,1 g EDTA und 60,55 g Tris dazugegeben. 1 x NET“G“: 500 mL NET“G“ 10 x wurde bei 37°C im

Wasserbad verflüssigt und zu 4 L H<sub>2</sub>O gegeben. Nach der pH-Einstellung mit konz. HCl auf 7,4 wurde mit H<sub>2</sub>O auf 5 L aufgefüllt.

ECL-Lösungen:

Luminol 0,5 M: 0,885 g gelöst in 10 mL DMSO und p-Jodphenol 0,5 M: 1,1 g gelöst in 10 mL DMSO. Diese beiden Stammlösungen wurden lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt und kurz vor dem Herstellen der ECL-Lösungen bei Raumtemperatur (RT) verflüssigt.

0,1 M Tris/HCl, pH 9,35: 12,11 g in H<sub>2</sub>O gelöst und nach pH-Einstellung auf 1 L aufgefüllt.

ECL-Lösung A (4,41 mM Luminol; 4,32 mM p-Jodphenol in 0,1 M Tris; pH 9,35): 880 µL 0,5 M Luminol und 864 µL 0,5 M p-Jodphenol wurden auf 100 mL mit 0,1 M Tris/HCl pH 9,35 aufgefüllt.

ECL-Lösung B (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,0075 % in 0,1 M Tris/HCl, pH 9,35): 25 µL Wasserstoffperoxid 30 % wurden mit 0,1 M Tris/HCl pH 9,35 auf 100 mL aufgefüllt. Die ECL-Lösungen A und B wurden im Kühlschrank maximal 2 Wochen gelagert und kurz vor Verwendung 1:1 gemischt.

Stripping-Puffer (66 mM Tris pH 6,8; 0,5 % β-Mercaptoethanol; 2 % SDS): Für 1 L wurden 8 g Tris und 20 g SDS in 800 mL H<sub>2</sub>O gelöst, der pH mit etwa 10 mL 25 %iger HCl auf 6,8 eingestellt und mit H<sub>2</sub>O auf 995 mL aufgefüllt. Danach wurde 5 mL β-Mercaptoethanol dazugegeben.

Coomassie-Lösung: 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250® wurde in einer Mischung aus Methanol, Wasser und Eisessig (4,5:4,5:1 v/v) gelöst und anschließend filtriert.

Coomassie-Entfärbelösung: Mischung aus Methanol, Wasser und Eisessig (4,5:4,5:1 v/v)

Phosphat-gepufferte Saline mit Proteasehemmer (PBS-PH): 1 Proteasehemmer-tablette ohne EDTA wurde in 50 mL PBS gelöst. Diese Lösung wurde im Kühlschrank maximal 1 Woche aufbewahrt.

2 x BBS (50 mM BES; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6,96 (NaOH)): 1,066 g BES, 5,6 mL einer 5 M NaCl-Lösung und 150 µL einer 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung wurden mit H<sub>2</sub>O auf 90 mL aufgefüllt. Dann wurde der pH-Wert von 6,96 mit NaOH genau eingestellt und auf 100 mL aufgefüllt. Die BBS-Lösung wurde durch eine Testtransfektion auf ihre Wirksamkeit überprüft.

„Mads“-Lysepuffer [132]:

a) Grundpuffer ( 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 % Triton® X-100): 6,05 g Tris, 8,8 g NaCl und 10 mL Triton® X-100 wurden mit H<sub>2</sub>O auf 850 mL und nach pH-Einstellung auf 900 mL aufgefüllt. Aliquots zu je 45 mL wurden im Kühlschrank gelagert.

b) 10 x Phosphatasehemmer (100 mM Natriumfluorid; 100 mM Natriumorthovanadat; 100 mM β-Glycerophosphat (Glycerol-2-Phosphat); 50 mM Natrium-pyrophosphat): Für 100 mL 10 x Phosphatasehemmer wurden 420 mg NaF, 1,84 g Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2,16 g C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>PNa<sub>2</sub> und 2,2 g Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O gelöst und in Aliquots zu je 5 mL eingefroren.

c) Proteasehemmer: Proteasehemmertablette EDTA-frei (Roche).

Zu 45 mL Grundpuffer wurden 5 mL 10 x Phosphatasehemmer-Lösung und eine Proteasehemmertablette gegeben.

### 2.3.3 Nährmedien und Antibiotika

Fötales Rinderserum (FCS)	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (PenStrep, 100.000 U)	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
LB Broth, Miller	Sigma, Deisenhofen

LB Agar (Lennox L Agar)	Sigma, Deisenhofen
DMEM 1 g Glc/L, ohne Gln	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
DMEM 4,5 g Glc/L, ohne Gln, ohne Natriumpyruvat	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Ampicillin	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe

LB-Medium (Luria-Bertani): 25 g LB wurden in 1 L Wasser suspendiert und autoklaviert.

LB/Amp-Medium: Ampicillin wurde nach dem Autoklavieren in einer Konzentration von 100 µg/mL zu LB-Medium dazugegeben.

LB/Amp-Nährböden: Dem LB-Agar wurde nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50°C Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100µg/mL zugegeben.

Standardmedium für BHK-Zellen: 440 mL DMEM mit 4,5 g Glucose/L werden mit 50 mL hitzeinaktiviertem FCS, 5 mL PenStrep und 5 mL 200 mM Glutamin versetzt.

Low Glucose Medium serumfrei: 490 mL DMEM mit 1 g Glucose/L wurden mit 5 mL PenStrep und 5 mL 200 mM Glutamin versetzt.

1 x TAE (Tris/Acetat/EDTA): 40 mM Tris; 2 mM EDTA; pH 8,0 mit Natriumacetat.

### 2.3.4 Radioaktive Materialien

[ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP, 370 MBq/mL, 10 mCi/mL, >5000 Ci/mMol	Amersham Biosciences, Freiburg
[ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP, 370 MBq/mL, 10 mCi/mL, 3000 Ci/mMol	NEN/Perkin Elmer Life Sciences

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

Plastikmaterialien (Reaktionsgefäße, Zellkulturflaschen, Pipetten, Petrischalen, Küvetten etc.) wurden von den Firmen Sarstedt, Eppendorf, Falcon, Greiner und Nunc bezogen.

Dialysemembran	Roth, Karlsruhe
Einmalsäulen für die Reinigung der GST-Fusionsproteine	BioRad, München
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Hyperkassette für die Autoradiographie mit Hyperscreen Verstärkerfolie	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperkassette für die Detektion der Chemilumineszenz von Proteinblots	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperscreen Verstärkerfolie	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm MP 18 x 24 cm <sup>2</sup>	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm ECL 18 x 24 cm <sup>2</sup>	Amersham Biosciences, Freiburg
„Isoplates“ 1450-514	Perkin-Elmer/ Wallac, Turku, Finnland
Laser-Kopierfolien	Xerox, Düsseldorf
Millipore Filter 0,22 µm Porenweite	Millipore, Bedford, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Prospekthüllen für <sup>32</sup> P Gele zum Einschweißen	Leitz, Stuttgart
Protran® BA 85, Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher Schüll, Dassel
“Resealable tape” 1450-462	Perkin-Elmer/Wallac Turku, Finnland
Plastikendlosschlauch	Roth, Karlsruhe
“Szintiplates” 1450-501	Perkin-Elmer/ Wallac, Turku, Finnland

## 2.5 Zellen und Bakterienstämme

### 2.5.1 Zellen

**BHK** (ATCC Nr. CCL 10). Diese Zelllinie wurde 1961 aus den Nieren von fünf Hamstern (*Mesocricetus auratus*), die einen Tag alt waren, gewonnen. Diese Zelllinie wurde von R. Lammers, Tübingen zur Verfügung gestellt.

**BHK<sup>IR</sup>-Zellen** ist eine BHK-Zelllinie mit stabil transfiziertem Insulinrezeptor. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von N.P. Møller, Novo Nordisk, Dänemark zur Verfügung gestellt.

### 2.5.2 Bakterienstämme

Die folgenden Bakterienstämme wurden für die Expression der GST-IRS-1-Fusionsproteine verwendet.

***E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$**  (Hanahan, 1983): Genotyp: (*supE* 44  $\Delta$ *lac* U169  $\Phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR* 17 *recA1* *endA* 1 *gyrA* 96 *thi-1* *relA1*)

***E. coli*-Stamm BL21** (Studier and Moffatt, 1986): Genotyp: (B F<sup>-</sup> *dcm ompT* *hsdS* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup>* *m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *gal*).

***E. coli*-Stamm BL21(DE3)-Codon Plus-(RIL)** (Stratagene, Amsterdam, NL)  
Genotyp: (B F<sup>-</sup> *ompT* *hsdS* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup>* *m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal* *endA* Hte [*argU* *ileY* *leuW* Cam<sup>r</sup>]) Dieser Stamm enthält zusätzliche Kopien von in *E. coli* in niedriger Kopienzahl vorkommenden tRNA-Genen und erlaubt dadurch eine effizientere Produktion von heterologen Proteinen.

**kompetente *E. coli*-Zellen** für die Transformation wurden von Katrin Brodbeck und Cora Weigert, Tübingen zur Verfügung gestellt.

## 2.6 Geräte

Absaugpumpe Sf 302 SL	Schwarzer GmbH, München
Autoklav SANOclav	Wolf, Geislingen
β-Counter LS 1801	Beckman, München
β-Counter Trilux 1450 MicroBeta™ Plus	Perkin-Elmer/Wallac, Finnland
Binokular Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Blotting Apparatur	PolyMehr, Kassel
Brutschrank Function line	Heraeus/Kendro, Hanau
Cleanbench Herasafe	Heraeus/Kendro, Hanau
Drehrad	PSI Medizintechnik, Laudenbach
DNA-Gelauwerteeinheit:	
MidiDoc™	Herolab, Wiesloch
UV-Kamera E.A.S.Y. 429 K	Herolab, Wiesloch
Video-Copy-Printer, P 67 E	Mitsubishi Electric, Singapur
B & W Monitor,	Monacor, Bremen
Elektrophoreseapparaturen	
Hofer SE 600 (16x16 cm <sup>2</sup> )	Amersham Biosciences, Freiburg
Minigelapparatur (10 x 10 cm <sup>2</sup> )	PolyMehr, Kassel
Maxigelapparatur (20 x 20 cm <sup>2</sup> )	PolyMehr, Kassel
Flachbettapparatur für Agarosegele	PolyMehr, Kassel
Filmentwickelmaschine	
Cronex T5A	Du Pont, Bad Homburg
Sterling Diagnostic Imaging	Du Pont, Bad Homburg
Folienschweißgerät, Heat Sealer 1295-012	LKB/Wallac, Turku, Finnland
Gelgießapparatur, Hofer SE 675	Amersham Biosciences, Freiburg
Gefrierschränke -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C	Heraeus/Kendro, Hanau
Hamilton Injektionsspritzen	Hamilton, Reno, USA
Heizgerät neo Block Duo	neoLab, Heidelberg
Heizrührer MR 2002	Heidolph, Schwabach
<b>HPLC</b>	
Controller SCL-10A VP	Shimadzu, Duisburg
Pumpe LC-10AT VP	Shimadzu, Duisburg
Schaltventil FCV-10AL VP	Shimadzu, Duisburg
Degasser DGU-14A	Shimadzu, Duisburg

Detektor LKB Uvicord VW 2251	Amersham Biosciences, Freiburg
Detektorzelle 2 mm, 0,8 µL	Amersham Biosciences, Freiburg
Rheodyne 7125	Rheodyne, Rohnert Park, USA
Fraktionssammler FC 203B	Bischoff, Leonberg
Software Class-VP V. 5.03	Shimadzu, Duisburg
Säule: µRPC C2/C18 2,1 x 100 mm	Amersham Biosciences, Freiburg
Inkubator HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Kapillarelektrophorese, ABI PRISM 310	Perkin Elmer, Überlingen
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer Reverstir RS-8	Toyo Kagaku Sangyo, Japan
Micro-HPLC	
Micro pro 1000	Eldex, Napa, USA
UV-Detektor GAT PHD 601	GAT, Bremerhaven
UV-“Bubble“-Zelle	Grom, Herrenberg
Rheodyne 8125	Rheodyne, Rohnert Park, USA
A/D Interface	Bischoff, Leonberg
Software McDAC32 V.1.51	Bischoff, Leonberg
Säule: TSK Super ODS 0,3 x 125 mm	Grom, Herrenberg
Säule: Zorbax-Extend 0,3 x 150 mm	Agilent, Waldbronn
Massenspektrometer	
TSQ 700 Triple Quadrupol	Thermo Finnigan, San Jose, USA
Micro-T-Stück	Upchurch, USA
Micro-T-Stück	Valco, Schweiz
Apparatus 22 Spritzenpumpe	Harvard, USA
PicoTips	New Objective, USA
Esquire3000 <sup>Plus</sup> Ionenfalle	Bruker Daltonics, Bremen
Offline NanoES-Quelle	Bruker Daltonics, Bremen
Nano Elektrospraynadeln	BioMedical Instruments, Zöllnitz
pH-Elektrode SenTix 81	WTW, Weilheim
pH-Meter inoLab	WTW, Weilheim
Photometer:	
GeneQuant II	Amersham Biosciences, Freiburg
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Plattenschüttler	Ika Labortechnik, Stauffen
Powersupplies:	
EPS 3500 XL	
EPS 601	Amersham Biosciences, Freiburg
Multidrive XL	
Scanner Sharp JX-330	Sharp, Japan
Thermocycler: Progene	Techne, Dextford-Cambridge, UK
Mastecycler 5330	Eppendorf, Hamburg

Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Transsonic 460/H	Elma, Singen
Ultraschallstab Sonoplus UW 70/GM 70	Bandelin, Berlin
Vakuumentrifuge SpeedVac SC 110	Savant, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Waagen:	
Sartorius MC1	Sartorius, Göttingen
AB 104	Mettler-Toledo, Gießen
Wasserbad, thermostatisierbar	GFL, Burgwedel
Wasserbad, thermostatisierbar	Julabo, Seelbach
Wasseraufbereitung, Milli-Qplus	Millipore, Bedford, USA
Zentrifugen:	
Minizentrifuge	Qualtron Inc., Korea
Avanti <sup>TM</sup> J-25 mit Rotoren JA-17 und JLA-10.500	Beckman, München
Biofuge fresco	Heraeus/Kendro, Hanau
Megafuge 2.0 R	Heraeus/Kendro, Hanau

## 2.7 Software und Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Proteinsequenzen wurden mit Hilfe verschiedener im Internet verfügbaren Programme bzw. Datenbanken durchgeführt. Dabei wurde in erster Linie auf das Prosite Programmpaket ([www.expasy.org/tools/](http://www.expasy.org/tools/)) und die Datenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) zugegriffen.

BioTools	Bruker Daltonics, Bremen
Chromas 2.1.3	Technelysium Pty. Ltd., Australien
GelScan 5.02	BioSciTec, Frankfurt am Main
Excel 2000	Microsoft Corporation, USA
GPMAW 5.0 (General Protein/ Mass Analysis for Windows)	Lighthouse data, Odense, Dänemark

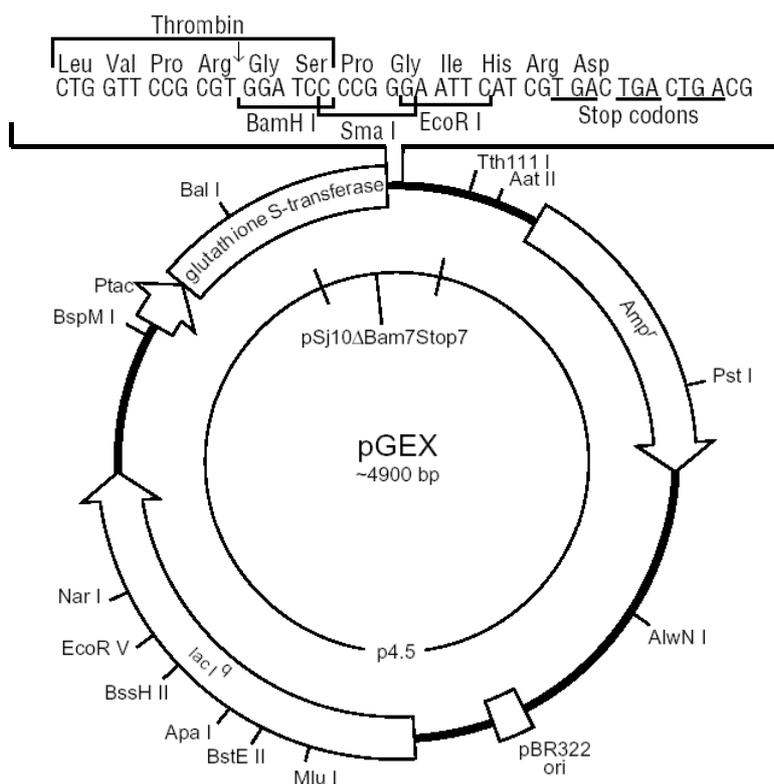
---

MicroBeta™ Trilux Windows Workstation V. 2.7	Perkin-Elmer/Wallac Turku, Finland
Powerpoint 2000	Microsoft Corporation, USA
Picture Publisher 8.0	Micrografx, Unterschleißheim
Reference Manager 10.0	ISI ResearchSoft, USA
Scansoftware ScionImage	Scion Corporation, USA
Word 2000	Microsoft Corporation, USA
DNA-Tools und Datenbanken	<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php">http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a> <a href="http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer">http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer</a> <a href="http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/nph-blast2sgd">http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/nph-blast2sgd</a> <a href="http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html">http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html</a>
Literatur-Datenbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi</a>
Protein-/Peptid-Tools und Datenbanken	<a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a> <a href="http://prospector.ucsf.edu/">http://prospector.ucsf.edu/</a> <a href="http://www.matrixscience.com/">http://www.matrixscience.com/</a>

### 3 Methoden

#### 3.1 Produktion und Reinigung von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* wurde der Expressionsvektor pGEX-2T verwendet. Dieser in Abbildung 3.1 schematisch dargestellte Vektor ermöglicht die Konstruktion einer Fusion mit GST in einer Thrombinschnittstelle und die Expression des konstruierten Fusionsgens in *E. coli* unter der Kontrolle des *tac*-Promotors, der mit IPTG induzierbar ist.



**Abb. 3.1:** Schematische Plasmidkarte des Vektors pGEX-2T. Amp<sup>r</sup>=β-Lactamase, Ptac=IPTG-induzierbarer Tac-Promotor, ori=Replikationsursprung. Weiterhin sind verschiedene Schnittstellen für Restriktionsenzyme, der Leserahmen für die Glutathion-S-Transferase, das Insert mit der Thrombinschnittstelle und der Klonierungsstelle skizziert (aus [133]). Die Gesamtgröße inklusive des Inserts ist 4948 Basenpaare.

Dazu wurden die Expressionsvektoren in den Protease-defizienten *E. coli* BL21, DH5 $\alpha$  oder den BL21 (RIL)-Stamm transformiert. Die Produktion erfolgte entweder aus Glycerinstocks (Bakteriensuspension wurde mit 50% Glycerin bei -80°C gelagert) oder aus frisch transformierten *E. coli*. Zur Reinigung der GST-Fusionsproteine wurde die Vorschrift von Smith [134] bzw. die des Herstellers [133] leicht modifiziert.

### **3.1.1 Transformation der Plasmide in *E. coli*-Stämme**

Für die Aufnahme von Plasmiden in *E. coli*-Zellen wurde die Hitzeschock-Methode verwendet. Zur Anlagerung der DNA wurden 500 ng des Plasmids in 100  $\mu$ L Suspension kompetenter *E. coli* gegeben und 5 sec gevortext. Nach 30 min auf Eis erfolgte ein 2 minütiger Temperaturschock bei 42°C. Die Bakterien wurden kurz auf Eis gekühlt, dann in 1 mL LB-Medium gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 2 min Zentrifugation bei 6500 rpm wurde etwa 90% des Überstandes verworfen und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert. Die Suspension wurde dann auf vorgewärmte LB/Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **3.1.2 Aufzucht der *E. coli***

Für eine Übernacht-Vorkultur wurde aus einer frisch ausgestrichenen LB/Amp-Platte eine Einzelkolonie ausgewählt, in 50 mL LB/Amp-Medium (100 $\mu$ g Ampicillin/mL LB-Medium) suspendiert und über Nacht bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Vorkultur in 1 L LB/Amp-Medium in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit Schikane überführt und für eine weitere Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von IPTG-Lösung mit einer Endkonzentration von 100  $\mu$ M induziert, und die Kulturen wurden für weitere

zwei bis vier Stunden (abhängig vom jeweiligen GST-IRS-1-Fragment, siehe Ergebnisteil) inkubiert.

### **3.1.3 Ernte und Lyse der *E. coli***

Die Bakterien wurden dann durch Zentrifugation (8000 rpm, 5 min, 4°C) pelletiert, der Überstand verworfen und bei RT in 18 mL PBS-PH resuspendiert. Nach Zugabe von 90 mg Lysozym in 2 mL PBS-PH und 10 minütiger Standzeit bei RT wurde 2 mL 10 %ige Triton® X-100 Lösung hinzugegeben. Die Lyse erfolgte durch drei- bis viermaliges Einfrieren in Trockeneis/Ethanol oder in Flüssigstickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 30°C. Danach wurde 20 µL DNaseI zum DNA-Verdau hinzugegeben und 10 min bis maximal 1 h bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Zellfragmente und eventuell vorhandene nicht lysierte Zellen wurden durch 20 minütige Zentrifugation bei 4°C mit 10.000 rpm abgetrennt.

### **3.1.4 Reinigung der GST-Fusionsproteine**

Zum Überstand wurde 1 mL Glutathion-Sepharose (1:1 in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit Proteasehemmern (PBS-PH)) gegeben und bei RT 30 min oder über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand verworfen und die Glutathion-Sepharose auf eine Einmalsäule gegeben. Nicht GST-modifizierte Proteine und niedermolekulare Substanzen wurden durch Spülen mit 10 mL PBS-PH entfernt. Die GST-Fusionsproteine wurden mit 50 mmol Tris/HCl, 10 mmol reduziertem Glutathion, pH 8,0 in Fraktionen zu 1 mL eluiert. Die Reinheitskontrolle erfolgte mit Hilfe eines SDS-Gels.

### 3.1.5 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit einem kolorimetrischen Test nach Bradford bestimmt [135]. Durch die Bindung an das Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G-250® von 465 nm nach 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist in einem bestimmten Bereich ( $\text{Ext.} < 1$ ) linear mit der Proteinkonzentration. Als Eichprotein wurde BSA verwendet. Bei dem verwendeten „Advanced Protein Reagent“ von Cytoskeleton wurden 1 oder 2  $\mu\text{L}$  der Probe direkt in 1 mL des Proteinreagenzes gegeben und nach 5 bis maximal 10 min bei 595 nm gemessen.

### 3.1.6 Lagerung der Fusionsproteine

Nach der Proteinbestimmung wurden die GST-IRS-1-Fusionsproteine aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 3.2 *In vitro*-Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen

### 3.2.1 Herstellung von Liposomen

Um Phosphatidylserin und DOG für eine Enzymreaktion im wässrigen Medium verfügbar zu machen, ist es notwendig diese Substanzen als Liposomen einzusetzen. Unter Liposomen versteht man Lipidvesikel, d.h. ein durch eine bimolekulare Schicht von Lipiden abgegrenztes wässriges Kompartiment [136]. Liposomen bilden sich durch Ultraschallbehandlung der Lipide in wässriger Lösung.

Zur Herstellung der Liposomen wurden immer drei Ansätze parallel durchgeführt, da es häufig vorkam, dass die Herstellung der Liposomen nicht gelang, oder dass Liposomen entstanden, die die Proteinkinasen nur schwach

aktivierten. Ein sehr wichtiger Bestandteil ist das verwendete Phosphatidylserin (PS). Mit dem PS von ICN oder dem lyophilisiert gekauften PS von Sigma konnten keine bzw. nur Liposomen erhalten werden, die die PKC kaum aktivierten. Nur mit dem in Lösung gekauften PS von Sigma wurden Liposomen erhalten, die bei den Phosphorylierungsreaktionen zufriedenstellende Einbauraten lieferten.

Es wurden drei Glasreagenzgläser mit je 4 mL HPLC-Wasser vorgelegt und dazu je 20  $\mu$ L PS (L- $\alpha$ -Phosphatidyl-L-Serin 98 % in Chloroform/Methanol, Sigma) und 40  $\mu$ L DOG (Calbiochem, 1 mg in 400  $\mu$ L Chloroform) gegeben. Die Lipide bilden kleine Tröpfchen und sinken zu Boden. Die Liposomen entstehen durch längeres Beschallen bei maximaler Schallstärke. Dabei wird die Suspension sofort milchig trüb und schlägt nach längerem Beschallen in eine klare opalisierende Lösung um. Die Schallstöße erfolgten 10-15 sec; danach wurden die Proben auf Eis wieder abgekühlt. Gute Liposomen bildeten sich nach 5-15 min. Bei den Proben, die innerhalb kürzerer Zeit klar wurden, hat sich gezeigt, dass mit diesen Liposomen die PKC-Isoenzyme nicht stimuliert werden können. Die Liposomen können im Kühlschrank 7 Tage aufbewahrt werden.

### **3.2.2 Zusammensetzung der Puffer für die Kinase-Assays**

Für die Phosphorylierung der GST-Fragmente von IRS-1 wurde ein modifizierter Assay nach Schächtele [137] verwendet, der im Folgenden näher beschrieben wird. Um die optimalen Bedingungen für jede PKC-Isoform zu erreichen, wurden verschiedene Puffer verwendet. Für PKC-Isoenzyme, die kein Calcium benötigen, also für die neuen PKC-Isoenzyme ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ), wurde Puffer A verwendet, der aus 83,5 mM HEPES-NaOH, pH 7,5; 1,66 mM EDTA; 2,1 mM EGTA und 8,3 mM  $MgCl_2$  bestand.

Puffer D enthielt zusätzlich noch 2,2 mM  $CaCl_2$  und wurde für die PKC-Isoenzyme verwendet, die zur Aktivierung Calcium benötigen, also für die konventionellen PKC-Isoenzyme ( $\alpha$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_2$ ) und die atypischen PKC-Isoenzyme (PKC- $\zeta$ , und  $\iota$  sowie für PKD).

Diese Puffer sind über Wochen im Kühlschrank stabil. Direkt vor der Phosphorylierungsreaktion wurde 10  $\mu\text{L}$  einer DTT-Stammlösung von 167 mM dazugegeben. Da die konventionellen und die neuen PKC-Isoenzyme zur Aktivierung PS und DOG benötigen, wurden zu 760  $\mu\text{L}$  des Puffers noch 240  $\mu\text{L}$  Liposomen gegeben.

Die PKC-Isoenzyme wurden nach dem ersten Auftauen in Portionen zu 320 mU (in der Regel 300-1000 nL) aliquotiert und unmittelbar vor der Verwendung mit 2,5  $\mu\text{L}$  Enzymverdünnungspuffer (500 mM HEPES-NaOH, pH 7,5; 2,5 mg/mL Polyethylenglykol (PEG) 15.000-20.000 und 10 mM DTT) versetzt und mit HPLC-Wasser auf 25  $\mu\text{L}$  aufgefüllt.

### 3.2.3 Durchführung der Assays

Ein Standard-Assay enthielt folgende Komponenten:

30  $\mu\text{L}$  Assaypuffer, 10  $\mu\text{L}$  ( 20 $\mu\text{g}$ ) Substratlösung, 5  $\mu\text{L}$  PKC-Lösung (64 mU) und 5  $\mu\text{L}$  ATP (100  $\mu\text{mol}$ ).

Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten in einem Standard-Assay (50  $\mu\text{L}$ ) betragen somit:

- 50 mM HEPES-NaOH, pH 7,5
- 1 mM EDTA
- 1,25 mM EGTA
- 5 mM  $\text{MgCl}_2$
- \*1,32 mM  $\text{CaCl}_2$
- \*\*Phosphatidylserin (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
- \*\*Diocanoylglycerol (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  )
- 1 mM DTT
- 10  $\mu\text{M}$  ATP
- 20  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1-Fragment
- 64 mU PKC in Enzymverdünnung

\* nur bei konventionellen und atypischen PKC-Isoenzymen

\*\* nur bei konventionellen und neuen PKC-Isoenzymen

HEPES, DTT und PEG 20.000 aus dem Enzymverdünnungspuffer wurden hierbei nicht berücksichtigt. Die Reaktion wurde durch ATP Zugabe gestartet und 90 min bei 30°C mit 800 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert. Abbruch des Assays erfolgte je nach Weiterverwendung mit 0,15 % Trifluoressigsäure, Laemmli-Puffer oder durch Schockgefrieren.

### **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Assay-Aufreinigung, zur Trennung von Zelllysaten und IPs unter denaturierenden Bedingungen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli [138] eingesetzt. Das Prinzip dieser SDS-PAGE beruht auf den unterschiedlichen Ladungszuständen des Glycins im Trenn- und im Sammelgel. Im Sammelgel ist Glycin aufgrund des pH-Wertes (6,8) elektrisch neutral und die durch SDS negativ geladenen Proteinkomplexe bilden die Leitonen und sammeln sich an der Lauffront. Durch das niedrig-prozentige Sammelgel erfahren die Proteine fast keinen Widerstand. Im Trenngel fungiert -wegen des höheren pH-Wertes von 8,8- Glycin, das nun negativ geladen vorliegt, als Leition. Durch die Hydrophobizität von Glycin bildet es keine Komplexe mit SDS. Die Proteine, die als reduzierte, denaturierte und negativ geladene SDS-Komplexe vorliegen, unterscheiden sich nur noch in ihrer Größe und wandern zum Pluspol. Durch den Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix werden die Proteine nach ihrem Stokes-Radius und somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt [139]. Die Gele wurden in einer Gießapparatur zwischen zwei Glasplatten mit den Dimensionen 10 x 10 x 0,1 cm<sup>3</sup> oder 16 x 16 x 0,1 cm<sup>3</sup> gegossen. Präparative Gele hatten die Dimension 20 x 20 x 0,15 cm<sup>3</sup>. Das Trenngel, das etwa 75% des gesamten Gels ausmachte, wurde direkt nach dem Gießen mit 300 µL Butanol/Wasser oder mit einigen mL Trenngelpuffer überschichtet, um eine gerade Oberkante zu bekommen. Nach einer

Polymerisationszeit von mindestens 60 min, wurde das Lösungsmittel abgegossen, die Oberkante des Trenngels mit Trenngelpuffer gespült, mit einem Filterpapier getrocknet und das Sammelgel gegossen. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 3.1 aufgeführt. In der Regel wurden 7,5 %ige Trenngele und 4 %ige Sammelgele verwendet. Die Polymerisation des Polyacrylamids wurde durch APS gestartet und mit TEMED moduliert. Die Proben wurden entweder mit 1 x Laemmli-Puffer im Verhältnis eins zu eins oder bei größeren Volumina und für die IP mit 5 x Laemmli-Puffer fünf zu eins versetzt und 3 min bei 95°C denaturiert. Die Laufbedingungen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

**Tabelle 3.1: Pipettierschema der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele.** Die Geldimensionen waren dabei: Minigel=10 x 10 x 0,1 cm<sup>3</sup>, Midigel=16 x 16 x 0,1 cm<sup>3</sup>, Maxigel=20 x 20 x 0,15 cm<sup>3</sup>.

<b>Trenngel</b>	Minigel	Midigel	Maxigel
Acrylamidlösung 30 %	2,5 mL	10 mL	20 mL
H <sub>2</sub> O	5 mL	20 mL	40 mL
1,5 M Tris pH 8,8, 2 % SDS	2,5 mL	10 mL	20 mL
TEMED	16,5 µL	66 µL	132 µL
APS 10 %	67,5 µL	270 µL	540 µL
<b>Sammelgel</b>			
Acrylamidlösung 30 %	0,45 mL	1,35 mL	2,7 mL
H <sub>2</sub> O	2,35 mL	7,05 mL	14,1 mL
1,5 M Tris pH 8,8, 2 % SDS	0,85 mL	2,55 mL	5,1 mL
TEMED	5 µL	15 µL	30 µL
APS	37,5 µL	112 µL	224 µL

**Tabelle 3.2: Laufbedingungen der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele.**

	Minigel	Midigel	Maxigel	2 Midigele, gekühlt
Probeneintritt	10 mA, 15 min	20 mA, 15 min	25 mA, 15 min	25 mA, 15 min
Trennphase	20 mA, 1 h	50 mA, 2-3 h	75 mA, 3-4 h	200 mA, 2 h

### 3.3.2 Coomassie-Färbung von Proteinen

Proteine werden mit dieser Färbung oberhalb 1 µg/Bande in der Regel gut detektiert. Das untere Detektionslimit liegt bei 200-500 ng Protein, der lineare Färbungsbereich geht bis etwa 15-20 µg [140]. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250® bindet im Sauren durch elektrostatische Wechselwirkung an freie geladene Amino- und Iminogruppen der Proteine. Die Gele müssen nicht fixiert werden, sondern können direkt in Coomassie-Färbelösung unter schwachem Schütteln für mindestens 1 h inkubiert werden. Häufig erfolgte die Färbung über Nacht. Entfärbung wurde mit einer Lösung aus 45 % Methanol/ 45 % Milli-Q Wasser/ 10 % Eisessig durchgeführt.

### 3.3.3 Färbung mit Simply Blue Safe Stain

Bei dieser Färbung handelt es sich um eine sensitivere kolloidale Coomassie-Färbung mit einfachem Protokoll. Das Gel wurde dreimal 5 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend eine bis maximal drei Stunden in Färbelösung inkubiert. Der Hintergrund wurde durch Waschen mit H<sub>2</sub>O entfärbt. Die Zugabe von NaCl-Lösung zu einer Endkonzentration von 4 % (w/v) und weiteres Entfärben von maximal 2 h erhöhte die Intensität und den Kontrast der Banden.

### 3.3.4 Silberfärbung

Die Silberfärbung nach Blum und Shevchenko [141;142] ist um einiges sensitiver als die Coomassie-Färbung. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 500 pg. Sie ist jedoch aufwändiger und zeitintensiver. Sie ist schwieriger zu reproduzieren und zu quantifizieren, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität angefärbt werden [143]. Durch Silberfärbung werden aber auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glycolipide angefärbt.

Das Prinzip der Silberfärbung beruht auf der Komplexbildung von  $\text{Ag}^+$ -Ionen mit den Cys-, Glu- und Asp-Resten der Proteine [144]. Durch Behandlung mit Formaldehyd im Alkalischen wird das  $\text{Ag}^+$  zu Ag reduziert.

Das Gel wurde kurz in Wasser gewaschen und dann mindestens 30 min in einer Lösung aus 50 % Methanol/ 10 % Eisessig fixiert. Zur Entfernung der Säure erfolgte 15 minütige Inkubation in 50 % Methanol/ 1 % Eisessig und danach 5 min in 50 % Methanol. Der Alkohol wurde anschließend durch dreimaliges Spülen von je 5 min mit Wasser entfernt. Sensibilisierung erfolgte durch 90 sec Inkubation in einer Lösung aus 0,2 g/L Natriumthiosulfat. Nach dem Waschen (3 x 30 sec mit  $\text{H}_2\text{O}$ ) wurde das Gel 25 min in einer Lösung aus 0,2 g/L Silbernitrat inkubiert. Nach dreimaligem je 30 sec langen Waschen mit Wasser wurde das Gel bis zu 10 min entwickelt. Die Entwicklerlösung enthielt 6 g/L Natriumcarbonat, 50  $\mu\text{L}/100\text{ mL}$  37 %iges Formaldehyd und 2 mL/100 mL der oben genannten Natriumthiosulfatlösung. Die Entwicklung wurde durch eine Glycinlösung (3 g/100 mL) gestoppt.

### 3.3.5 Autoradiographie

Die Phosphorylierung von Proteinen kann sehr einfach detektiert werden, indem radioaktiv markiertes ATP für die Kinase-Reaktion eingesetzt wird. [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP ist ein  $\beta$ -Strahler, der die Bildung von Silberkeimen auf lichtempfindlichen Filmen bewirkt. Diese Silberkeime werden durch das Einwirken von Entwicklerlösung zu elementarem Silber reduziert, so dass die Proteinbanden als Schwärzung auf dem Film erkennbar werden. Die Filmschwärzung ist nicht in allen Bereichen proportional zur Intensität der radioaktiven Strahlung, da durch das Einwirken hoher Strahlendosen eine Sättigung des Films erreicht werden kann.

Zur Detektion der Phosphoproteine durch Autoradiographie mit präparativen SDS-Gelen wurden die Gele mit 5-10 mL Fixierlösung (45 % Methanol, 45 %  $\text{H}_2\text{O}$ , 10 % Eisessig) in eine Klarsichtfolie eingeschweißt. Um das Schrumpfen des Gels in Fixierlösung und das Quellen in wässriger Lösung zu verhindern,

wurden dazu Gele verwendet, die auf einer Trägerfolie polymerisiert wurden. Die Analyse der radioaktiven Proben erfolgt durch deren Exposition in einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolie auf Hyperfilm MP Filmen. Die Dauer der Belichtung richtete sich nach der Strahlungsintensität der Proben und lag zwischen einigen Stunden und mehreren Tagen. Anschließend wurden die Filme in einem Cronex T5A oder einem Sterling Diagnostic Imaging-System entwickelt und fixiert.

### 3.3.6 Verdau der Proteine aus dem SDS-Gel

Proteine lassen sich nur schwer und in niedrigen Ausbeuten aus einem SDS-Gel eluieren. Da eine Analyse von Phosphorylierungen massenspektrometrisch aus Peptiden erfolgt, können die Proteine direkt aus dem Gel tryptisch gespalten werden. Die GST-IRS-1 Fragmente wurden nach *in vitro*-Phosphorylierung über ein SDS-Gel gereinigt und mit Coomassie gefärbt oder autoradiographisch detektiert. Bei autoradiographisch detektierten Proteinen wurde der Röntgenfilm als Vorlage für das Ausschneiden der Proteine benutzt.

Der Verdau wurde nach modifizierten Vorschriften von Rosenfeld [145], Shevchenko [142] und Immler [146] durchgeführt, wobei v.a. die Puffer so modifiziert wurden, dass eine optimale Probenvorbereitung für eine massenspektrometrische Analyse erfolgte. Die verwendeten Tris-Puffer wurden durch Ammoniumcarbonatpuffer ersetzt. Dadurch mussten die Peptide nicht entsalzt werden und konnten somit direkt massenspektrometrisch untersucht werden.

#### Waschen und Entfärben des Gels

Nach der Autoradiographie bzw. dem Entfärben des Hintergrundes wurde das Gel 2 x gründlich mit Wasser gewaschen. Durch das Waschen werden ATP und PEG aus den Assays und SDS aus der PAGE ausgewaschen. Das Ausschneiden der Gelbanden mit einem Skalpell erfolgte möglichst eng, um das Protein/Gel-Verhältnis so hoch wie möglich zu halten, was sich in guten Ausbeuten und der Reduktion des chemischen Hintergrundes bei der MS niederschlägt [147]. Die

ausgeschnittenen Gelbanden wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und zweimal jeweils 15 min mit 1 mL H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Reaktionsgefäße in einen Thermoschüttler gestellt, wo sie bei RT mit 1400 rpm schüttelten. Die Gelbanden wurden mit einem Skalpell in Würfel von etwa 1 mm<sup>3</sup> zerschnitten, zurück in das Gefäß gegeben und erneut zweimal bei 1400 rpm mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die nächsten beiden Waschschriffe erfolgten mit 100 µL 50 % Acetonitril, wiederum jeweils 15 min bei 1500 rpm. Nach dem Entfernen der Lösung wurden die Gelstücke mit 50-100 µL Acetonitril geschrumpft, das ACN abgenommen und 5 min mit 100 µL 50 mmol NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> rehydratisiert. Nach Zugabe von 100 µL ACN erfolgte erneute 15 min Inkubation unter Schütteln. Nach der Abnahme des Lösungsmittel wurde das Gefäß mit den Gelstückchen bis zum endgültigen Trocknen in die Vakuumzentrifuge gestellt.

#### Reduktion und Alkylierung

Damit das Protein vollständig reduziert vorliegt und somit Trypsin nicht durch Disulfidbrücken an der Proteolyse des Proteins gehindert wird, wurde ein Reduktionsschritt mit DTT durchgeführt. Danach werden die Cysteinreste mit 4-Vinylpyridin modifiziert, wodurch sie nicht nur im reduzierten Zustand bleiben, sondern auch ihre Stabilität erhöhen, und somit besser sequenziert werden können. Die Reduktion erfolgte im Dunkeln unter N<sub>2</sub> als Schutzgas 1 h bei 56°C, 800 rpm in 10 mmol DTT, 50 mmol NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,2. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der Überstand abgenommen und die Gelstücke im Dunkeln unter Schutzgas 30 min bei RT, 800 rpm in 2 % 4-Vinylpyridin, 50 mmol NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,2 inkubiert.

#### Waschen der Gelstücke

Nach der Abnahme des Alkylierungsreagenzes wurden die Gelstücke 3 x 15 min bei 1500 rpm und RT mit 100 µL H<sub>2</sub>O/ACN gewaschen. Danach erfolgte wiederum Abnahme des Lösungsmittels und Schrumpfen mit 100 µL ACN. Nach Zugabe von 100 µL 50 mmol NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> wurde nochmals 15 min geschüttelt und danach in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

### Verdau im Gel

Die Rehydratisierung erfolgte direkt in trypsinhaltigem Verdaupuffer (50 mmol  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 10 % ACN, 1 mmol  $\text{CaCl}_2$ ). Dabei wurde Trypsin so eingesetzt, dass das Verhältnis Substrat/Enzym etwa 50:1 betrug. Da nach Michaelis-Menten die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional der Substratkonzentration ist, wurde das Volumen des Verdaupuffers möglichst gering gewählt. Die Gelwürfel wurden in 50  $\mu\text{L}$  Verdaupuffer, der die benötigte Menge Trypsin enthielt, rehydratisiert und mehrere Minuten bei 300 rpm und  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Waren die Gelstücke nicht vollständig rehydratisiert, so wurde Verdaupuffer ohne Trypsin in 20  $\mu\text{L}$  Portionen dazugegeben, kurz bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, und bei Bedarf erneut zugegeben. Die Zugabe erfolgte solange bis die Gelstückchen rehydratisiert und vollständig mit Puffer bedeckt waren. Der Verdau erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  für 12 h bei 800 rpm.

### Elution der tryptisch gespaltenen Peptide

Nach Verdauende erfolgte nach Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  25 mmol  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung 15 minütige Inkubation bei 1400 rpm auf dem Schüttler und nach Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  ACN nochmals 15 min. Der Überstand wurde mit „Gelloadern“ in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Dabei musste sehr sorgfältig pipettiert werden, so dass keine Gelstückchen ins Eluat gelangten. Es erfolgte 2 x Elution mit 100  $\mu\text{L}$  5 % Ameisensäure/50 % ACN, wobei die Proben jeweils 15 min bei 1500 rpm inkubiert wurden. Es erfolgte eine weitere Elution mit 100  $\mu\text{L}$  5 % Ameisensäure/50 % ACN, wobei diesmal 15 min im Ultraschallbad inkubiert wurde. Die vereinigten Eluate wurden in der Vakuumzentrifuge auf etwa 10  $\mu\text{L}$  eingengt und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **3.3.7 Verdaukontrolle durch HPLC-Trennung**

Die eluierten Peptide wurden in 0,05 % TFA gelöst und maximal 50 pmol über die Eldex Micro-HPLC getrennt. Die Detektion erfolgte bei 214 nm.

Als Säule wurde eine TSK Super ODS 125 x 0,3 mm von der Fa. Grom verwendet, der Fluss betrug 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Als Laufmittel wurde verwendet: System

A: 0,05 % TFA; System B: 80 % ACN, 0,05 % TFA. Die Gradientenelution erfolgte durch 20 % B (20 min), 60 % B (60 min) und 95 % B (80 min).

### 3.3.8 Bestimmung der Phosphat-Einbaurrate im *in vitro*-Assay

GST-IRS-1<sup>N1</sup>, GST-IRS-1<sup>N2</sup>, GST-IRS-1<sup>M</sup> und GST-IRS-1<sup>C</sup> wurden durch die konventionellen PKC-Isoenzyme ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2), die neuen PKC-Isoenzyme ( $\theta$ ,  $\epsilon$  und  $\delta$ ), die atypischen PKC-Isoenzyme ( $\zeta$  und  $\iota$ ) und PKD phosphoryliert. Hierzu wurde folgendes Pipettierschema verwendet: 80  $\mu$ g Substrat, 120  $\mu$ L Puffer, 20  $\mu$ L (256 mU) Enzymlösung und 20  $\mu$ L ATP (100  $\mu$ M). Das ATP wurde mit [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP so eingestellt, dass es 2080 cpm/pMol  $\beta$ -Strahlung emittierte.

Die Assays wurden 90 min im Thermoschüttler bei 30°C und 800 rpm inkubiert und mit 20  $\mu$ L 1 x Laemmli-Puffer beendet. Die Proben wurden in der Vakuumzentrifuge auf 40  $\mu$ L eingeeengt, auf 7,5 % SDS-Gele (Maxigele mit 20 x 20 x 0,15 cm<sup>3</sup>) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Gele wurden 2 h mit Coomassie gefärbt und über Nacht entfärbt. Anschließend wurden die Gelbanden ausgeschnitten, mit 1 mL H<sub>2</sub>O in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und am  $\beta$ -Counter LS 1801 vermessen. Da die emittierte Strahlung nicht durch Szintillationsflüssigkeit stabilisiert und verstärkt wurde, wurden alle Messungen dreimal wiederholt. Zur Kontrolle und zur Bestimmung des Untergrundes wurden 3 Gelblanks mit vermessen.

Nachdem die Banden ausgeschnitten waren, wurde das Gel in eine Klarsichtfolie eingeschweißt, und mit einem Hyperfilm MP in eine Filmkassette eingelegt. Dadurch sollten eventuelle Fehler beim Ausschneiden bzw. ungefärbte phosphorylierte Proteine oder Proteinfragmente erkannt werden.

### 3.3.9 Erstellen der Cerenkov-Pattern der GST-IRS-1-Fragmente

Die Assays wurden wie in 3.3.8 beschrieben durchgeführt. 200 µg GST-IRS-1<sup>N1</sup>, GST-IRS-1<sup>N2</sup>, GST-IRS-1<sup>M</sup> und GST-IRS-1<sup>C</sup> wurden durch die konventionellen PKC-Isoenzyme ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2), die neuen PKC-Isoenzyme  $\theta$  und  $\delta$ , und die atypische PKC- $\zeta$  phosphoryliert. Hierzu wurde folgendes Pipettierschema verwendet: 200 µg Substrat, 300 µL Puffer, 50 µL (640 mU) Enzymlösung und 50 µL ATP (100 µM). Das ATP wurde mit [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP so eingestellt, dass es 2080 cpm/pMol  $\beta$ -Strahlung emittierte.

Die Assays wurden 90 min im Thermoschüttler bei 30°C und 800 rpm inkubiert und mit 50 µL 1 x Laemmli-Puffer beendet. Die Proben wurden auf 100 µL eingengt, auf 7,5 % SDS-Gele (Maxigele mit 20 x 20 x 0,15 cm<sup>3</sup>) aufgetragen und wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben elektrophoretisch getrennt. Da das Probenvolumen und bzw. die Proteinmenge für eine Geltasche zu groß ist, wurden die Stege zwischen jeweils 4 Geltaschen entfernt, so dass große Taschen entstanden. Die Gele wurden 2 h mit Coomassie gefärbt und über Nacht entfärbt. Anschließend wurden die Gelbanden ausgeschnitten und wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben, verdaut. Die fast trockenen Eluate wurden in 50 µL 0,05 % TFA aufgenommen, über die Shimadzu-HPLC getrennt und in 1 min (100 µL) Schritten in „Isoplates“ fraktioniert. Als Säule wurde eine  $\mu$ RPC C2/C18 2,1 x 100 mm von Amersham Biosciences verwendet, die Proben wurden über ein Rheodyne 8125 aufgetragen und mit einem Fluss von 100 µL/min getrennt. Als Laufmittel wurde verwendet: System A: 0,05 % TFA; System B: 80 % ACN, 0,05 % TFA. Da der Auftrag meist zweimal erfolgte, blieb der Gradient von 0–10 min bei 0 % B. Die Gradientenelution erfolgte durch 10 % B (20 min), 40 % B (60 min) und 100 % B (90 min). In den nächsten 6 min ging der Gradient auf 0 % B zurück. Die Platten wurden mit einem „Resealable tape“ verschlossen und im  $\beta$ -Counter Trilux 1450 MicroBeta<sup>TM</sup> Plus vermessen. Die erhaltenen Daten wurden in Excel exportiert und ausgewertet.

### 3.3.10 LC-MS-Kontrolle der Phosphorylierungsreaktion

Zur Überprüfung der Aktivierung der PKC-Isoenzyme, wurde ein System entwickelt, durch das die Phosphorylierung durch ein Modellpeptid kontrolliert werden konnte. Dazu wurde das „myristoylated alanine-rich C-kinase substrate“ (MARCKS) PSD-Peptid als Substrat ausgewählt. MARCKS PSD-Peptid ist ein synthetisches Peptid, das die Aminosäurenreste 154-165 des „myristoylated alanine-rich C kinase substrate“, einem natürlichen Substrat vieler Proteinkinasen, enthält [148-151]. Das Peptid enthält zwei der vier Serinreste in der PSD („phosphorylation site domain“) von MARCKS und hat die Sequenz H-Lys-Lys-Arg-Phe-Ser-Phe-Lys-Lys-Ser-Phe-Lys-Leu-OH mit einem Molekulargewicht von 1542,9 Da. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass es *in vitro* durch die klassischen und neuen PKC-Isoenzyme an beiden Serinresten phosphoryliert wird, durch die atypische PKC- $\iota$  jedoch nur an Ser<sup>9</sup> mit verminderter Phosphorylierungsgeschwindigkeit [131]. Jeweils 7,5  $\mu$ g des Peptids wurden mit der jeweiligen PKC-Isoform phosphoryliert und nach dem Assay, der 30 min durchgeführt wurde, mit TFA bis zu einer Endkonzentration von 0,05 % angesäuert. Über ein Rheodyne 8125 wurde die Probe direkt auf eine TSK Super ODS 0,3 x 125 mm injiziert, die an die HPLC-Pumpe Eldex MicroPro angeschlossen war. Der Fluss betrug 5  $\mu$ L/min. Als Laufmittel A wurde 0,05 % TFA und als Laufmittel B 0,05 % TFA in 80 % ACN verwendet. Für die Elution wurde ein Gradient von 5 auf 95 % B innerhalb von 40 min verwendet. Die Analyse der Proben erfolgte am ESI Triple Quadrupol-MS TSQ700 im Positivionen-Modus analysiert.

### 3.3.11 Detektion von Phosphopeptiden durch alkalische Negativionen $\mu$ LC/ES-API-CID-MS-Hybrid Scan Technik

Verglichen mit den bekannten API („atmospheric pressure ionization“)-CID („collision-induced dissociation“)-Techniken wird die Ionisierung der Phospho-

peptide durch alkalische Bedingungen verbessert [152], wodurch Phosphopeptide leichter detektierbar sind [153;154]. Bei der von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Methode zur Erzeugung der phosphospezifischen Markerionen ( $[\text{PO}_3^-]$  mit  $m/z$  79, bzw.  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$  mit  $m/z$  97) wurde am Quadrupol-MS im negativen Ionenmodus im Skimmerbereich ein hohes Potential (140 V) angelegt und dabei im dritten Quadrupol 0,2 sec über den Bereich von  $m/z$  75-100 gescannt. Zur Bestimmung der Molekülionen wurde im dritten Quadrupol bei niedrigem Potential (10 V) für 2 sec über den Bereich  $m/z$  450-1500 gescannt.

GST-IRS-1<sup>N2</sup> wurde phosphoryliert, über SDS-PAGE getrennt, tryptisch im Gel verdaut und mit einer Eldex Micro Pro HPLC-Pumpe über eine Zorbax-Extend-Säule mit einem Fluss von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  getrennt. Als Laufmittel A wurde mit  $\text{NH}_3$  auf pH 10,3 eingestelltes Wasser und als Laufmittel B 80 % ACN in  $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ , pH 10,3 verwendet. Die Proben wurden durch einen Gradienten getrennt, der von 3 % B bis auf 60 % B innerhalb von 10-130 min anstieg.

Die Probe wurde in 2  $\mu\text{L}$  System A gelöst und über ein Injektionsventil Rheodyne 8125 mit einer 5  $\mu\text{L}$  Injektionsschleife direkt auf die Säule injiziert. Dem HPLC-Eluenten wurde über ein Mikro-T-Stück Methanol mit einem Fluss von 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  dazugemischt („sheath-flow“), um stabile Spraybedingungen zu erhalten. Durch ein zweites T-Stück wurde der Eluent aufgetrennt, so dass 4  $\mu\text{L}$  manuell fraktioniert und die restlichen 2  $\mu\text{L}$  direkt über ein 30  $\mu\text{m}$  PicoTip in das ESI Triple Quadrupol-MS infundierten.

### **3.3.12 Sequenzierung von Phosphopeptiden durch offline Nanospray-Ionenfallenanalyse**

Die durch alkalische Negativionen  $\mu\text{LC}/\text{ES}$ -API-CID-MS-Hybrid-Scan-Technik detektierten Phosphopeptide wurden in der Vakuumzentrifuge eingeengt, in 3  $\mu\text{L}$  Methanol/Wasser 1:1 (v/v), 1 % Ameisensäure gelöst und mit Nano-Elektrospraynadeln über eine Offline NanoES-Quelle in die Esquire3000<sup>Plus</sup> Ionenfalle appliziert. Zuerst wurde ein Übersichtsspektrum im Negativmodus bei 650 V aufgenommen, dann wurde in den Positivmodus umgeschaltet (-750 V) um die

MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>-Spektren aufzunehmen. Im MS<sup>2</sup>-Modus wurde das dreifach geladene Molekölion in der Ionenfalle isoliert und fragmentiert. Durch die  $\beta$ -Eliminierung von H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> wurde ein intensives [M+3H-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>]<sup>3+</sup>-Neutralverlust-Fragmentation gebildet, das zum isolierten Elternion einen Abstand von 98/3 Da hatte. Dieses Fragmentation wurde in der Ionenfalle isoliert und erneut fragmentiert (MS<sup>3</sup>) [153;155]. Über das entstandene Produktionenspektrum gelang die Sequenzierung der Phosphopeptide. Phosphorylierte Serinreste können durch das durch Gasphasendephosphorylierung entstandene Dehydroalanin (69 Da) identifiziert werden [156].

## 3.4 Immunologische Methoden

### 3.4.1 Immunpräzipitation

Nach der Lyse (siehe Kapitel 3.5.5) wurde der Proteingehalt der Lysate bestimmt und 750  $\mu$ g (zwischen 100 und 200  $\mu$ L) in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anhand von Vorversuchen wurden die optimalen Mengen an Antikörper und Protein G- bzw. A-Sepharose bestimmt. Bei der Durchführung von IPs mit dem Antikörper gegen IRS-1 sc-560 wurde 4  $\mu$ g (=4  $\mu$ L) Antikörper und 20  $\mu$ L Protein A-Sepharose (1:1 mit Sepharose versetzt) eingesetzt. Bei der Verwendung des Antikörpers gegen IRS-1 12H8 wurde 3  $\mu$ g Antikörper und 30  $\mu$ L Protein G-Sepharose eingesetzt, da dieser Antikörper ein Immunglobulin der Klasse IgG1 ist. Diese Antikörper binden besser an Protein G-Sepharose, wohingegen die Antikörper der Klasse IgG2, wie z.B. anti-IRS-1 sc-560, sowohl an Protein A-, als auch an Protein G-Sepharose gut binden.

Die Proben wurden zusammen mit dem Antikörper über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach Zugabe von Protein A- bzw. Protein G-Sepharose erfolgte erneute Inkubation bei 4°C auf dem Drehrad. Durch die kovalente Fixierung von Protein A bzw. Protein G an die Sepharose gelingt es durch einfache Zentrifugation das Protein zu fällen, gegen das der Antikörper gerichtet

ist. Nach 4 h wurden die IPs bei 4°C mit 500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und 5 x mit 250 µL „Mads“ Lysepuffer gewaschen. Dazu wurden die IPs ständig auf Eis gehalten. Zum Waschen wurde der Überstand nach der Zentrifugation abgesaugt, durch neuen Puffer ersetzt und gründlich gemischt. Danach wurde kurz zentrifugiert und der Waschvorgang viermal wiederholt.

Nach dem letzten Waschgang wurde das Pellet in 30 µL 5 x Laemmli-Puffer aufgenommen. Im Pellet liegt das gewünschte Protein folgendermaßen vor: Der gegen das Protein gerichtete Antikörper bindet an das Protein. Protein A bzw. Protein G bindet an den Antikörper und da es mit Sepharose kovalent fixiert ist, wird dadurch das Protein fällbar.

Kurz vor dem Gellauf wurden die IPs 3 min aufgekocht, wodurch der Komplex in die einzelnen Komponenten zerlegt wird. Nach dem Abkühlen wurde mit einer abgeschnittenen 100 µL Pipettenspitze das gesamte Gemisch auf das Gel aufgetragen. Dazu war es sehr wichtig, dass die Geltaschen sorgfältig von allen Acrylamidresten gereinigt wurden, da die Proben in die Taschen hineinlaufen mussten.

### **3.4.2 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen (Westernblot)**

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Zelllysate oder IPs wurden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Bei der sogenannten „semidry“-Methode liegen Gel und Membran zwischen puffergetränkten Filterpapieren. Der Ausdruck „semidry“ kommt daher, dass der Aufbau selbst nicht von Puffer umgeben und somit trocken ist. Die Spannung wird durch zwei außen angelegte Elektrodenplatten erzeugt. Da die Proteine durch das gebundene SDS negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld Richtung der anodisch angeordneten Membran.

Das mit Blot-Puffer angefeuchtete, jedoch nicht nasse Filterpapier wurde auf die Anode aufgelegt. Darüber kam die in Blot-Puffer getränkte Membran und darüber das mit Wasser gewaschene Gel. Zum Abschluss kam auf die

Kathodenseite nochmals ein mit Blot-Puffer angefeuchtetes Filterpapier. Zum Entfernen von Luftblasen wurde mit einer 10 mL Plastikpipette mehrfach von innen nach außen gerollt. Nach Entfernen der ausgetretenen Flüssigkeit mit Filterpapier wurde die Kathode aufgelegt und befestigt. Die angelegte Stromstärke berechnete sich aus der Gelfläche x 0,8 in mA. Da IRS-1 ein relativ großes Protein ist, wurde 2 h lang geblottet.

### **3.4.3 Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen mit Ponceau S®**

Bei dieser Methode [157] handelt es sich um eine relativ unempfindliche (Nachweisgrenze 250-500 ng Protein pro Bande), jedoch reversible Anfärbung der meisten Proteine auf der Blotmembran. Nach 3-5 min Inkubation in der Färbelösung ist die gesamte Membran rot gefärbt. Durch Waschen mit Wasser wird der Hintergrund entfärbt, die Proteine bleiben rötlich gefärbt. Das Entfärben der Proteine geschieht durch mehrmaliges Waschen mit NET“G“. Diese Methode wurde verwendet, um die Effizienz des Proteintransfers auf die Membran zu untersuchen.

### **3.4.4 Detektion der Proteine durch Antikörper**

Die auf der Membran durch den Blotvorgang immobilisierten Proteine können durch spezifische Immunreaktionen nachgewiesen werden. Dazu wurde die Membran vollständig entfärbt und nochmals dreimal 15 min mit 20 mL NET“G“ geblockt, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Membran mit verdünnter Antikörperlösung (1:10.000 bis 1:500 in NET“G“) in einer Folie eingeschweißt und über Nacht auf einer Wippe bei 4°C oder in seltenen Fällen auch 1 h bei RT inkubiert. Der erste Antikörper bindet spezifisch an das Protein gegen das er gerichtet ist. Nach dem Entfernen der Antikörperlösung wurde die Membran wiederum dreimal 15 min mit NET“G“ gewaschen. Danach erfolgte

Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Dazu wurde die Membran in einer Polypropylenschale vollständig mit NET“G“ bedeckt, der Antikörper dazu pipettiert und 45-60 min auf einer Wippe bei RT inkubiert. Der Zweitantikörper gegen Kaninchen wurde 1:10.000 bis 1:20.000, der gegen Maus 1:3000, der gegen Ziege 1:2500 verdünnt. Danach wurde viermal 15 min mit Net“G“ geblockt.

Der zweite Antikörper erkennt das Fc-Fragment des ersten Antikörpers und wird als HRP-Konjugat eingesetzt. Die Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion, wobei aus  $H_2O_2$  Radikale gebildet werden, die in Luminol Elektronen anregen. Beim Zurückkehren in den Ausgangszustand wird die freiwerdende Energie als Licht emittiert, das auf einem Röntgenfilm zur Schwärzung führt.

Zur Entwicklung des Blots wurde das „Enhanced Chemiluminescence-System“ (ECL) verwendet. Die Membran wurde 3-5 min in einer 1:1 (v/v)-Lösung der ECL-Lösungen A und B inkubiert und danach zwischen zwei Kopierfolien in eine Filmkassette gelegt. Unter Rotlicht wurde ein ECL-Film aufgelegt. Da das Signal von vielfältigen Parametern, wie z.B. der Gelbeladung und den verwendeten Antikörpern abhängt, kann es sehr unterschiedlich ausfallen und deswegen wurde idR der erste Film 3 sec, und der zweite Film 30 sec aufgelegt. Je nach Signalintensität wurden weitere Filme belichtet. Anschließend wurden die Filme in einem Cronex T5A oder einem Sterling Diagnostic Imaging-System entwickelt und fixiert.

### **3.4.5 Entfernen („Strippen“) von Antikörpern von Nitrocellulose-Membranen**

In der Regel wurde ein Immunblot zur Untersuchung der Proteinmodifikation (z.B. Phosphorylierung an Tyr oder Ser) durchgeführt. Zur Kontrolle auf die Proteinmenge ist es notwendig, dieselbe Membran nochmals mit einem Antikörper gegen das Protein zu inkubieren. Da die geblohteten Proteine kovalent und somit stabil an der Membran fixiert sind, können die gebundenen Antikörper

entfernt und eine weitere Immundetektion mit einem anderen Antikörper durchgeführt werden. Zur Ablösung der Antikörper wurde die Membran in „Stripping“-Puffer (siehe 2.3.9) 30 min bei 55°C in einer Polypropylenschale inkubiert. Nach dem Abkühlen auf RT und dem Entfernen des Puffers wurde die Membran mehrfach mit NET“G“ gewaschen und wie ein Primärblot weiterbearbeitet.

## **3.5 Molekularbiologische Methoden**

### **3.5.1 Zellkultivierung**

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer „Cleanbench“ durchgeführt. Ein Kryoröhrchen mit  $5 \times 10^6$  Zellen in Kryomedium (20 % FCS; 10 % DMSO in DMEM; 4,5 g/L Glc) gelagert in Flüssigstickstoff, wurde in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Falcon-Röhrchen überführt und -aufgrund der osmotischen Eigenschaften des DMSO- tropfenweise und unter vorsichtigem Umschwenken mit 5 mL Medium versetzt. Nach 5 min Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in Standardmedium aufgenommen.

Die Zellen wurden in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 12 mL BHK-Standardmedium (440 mL DMEM; 4,5 g/L Glucose; 50 mL FCS; 5 mL PenStrep; 5 mL 200 mmol Gln) kultiviert. Dies erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre (etwa 98 % Luftfeuchtigkeit) bei 37°C unter Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank.

### **3.5.2 Aufteilen („splitten“) der Zellen**

Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage 1:10 bis 1:20 „gesplittet“. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen und zum Ablösen 3 min mit 5 mL Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe

von 5 mL Medium. Nach dem Überführen in ein steriles 50 mL Falcon-Röhrchen wurden die Zellen bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und in neuem Medium suspendiert. Für die Experimente wurden die Zellen gezählt und in 6-Loch Platten mit jeweils  $4 \times 10^5$  Zellen in 2 mL Medium ausgesät.

### 3.5.3 Bestimmung der Zellzahl

Von der Zellsuspension wurden 50  $\mu\text{L}$  mit 450  $\mu\text{L}$  Trypanblau versetzt und vorsichtig gevortext. Von dieser Suspension wurden 20  $\mu\text{L}$  in einer Neubauer Zählkammer mit vier 16er Quadraten ausgezählt. Die Zellzahl pro mL wurde durch die Multiplikation des Mittelwertes mit dem kammerspezifischen Faktor  $10^5$  erhalten.

### 3.5.4 Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode zur Einschleusung von DNA in Eukaryontenzellen. Zur Einschleusung wird ein Vektor benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurde pRK5 als Vektor verwendet. Die Zellen wurden am Vortag in 6-Loch-Platten mit einer Zelldichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in 2 mL Medium ausgesät.

#### Transiente Transfektion durch Calciumphosphat Copräzipitation

Bei dieser Methode [158] wird die DNA mit  $\text{CaCl}_2$  gemischt. Nach Zugabe des BBS-Puffers fällt schwerlösliches Calciumphosphat aus. Auch die phosphathaltige DNA wird dabei präzipitiert. Durch Endozytose wird die DNA zusammen mit dem Calciumphosphat in das Cytoplasma aufgenommen und in den Zellkern transportiert. Der genaue Mechanismus ist noch nicht exakt erforscht.

Für 3 Vertiefungen wurden in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß 300  $\mu\text{L}$  0,25 M  $\text{CaCl}_2$  vorgelegt. Dazu wurden insgesamt 13  $\mu\text{g}$  DNA gegeben, die in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  vorlag. Bei der Cotransfektion von zwei verschiedenen DNA

wurde von jeder DNA 6,5 µg eingesetzt. Die Lösung wurde gevortext und kurz abzentrifugiert. Nach Zugabe von 310 µL 2 x BBS wurde die Lösung 20 sec durch Fingerschnippen gemischt. Nach 15 min Standzeit wurde in jede Vertiefung tropfenweise 200 µL des Gemisches gegeben. Bei der Transfektion mehrerer Plasmide, wie z.B. IRS-1 zusammen mit PKC wurden in den Kontrollen anstatt der PKC der eukaryontische Expressionsvektor pcDNA3 cotransfiziert.

#### Transiente Transfektion mit der „FuGENE 6“-Methode

FuGENE 6 ist ein lipophiles Reagenz, mit dem die DNA gemeinsam von der Zelle aufgenommen wird. Durch eine verbesserte Transfektionseffizienz kann bei dieser Methode weniger DNA eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Vergleich der Transfektionseffizienz mehrfach durchgeführt.

Für drei Vertiefungen wurde 300 µL serumfreies DMEM mit 4,5 g/L Glucose vorgelegt. Nach der Zugabe von 9 µL FuGENE 6 wurde sanft gevortext und insgesamt 6 µg DNA zugegeben. Nach erneutem sanften vortexen wurde nach 15 min Standzeit in jede Vertiefung 100 µL des Gemisches gegeben.

### **3.5.5 Stimulation und Lyse der Zellen**

16-24 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Dabei wurde das Standardmedium durch serumfreies Medium, mit 1 g/L Glucose ersetzt. Nach wiederum 24 Stunden wurden die Zellen stimuliert und lysiert. Die Stimulation erfolgte entweder mit 100 nM Insulin oder mit 100 nM Insulin nach Vorstimulation mit 0,5 µM 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA).

Die Stimulantien wurden in den 6-Loch-Platten so zugegeben, so dass alle Vertiefungen gleichzeitig lysiert werden konnten. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 200 µL „Mads“-Lysepuffer versetzt. Die Lyse erfolgte auf Eis. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Proteinbestimmung wurden 1-2 µL des Lysates

verwendet. Zur Transfektionskontrolle wurde 20 µg Gesamtprotein (4-5 µL) mit 10 µL 1 x Laemmli-Puffer versetzt, mit H<sub>2</sub>O auf 20 µL aufgefüllt, 3 min gekocht und gelelektrophoretisch analysiert.

### **3.5.6 Statistische Auswertung**

ECL-Filme wurden mit 200 dpi eingescannt und mit Hilfe der Software GelScan densitometrisch vermessen. Nach Abzug des Gel-Hintergrunds wurden die Werte in Excel exportiert. Die Werte wurden als Mittelwerte ± SEM ausgewertet, für den Vergleich der Mittelwerte wurde der ungepaarte Studentische t-Test („Student´s-Two-Tailed t-Test“) verwendet. Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet und in den jeweiligen Abbildungen durch die Symbole \*,# und Δ gekennzeichnet.

## **3.6 Standard DNA-Methoden**

### **3.6.1 Analytische Plasmidreinigung, MiniPrep**

Ein einzelner Klon wurde ausgewählt und in einem Reagenzglas in 2 mL LB/Amp-Medium überführt. Die Probe wurde über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µL Puffer (100 µg/mL RnaseA; 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM KCl) resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte auf Eis durch Zugabe von 100 µL 0,2 M NaOH/ 2 % SDS für 5 min. Nach der Zugabe von 75 µL 3 M Kaliumacetatlösung zur Neutralisation wurde kräftig geschüttelt und das Präzipitat aus chromosomaler DNA, Zellfragmenten, Proteinen und SDS wurde 10 min bei 4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert. Zu 200 µL des Überstands wurde 200 µL Isopropanol gegeben, gevortext und danach 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde mit 200 µL eiskaltem 70 %igen

Ethanol gewaschen, 3 min zentrifugiert, der Alkohol abgeblasen und in 20  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Von dieser Präparation wurden 3  $\mu\text{L}$  mit 7  $\mu\text{L}$  Verdaumix (13  $\mu\text{L}$  Puffer; 2  $\mu\text{L}$  Restriktionsenzym; 78  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ ) unter Standardbedingungen verdaut und über ein Agarosegel analysiert.

### **3.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA, „MaxiPrep“**

Zur Präparation großer Mengen an Plasmid-DNA mit großem Reinheitsgrad zur Transfektion wurde das Plasmid Maxi Kit von Quiagen verwendet. Hierzu wurde eine Einzelkultur in 100 mL Medium über Nacht in einem 1 L Erlenmeyerkolben auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf zwei 50 mL Falcon-Röhrchen verteilt und durch 10 min Zentrifugation bei 4000 rpm pelletiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers [159]. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die DNA in 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Die Kontrolle der Reinheit erfolgte durch Restriktionsverdau (Kapitel 3.6.4) und anschließender Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.6.5) oder durch Sequenzierung (Kapitel 3.6.6).

### **3.6.3 Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA**

Die Plasmid-DNA wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  1:100 bis 1:50 verdünnt und in einer Quarz-Mikroküvette in einem UV-Photometer GeneQuant bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doppelsträngiger DNA. Gleichzeitig wurde das OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Verhältnis bestimmt, um das Protein/DNA-Verhältnis zu abzuschätzen. Ab einem Verhältnis von 1,8 gilt die DNA als frei von Proteinverunreinigungen [160]. Präparationen mit einem Verhältnis <1,6 wurden verworfen.

### 3.6.4 Restriktionsanalyse der Plasmide

Zuerst wurde die DNA-Sequenz in einer Genbank (z.B.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) gesucht und anschließend mit dem „NEBcutter“ mit allen Restriktionsenzymen theoretisch verdaut (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Anhand der Resultate wurden Restriktionsenzyme ausgewählt, die nur einmal die Plasmid-DNA schneiden. Für einen gleichzeitigen Verdau mit zwei Enzymen wurden sie so ausgewählt, dass sie in dem Puffersystem möglichst 100 % ihrer Aktivität zeigten. Dabei wurden die Angaben der Enzymhersteller verwendet.

#### Standardansatz für 1 Gelbahn:

1  $\mu\text{L}$  (=1  $\mu\text{g}$ ) Plasmid wurde mit 1  $\mu\text{L}$  10 x Puffer und 1  $\mu\text{L}$  Restriktionsenzym(e) mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 10  $\mu\text{L}$  aufgefüllt und 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Der Abbruch erfolgte mit 2  $\mu\text{L}$  Probenpuffer.

IRS-1 wurde mit BamHI/XhoI, PKC- $\zeta$  mit HINDIII/SALI und PKC- $\delta$  mit SACL, PVUII oder StuI verdaut.

### 3.6.5 Agarose Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der verdauten Plasmid-DNA wurden horizontale 1%-ige TAE-Agarosegele mit 5  $\mu\text{L}$  Ethidiumbromidlösung (10 mg/mL) pro 100 mL Agarose in TAE-Puffer mit 1 x TAE als Laufpuffer verwendet.

Die mit 2  $\mu\text{L}$  Probenpuffer versetzten Proben und 6  $\mu\text{L}$  DNA-Längenstandard X wurden für 1 bis 1,5 h bei 80V aufgetrennt. Über das interkalierende Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und über eine Gelauswerteeinheit dokumentiert werden.

### 3.6.6 Kontrollsequenzierung der Plasmid-DNA

Transfektion der Zellen erfolgte durch Plasmid-DNA, die in den Vektor pRK5 ligiert wurden (IRS-1 S<sup>318</sup>, IRS-1 A<sup>318</sup>, PKC- $\delta$  und PKC- $\zeta$ ). Die Kontrollsequenzierung dieser Plasmide erfolgte nach der modifizierten Kettenabbruchmethode des „Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing“ [161-163]. Zuerst wird eine Polymerisation durchgeführt, bei der sowohl die zur Elongation des DNA-Stranges notwendigen Desoxynukleotide (dNTPs), als auch in geringerer Menge Didesoxynukleotide (ddNTPs) zugesetzt werden. Nach Einbau der ddNTPs kommt es zu Kettenabbrüchen, da keine 3'-Hydroxylgruppe mehr für die weitere Polymerisation zur Verfügung steht. Man erhält DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die anschließend kapillarelektrophoretisch aufgetrennt wurden. Da die verschiedenen ddNTPs durch unterschiedlich fluoreszierende Gruppen modifiziert sind, können sie durch fluorimetrische Detektion analysiert werden. Aus der Migrationsgeschwindigkeit der unterschiedlichen DNA-Fragmente wird die Sequenz bestimmt.

Für die Polymerasereaktion wurden folgende Ansätze gewählt:

500 ng Plasmid, 4  $\mu$ L Premix und 10 pmol Primer (siehe Tabelle 3.3) wurden mit H<sub>2</sub>O auf 10  $\mu$ L aufgefüllt. Der Premix (ABI PRISM® BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit) enthält die dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), fluoreszenzmarkierte ddNTPs, die thermostabile AmpliTaq® DNA Polymerase, eine thermostabile Pyrophosphatase und Magnesiumchlorid in Tris-Puffer mit pH 9,0.

Ein Standardansatz durchlief folgende Schritte: Segment 1 (1 Zyklus): Denaturierungsschritt: 2 min bei 96 °C; Segment 2 (30 Zyklen): Denaturierungsschritt: 10 sec bei 96 °C, Annealingschritt: 10 sec bei 55°C und Elongationsschritt: 3 min bei 72°C.

Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden anschließend über CENTRI-SEP-Säulen nach Herstellerangaben gereinigt. Danach wurden 4  $\mu$ L mit 16  $\mu$ L HPLC-Wasser versetzt und kapillarelektrophoretisch in einem ABI-PRISM 310 Gene

analyzer getrennt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Abi Prism-Software „Sequencing analysis 3.7“. Der Sequenzvergleich wurde über das Internet mit BLAST durchgeführt, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> frei zur Verfügung steht.

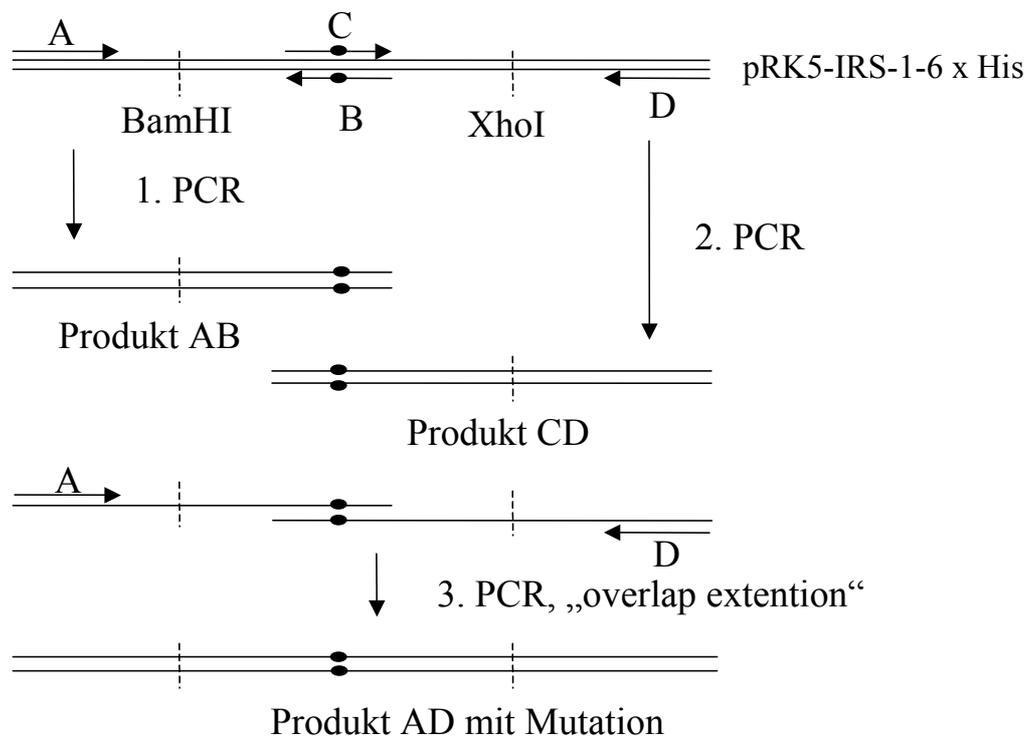
**Tabelle 3.3: Primer, die für die Kontrollsequenzierungen der Plasmid-DNA verwendet wurden.**

Plasmid	Primer	Herst.	Sequenz
pRK5-PKC- $\delta$	pRK5'PCR 5' $\rightarrow$ 3'	Gibco	TTG CCT TTC CCA CAG GTG
pRK5-PKC- $\delta$	pRKrev2 3' $\rightarrow$ 5'	Gibco	GCC TGG GGA CTT TCC ACA CCC
pRK5-PKC- $\zeta$	pRK5'PCR 5' $\rightarrow$ 3'	Gibco	TTG CCT TTC CCA CAG GTG
pRK5-PKC- $\zeta$	pRKrev2 3' $\rightarrow$ 5'	Gibco	GCC TGG GGA CTT TCC ACA CCC
pRK5-IRS-1 S <sup>318</sup>	IRS-1 ala 295 5' $\rightarrow$ 3'	Gibco	CCG CCC AGC CAA VTG GCT CGG AGA TCT CGA ACT GAG AGC
pRK5-IRS-1 A <sup>318</sup>	IRS-1 ala 295 5' $\rightarrow$ 3'	Gibco	CCG CCC AGC CAA VTG GCT CGG AGA TCT CGA ACT GAG AGC

### 3.6.7 „Overlap extension“ PCR Mutagenese

Zur Mutation von Serin<sup>318</sup> zu Alanin<sup>318</sup> im GST-IRS-1<sup>N2</sup>-Fragment und im Gesamt-IRS-1 wurde die „Overlap extension“ PCR nach Ho [164] nach einem Protokoll von Horton durchgeführt [165]. Dazu wurden zwei Primer entgegengesetzter Richtung verwendet, welche die gewünschte Mutation enthielten. Mit Hilfe jeweils eines dieser Primer und zweier weiterer Flankenprimer wurden in den ersten beiden PCR-Reaktionen zwei überlappende DNA-Fragmente mit der Mutation amplifiziert. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit den beiden Flankenprimern einer dritten PCR unterzogen, der eigentlichen „overlap extension“ PCR, wodurch das gewünschte, vollständige und mutierte DNA-Fragment amplifiziert wurde (Abbildung 3.2). Nach der Reinigung wurde das

Produkt IRS-1<sup>N2</sup> A<sup>318</sup> in den Expressionsvektor pGEX-2T, das Produkt Gesamt-IRS-1 A<sup>318</sup> in den Vektor pRK5-IRS-1-6 x His ligiert.



**Abb. 3.2:** „Overlap extension“-PCR Mutagenese von IRS-1 S<sup>318</sup> zu IRS-1 A<sup>318</sup>. Die Mutation (schwarzer Punkt) wird in die Sequenz AD über die Primer C und B (enthalten die Mutation) eingebaut. Aus der ersten und zweiten PCR entstehen 2 überlappende Produkte, die jeweils die Mutation enthalten. Aus diesen Produkten entsteht in der dritten PCR mit Hilfe der Primer A und D das mutierte Produkt AD.

### Erste Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion nach Saiki und Mullis [166-168] verwendet. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur enzymatischen, selektiven Vermehrung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge mit bekannter Teilsequenz. Als Template wurde die Wildtyp-DNA im Vektor pRK5 verwendet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.4 angegeben.

2  $\mu\text{L}$  (=200 ng) Template-DNA (pRK5-IRS-1-6 x His) wurde mit 1  $\mu\text{L}$  (=100 pMol) Flanken-Primer (pRK5'PCR), 1  $\mu\text{L}$  (=100 pMol) Mutagenese-Primer (ala 318/4), 4  $\mu\text{L}$  (2,5 mMol) dNTPs, 5  $\mu\text{L}$  Puffer (10 x komplett), 2,5  $\mu\text{L}$  (=2,5 U)

PWO-Polymerase und 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  den in Tabelle 3.5 aufgeführten PCR-Zyklen unterworfen.

**Tabelle 3.4: Primer die für die Mutation IRS-1 Ser<sup>318</sup>  $\rightarrow$  Ala<sup>318</sup> verwendet wurden.** Alle Primer waren von Gibco/Invitrogen. Die mutierten Basen wurden fett und unterstrichen hervorgehoben.

Primer	Sequenz
pRK5'PCR Flankenprimer A	TTG CCT TTC CCA CAG GTG
IRS-1 318/1 Flankenprimer D	GCT GCT GCT GCT GTT GCT CTC GTA CCC GGG GTA AAG T
ala 318/3 Mutageneseprimer C	CCA GTA TGG TGG GTG GGA AAC CAG <b>GTG</b> <b>CCT</b> TCA GGG TGC GTG CCT CCA GC
ala 318/4 Mutageneseprimer B	GCT GGA GGC ACG CAC CCT GAA <b>GGC</b> ACC TGG TTT CCC ACC CAC CAT ACT GG

**Tabelle 3.5: PCR-Zyklen für die „overlap extension“ Mutagenese**

Segment	Zyklen	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Zeit (min)
1	1	95	5
2	30	55	1
2	30	72	4
2	30	95	1
3	1	55	1
3	1	72	5

Durch den zyklischen Ablauf definierter Temperaturprofile wird die cDNA in der PCR amplifiziert. Jeder Zyklus umfasst dabei die Schritte Denaturierung, Primeranlagerung („Annealing“) und Primerverlängerung („Elongation“).

Die Denaturierung bei 95  $^{\circ}\text{C}$  führt zur Auftrennung sämtlicher doppelsträngiger Nukleotidbereiche. Das Absenken der Temperatur auf 55 $^{\circ}\text{C}$ , dem Optimum für die Primeranlagerung, bewirkt die Bildung von Hybriden zwischen DNA und Oligonukleotiden. Durch die Erhöhung der Temperatur auf 72 $^{\circ}\text{C}$  wird das Temperaturoptimum der PWO-DNA-Polymerase erreicht. Diese Polymerase ist

eine in *E. coli* rekombinant exprimierte thermostabile 5' → 3' DNA-Polymerase mit 3' → 5' DNA-Exonuclease-, „Proofreading“-Funktion. Am Ende des Elongationsschrittes liegen die DNA-Moleküle doppelsträngig vor und werden während des Denaturierungsschrittes des nächsten Zyklus wieder getrennt. Nach 30 Zyklen wurden die PCR-Produkte über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt. Zur Elektroelution wurde das Gelstück unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, in einem möglichst geringen Volumen 1 x TAE in einen Dialyseschlauch gefüllt, in eine mit 1 x TAE gefüllte Elektrophoresekammer gehängt und 30 min bei 40 V eluiert.

#### Zweite Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die zweite PCR wurde als Mutagenese-Primer ala 318/3 und als Flankenprimer IRS-1-318/1 eingesetzt.

#### Dritte Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die dritte PCR wurden 200 ng der gereinigten PCR Produkte der ersten beiden Reaktionen mit den beiden Flankenprimern eingesetzt.

#### Reinigung, Elution und Ligation

Nach der Reinigung über ein Agarosegel wurde die Gelbande unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA eluiert.

Mit XhoI und BamHI wurde das Insert ausgeschnitten und in den Vektor pRK5-IRS-1-6 x His ligiert [169]. Dazu wurde die Vektor-DNA (30-50 ng) mit der 5-6-fachen molaren Menge der Fragment-DNA, 2 µL 5 x Ligasepuffer und 1,5 U Ligase in einem 10 µL Reaktionsansatz bei RT über Nacht inkubiert.

Für die Mutation des Ser<sup>318</sup> zu Ala im GST-IRS-1<sup>N2</sup>-Fragment wurde dieselbe Methodik verwendet, wobei IRS-1<sup>N2</sup> im Vektor pGEX-2T als Template DNA eingesetzt wurde. Die Mutageneseprimer waren identisch, als Flankenprimer wurden pGEXall5': TGG CAA GCC ACG TTT GGT GGT G und pGEX rev1024: CAG AGG TTT TCA CCG TCA TCA C verwendet. Das Insert wurde mit *EcoRI* und *BamHI* ausgeschnitten und wiederum im Vektor pGEX-2T ligiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Entwicklung eines *in vitro*-PKC-Assays

#### 4.1.1 Generierung, Expression und Reinigung von rekombinanten GST-Fragmenten von IRS-1

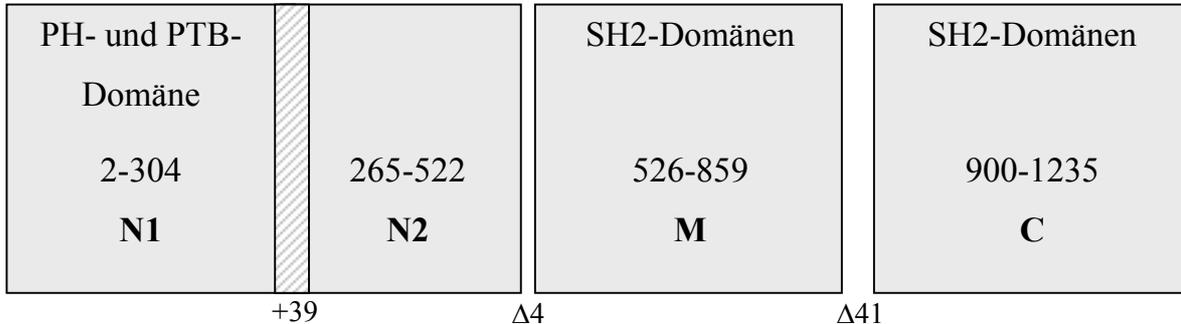
Wie von uns und anderen gezeigt wurde, ist es zur Erforschung von Proteinmodifikationen meist notwendig, ein *in vitro*-Testsystem zu etablieren [131;170;171]. Die Möglichkeit IRS-1 rekombinant in größeren Mengen herzustellen und *in vitro* zu phosphorylieren erleichtert die Detektion und Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen. Insulinrezeptor-Substrat-1 ist mit einem Molekulargewicht von 131 kDa zu groß, um in einem bakteriellen Expressionssystem exprimiert zu werden. Deswegen wurde IRS-1 in vier Fragmenten als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert (Abbildung 4.1).

##### 4.1.1.1 Überblick über verwendete Fusionsproteine

Von X.J. Sun [172] wurden unserer Arbeitsgruppe drei GST-Fusionsproteine des IRS-1 als Plasmide in pGex-2T Vektoren [134] zur Verfügung gestellt. Der aminoterminal Bereich (Aminosäuren 2-516) wird als IRS-1<sup>N</sup>, der mittlere Bereich (AS 526-859) als IRS-1<sup>M</sup> und der carboxyterminale Bereich (AS 900-1235) als IRS-1<sup>C</sup> bezeichnet. Exprimiert wurden die GST-Fusionsproteine in *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Die M- und C-Fragmente konnten in guten Ausbeuten, das N-Fragment jedoch nur in Spuren aufgereinigt werden. Neben der geringen Expressionsrate war auch die Wiederfindungsrate nach der Glutathionsäule unbefriedigend. Aus diesen Gründen wurden in unserer Arbeitsgruppe aus dem N-Teil zwei sich

überlappende Fragmente konstruiert, die als IRS-1<sup>N1</sup> und IRS-1<sup>N2</sup> bezeichnet werden (Abbildung 4.1).



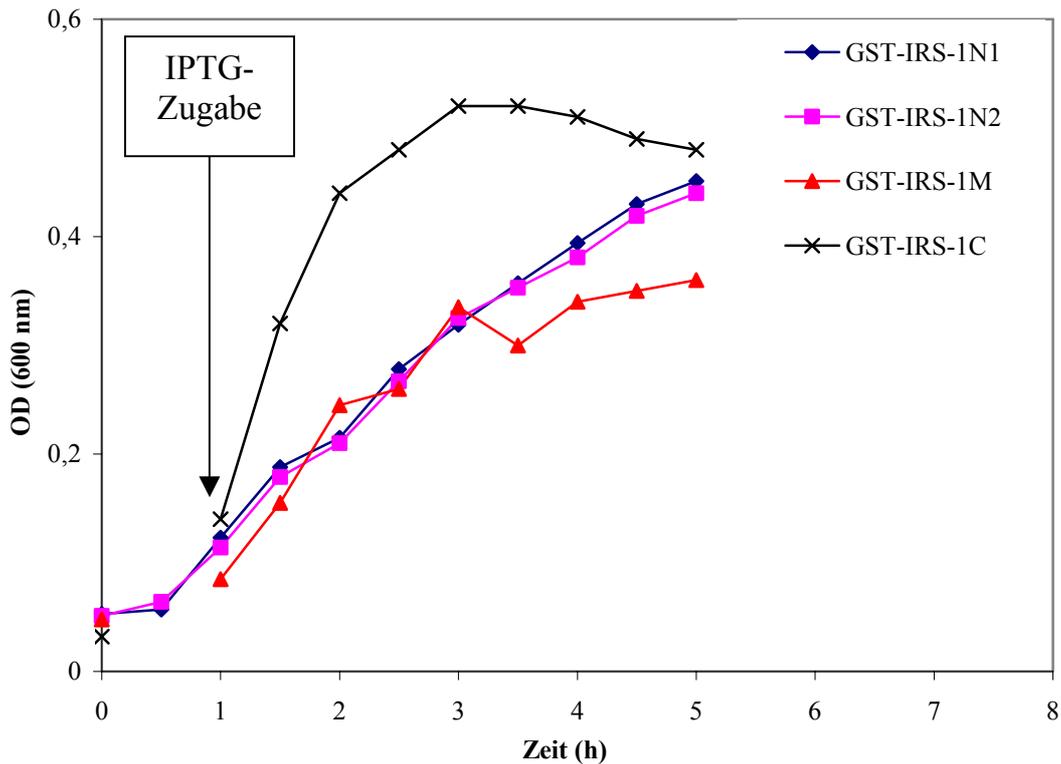
**Abb. 4.1: Bereiche des IRS-1 Proteins, die die verwendeten GST-Fusionsproteine IRS-1<sup>N1</sup>, IRS-1<sup>N2</sup>, IRS-1<sup>M</sup> und IRS-1<sup>C</sup> umfassen.** Es sind die vier Fragmente mit Zuordnung zur jeweiligen funktionellen Domäne gezeichnet. IRS-1<sup>N1</sup> und IRS-1<sup>N2</sup> überlappen mit 39 Aminosäureresten, zwischen IRS-1<sup>N2</sup> und IRS-1<sup>M</sup> gibt es eine Lücke von 4 AS-Resten, zwischen IRS-1<sup>M</sup> und IRS-1<sup>C</sup> eine Lücke von 41 AS-Resten.

#### 4.1.1.2 Zeitlicher Verlauf des Bakterienwachstums nach Expression von GST-Fusionsproteinen aus IRS-1 in *E. coli* DH5

Um den Zeitpunkt der maximalen Proteinexpression in Verbindung mit minimaler Proteindegradation zu ermitteln, wurden *E. coli* mit dem jeweiligen Expressionsvektor transformiert, eine Übernacht-Vorkultur in die Hauptkultur überimpft und nach 1 h bei 37 °C mit IPTG induziert. Danach wurden alle 30 min Proben entnommen, und die OD<sub>600</sub> bestimmt (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.2).

**Tabelle 4.1: Zeitlicher Verlauf des Wachstums von *E. coli*, transformiert mit den verschiedenen GST-Fusionsproteinen von IRS-1.** Für die einzelnen Fusionsproteine wurde im Abstand von jeweils einer halben Stunde die OD<sub>600</sub> bestimmt.

Zeit (h)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
GST-IRS-1 <sup>N1</sup>	0,053	0,057	0,123	0,188	0,215	0,278	0,319	0,357	0,394	0,43	0,451
GST-IRS-1 <sup>N2</sup>	0,051	0,064	0,114	0,179	0,21	0,267	0,325	0,353	0,381	0,419	0,440
GST-IRS-1 <sup>M</sup>	0,048		0,085	0,155	0,245	0,26	0,335	0,3	0,34	0,35	0,36
GST-IRS-1 <sup>C</sup>	0,032		0,24	0,32	0,44	0,48	0,52	0,52	0,44	0,49	0,48

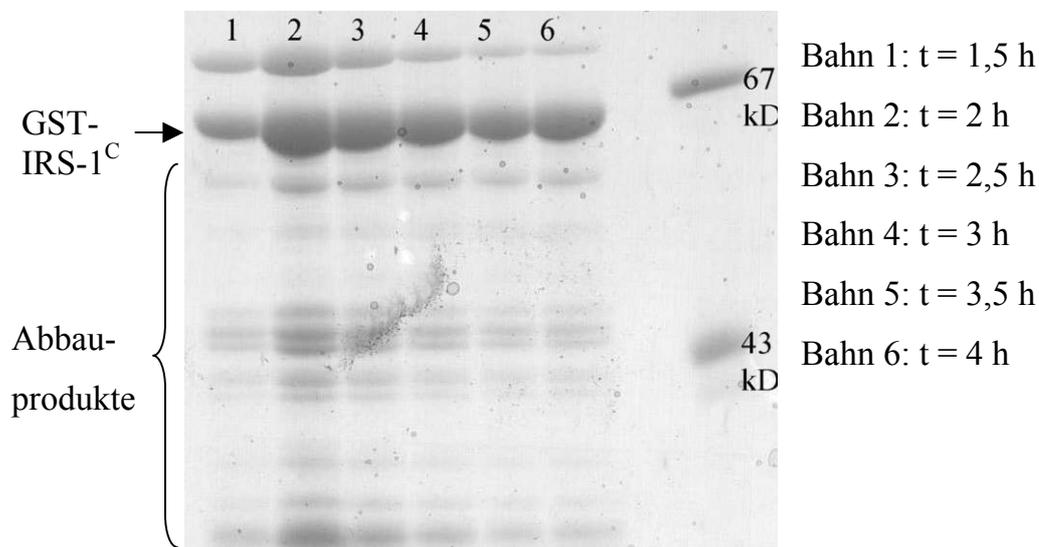


**Abb. 4.2: Zeitlicher Verlauf des Wachstums von *E. coli*, transformiert mit den verschiedenen GST-Fusionsproteinen von IRS-1.** 50 mL einer über Nacht-Kultur von *E. coli* wurde mit GST-IRS-1<sup>N1</sup>, GST-IRS-1<sup>N2</sup>, GST-IRS-1<sup>M</sup> oder GST-IRS-1<sup>C</sup> transformiert und zum Zeitpunkt 0 in eine 1 L Hauptkultur überführt. Nach 1 h wurde die Expression der Fusionsproteine durch IPTG-Zugabe induziert. Die OD bei 600 nm wurde im Abstand von 0,5 h bestimmt.

Die Wachstumskurve zeigt, dass die Bakterien nach Transformation mit dem GST-IRS-1<sup>C</sup>-Fragment am besten wachsen. Nach drei Stunden befinden sich die Bakterien, die mit dem GST-IRS-1<sup>C</sup>-Fragment transformiert wurden in der stationären Phase, das heißt, dass sie nach IPTG-Zugabe maximal nach zwei Stunden geerntet werden müssen. Zu einem späterem Zeitpunkt steigt die Gefahr des proteolytischen Abbaus, der v.a. durch Stressproteasen erfolgt, die in der stationären Phase gebildet werden. Die mit dem GST-IRS-1<sup>M</sup>-Fragment transformierten Bakterien haben ebenfalls zwei Stunden nach der Induktion mit IPTG die stationäre Phase erreicht, sind jedoch schlechter gewachsen.

*E. coli*, die mit den beiden N-Fragmenten transformiert wurden, haben nahezu identische Wachstumskurven. Sie wachsen ebenfalls schlechter als die mit dem C-Fragment transformierten Bakterien, aber besser als die mit dem M-Fragment

transformierten *E. coli*. Auffallend ist, dass sie sich nach fünf Stunden Wachstum noch nicht in der stationären Wachstumsphase befinden. Zur Überprüfung, ob die Expression der IRS-1- Fusionsproteine mit der Wachstumskurve korreliert, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben abgenommen, gereinigt, über ein SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt. Exemplarisch wird im Folgenden die Produktion von GST-IRS-1<sup>C</sup> erläutert werden. Die Expression von GST-IRS-1<sup>C</sup> in Abbildung 4.3 korreliert mit der Wachstumskurve in Abbildung 4.2. Zwei h nach IPTG-Zugabe ist der Proteingehalt am höchsten, doch auch nach 3 oder 4 h ist der Anteil des Fusionsproteins im Vergleich mit den anderen Proteinen in etwa gleich geblieben.

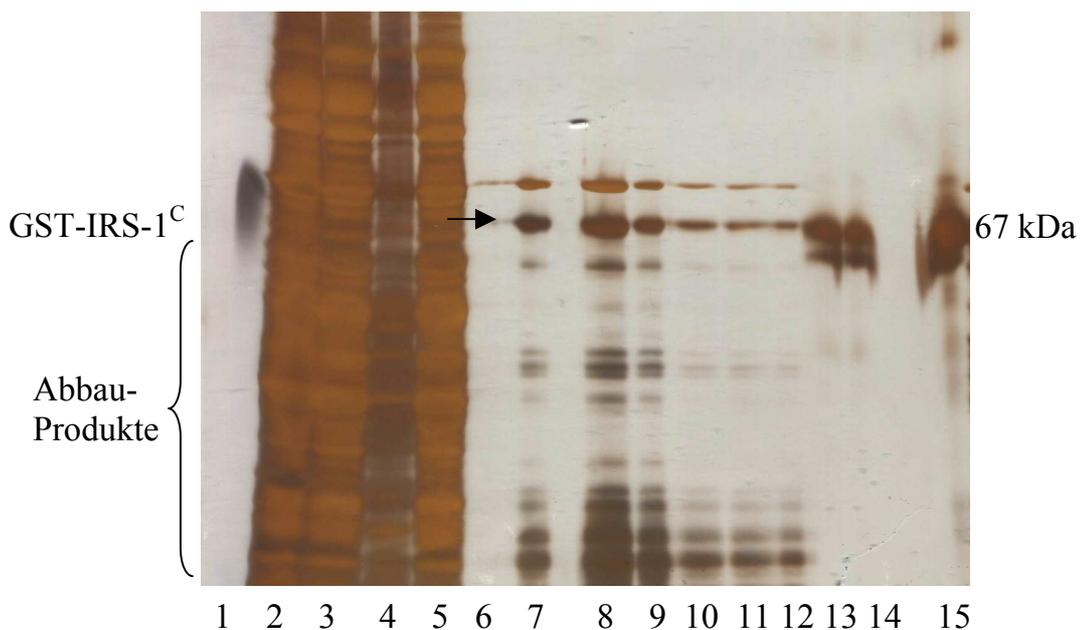


**Abb. 4.3: Expression von GST-IRS-1<sup>C</sup> in *E. coli* in Abhängigkeit der Zeit.** Aus 1 L Bakterienkultur wurde zu verschiedenen Zeitpunkten 100 mL abgenommen, lysiert und über Glutathion-Sepharose gereinigt. Aus den vereinigten Eluaten wurden pro Bahn 20 µL aufgetragen. Die Aufzucht, Reinigung, der Gellauf und die Coomassie-Färbung erfolgten unter Standardbedingungen, die im Methodenteil beschrieben sind.

Auch der Anteil an Abbauprodukten hat nicht zugenommen. Aus diesen und den entsprechenden Versuchen mit den anderen drei GST-IRS-1-Fragmenten wurden für die Aufzucht der einzelnen Fragmente in *E. coli* folgende Zeitspannen bestimmt: Die Fragmente GST-IRS-1<sup>N1</sup> und GST-IRS-1<sup>N2</sup> wurden 3 h, die Fragmente GST-IRS-1<sup>M</sup> und GST-IRS-1<sup>C</sup> 2 h nach IPTG-Zugabe lysiert.

### 4.1.2 Reinigung der GST-Fusionsproteine

Die Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte nach einer leicht modifizierten Vorschrift des Herstellers [133]. Dabei wurden die GST-Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose im „batch-Verfahren“ angereichert, dann auf eine Einmalsäule gegeben und durch Spülen mit 7 x 1 mL 10 mmol reduziertem Glutathion eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden über SDS-Gele analysiert. Abbildung 4.4 zeigt ein Gel einer Aufreinigung von GST-IRS-1<sup>C</sup>. Für die Detektion der Proteine wurde die Silberfärbung, die unter 3.3.4 beschrieben wurde, gewählt, um auch die weniger konzentrierten Abbauprodukte sichtbar zu machen



**Abb. 4.4: Reinigung von GST-IRS-1<sup>C</sup> über Glutathion-Sepharose.** GST-IRS-1<sup>C</sup> wurde in *E. coli* exprimiert, durch „freeze and thaw“ lysiert und über Glutathion-Sepharose gereinigt. 10  $\mu$ L der einzelnen Reinigungsschritte (Bahnen 2-5, Erläuterungen im Text), 10  $\mu$ L der Eluate (Bahnen 6-12), BSA-Standards (13, 14, 15) und 10  $\mu$ L „prestained“ Marker wurden über ein 7,5 % SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und silbergefärbt.

Auf Bahn 1 wurde der „Prestained Marker“ von Gibco aufgetragen, der jedoch sehr unscharfe Banden ergibt und später durch andere Marker ersetzt wurde. Die Bahnen 2-5 zeigen die einzelnen Reinigungsschritte:

Bahn 2: 10  $\mu$ L Probe nach dem DNaseI-Verdau

Bahn 3: 10  $\mu$ L Überstand nach der darauffolgenden Zentrifugation

Bahn 4: 10  $\mu$ L des resuspendierten Pellets der Zentrifugation

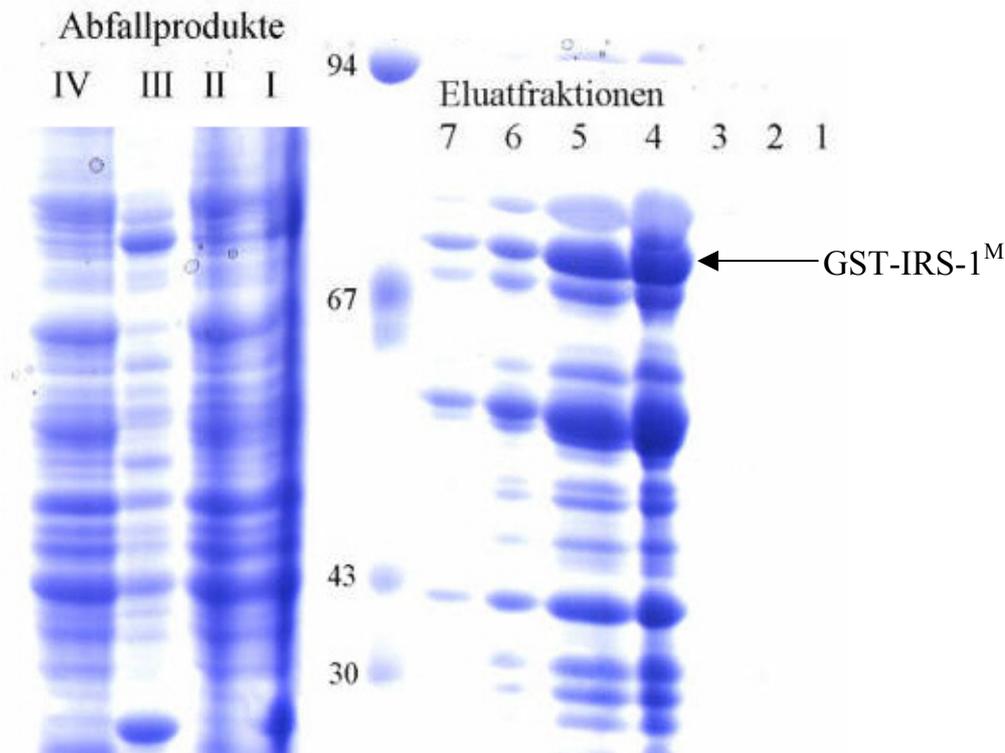
Bahn 5: 10  $\mu$ L des Überstandes nach der Inkubation mit Glutathion-Sepharose

Die Bahnen 6-13 zeigen die Eluate mit reduziertem Glutathion. Dabei wurde 7 x mit je 1 mL reduziertem Glutathion eluiert. Im ersten Eluat ist noch kein IRS-1<sup>C</sup>-Fragment zu sehen, im zweiten und im dritten Eluat deutlich mehr als in den folgenden Eluaten. Die Hauptbande bei etwa 61 kDa ist GST-IRS-1<sup>C</sup>, das ein berechnetes Molekulargewicht von 61,8 kDa besitzt. Bei allen Eluaten sind auch Abbauprodukte zu sehen, was bei diesem System kaum vermeidbar ist [133]. Durch Protease-defiziente Bakterienstämme wie z.B. der *E. coli*-Stamm BL21 RIL, könnten die Abbauprodukte verringert werden. GST-IRS-1<sup>C</sup> ließ sich jedoch nur schlecht in diesem Stamm exprimieren. Die Bahnen 13, 14 und 15 zeigen BSA-Standards in den Mengen 0,5, 1 und 5  $\mu$ g.

Die Anreicherung durch Affinitätschromatographie ist deutlich zu erkennen. Größere Proteine als das GST-IRS-1<sup>C</sup>-Fragment sind nicht mehr vorhanden. Die Bande bei etwa 80 kDa ist ein Artefakt, das bei allen Proben auftrat, die über Glutathion-Sepharose gereinigt wurden. Es sind jedoch viele kleinere Fragmente zu erkennen. Mittels Immunblot konnte gezeigt werden, dass es sich um GST-modifizierte Abbauprodukte des IRS-1<sup>C</sup>-Fragments handelt (siehe unten, Abb. 4.7). Die Ausbeute aus 1 L *E. coli*-Suspension betrug  $10 \pm 2$  mg GST-IRS-1<sup>C</sup> in den vereinigten Fraktionen 7-9.

GST-IRS-1<sup>M</sup>, mit 62,6 kDa das größte Fragment, wurde in den Fraktionen 4 und 5 (Abbildung 4.5) mit Ausbeuten von  $10 \pm 2$  mg/L eluiert. Die Ausbeute ist hoch, doch gibt es viele proteolytische Abbauprodukte.

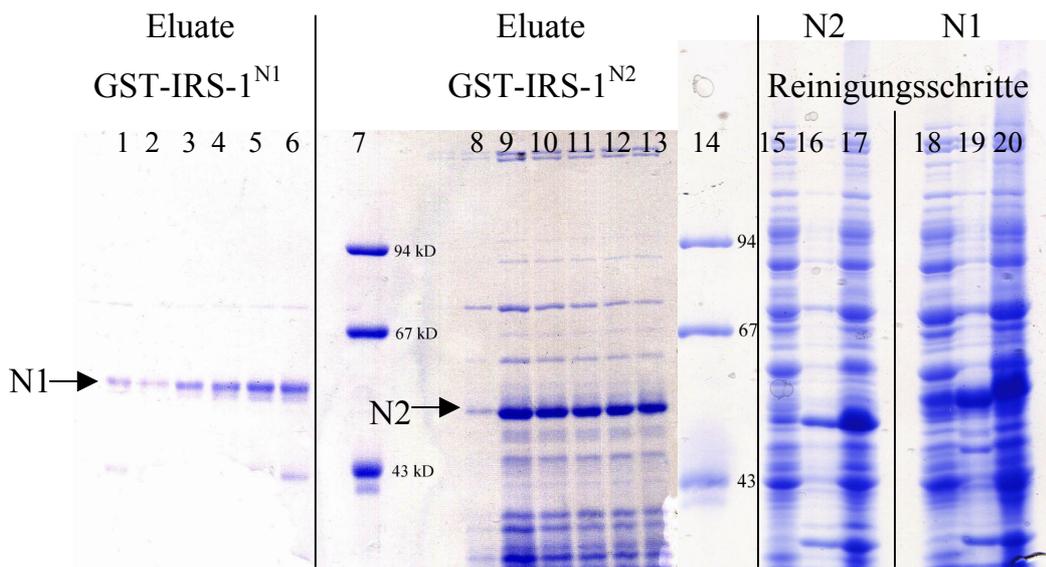
Die GST-IRS-1<sup>N1</sup>-Fragmente (Abb. 4.6, linkes Gel) eluieren sehr spät. In der ersten Fraktion konnte kein Protein nachgewiesen werden. Erst in den Fraktionen 6 und 7 wurde genügend Protein eluiert. Die Ausbeute betrug bei diesem Fragment  $5 \pm 1$  mg Protein pro 1 Liter Zellsuspension. Die Reinheit des Produkts, das ein MG von 60,6 kDa besitzt, ist höher als bei den anderen drei Fragmenten.



**Abb. 4.5: Reinigung von GST-IRS-1<sup>M</sup> über Glutathion-Sepharose.** GST-IRS-1<sup>M</sup> wurde in *E. coli* exprimiert, durch “freeze and thaw“ lysiert und über Glutathion-Sepharose gereinigt. 10  $\mu$ L der einzelnen Reinigungsschritte (Bahnen I-IV), 10  $\mu$ L der Eluate (Bahnen 1-7), und 10  $\mu$ L LMW wurden über ein 7,5 % SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie gefärbt.

Die GST-IRS-1<sup>N2</sup>-Fragmente (Abb. 4.6, mittleres Gel) wurden in Ausbeuten von  $8 \pm 2$  mg Protein pro 1 Liter Zellsuspension erhalten. Dieses Fragment ist mit einem MG von 57,8 KD das kleinste Fragment. Das rechte Gel in Abbildung 4.6 zeigt Proben der jeweils letzten drei Reinigungsschritte der Fusionsproteine.

In Tabelle 4.2 sind die erhaltenen Ausbeuten der Aufreinigungen der einzelnen IRS-1-Fusionsproteine zusammengefasst. Die Fragmente mit den höheren Ausbeuten (GST-IRS-1<sup>C</sup> und GST-IRS-1<sup>M</sup>) zeigen auch mehr Abbauprodukte (Abb. 4.4 und 4.5). Die Reinheiten der beiden GST-IRS-1<sup>N</sup>-Fragmente sind höher, doch sind die Ausbeuten geringer.

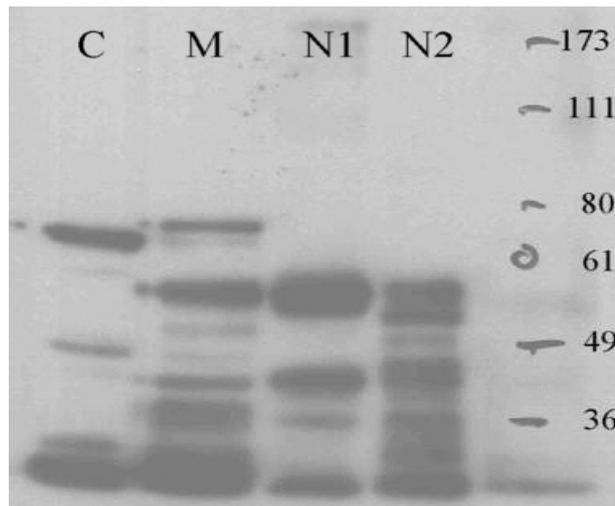


**Abb. 4.6: Reinigung von GST-IRS-1<sup>N1</sup> und GST-IRS-1<sup>N2</sup> durch Affinitätschromatographie.** Je 10 µL der Eluate mit reduziertem Glutathion wurden mit 10 µL 1 x Laemmli-Puffer versetzt, 3 min gekocht und durch SDS-Gelelektrophorese gereinigt. Färbung erfolgte mit SimplyBlue™ SafeStain. Das linke Gel zeigt die Eluate der Reinigung von GST-IRS-1<sup>N1</sup> (Bahnen 1-6), das mittlere Gel zeigt die Eluate der Reinigung von GST-IRS-1<sup>N2</sup> (Bahnen 8-13). Auf den Bahnen 7 und 14 ist jeweils der LMW aufgetragen. Die Bahnen 15-17 (N2) und 18-20 (N1) zeigen jeweils Proben der letzten drei Reinigungsschritte.

**Tabelle 4.2: Molekulargewichte der einzelnen GST-IRS-1-Fusionsproteinfragmente und Ausbeuten von Aufreinigungen aus 1 L *E. coli*-Suspension.** Die GST-IRS-1-Fragmente wurden in *E. coli* exprimiert, durch “freeze and thaw“ lysiert und über Glutathion-Sepharose gereinigt.

IRS-1-Fragment	Molekulargewicht	Ausbeute (mg/L)
GST-IRS-1 <sup>N1</sup>	60,6	4-6
GST-IRS-1 <sup>N2</sup>	57,8	6-10
GST-IRS-1 <sup>M</sup>	62,6	8-12
GST-IRS-1 <sup>C</sup>	61,8	8-12

Untersuchung von geblotteten GST-IRS-1-Fragmenten, die mit einem Antikörper gegen GST detektiert wurden (siehe Abbildung 4.7) zeigen dass es sich bei den meisten Abbauprodukten um proteolytische Fragmente handelt, in denen der GST-Teil noch erhalten ist. Versuche, diese Fragmente durch einfache Filtration oder durch Reinigung über HPLC zu entfernen waren erfolglos.



**Abb. 4.7: Detektion der GST-haltigen Abbaufragmente bei der Reinigung der GST-IRS-1-Fusionsproteine.** GST-IRS-1-Fusionsproteine, überexprimiert in *E. coli*, gereinigt durch Affinitätschromatographie. Je 1  $\mu\text{g}$  wurde über ein SDS-Minigel gereinigt, geblottet und durch einen Antikörper gegen GST detektiert.

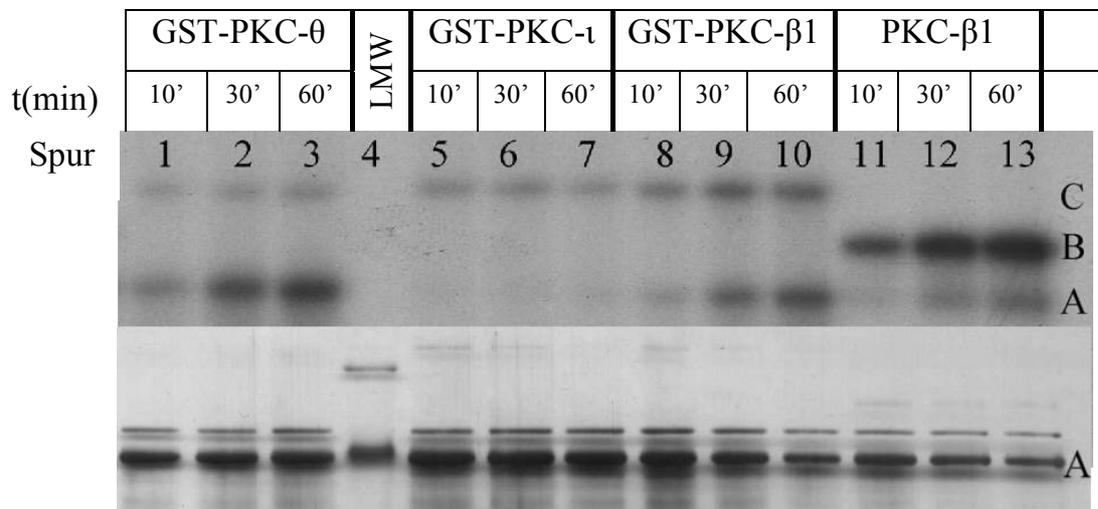
Da die Fragmente zur *in vitro*-Phosphorylierung verwendet und danach durch SDS-PAGE abgetrennt werden, konnte auf eine weitere Reinigung vor den Assays verzichtet werden.

### 4.1.3 *In vitro*-Phosphorylierungskinetik

#### Bestimmung der optimalen Phosphorylierungszeit

Für die Phosphorylierung der GST-Fragmente von IRS-1 wurden verschiedene Assays getestet. Mit den Assays nach Huang [173], Dammeier [174] oder Tennagels [19] wurden keine bzw. nur sehr geringe Phosphorylierung mit den GST-IRS-1-Fragmenten erreicht. Am geeignetsten erwies sich ein modifizierter Assay nach Schächtele [137], der in Kapitel 3.2 beschrieben wurde. Zur Bestimmung der optimalen Enzym- und ATP-Konzentration und der Phosphorylierungszeiten wurden mit verschiedenen PKC-Isoenzymen und mit GST-IRS-1<sup>C</sup> als Substrat Vorversuche durchgeführt. Von den klassischen PKC-Isoenzymen wurde PKC- $\beta$ 1, von den neuen PKC- $\theta$  und von den atypischen Isoformen PKC- $\iota$  verwendet. Eingesetzt wurden 7  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1<sup>C</sup>, 10  $\mu\text{L}$  Assaypuffer, 1,5  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  ATP und 21 mU PKC-Lösung. Nach 10, 30 bzw.

60 min wurden die Assays durch Zugabe von 15  $\mu\text{L}$  1 x Laemmli-Puffer abgebrochen und über SDS-PAGE getrennt. Das foliengestützte Gel wurde mit 5 mL Fixierlösung in einer Klarsichthülle eingeschweißt und über Nacht mit einem Hyperfilm MP in einer Filmkassette aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurde der Film entwickelt. Danach wurde das Gel nach der Methode von Blum und Shevchenko [141;142] silbergefärbt. Das Autoradiogramm im oberen Teil von Abbildung 4.8 zeigt die *in vitro*-Phosphorylierungskinetik des Fusionsproteins GST-IRS-1<sup>C</sup> und im unteren Teil die Silberfärbung des Gels. Neben der Phosphorylierung des GST-IRS-1<sup>C</sup> wurden auch die autophosphorylierten PKC-Isoenzyme detektiert. Die Signale auf Höhe C bei etwa 104 kDa entsprechen den phosphorylierten GST-PKC-Isoenzymen, die Signale auf Höhe B bei 77 kDa der phosphorylierten PKC- $\beta$ 1, die Signale bei A auf Höhe von 62 kDa dem phosphorylierten GST-IRS-1<sup>C</sup>. Die Silberfärbung im unteren Bild zeigt die Substratbande (A), die Enzyme sind sehr schwach zu erkennen.



**Abb. 4.8:** *In vitro*-Phosphorylierungskinetik des Fusionsproteins GST-IRS-1<sup>C</sup> (MG 62 kDa) mit PKC- $\beta$ 1 und den GST-PKC-Isoformen - $\beta$ 1, - $\theta$ , und - $\iota$ . 7  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1<sup>C</sup> wurde *in vitro* mit 1,5  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  ATP (2080 cpm <sup>32</sup>P-ATP /pMol ATP) und 21 mU PKC-Lösung 10, 30 und 60 min inkubiert, über SDS-PAGE getrennt und über Autoradiographie dargestellt. Das untere Bild zeigt die Silberfärbung des Gels nach der Autoradiographie. Die Spur 4 zeigt die Banden 94 und 67 kDa des LMW. Die Bande bei A zeigt GST-IRS-1<sup>C</sup> (62 kDa), B autophosphorylierte PKC- $\beta$ 1 (77 kDa) und C die autophosphorylierten GST-PKC-Isoenzyme (104 kDa).

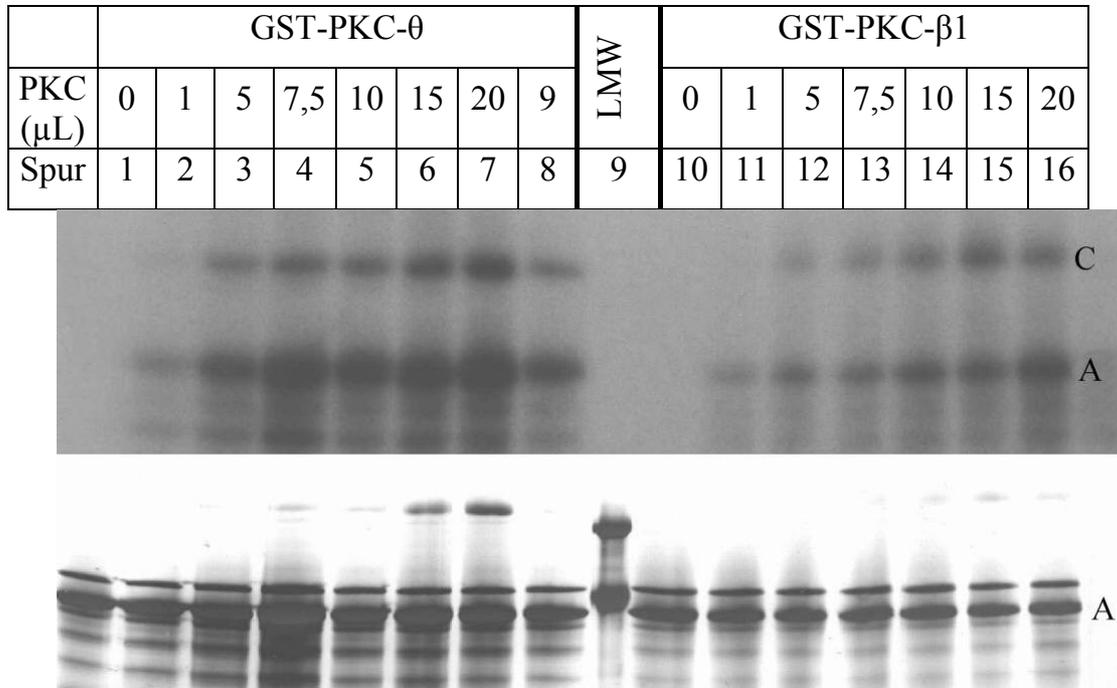
Auf Bahn 4 wurde der LMW aufgetragen, von dem die Banden bei 94 kDa und bei 67 kDa zu sehen sind. PKC- $\beta$ 1 baut weniger Radioaktivität ein als das entsprechende GST-Enzym. Die GST-Enzyme sind jedoch nur schwer mit freien PKC-Isoenzymen zu vergleichen. Die Aktivität der „getaggt“ PKC-Isoenzyme wurden mit einem Assay getestet, der von den Produzenten nicht zu erfahren war. Die Aktivität der „nicht getaggt“ PKC-Isoenzyme wurde mit Histon H1 als Substrat bestimmt. Bei den „getaggt“ Enzymen wurde durch PKC- $\theta$  die meiste Radioaktivität, mit PKC- $\iota$  die geringste Radioaktivität eingebaut. Bei allen Ansätzen ist jedoch deutlich zu sehen, dass nach 60 min die meiste Radioaktivität eingebaut wurde. Durch eine Verlängerung der Phosphorylierungszeit auf 90 min konnte die Phosphorylierungsrate noch um etwa 10 % gesteigert werden.

#### Bestimmung des optimalen Enzym:Substrat-Verhältnisses

Zur Bestimmung des optimalen Enzym:Substrat-Verhältnisses wurde 7  $\mu$ g Substrat mit 1,5  $\mu$ L 100  $\mu$ M ATP und GST-PKC- $\beta$ 1 und - $\theta$  mit verschiedenen Enzymaktivitäten 30 min bei 30 °C phosphoryliert. Die Assays wurden mit 20  $\mu$ L 1 x Laemmli-Puffer abgebrochen, 3 min gekocht und über ein SDS-Gel getrennt. Abbildung 4.9 zeigt in der oberen Hälfte die Autoradiographie, in der unteren Hälfte die Silberfärbung des Gels.

Die Banden auf Höhe A zeigen das phosphorylierte GST-IRS-1<sup>C</sup>, die Banden auf Höhe C zeigen die autophosphorylierten Banden der PKC-Isoenzyme. Es ist deutlich zu erkennen, dass GST-PKC- $\theta$  besser phosphoryliert als GST-PKC- $\beta$ 1. Ohne Enzymzugabe (Spur 1 und 10) findet keine Autophosphorylierung des Substrates statt. Bei 7,5  $\mu$ L (21 mU) GST-PKC- $\theta$  wird ein Maximalwert erreicht, der durch weitere Enzymzugabe nicht gesteigert werden kann. Bei der weniger aktiven GST-PKC- $\beta$ 1 kann die Einbaurate durch Enzymzugabe bis auf 56 mU noch gesteigert werden. In einem Zusatzversuch (Tabelle 4.3) wurde analysiert, wie viel Radioaktivität durch die zehnfache Enzymaktivität eingebaut werden kann und für spätere massenspektrometrische Analysen wurde überprüft, wie sich die Einbauraten verhalten, wenn das Enzym nicht mit Enzymverdünnungspuffer, sondern mit Assaypuffer verdünnt wird. Enzymverdünnungspuffer

enthält Polyethylenglykol (PEG). PEG quencht die Peptidsignale im MS, und es erscheint im Spektrum ein „Lattenzaun“ der CH<sub>2</sub>-Gruppen.



**Abb. 4.9:** *In vitro*-Phosphorylierungskinetik des Fusionsproteins GST-IRS-1<sup>C</sup> (MG 62 kDa) mit den GST-PKC-Isoformen  $\theta$  und  $\beta$ 1. 7  $\mu$ g GST-IRS-1<sup>C</sup> wurde *in vitro* mit 1,5  $\mu$ L 100  $\mu$ M ATP (2080 cpm <sup>32</sup>P-ATP /pMol ATP) und verschiedenen Mengen PKC-Lösung 30 min bei 30 °C inkubiert, über SDS-PAGE getrennt und autoradiographisch dargestellt (oberes Bild). Das untere Bild zeigt die Silberfärbung des Gels. Die Spur 4 zeigt die Banden 94 und 67 kDa des LMW. Die Banden A zeigen GST-IRS-1<sup>C</sup> (62 kDa) und C die autophosphorylierten GST-PKC-Isoenzyme (104 kDa).

Da neben dem Verdau im Gel auch ein Lösungsverdau der phosphorylierten GST-IRS-1-Fusionsproteine in Erwägung gezogen wurde, bei dem das PEG nicht abgetrennt werden kann, wurde zum Vergleich ein Assay ohne PEG durchgeführt. Der Lösungsverdau ist im Gegensatz zum Verdau aus dem Gel weniger arbeits- und zeitaufwändig und für schnelle Analysen eine gute Alternative. Es können größere Mengen Protein ohne Zusatzaufwand schnell verdaut werden. Problematisch beim Lösungsverdau ist die Zunahme der Komplexität der erhaltenen Lösung. Wie in den vorigen Kapiteln gezeigt wurde, sind die GST-Fusionsproteine mit vielen proteolytischen Abbaufragmenten verunreinigt. Diese und weitere an den Assays beteiligten Komponenten, wie

z.B. die eingesetzte PKC, Assaypuffer oder PEG erhöhen die Komplexität und erschweren somit die Analyse der phosphorylierten Proteine erheblich.

**Tabelle 4.3:  $^{32}\text{P}$ -ATP Einbauraten (in cpm) in GST-IRS-1<sup>C</sup> in Abhängigkeit der Enzymzugabe.** 10  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1<sup>C</sup> wurde *in vitro* mit PKC- $\zeta$  und 2,5  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  ATP (2080 cpm/pMol) 90 min bei 30 °C phosphoryliert. Die Enzymzugabe erfolgte in bis zu 5 Portionen in regelmäßigen Zeitabständen. Die Assays wurden mit 25  $\mu\text{L}$  1 x Laemmli-Puffer abgebrochen, über ein SDS-PAGE getrennt und nach Autoradiographie ausgeschnitten. Die Gelbanden wurden mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit im  $\beta$ -Counter vermessen.

	Enzymzugabe ( $\mu\text{L}$ )	Ci im Assay	cpm Gelbande	Mittelw.	%
1	Standardlösung 1 x 2,5	521.435	494	478	100
		540.639	461		
2	2 x 1,25	518.394	411	421	88
		515.570	432		
3	10 x 2,5	555.215	927	902	188
		547.849	876		
4	5 x 0,5	528.479	409	420	88
		521.763	431		
5	Enzym in H <sub>2</sub> O 1 x 2,5	531.828	427	401	85
		516.269	374		
6	blank	518.741	37	37	

Beim Ansatz mit der 10-fachen Enzymmenge („1000 %“) wurde die meiste Radioaktivität eingebaut, jedoch betrug die Steigerung nur 88 %. Die Ansätze, bei denen das Enzym in kleineren Mengen sukzessive dazugegeben wurde (Proben 2 und 4) und der Ansatz, bei dem das Enzym in H<sub>2</sub>O verdünnt wurde (Probe 5), erreichten weniger als 90 % des Standardansatzes. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass während der Reaktion keine Enzymhemmung stattfindet.

#### Bestimmung der optimalen ATP-Konzentration

7  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1<sup>C</sup> wurde mit 21 mU PKC- $\theta$  für 90 min phosphoryliert. ATP wurde in zwei Konzentrationen eingesetzt (10  $\mu\text{mol}$  und 100  $\mu\text{mol}$ ). Die ATP-Lösungen wurden mit  $^{32}\text{P}$ -ATP versetzt, so dass sie jeweils 2080 cpm/pMol ATP enthielten. Die Lösungen wurden im  $\beta$ -Counter auf Gleichheit überprüft.

Das Autoradiogramm in Abbildung 4.10 zeigt, dass mit einer ATP-Konzentration von 10  $\mu\text{mol}$  nur schwache Phosphorylierung erhalten werden konnte. Schon mit

1  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{mol}$  ATP konnte eine deutlich höhere Phosphorylierung erhalten werden als bei 10  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol}$  ATP-Zugabe, obwohl eigentlich dieselbe Menge zugegeben wurde. Der einzige Unterschied besteht darin, dass das Volumen bei Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol}$  ATP 10 mal erhöht ist, und somit für den Assay nicht mehr die optimalen Konzentrationsverhältnisse herrschen. Bei Zugabe von 100  $\mu\text{mol}$  ATP wurde bei 5  $\mu\text{L}$  maximale Phosphorylierung erreicht, die durch weitere ATP-Zugabe nicht mehr gesteigert werden konnte.

		ATP 100 $\mu\text{mol}$					ATP 10 $\mu\text{mol}$				
ATP( $\mu\text{L}$ )	0	1	2,5	5	7,5	10	1	2,5	5	7,5	10
Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11



**Abb. 4.10: *In vitro*-Phosphorylierungskinetik des Fusionsproteins GST-IRS-1<sup>C</sup> (MG 62 kDa) mit GST-PKC- $\theta$ .** 7  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1<sup>C</sup> wurde *in vitro* mit 21 mU GST-PKC- $\theta$  und verschiedenen Mengen ATP (2080 cpm <sup>32</sup>P-ATP /pMol ATP) 90 min bei 30 °C inkubiert, über SDS-PAGE getrennt und autoradiographisch dargestellt.

## 4.2 Bestimmung der ATP-Einbaurate in GST-IRS-1-Fusionsproteine durch verschiedene PKC-Isoenzyme

Wie die Vorversuche gezeigt haben, können die Fusionsproteine von IRS-1 *in vitro* nur mit geringen Ausbeuten phosphoryliert werden. Zum Aufbau einer geeigneten Strategie zur Identifizierung der PKC-Isoform-spezifischen Phosphorylierungsstellen von IRS-1 wurde zuerst die Einbaurate in die vier GST-IRS-1-Fusionsproteine bestimmt. Dazu wurden die GST-IRS-1-Fragmente mit 9 verschiedenen PKC-Isoenzymen unter optimierten Standardbedingungen phosphoryliert (Kapitel 3.2). 80  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1-Fusionsprotein in 40  $\mu\text{L}$  Lösung wurde mit 120  $\mu\text{L}$  Assaypuffer, 256 mU PKC in 20  $\mu\text{L}$  Enzymverdünnung und mit 20  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  ATP mit [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP (2080 cpm/pMol ATP) 90 min bei 30 °C mit 800 rpm inkubiert. Der Abbruch erfolgte mit 20  $\mu\text{L}$  1 x Laemmli-Puffer. Nach kurzen Aufkochen wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge auf etwa

40  $\mu\text{L}$  eingeengt und über ein 7,5 % SDS-Gel getrennt. Nach der Coomassie-Färbung wurden die Banden ausgeschnitten und mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit im  $\beta$ -Counter vermessen. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt und die Proben wurden dreimal vermessen, so dass die angegebenen cpm-Werte die Mittelwerte von 6 Messungen darstellen. Im GST-Teil gibt es kein Phosphorylierungsmotiv für die PKC-Isoenzyme und außerdem konnte nach Thrombinspaltung keine Radioaktivität in diesem Teil nachgewiesen werden. Die gesamte Radioaktivität wird in den IRS-1-Teil eingebaut und kann dafür berechnet werden. Zur Berechnung des Phosphorylierungsgrads der IRS-1-Fragmente wurden die Mengenangaben in Tabelle 4.4 zugrunde gelegt.

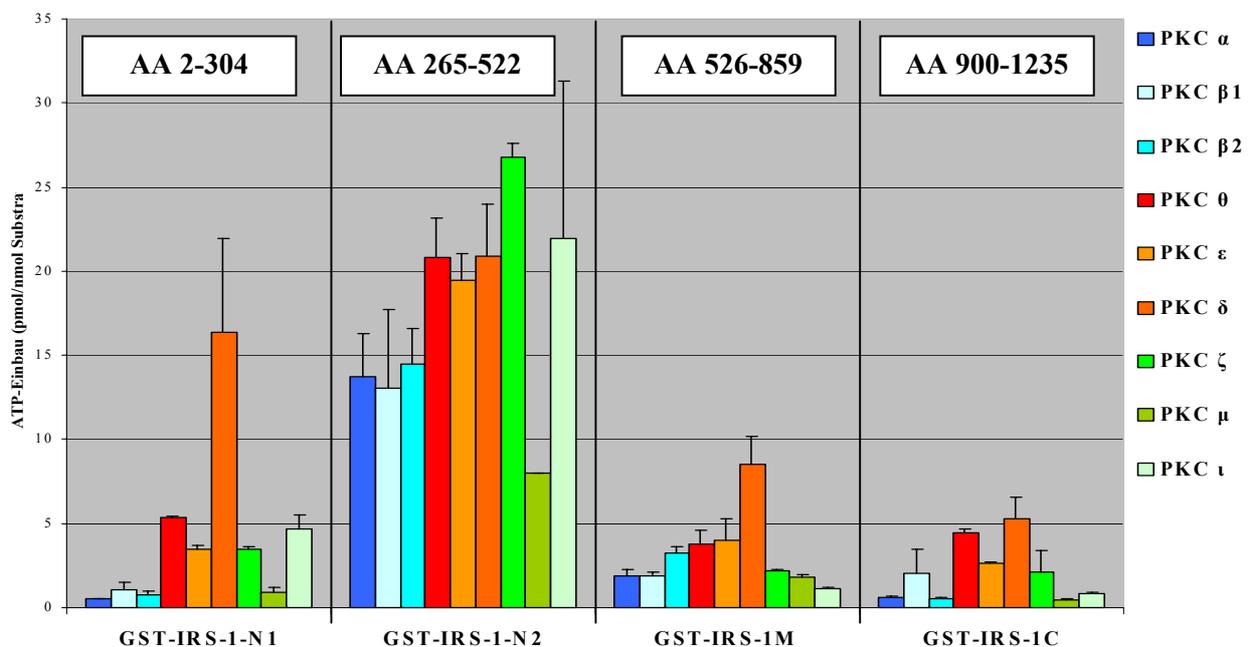
**Tabelle 4.4: Molekulargewichte der verwendeten GST-IRS-1-Fragmente und Mengenangaben zur Berechnung der Phosphateinbaureate.**

Fragment	MG (kDa)		1 nMol $\equiv$ x $\mu\text{g}$	80 $\mu\text{g}$ $\equiv$ x nMol
	mit GST	ohne GST		
GST-IRS-1 <sup>N1</sup>	60,6	33,6	33,6	2,38
GST-IRS-1 <sup>N2</sup>	53,7	26,7	26,7	3,00
GST-IRS-1 <sup>M</sup>	62,6	35,6	35,6	2,25
GST-IRS-1 <sup>C</sup>	61,8	34,8	34,8	2,30

Aus jedem Gel wurden auf Höhe des Substrates vier Leerwerte ausgeschnitten. Diese Werte wurden gemittelt und damit die Messwerte korrigiert. Da ATP mit einer Strahlung von 2080 cpm/pMol eingesetzt wurde, wurden die erhaltenen Cerenkov-Werte durch 2080 und den Faktor in der rechten Spalte der Tabelle 4.4 geteilt. Die Ergebnisse in pMol ATP/nMol Fusionsprotein sind in Tabelle 4.5 aufgelistet und in Abbildung 4.11 dargestellt.

**Tabelle 4.5: Phosphateinbau durch PKC-Isoformen in die GST-Fusionsproteine von IRS-1.** 80 µg des jeweiligen Fusionsproteins wurde *in vitro* durch PKC-Isoenzyme phosphoryliert, über ein 7,5 % SDS-Gel getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und im β-Counter vermessen. Die Werte in der Tabelle errechnen sich aus den cpm/2080xFaktor aus Tabelle 4.4 und drücken pMol eingebautes ATP pro nMol Substrat aus.

	GST-IRS-1 <sup>N1</sup>	GST-IRS-1 <sup>N2</sup>	GST-IRS-1 <sup>M</sup>	GST-IRS-1 <sup>C</sup>
PKC-α	0,50	13,70	1,92	0,63
PKC-β1	1,05	13,03	1,92	0,63
PKC-β2	0,77	14,47	3,25	0,55
PKC-θ	5,38	20,80	3,81	4,42
PKC-ε	3,46	19,45	4,03	2,62
PKC-δ	16,39	20,92	8,51	5,28
PKC-ζ	3,47	26,80	2,20	0,85
PKC-μ	0,91	7,98	1,83	0,46
PKC-ι	4,70	21,96	1,15	0,85



**Abb. 4.11: Phosphateinbau durch PKC-Isoformen in GST-Fusionsproteine von IRS-1.** 80 µg der Fusionsproteine wurden *in vitro* mit 256 mU der jeweiligen PKC und 20 µL 100 µMol ATP mit einer Aktivität von 2080 cpm pro pMol phosphoryliert, über ein 7,5 % SDS-Gel getrennt, mit Coomassie gefärbt, aus dem Gel ausgeschnitten und im β-Counter vermessen.

Die konventionellen PKC-Isoenzyme sind in der Abbildung in blauen, die neuen PKC-Isoenzyme in roten die atypischen PKC-Isoenzyme in grünen Farbtönen wiedergegeben. Auffallend ist, dass alle PKC-Isoenzyme das N2-Fragment am besten phosphorylieren. Die konventionellen PKC-Isoenzyme (PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2) zeigen geringere Aktivität als die beiden anderen Gruppen. Die neuen PKC-Isoenzyme (PKC- $\theta$ , - $\varepsilon$  und - $\delta$ ) phosphorylieren im Mittel am besten, nur am N2-Fragment zeigen die beiden atypischen PKC-Isoenzyme (PKC- $\zeta$  und - $\iota$ ) eine höhere Einbaurrate. Die geringste Aktivität gegenüber allen vier Substraten zeigt PKC- $\mu$  (PKD). PKC- $\delta$  ist im Mittel mit Abstand das aktivste Enzym, nur beim N2-Fragment sind die beiden atypischen PKC-Isoenzyme etwas aktiver.

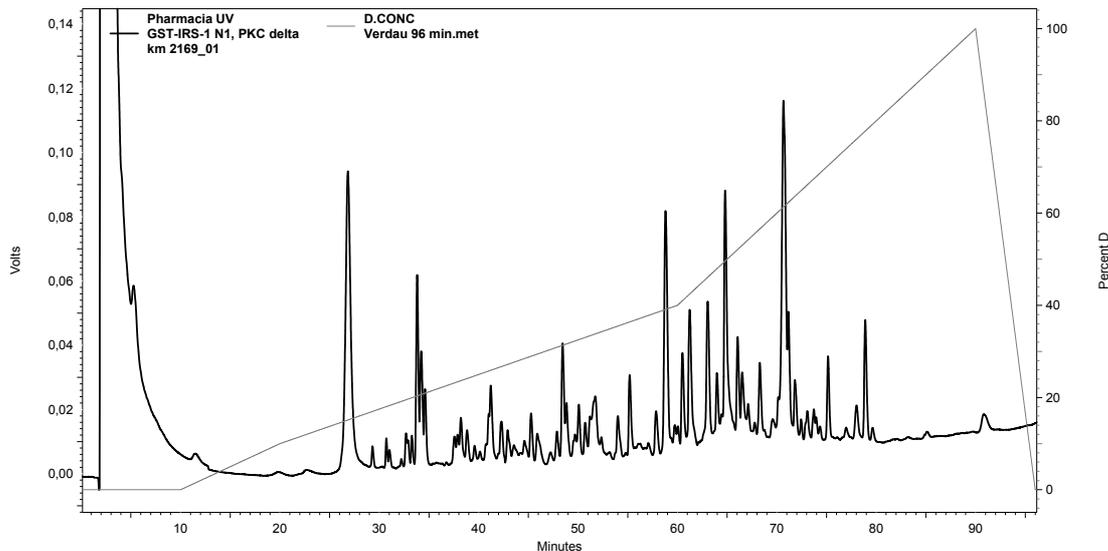
### 4.3 Cerenkov-Pattern

Durch die Bestimmung der Einbauraten bekommt man noch keine genauen Werte über den tatsächlichen Phosphateinbau, da nicht berücksichtigt wird, wie viele verschiedene Stellen im Substrat von der jeweiligen PKC phosphoryliert wurden. Zur Analyse der Phosphorylierungsstellen wurden Cerenkov-Pattern der einzelnen phosphorylierten Fusionsproteine erstellt. Die Assays wurden wie in den Kapiteln 3.3.8 und 3.3.9 beschrieben, durchgeführt.

Je 200  $\mu$ g der GST-Fragmente von IRS-1 wurden durch die konventionellen Isoenzyme PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2, die neuen Isoenzyme PKC- $\theta$  und - $\delta$  und durch die atypische PKC- $\zeta$  phosphoryliert und anschließend elektrophoretisch gereinigt. Nach der SDS-PAGE wurden die Banden mit Coomassie gefärbt und im Gel mit Trypsin verdaut. Die Eluate wurden über eine  $\mu$ RPC C2/C18 2,1 x 100 mm Säule mit einem Fluss von 200  $\mu$ L/min getrennt und in Minutenschritten in „Isoplates“ von Perkin Elmer gesammelt. „Isoplates“ sind spezielle 96-Loch Platten, die einen klaren Boden und weiß gefärbte Stege haben und für eine Messung im  $\beta$ -Plattencounter optimiert sind. Die Platten wurden mit „Resealable tapes“ verschlossen und direkt vermessen. Die Cerenkov-Werte wurden in Excel exportiert und ausgewertet.

### 4.3.1 Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>N1</sup>

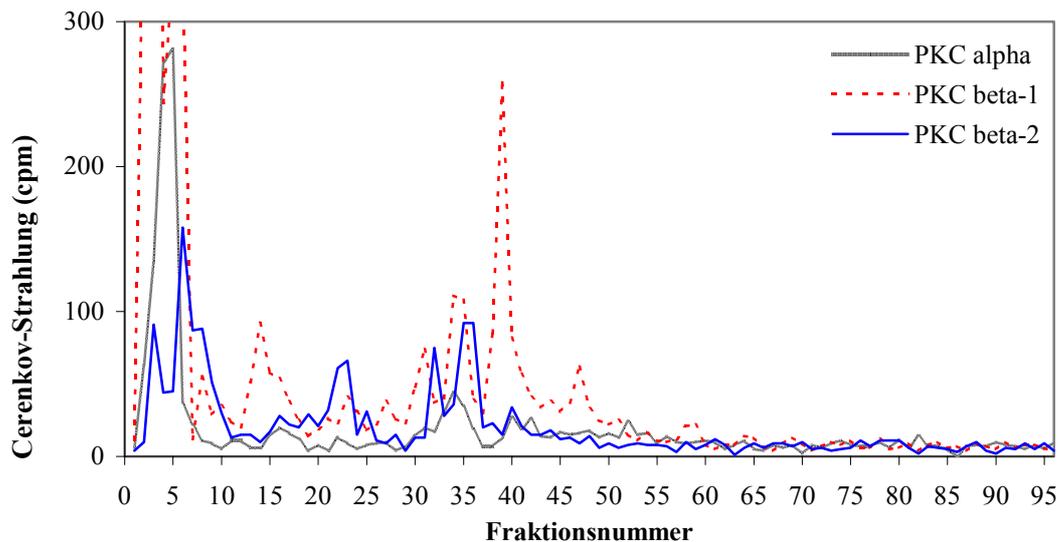
Die vereinigten Eluate des tryptischen Verdau von GST-IRS-1<sup>N1</sup>, *in vitro* phosphoryliert mit PKC- $\delta$ , wurden über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu$ L/min getrennt. Das UV-Diagramm von GST-IRS-1<sup>N1</sup>, wird in Abbildung 4.12, die Cerenkov-Pattern aller verwendeten PKC-Isoenzyme in den darauf folgenden Abbildungen 4.13 und 4.14 dargestellt.



**Abb. 4.12: UV-Diagramm von GST-IRS-1<sup>N1</sup>, mit PKC- $\delta$  phosphoryliert und tryptisch gespalten.** 200  $\mu$ g GST-IRS-1<sup>N1</sup> wurde mit PKC- $\delta$  phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die Bande wurde mit Trypsin aus dem Gel verdaut und das Eluat über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu$ L/min getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 204 nm.

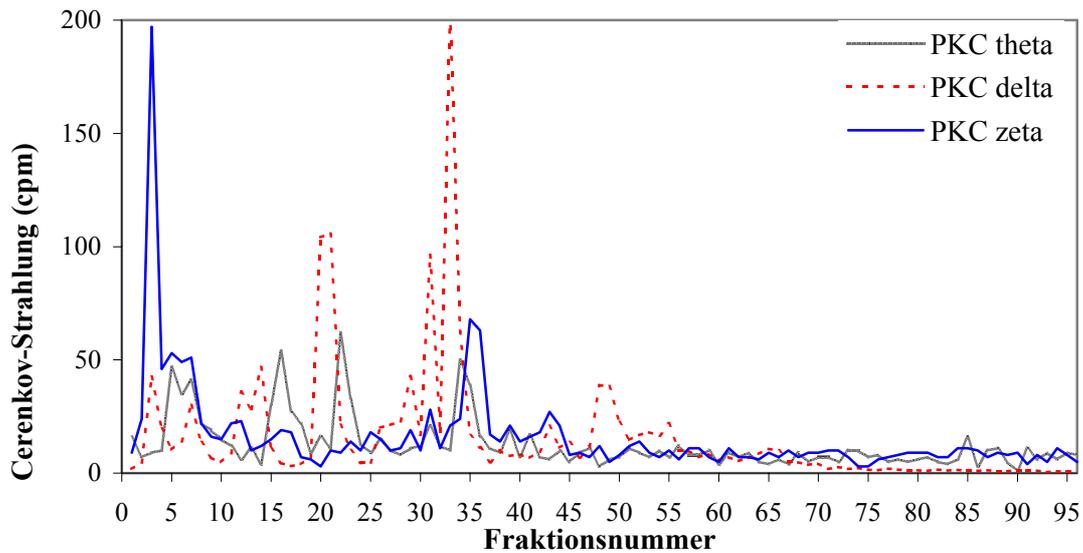
Die Abbildung 4.13 zeigt, dass die Pattern der klassischen PKC-Isoenzyme  $\alpha$ ,  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 nur geringe Unterschiede aufweisen. Das Pattern der mit PKC- $\alpha$ -phosphorylierten Probe zeigt niedrigere Peakhöhen als die der beiden anderen. Durch PKC- $\beta$ 1 wird ein zusätzliches Phosphopeptid gebildet, das bei 46 min eluiert und der Peak bei 40 min ist deutlich ausgeprägter. Im Vergleich zur UV-Aufzeichnung der eluierten Peptide in Abbildung 4.12, die hier für die PKC- $\delta$  gezeigt wird, aber bei allen PKC-Isoformen nahezu identisch ist, ist ersichtlich, dass die Phosphopeptide nur in wenigen Fraktionen eluiert werden und deutlich

hydrophiler sind als die meisten Peptide, die erst mit einem höheren Anteil an Acetonitril eluiert werden. Es ist sehr deutlich zu sehen, dass die Phosphopeptide in einem Bereich geringer UV-Absorption eluiert wurden und somit nur in geringen Mengen vorkommen.



**Abb. 4.13: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>N1</sup>, mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 phosphoryliert und tryptisch gespalten.** 200  $\mu$ g GST-IRS-1<sup>N1</sup> wurde mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 und [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die Banden wurden mit Trypsin aus dem Gel verdaut und die Eluate über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu$ L/min getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Säuleneeluat wurden in Mikrotiterplatten in 1 min Fraktionen gesammelt und im  $\beta$ -Counter Trilux 1450 MicroBeta<sup>TM</sup> Plus vermessen.

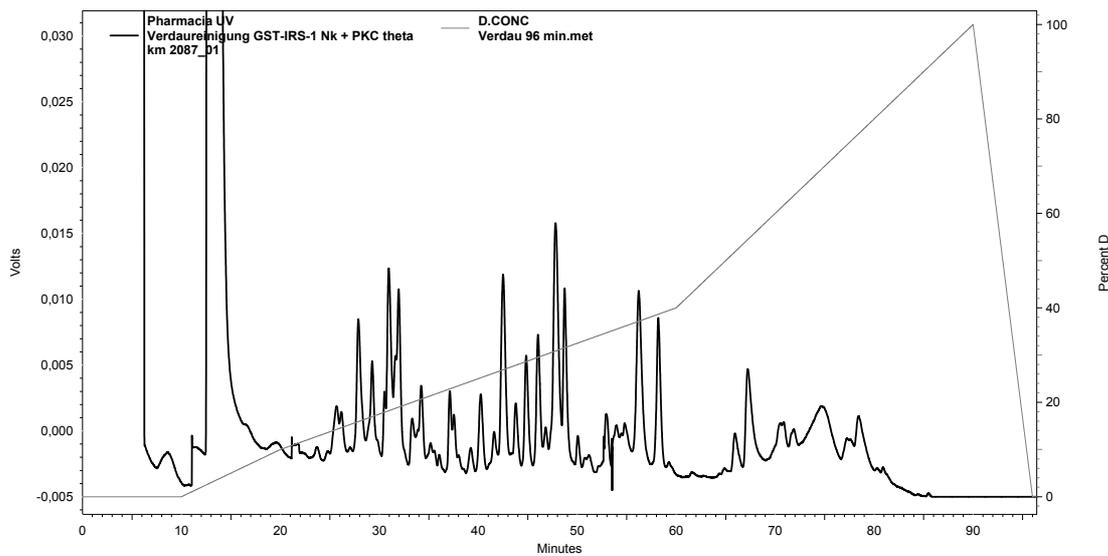
Auch bei den atypischen und neuen PKC-Isoenzymen (Abbildung 4.14) werden nahezu identische Cerenkov-Pattern erhalten. Die Signale des Verdau von GST-IRS-1<sup>N1</sup> mit PKC- $\delta$  sind intensiver und nach früheren Elutionszeiten verschoben. Bei einem Anteil von etwa 30 % System B sind alle Phosphopeptide eluiert.



**Abb. 4.14: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>N1</sup>, mit PKC- $\theta$ , - $\delta$  und - $\zeta$  phosphoryliert und tryptisch gespalten.** 200  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1<sup>N1</sup> wurde mit PKC- $\theta$ , - $\delta$  und - $\zeta$  und [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die Banden wurden mit Trypsin aus dem Gel verdaut und die Eluate über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Säuleneeluete wurden in Mikrotiterplatten in 1 min Fraktionen gesammelt und im  $\beta$ -Counter Trilux 1450 MicroBeta<sup>TM</sup> Plus vermessen.

### 4.3.2 Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>N2</sup>

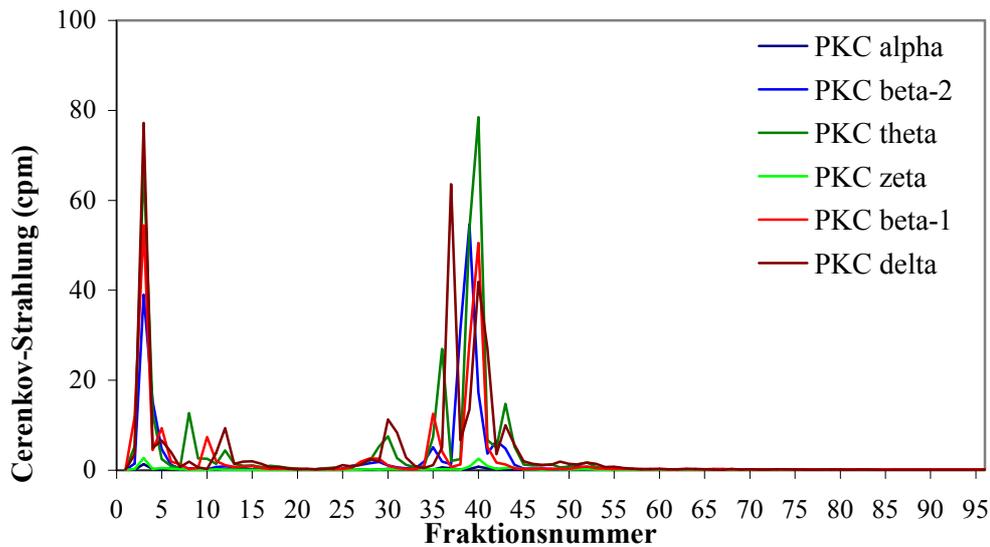
GST-IRS-1<sup>N2</sup> ist mit einem Molekulargewicht von 53,7 kDa das kleinste Fusionsprotein. Es wird von allen PKC-Isoenzyme *in vitro* am stärksten phosphoryliert (Abb. 4.11). Im UV-Spektrum der eluierten Peptide in Abbildung 4.15 ist deutlich zu erkennen, dass die Peptide zwischen 25 und 80 min eluiert werden, wohingegen die Phosphopeptide nur in den Anfangsfraktionen und in einer Fraktion zwischen 35 und 45 min eluieren (siehe Abbildung 4.16). In Abbildung 4.15 ist das UV-Diagramm von GST-IRS-1<sup>N2</sup>, phosphoryliert mit PKC- $\theta$ , wiedergegeben. Die UV-Spektren aller 6 Verdauansätze sind nahezu identisch und deswegen wird nur das Spektrum mit GST-IRS-1<sup>N2</sup> mit PKC- $\theta$  abgebildet.



**Abb. 4.15: UV-Diagramm von GST-IRS-1<sup>N2</sup>, mit PKC- $\theta$  phosphoryliert und tryptisch gespalten.** 200  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1<sup>N2</sup> wurde mit PKC- $\theta$  phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die Bande wurde mit Trypsin aus dem Gel verdaut und das Eluat über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 204 nm.

Auch die Cerenkov-Pattern aller 6 PKC-Isoenzyme in Abbildung 4.16 sind nahezu identisch. Um dieses zu verdeutlichen, wurden die Cerenkov-Pattern aller verwendeten Isoenzyme in eine Grafik aufgetragen.

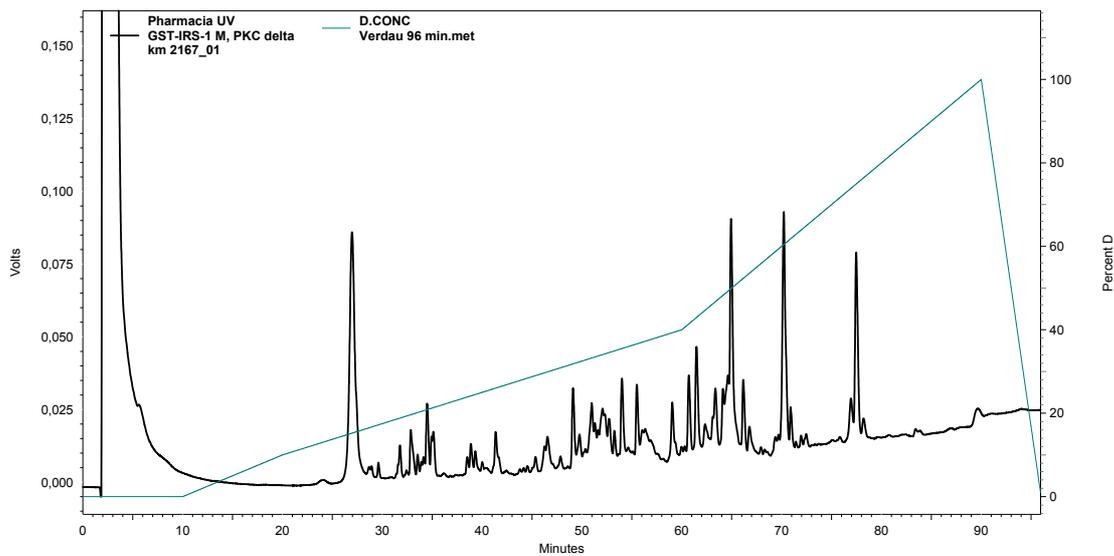
GST-IRS-1<sup>N2</sup> wurde *in vitro* von allen PKC-Isoenzymen an zwei Stellen phosphoryliert. Dabei phosphorylieren die klassischen PKC-Isoformen am schlechtesten, die neuen PKC-Isoformen phosphorylieren etwa 20 % und PKC- $\zeta$  weitere 20 % besser. Die Nebenpeaks, deren Höhen je nach Verdaubedingungen variieren, sind Modifikationen des Peptids in der Hauptfraktion (siehe Kapitel 4.4.4).



**Abb. 4.16: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>N2</sup>, mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\theta$ , - $\delta$  und - $\zeta$  phosphoryliert und tryptisch gespalten.** 200  $\mu$ g GST-IRS-1<sup>N2</sup> wurde mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\theta$ , - $\delta$  und - $\zeta$  und [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die Banden wurden mit Trypsin aus dem Gel verdaut und die Eluate über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu$ L/min getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Säuleneluate wurden in Mikrotiterplatten in 1 min Fraktionen gesammelt und im  $\beta$ -Counter Trilux 1450 MicroBeta<sup>TM</sup> Plus vermessen.

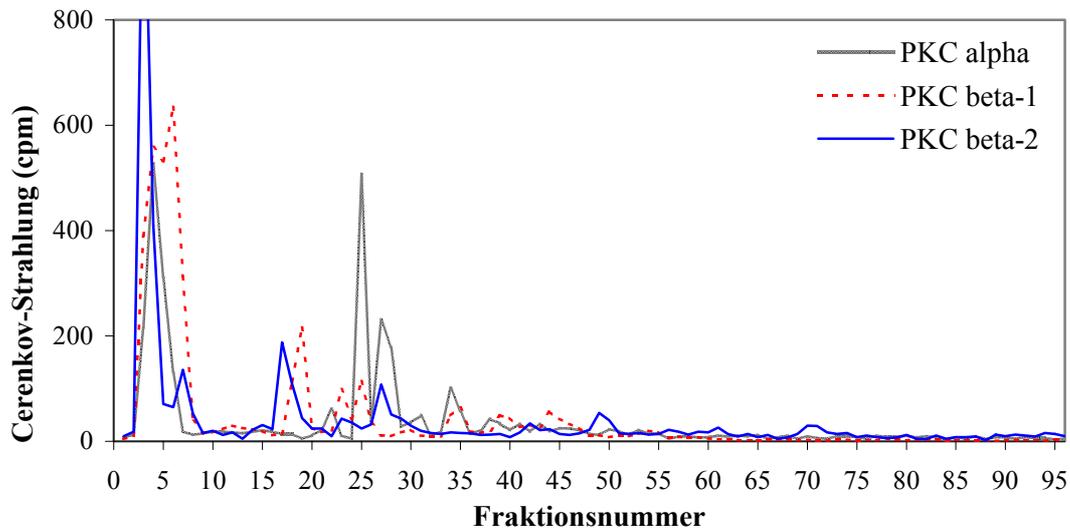
### 4.3.3 Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>M</sup>

GST-IRS-1<sup>M</sup> ist mit einem Molekulargewicht von 62,6 kDa das größte Fusionsprotein. Es wird von allen PKC-Isoenzymen *in vitro* nur schwach phosphoryliert (Abb. 4.11). Im UV-Spektrum der eluierten Peptide in Abbildung 4.17 ist deutlich zu sehen, dass die Peptide zwischen 25 und 80 min eluiert werden, wohingegen die Phosphopeptide nach 35 min vollständig eluiert sind (Abbildung 4.18).



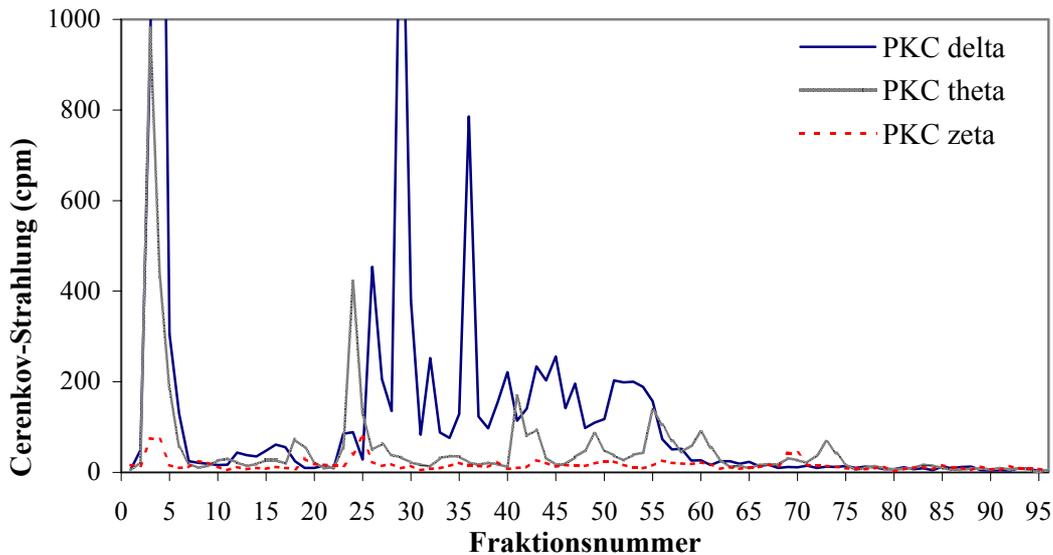
**Abb. 4.17: UV-Diagramm von GST-IRS-1<sup>M</sup>, mit PKC-δ phosphoryliert und tryptisch gespalten.** 200 µg GST-IRS-1<sup>M</sup> wurde mit PKC-δ phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die Bande wurde mit Trypsin aus dem Gel verdaut und das Eluat über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200 µL/min getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 204 nm.

Die Peptidsignale bei 214 nm sind auch hier bei allen 6 Proben nahezu identisch. Abbildung 4.17 zeigt exemplarisch den Verdau des mit PKC-δ phosphorylierten Fragments. Obwohl beim M-Fragment die Einbaurate durch PKC-α niedriger ist als durch PKC-β2, zeigt der Verdau der mit PKC-α-phosphorylierten Probe in Abbildung 4.18 prominente Peaks bei 25 und 28 min. Die Phosphopeptide, die durch die beiden PKC-Isoenzyme β1 und β2 generiert wurden, eluieren nahezu identisch, jedoch unterschiedlich zu denen, die durch PKC-α generiert wurden.



**Abb. 4.18: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>M</sup>, mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 phosphoryliert und tryptisch gespalten.** 200  $\mu$ g GST-IRS-1<sup>M</sup> wurde mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 und [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die Banden wurden mit Trypsin aus dem Gel verdaut und die Eluate über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu$ L/min getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Säuleneluate wurden in Mikrotiterplatten in 1 min Fraktionen gesammelt und im  $\beta$ -Counter Trilux 1450 MicroBeta<sup>TM</sup> Plus vermessen.

Die Einbaurate mit PKC- $\zeta$  (Abb. 4.19) ist sehr gering und es sind im Pattern auch nur drei schwache Signale bei 3, 25 und 75 min zu sehen. PKC- $\theta$  phosphoryliert ebenfalls schwach und es sind acht schwächere Signale und ein starkes Signal bei 4 min zu erkennen. Am besten wird GST-IRS-1<sup>M</sup> von PKC- $\delta$  phosphoryliert. Es wurden acht starke Phosphopeptid-Signale erhalten (Abb. 4.19). Im Gegensatz zu den beiden N-Fragmenten wird das M-Fragment von den PKC-Isoenzymen sehr viel heterogener phosphoryliert. Es entstehen auch Phosphopeptide, die hydrophober sind und somit später eluieren.

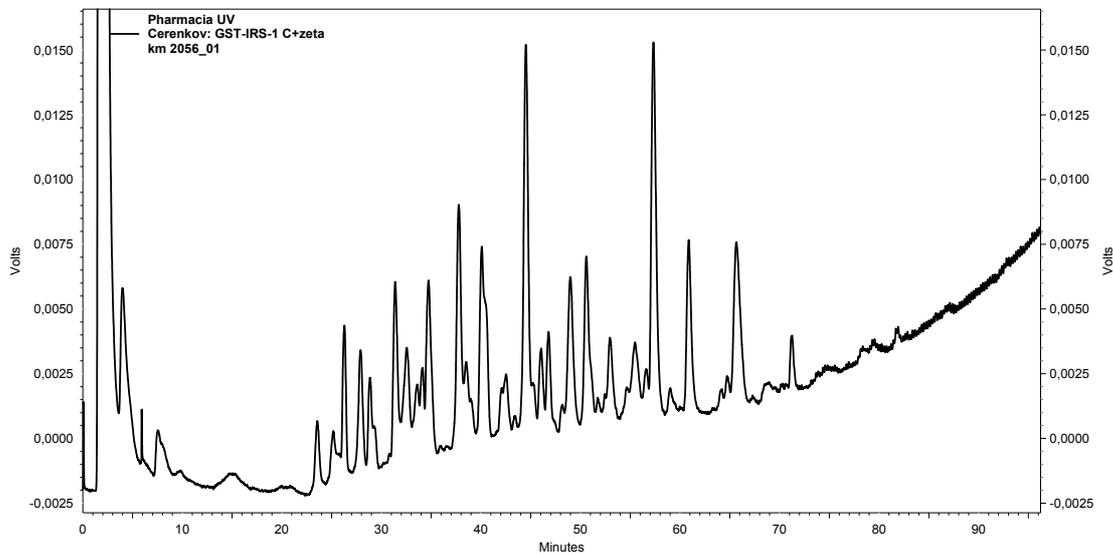


**Abb. 4.19: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>M</sup>, mit PKC- $\theta$ , - $\delta$  und - $\zeta$  phosphoryliert und tryptisch gespalten.** 200  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1<sup>M</sup> wurde mit PKC- $\theta$ , - $\delta$  und - $\zeta$  und [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die Banden wurden mit Trypsin aus dem Gel verdaut und die Eluate über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Säuleneluate wurden in Mikrotiterplatten in 1 min Fraktionen gesammelt und im  $\beta$ -Counter Trilux 1450 MicroBeta<sup>TM</sup> Plus vermessen.

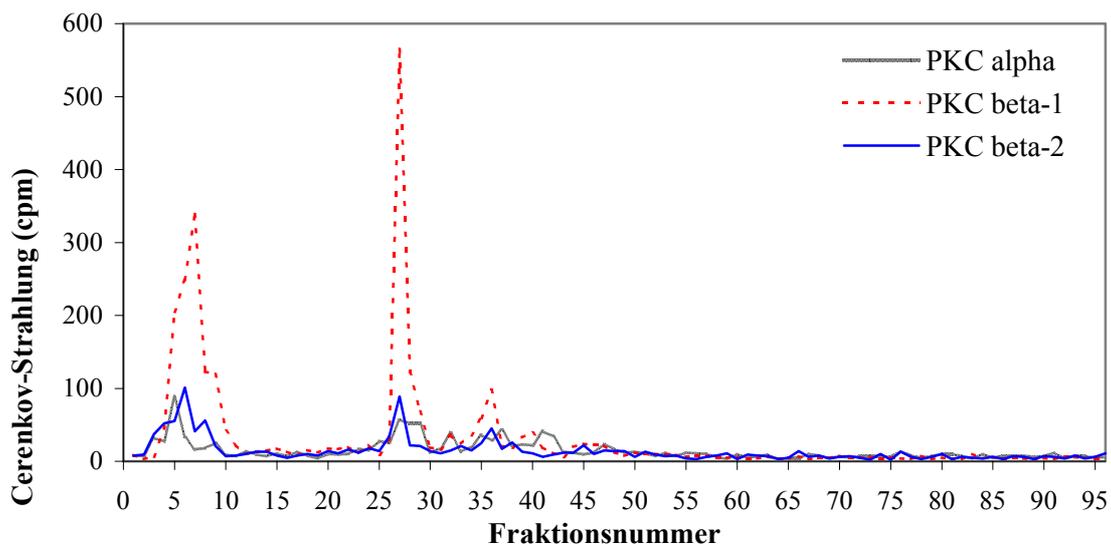
#### 4.3.4 Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>C</sup>

GST-IRS-1<sup>C</sup> wird von allen PKC-Isoenzymen *in vitro* nur schwach phosphoryliert (Abb. 4.11). Im UV-Spektrum der eluierten Peptide in Abbildung 4.20 ist zu erkennen, dass die Peptide zwischen 25 und 75 min eluieren, wohingegen die Phosphopeptide nach 55 min vollständig eluiert sind (Abbildung 4.21 und 4.22). Auch hier sind die UV-Spektren der mit verschiedenen PKC-Isoformen phosphorylierten und tryptisch verdauten Fragmente nahezu identisch. In Abbildung 4.20 wurde exemplarisch das Spektrum der mit PKC- $\zeta$  phosphorylierten Probe wiedergegeben. Vergleicht man die Cerenkov-Pattern in Abbildung 4.21 so fällt auf, dass beim Verdau des mit PKC- $\beta$ 1 phosphorylierten

Fragments ein Phosphopeptid generiert wird, das bei 27 min eluiert und dessen Phosphateinbau etwa 9 mal höher ist, als bei den beiden anderen Eluaten.



**Abb. 4.20: UV-Diagramm von GST-IRS-1<sup>C</sup>, mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert und tryptisch gespalten.** 200  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1<sup>C</sup> wurde mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die Bande wurde mit Trypsin aus dem Gel verdaut und das Eluat über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 204 nm.

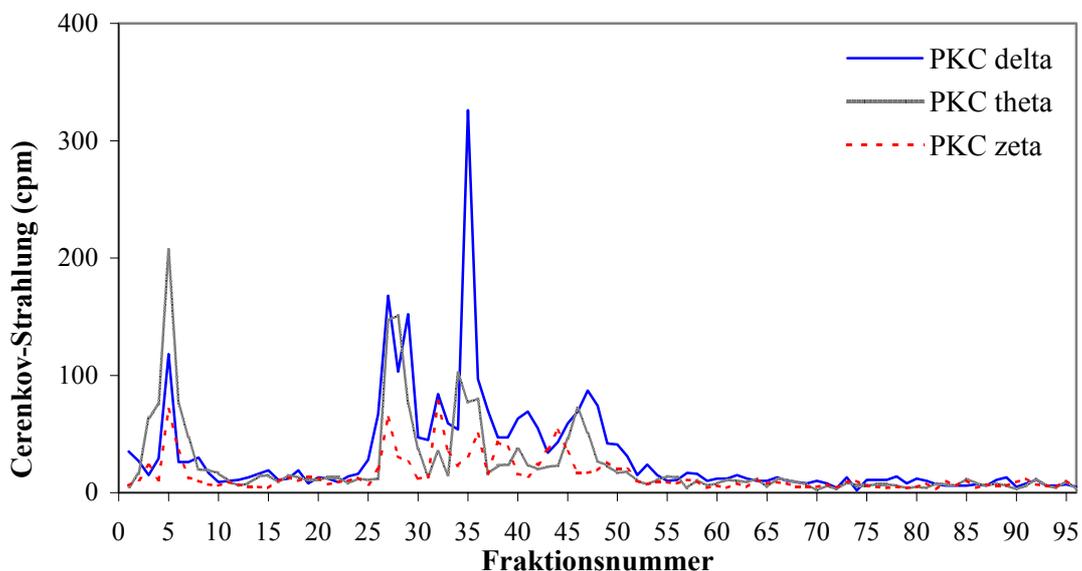


**Abb. 4.21: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>C</sup>, mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 phosphoryliert und tryptisch gespalten.** 200  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1<sup>C</sup> wurden mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 und [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt.

Die Banden wurden mit Trypsin aus dem Gel verdaut und die Eluate über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Säuleneluate wurden in Mikrotiterplatten in 1 min Fraktionen gesammelt und im  $\beta$ -Counter Trilux 1450 MicroBeta<sup>TM</sup> Plus vermessen.

Bei der Bestimmung der Einbaurrate (Abbildung 4.11) wird durch PKC- $\beta$ 1 jedoch nur die 2,5fache Menge an Radioaktivität eingebaut.

Bei den Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>C</sup>, phosphoryliert mit neuen und atypischen PKC-Isoformen in Abbildung 4.22 sind deutlich mehr und intensivere Phosphopeptide zu erkennen.



**Abb. 4.22: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>C</sup>, mit PKC- $\theta$ , - $\delta$  und - $\zeta$  phosphoryliert und tryptisch gespalten.** 200  $\mu\text{g}$  GST-IRS-1<sup>C</sup> wurden mit PKC- $\theta$ , - $\delta$  und - $\zeta$  und [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die Banden wurden mit Trypsin aus dem Gel verdaut und die Eluate über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Säuleneluate wurden in Mikrotiterplatten in 1 min Fraktionen gesammelt und im  $\beta$ -Counter Trilux 1450 MicroBeta<sup>TM</sup> Plus vermessen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Cerenkov-Pattern, die durch Phosphorylierung von GST-IRS-1-Fragmenten mit verschiedenen PKC-

Isoformen generiert wurden, sehr ähnlich sind. Im N2-Fragment phosphorylieren alle PKC-Isoenzyme identische Serin- oder Threoninreste. PKC- $\beta$ 1 generiert im N1- und im C-Fragment Phosphopeptide, die von den anderen PKC-Isoenzymen nicht oder nur sehr wenig phosphoryliert werden. Ein ähnlicher Befund wird für das durch PKC- $\alpha$ -phosphorylierte M-Fragment gefunden. PKC- $\delta$  katalysiert bei allen vier Fragmenten die besten Einbauraten, wodurch auch eine größere Anzahl von Phosphopeptiden als bei den anderen Isoformen detektierbar sind. In Tabelle 4.6 sind die mit Hilfe der Cerenkov-Pattern geschätzten Gesamtzahlen der Phosphopeptide aufgeführt.

**Tabelle 4.6: Anzahl der Cerenkov-Peaks bestimmt anhand der Cerenkov-Pattern der vier Fusionsproteine von IRS-1, phosphoryliert mit 6 PKC-Isoformen.** Die erste Zahl gibt die Menge der Hauptpeaks, die zweite die Menge der Nebenpeaks an.

	$\alpha$		$\beta$ 1		$\beta$ 2		$\theta$		$\delta$		$\zeta$	
GST-IRS-1 <sup>N1</sup>	0	3	2	4	1	3	0	4	3	4	1	1
GST-IRS-1 <sup>N2</sup>	0	3	2	2	2	2	2	4	3	3	1	1
GST-IRS-1 <sup>M</sup>	2	2	1	3	1	3	3	4	1	3	0	3
GST-IRS-1 <sup>C</sup>	0	2	2	1	0	2	2	2	2	3	0	4
Summe	2	10	7	10	4	10	7	14	9	13	2	9

Dabei werden durch PKC- $\zeta$  im gesamten IRS-1 nur 2 intensiv phosphorylierte und neun schwach phosphorylierte Peptide generiert. Durch die neuen PKC-Isoformen  $\delta$  und  $\theta$  werden am meisten Peptide generiert.

#### 4.4 Identifizierung von Serin<sup>318</sup> als *in vitro*-Phosphorylierungsstelle von IRS-1

Als Standard zum Nachweis und zur Identifizierung von Phosphorylierungsstellen wird die radioaktive Phosphorylierung mit [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP verwendet. Radioaktivität stellt neben den bekannten Gefahren auch ein hohes Risiko für den Detektor im Massenspektrometer dar. Im Rahmen dieser Dissertation wurde in unserer Arbeitsgruppe eine MS-Technik entwickelt, mit der auf den Einsatz von

Radionukliden zur Detektion und Sequenzaufklärung von Phosphopeptiden verzichtet werden konnte [153;154].

Nach Abbildung 4.11 ist das GST-IRS-1<sup>N2</sup>-Fragment die Hauptstelle für *in vitro*-Phosphorylierungen aller verwendeten Fusionsproteine. Die aktivste PKC-Isoform war dabei die PKC- $\zeta$ . Zur Aufklärung der Lokalisierung der phosphorylierten Stelle wurden 200  $\mu\text{g}$  (7,5 nMol) GST-IRS-1<sup>N2</sup> mit 640 mU PKC- $\zeta$  phosphoryliert. Mit der klassischen PKC- $\beta$ 1 und der neuen PKC- $\delta$  wurden entsprechende Versuche durchgeführt. Die genaue Durchführung wird in Kap. 3.3.9 beschrieben. Die Proben wurden über SDS-PAGE getrennt, mit Coomassie Blue gefärbt und tryptisch aus dem Gel verdaut ( Kap 3.3.6).

#### 4.4.1 Phosphorylierungskontrolle mit „MARCKS-PSD-Peptid“

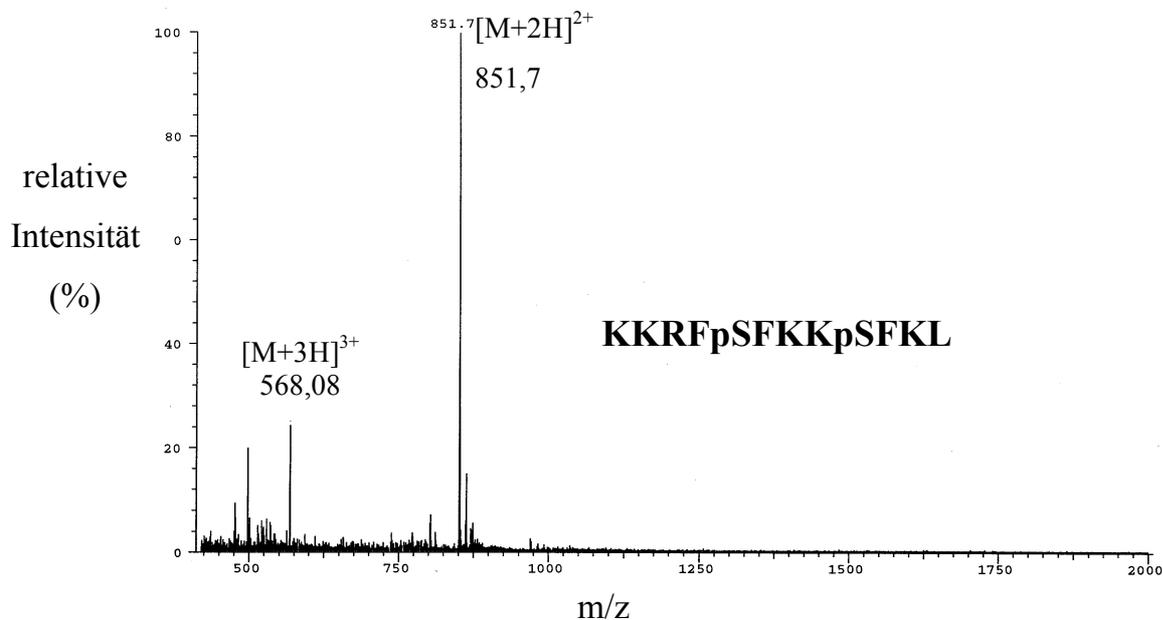
Bei der Analyse phosphorylierter Proteine mit Radionukliden hat man ein einfaches Werkzeug zur Kontrolle der einzelnen Arbeitsschritte. Um die Phosphorylierung bei „kalten“ Experimenten überprüfen zu können, wurde ein Assay mit MARCKS-„phosphorylation site-derived“ (PSD) Peptid als Substrat durchgeführt. MARCKS-PSD hat die Sequenz H-Lys-Lys-Arg-Phe-Ser-Phe-Lys-Lys-Ser-Phe-Lys-Leu-OH mit einem MG von 1542,9 D. Die Assays wurden 1:10 (v/v) mit 0,5 % TFA abgebrochen und direkt über  $\mu\text{HPLC-ESI-MS}$  analysiert. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass bis auf PKC- $\iota$ , alle PKC-Isoformen das MARCKS-Peptid an den Serinresten 5 und 9 sehr schnell quantitativ phosphorylieren [131]. Unvollständige Phosphorylierung oder selektive Phosphorylierung an einem der beiden Serinresten ist ein Zeichen für schwache PKC-Aktivität oder Aktivierung. In der Tabelle 4.7 sind die Massen (m/z) aufgeführt, die bei der Fragmentierung des unphosphorylierten, des an einem und an zwei Serinresten phosphorylierten Peptids gebildet werden.

Marcks-PSD-Peptid wurde 30 min mit dem jeweiligen PKC-Isoenzym unter Standardbedingungen (30  $\mu\text{L}$  Assaypuffer pH 7,5; 10  $\mu\text{L}$  (7,5 $\mu\text{g}$ ) Substratlösung; 5  $\mu\text{L}$  PKC-Lösung (64 mU) und 5  $\mu\text{L}$  ATP (100  $\mu\text{M}$ )) phosphoryliert, mit TFA angesäuert und über online- $\mu\text{LC/ESI-MS}$  am TSQ700 analysiert. Die Abbildung

4.23 zeigt das über das UV-Signal (Retentionszeit des Peptids lag bei 23,5 min) aufsummierte Massenspektrum eines vollständig phosphorylierten Peptids.

**Tabelle 4.7: Molekülmassen/Ladungszahl, die bei der Fragmentierung von „MARCKS-PSD“ Peptid entstehen.** Das Peptid (H-Lys-Lys-Arg-Phe-Ser-Phe-Lys-Lys-Ser-Phe-Lys-Leu-OH ) hat die Masse 1543,9 Da, das 1 x phosphorylierte Peptid 1623,8 Da und das 2 x phosphorylierte 1703,7 Da.

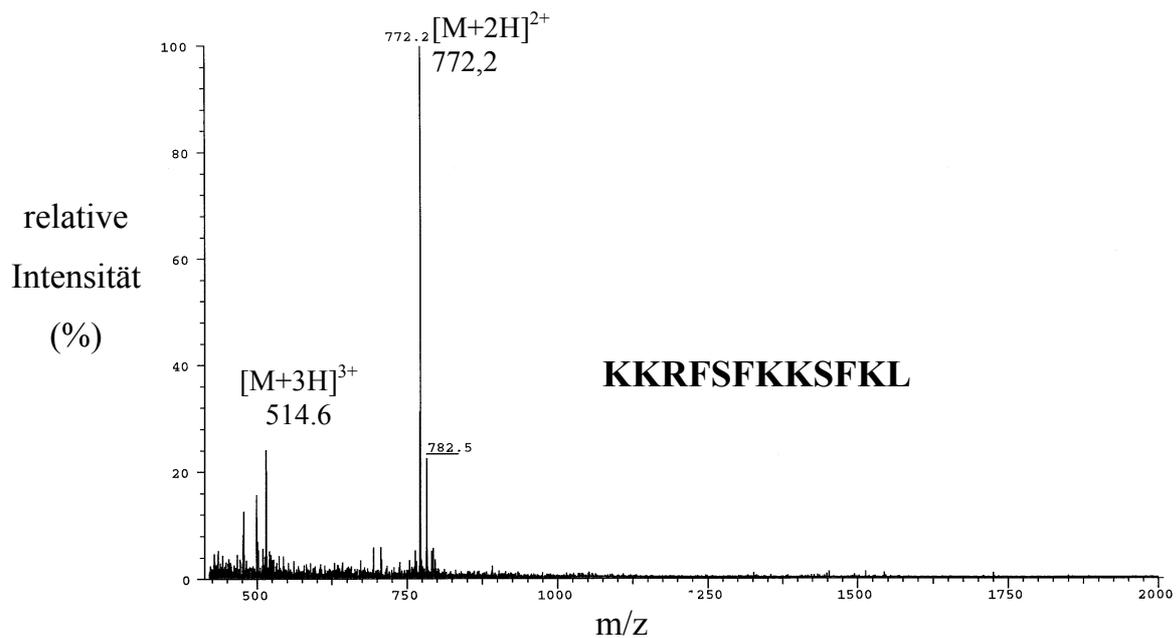
	unphosphoryliert	1 x phosphoryliert	2 x phosphoryliert
$[M + 2 H]^{2+}$	771,8	812,05	851,8
$[M + 3 H]^{3+}$	515,3	541,9	568,6



**Abb. 4.23: Positiv-Ionen- $\mu$ LC/ESI-MS-Analyse (TSQ 700) von „MARCKS-PSD“ Peptid, das 30 min mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert wurde.** Über das Signal im UV-Chromatogramm (Retentionszeit bei 23,5 min) aufsummiertes ESI-Massenspektrum mit Zuordnung der Peptidmassen: 2 x phosphoryliertes Peptid KKRFpSFKKpSFKL  $[M+2H]^{2+}$  bei m/z 851,7;  $[M+3H]^{3+}$  bei m/z 568,08. Bedingungen: LC: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300  $\mu$ m ( $C_{18}$ ); Flussrate 5  $\mu$ L/min; Elutionsmittel: Puffer A: 0,05 % TFA in Wasser; Puffer B: 80 % ACN/ 0,05 % TFA in Wasser; Gradient: 5-95 % B in 40 min; UV-Detektion  $\lambda = 214$  nm („Bubble“-Zelle, ca. 150  $\mu$ m I.D.); Injektion: Probe gelöst in 10  $\mu$ L 5 % B; Standard-ESI-Quelle; 50  $\mu$ m I.D. „fused silica“-ESI-Kapillare; -4,5 kV ESI-Spannung; Positiv-Ionenmodus; 5  $\mu$ L/min, sheath-Flüssigkeit (70 % MeOH in Wasser); Q1 Scan im Bereich von 450-2000 m/z in 3 sec.

Die Zweifachladung des zweifach phosphorylierten Peptids erscheint bei  $m/z$  851,7, die Dreifachladung bei  $m/z$  568,08. Die Abweichungen von den theoretischen Massen in Tabelle 4.7 kommen durch die Ungenauigkeit des TSQ700 zustande.

Mit dem nicht phosphorylierten Assayblank wurde dieselbe Prozedur durchgeführt und das Spektrum in Abbildung 4.24 erhalten.

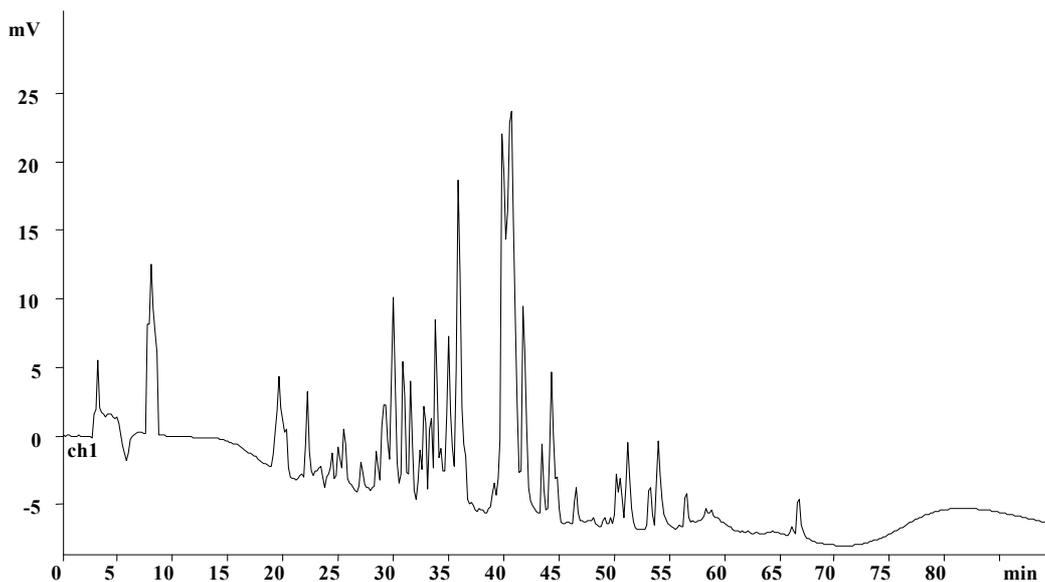


**Abb. 4.24: Positiv-Ionen- $\mu$ LC/ESI-MS-Analyse (TSQ 700) von „MARCKS-PSD“ Peptid.** Über das Signal im UV-Chromatogramm (Retentionszeit bei 25 min) aufsummiertes ESI-Massenspektrum mit Zuordnung der Peptidmassen: nicht-phosphoryliertes Peptid KKRFpSFKKpSFKL  $[M+2H]^{2+}$  bei  $m/z$  772,2,  $[M+3H]^{3+}$  bei  $m/z$  514,6. Bedingungen: LC: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300  $\mu$ m ( $C_{18}$ ); Flussrate 5  $\mu$ L/min; Elutionsmittel: Puffer A: 0,05 % TFA in Wasser; Puffer B: 80 % ACN, 0,05 % TFA in Wasser; Gradient: 5-95 % B in 40 min; UV-Detektion  $\lambda = 214$  nm („Bubble“-Zelle, ca. 150  $\mu$ m I.D.); Injektion: Probe gelöst in 10  $\mu$ L 5 % B; Standard-ESI-Quelle; 50  $\mu$ m I.D. „fused silica“-ESI-Kapillare; -4,5 kV ESI-Spannung; Positiv-Ionenmodus; 5  $\mu$ L/min, sheath-Flüssigkeit (70 % MeOH in Wasser); Q1 Scan im Bereich von 450-2000  $m/z$  in 3 sec.

In dem Spektrum der nicht phosphorylierten Probe erscheint bei  $m/z$  772,2 der zweifach und bei  $m/z$  514,6 der dreifach geladene Massenpeak des nicht-phosphorylierten Peptids.

#### 4.4.2 Verdaukontrolle

GST-IRS-1<sup>N2</sup> wurde *in vitro* mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert, elektrophoretisch gereinigt und im Gel verdaut. 50 pMol (1,3  $\mu$ g) des mit TFA angesäuerten Verdau wurde durch folgende Bedingungen getrennt: HPLC-Pumpe: Eldex MicroPro; Säule: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300  $\mu$ m (C<sub>18</sub>); Flussrate 5  $\mu$ L/min; Elutionsmittel: Puffer A: 0,05 % TFA in Wasser; Puffer B: 80 % ACN, 0,05 % TFA in Wasser; Gradient: 0-10 min 5 % B, 10 bis 20 min 30 % B, 20-60 min 80 % B, 60-80 min 95 % B; UV-Detektion  $\lambda = 214$  nm („Bubble“-Zelle, ca. 150  $\mu$ m I.D.); Injektion: Probe gelöst in 10  $\mu$ L 5 % B. Das HPLC-Chromatogramm der Verdaukontrolle in Abbildung 4.25 zeigt die Effizienz der tryptischen Spaltung; nicht verdautes Protein wird als breiter Peak nach 60-70 min eluiert.

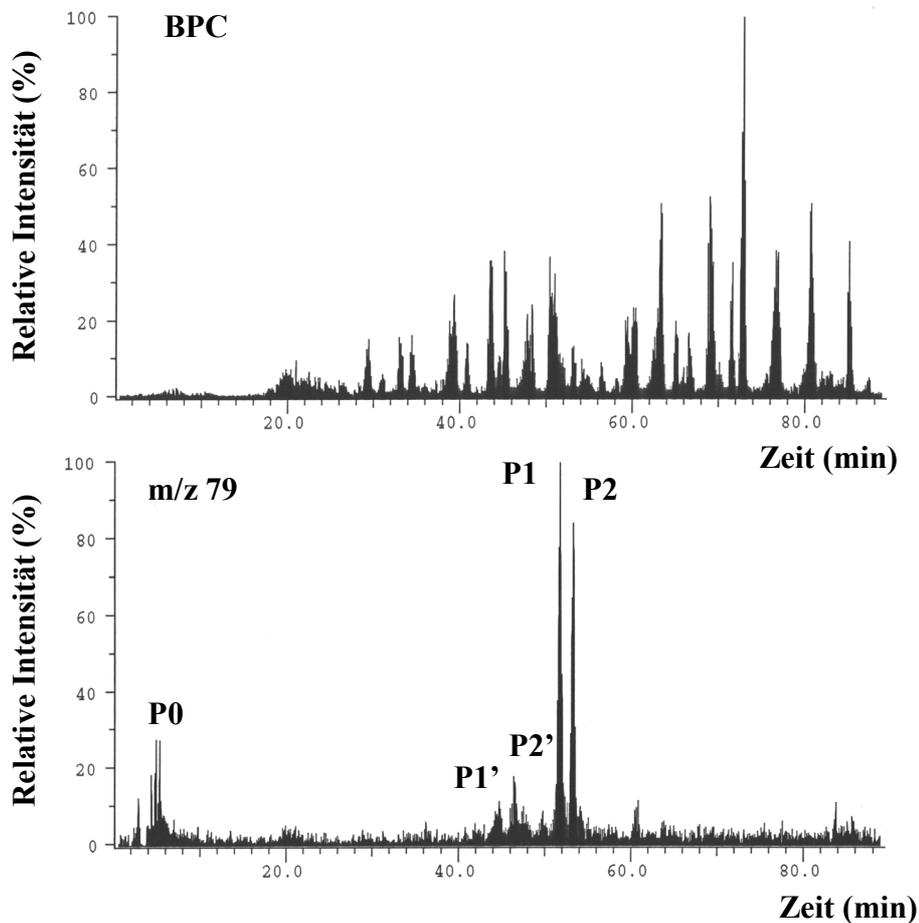


**Abb. 4.25: Verdaukontrolle von tryptisch gespaltenen GST-IRS-1<sup>N2</sup>, *in vitro* mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert.** 50 pMol GST-IRS-1<sup>N2</sup> wurde mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und die Coomassie gefärbte Bande wurde tryptisch aus dem Gel verdaut. Der angesäuerte Verdau wurde durch folgende Bedingungen getrennt: HPLC-Pumpe: Eldex MicroPro; Säule: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300  $\mu$ m (C<sub>18</sub>); Flussrate 5  $\mu$ L/min; Elutionsmittel: Puffer A: 0,05 % TFA in Wasser; Puffer B: 80 % ACN, 0,05 % TFA in Wasser; Gradient: 0-10 min 5 % B, 10 bis 20 min 30 % B, 20-60 min 80 % B, 60-80 min 95 % B; UV-Detektion  $\lambda = 214$  nm („Bubble“-Zelle, ca. 150  $\mu$ m I.D.); Injektion: Probe gelöst in 10  $\mu$ L 5 % B.

#### 4.4.3 Detektion von Phosphopeptiden durch alkalische Negativ-Ionen $\mu$ LC/ES-API-CID-MS-Hybrid Scan Technik

GST-IRS-1<sup>N2</sup> wurde *in vitro* mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert, elektrophoretisch gereinigt und im Gel verdaut. 25 pMol des Verdaus (667 ng) wurden durch folgende Bedingungen getrennt: HPLC-Pumpe: Eldex MicroPro; Säule: Zorbax-Extend (120 mm x 300 $\mu$ m); Flussrate 5  $\mu$ L/min; Elutionsmittel: Puffer A: H<sub>2</sub>O pH 10,3 (NH<sub>3</sub>); Puffer B: 80 % ACN in H<sub>2</sub>O pH 10,3 (NH<sub>3</sub>); Gradient: 0-10 min 3 % B, 10 bis 130 min 60 % B. Die Probe wurde in 2  $\mu$ L System A gelöst und über ein Rheodyne 8125 Injektionsventil direkt auf die Säule injiziert. Dem HPLC-Eluenten wurde über ein Mikro-T-Stück Methanol mit einem Fluss von 1  $\mu$ L/min dazugemischt („sheath-flow“), um stabile Spraybedingungen zu erhalten. Durch ein zweites T-Stück wurde der Eluent aufgetrennt, so dass  $\frac{2}{3}$  manuell fraktioniert und der Rest direkt über ein 30  $\mu$ m PicoTip in das ESI Triple Quadrupol-MS infundiert wurde.

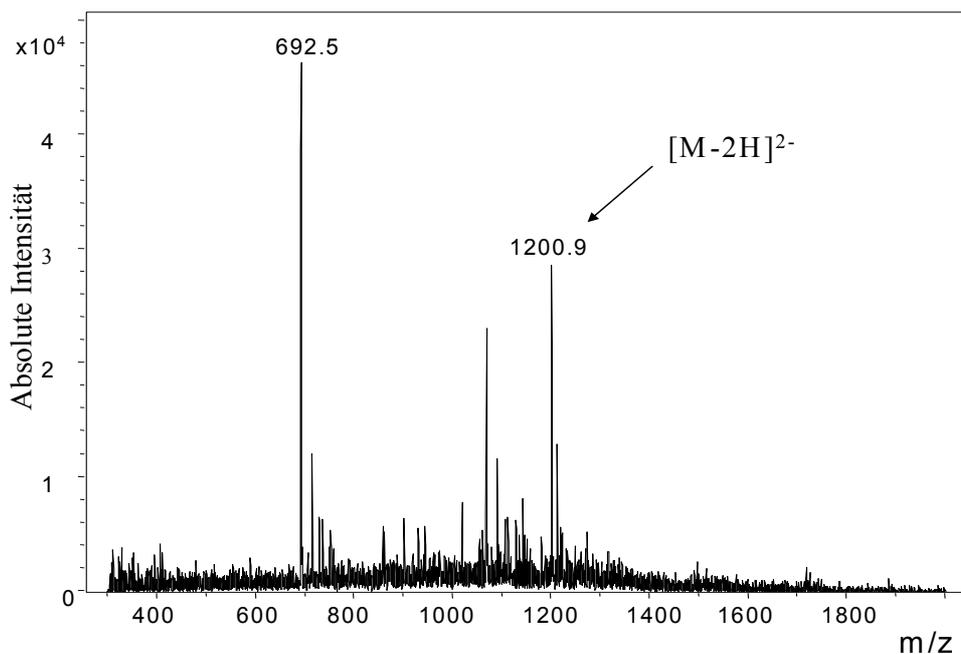
Der obere Teil von Abbildung 4.26 zeigt das Basis-Peak-Chromatogramm (BPC), in dem die Komplexität der Verdaumischung deutlich wird. Die phosphospezifische Markerspur im unteren Teil der Abbildung, bei der nur  $m/z$  79 (=PO<sub>3</sub><sup>-</sup>) detektiert wird, zeigt zwei ausgeprägte Peaks (P1 und P2) mit einem Verhältnis von Signal zu Rauschen von über 20. Außerdem wurden drei schwächere Peaks mit einem Signal- zu Rauschen-Verhältnis unter fünf detektiert. Diese Peaks wurden im Spektrum als P0, P1' und P2' bezeichnet. Der direkte Vergleich mit dem Basis-Peak-Chromatogramm zeigt, dass die intensivsten Peaks der Markerspur im BPC nur als schwache Peaks zu sehen sind.



**Abb. 4.26: Alkalische Negativ-Ionen  $\mu$ LC/ES-API-CID-MS Hybridscan-Analyse am Finnigan TSQ 700 von 25 pMol des tryptischen Verdaus von GST-IRS-1<sup>N2</sup> *in vitro* phosphoryliert mit PKC- $\zeta$ .** GST-IRS-1<sup>N2</sup> wurde *in vitro* mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert, elektrophoretisch gereinigt und im Gel verdaut. 25 pMol des Verdaus (667 ng) wurden durch folgende Bedingungen getrennt: HPLC-Pumpe: Eldex MicroPro; Säule: Zorbax-Extend (120 mm x 300 $\mu$ m); Flussrate 5  $\mu$ L/min; Elutionsmittel: Puffer A: H<sub>2</sub>O pH 10,3 (NH<sub>3</sub>); Puffer B: 80 % ACN in H<sub>2</sub>O pH 10,3 (NH<sub>3</sub>); Gradient: 0-10 min 3 % B, 10 bis 130 min 60 % B. Die Probe wurde in 2  $\mu$ L System A gelöst und über ein Rheodyne 8125 Injektionsventil direkt auf die Säule injiziert. Die obere Abbildung zeigt das Basis-Peak-Chromatogramm (BPC), die untere die phosphospezifische Marker-Spur mit m/z von 79, was dem Verlust von negativ geladenen PO<sub>3</sub><sup>-</sup> entspricht (entnommen aus unserer Veröffentlichung [153]).

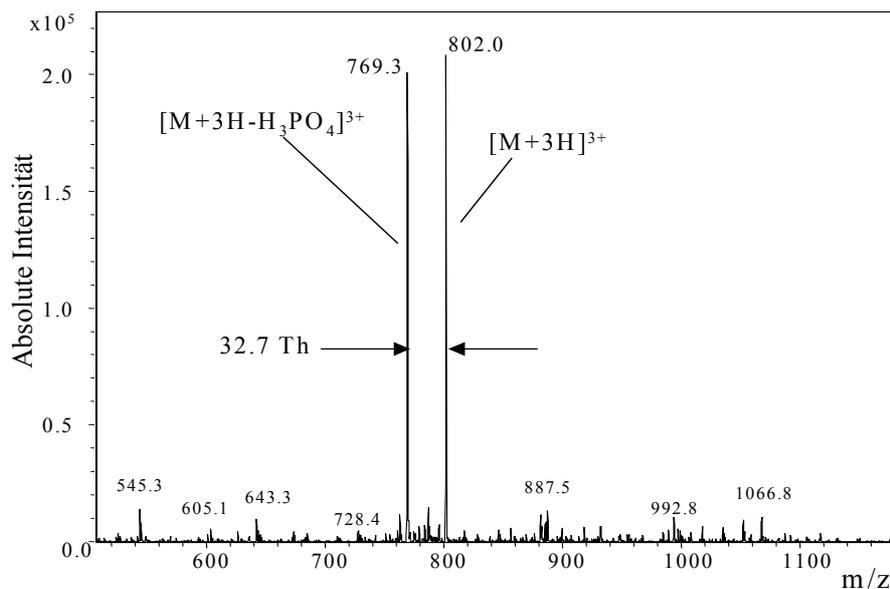
#### 4.4.4 Sequenzierung der tryptischen Phosphopeptide aus GST-IRS-1<sup>N2</sup>, das mit PKC- $\zeta$ phosphoryliert wurde, durch Nanospray-Ionenfallen-MS-Analyse

Die Fraktion P2 (siehe Kapitel 4.4.3 und Abbildung 4.26) wurde zur Sequenzierung durch das Ionenfallen-Massenspektrometer verwendet. Im Negativ-Ionenübersichtsspektrum der Fraktion P2 in Abbildung 4.27 wurde das Signal bei  $m/z$  1200,9 als  $[M-2H]^{2-}$  Molekülionensignal detektiert. Dieses Signal entspricht dem zweifach geladenen Molekülion des einfach phosphorylierten Peptids S<sup>298</sup>RTESITATSPASMVGGKPGSFR<sup>320</sup>, das der Aminosäuresequenz 298-320 von IRS-1 entspricht.



**Abb. 4.27: Offline Ionenfallen-Negativ-Ionenspektrum (Esquire 3000<sup>Plus</sup> Ionenfallen-MS) der Phosphopeptid-Fraktion P2 (Abb.4.26) des tryptischen Verdau von 25 pMol GST-IRS-1<sup>N2</sup> *in vitro* phosphoryliert mit PKC- $\zeta$ . Die mit alkalischer Negativ-Ionen  $\mu$ LC/ES-API-CID-MS Hybridscan-Analyse detektierte Fraktion P2 wurde nach Trocknen in 3  $\mu$ L Methanol/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) mit 0,5 % Ameisensäure aufgenommen und über Nano-Elektrospraynadeln über eine Offline NanoES-Quelle in die Esquire3000<sup>Plus</sup> Ionenfalle appliziert. Das zweifach negativ geladene Molekülion erscheint bei  $m/z$  1200,9.**

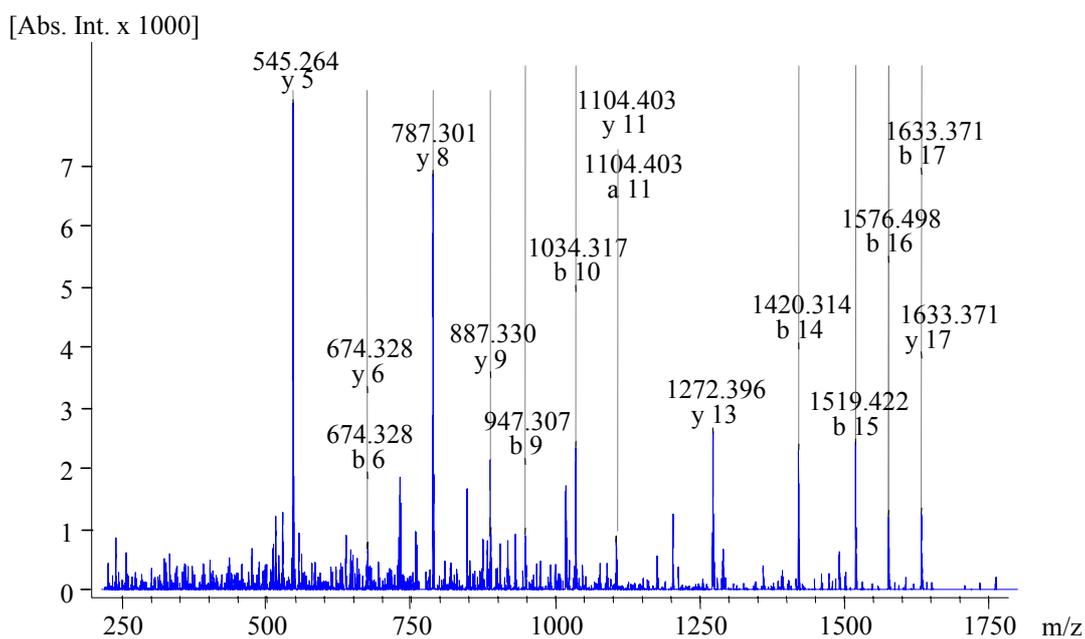
Bei dem Peptid handelt es sich um ein fehlgeschnittenes Peptid, da die theoretische Schnittstelle beim Argininrest an Position 2 der Sequenz von Trypsin nicht gespalten wurde. Dieses Peptid enthält fünf Serinreste und drei Threoninreste. Um die relevante Phosphorylierungsstelle zu identifizieren, muss das Peptid mittels MS sequenziert werden. Dazu wurde das Massenspektrometer in den Positiv-Modus umgeschaltet und direkt das dreifach geladene Molekülion ( $[M+3H]^{3+}$ ) in der Ionenfalle isoliert und fragmentiert. Der Positiv-Modus wurde verwendet, da tryptische Peptide C-terminal eine basische Aminosäure enthalten, wodurch die aus dem Peptid gebildeten Vorläuferionen sehr effizient fragmentieren und somit einfach zu interpretierende Ionenserien bilden [175]. Das Molekülion erscheint bei  $m/z$  802,0 (Abbildung 4.28).



**Abb. 4.28: Offline Ionenfallen-Positiv-Ionen-MS<sup>2</sup>-Spektrum der Phosphopeptid-Fraktion P2 (Abb. 4.2.6) des tryptischen Verdaus von 25 pMol GST-IRS-1<sup>N2</sup> *in vitro* phosphoryliert mit PKC- $\zeta$ .** Das dreifach positiv geladene Molekülion erscheint bei  $m/z$  802,0 und das daraus durch Neutralverlust entstandene Fragment bei  $m/z$  769,3. Der Neutralverlust beträgt  $98/3$ , also 32,7 Th.

Durch die  $\beta$ -Eliminierung von Phosphorsäure als Neutralion ( $H_3PO_4$ ) wurde ein intensives Fragmention bei  $m/z$  769,3 gebildet (Abb. 4.28). Der Massenverlust zum Elternion beträgt  $98/3$  ( $=H_3PO_4/3$ ), was 32,7 Th entspricht. Die Einheit

Thomson entspricht dem Molekulargewicht des geladenen Moleküliions geteilt durch die Ladung. Das Fragmentation wurde in der Ionenfalle isoliert und erneut fragmentiert. Durch das bei diesem MS<sup>3</sup>-Experiment entstandene Fragmentierungsmuster (Abb. 4.29) konnte anhand der y- und b-Ionen die phosphorylierte Aminosäure eindeutig zugeordnet werden. Y- und b-Ionen entstehen, indem das Peptid durch Spaltung der Säureamidbindung fragmentiert wird. Dabei bilden sich Ionen mit positiver Ladung am aminoterminalen (b-Ionen) oder am carboxyterminalen (y-Ionen) Ende [176].



**Abb. 4.29: Produkt-Ionen-Spektrum (MS<sup>3</sup>-Experiment) des Fragmentations bei m/z 769,3, das durch Gasphasendephosphorylierung von H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aus dem Elternion mit m/z 802,0 entstanden war [153]. Die b- und y-Ionen wurden gekennzeichnet.**

Die automatische Auswertung erfolgte mit der Software BioTools (Bruker Daltonics, Bremen). Während der Gasphasendephosphorylierung entsteht aus pSer durch die Abspaltung von Phosphorsäure Dehydroalanin [155;156]. Die Auswertung zeigt zweifelsfrei, dass GST-IRS-1<sup>N2</sup> an Serin<sup>318</sup> *in vitro* durch PKC- $\zeta$  phosphoryliert wird. Der tryptische Verdau generierte somit das Peptid **S**<sup>298</sup>**RTESITATSPAS**MVGGKPG**pSFR**<sup>320</sup>. Dieses Peptid enthält acht phosphorylierbare Aminosäuren und so wurde zur Kontrolle eine manuelle Fragmentierung der anderen theoretischen Phosphopeptide mit der Software GPMW 5.0 durchgeführt, die in Tabelle 4.8 aufgeführt ist.

**Tabelle 4.8: Theoretische Fragmentierung des Peptids S<sup>298</sup>RTESITATSPASMGKPGSFR<sup>320</sup>.** Das Peptid wurde mit Hilfe der Software GPMW 5.0 theoretisch fragmentiert. In der ersten Spalte sind die theoretisch möglichen phosphorylierten Aminosäuren aufgeführt. In den Spalten dahinter stehen die bei der Sequenzierung dieser Peptide gebildeten y- und b-Ionen. Die Fragmente, die nur durch pSer<sup>318</sup> entstehen können, wurden grau unterlegt.

	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11
S <sup>298</sup>	70,03	226,13	327,18	456,22	543,25	656,34	757,38	828,42	929,47	1016,50	1113,55
T <sup>300</sup>	88,04	244,14	327,18	456,22	543,25	656,34	757,38	828,42	929,47	1016,50	1113,55
S <sup>302</sup>	88,04	244,14	345,19	474,23	543,25	656,34	757,38	828,42	929,47	1016,50	1113,55
T <sup>304</sup>	88,04	244,14	345,19	474,23	561,26	674,35	757,38	828,42	929,47	1016,50	1113,55
T <sup>306</sup>	88,04	244,14	345,19	474,23	561,26	674,35	775,40	846,43	929,47	1016,50	1113,55
S <sup>307</sup>	88,04	244,14	345,19	474,23	561,26	674,35	775,40	846,43	947,48	1016,50	1113,55
S <sup>310</sup>	88,04	244,14	345,19	474,23	561,26	674,35	775,40	846,43	947,48	1034,51	1131,57
S <sup>318</sup>	88,04	244,14	345,19	474,23	561,26	674,35	775,40	846,43	947,48	1034,51	1131,57
	y1	y2	y3	y4	y5	y6	y7	y8	y9	y10	y11
S <sup>298</sup>	175,12	322,19	409,22	466,24	563,29	691,39	748,41	805,43	904,50	1035,54	1122,57
T <sup>300</sup>	175,12	322,19	409,22	466,24	563,29	691,39	748,41	805,43	904,50	1035,54	1122,57
S <sup>302</sup>	175,12	322,19	409,22	466,24	563,29	691,39	748,41	805,43	904,50	1035,54	1122,57
T <sup>304</sup>	175,12	322,19	409,22	466,24	563,29	691,39	748,41	805,43	904,50	1035,54	1122,57
T <sup>306</sup>	175,12	322,19	409,22	466,24	563,29	691,39	748,41	805,43	904,50	1035,54	1122,57
S <sup>307</sup>	175,12	322,19	409,22	466,24	563,29	691,39	748,41	805,43	904,50	1035,54	1122,57
S <sup>310</sup>	175,12	322,19	409,22	466,24	563,29	691,39	748,41	805,43	904,50	1035,54	1104,56
S <sup>318</sup>	175,12	322,19	391,21	448,23	545,28	673,38	730,40	787,42	886,49	1017,53	1104,56
	b12	b13	b14	b15	b16	b17	b18	b19	b20	b21	b22
S <sup>298</sup>	1184,59	1271,62	1402,66	1501,73	1558,75	1615,78	1743,87	1840,92	1897,94	1984,98	2132,05
T <sup>300</sup>	1184,59	1271,62	1402,66	1501,73	1558,75	1615,78	1743,87	1840,92	1897,94	1984,98	2132,05
S <sup>302</sup>	1184,59	1271,62	1402,66	1501,73	1558,75	1615,78	1743,87	1840,92	1897,94	1984,98	2132,05
T <sup>304</sup>	1184,59	1271,62	1402,66	1501,73	1558,75	1615,78	1743,87	1840,92	1897,94	1984,98	2132,05
T <sup>306</sup>	1184,59	1271,62	1402,66	1501,73	1558,75	1615,78	1743,87	1840,92	1897,94	1984,98	2132,05
S <sup>307</sup>	1184,59	1271,62	1402,66	1501,73	1558,75	1615,78	1743,87	1840,92	1897,94	1984,98	2132,05
S <sup>310</sup>	1202,60	1271,62	1402,66	1501,73	1558,75	1615,78	1743,87	1840,92	1897,94	1984,98	2132,05
S <sup>318</sup>	1202,60	1289,63	1420,67	1519,74	1576,76	1633,79	1761,88	1858,93	1915,96	1984,98	2132,05
	y12	y13	y14	y15	y16	y17	y18	y19	y20	y21	y22
S <sup>298</sup>	1193,61	1290,66	1377,70	1478,74	1549,78	1650,83	1763,91	1850,94	1979,99	2081,03	2237,14
T <sup>300</sup>	1193,61	1290,66	1377,70	1478,74	1549,78	1650,83	1763,91	1850,94	1979,99	2063,02	2219,12
S <sup>302</sup>	1193,61	1290,66	1377,70	1478,74	1549,78	1650,83	1763,91	1832,93	1961,98	2063,02	2219,12
T <sup>304</sup>	1193,61	1290,66	1377,70	1478,74	1549,78	1632,82	1745,90	1832,93	1961,98	2063,02	2219,12
T <sup>306</sup>	1193,61	1290,66	1377,70	1460,73	1531,77	1632,82	1745,90	1832,93	1961,98	2063,02	2219,12
S <sup>307</sup>	1193,61	1290,66	1359,68	1460,73	1531,77	1632,82	1745,90	1832,93	1961,98	2063,02	2219,12
S <sup>310</sup>	1175,60	1272,65	1359,68	1460,73	1531,77	1632,82	1745,90	1832,93	1961,98	2063,02	2219,12
S <sup>318</sup>	1175,60	1272,65	1359,68	1460,73	1531,77	1632,82	1745,90	1832,93	1961,98	2063,02	2219,12

Die Tabelle zeigt, dass es günstig ist, dass zwischen Ser<sup>318</sup> und der nächsten phosphorylierbaren Aminosäure sieben nicht phosphorylierbare Aminosäuren liegen, wodurch bei der Fragmentierung des entsprechenden Peptids je acht eindeutige b- und y-Ionen entstehen. Im Produkt-Ionen-Spektrum in Abbildung 4.29 konnten bis auf wenige Ausnahmen alle berechneten Fragmentationen detektiert werden. Die Analysen von GST-IRS-1<sup>N2</sup>, das mit PKC-β1 oder mit PKC-δ phosphoryliert wurde, führten zu identischen Ergebnissen.

Bei der Sequenzierung des Peptids P1 (Abb. 4.26), das bei 51,7 min eluierte, wurde die Sequenz T<sup>300</sup>ESITATSPASMVGGKPG(pS)FR<sup>320</sup> mit einem phosphorylierten Serin an Position 318 detektiert. Diese Sequenz entspricht dem erwarteten, tryptisch richtig geschnittenem Peptid. Die Sequenzierung der Peptide P1' und P2' identifizierte die Met<sup>311</sup>-oxidierten Derivate von P1 und P2 [153]. Das Peptid P0, das bei der Chromatographie frühzeitig retendiert wurde (Abb. 4.14 und 4.26), wurde als Peptid mit einem phosphorylierten Serinrest an Position 436 von IRS-1 identifiziert. Von den sechs im N2-Fragment vorkommenden PKC-Motiven wurden *in vitro* nur Ser<sup>318</sup> und Ser<sup>436</sup> durch die PKC-Isoformen β1, δ und ζ phosphoryliert. An den Aminosäureresten Thr<sup>295</sup>, Ser<sup>346</sup>, Ser<sup>358</sup> und Ser<sup>375</sup> wurde keine Phosphorylierung analysiert.

#### **4.5 Mutation des Serin<sup>318</sup> in GST-IRS-1<sup>N2</sup> und in IRS-1 zu Alanin**

Zur Mutation von Serin<sup>318</sup> im GST-IRS-1<sup>N2</sup>-Fragment bzw. im Gesamt-IRS-1 wurde die „Overlap extension“ PCR nach Ho [164] nach einem Protokoll von Horton [165] durchgeführt (siehe Kapitel 3.6.7). Aus Tabelle 4.9 wird ersichtlich, dass Serin<sup>318</sup> von IRS-1 durch das Basentriplett tcc codiert wird. Durch eine Punktmutation, bei der das Thymin<sup>1536</sup> in der Basensequenz des IRS-1 durch Guanin ersetzt wird, kann Serin<sup>318</sup> zu Alanin mutiert werden. Alanin wird im genetischen Standardcode unter anderem durch das Triplett „gcc“ codiert (siehe Tabelle 4.10).

**Tabelle 4.9: Proteinprimärsequenz und die dazugehörigen Basentriplets der Aminosäuren 313-323 von IRS-1.** Die Position 318 wurde grau unterlegt.

AS-Position	313	314	315	316	317	<b>318</b>	319	320	321	322	323
AS-Rest	G	G	K	P	G	<b>S</b>	F	R	V	R	A
Basentriplett	ggt	ggg	aaa	cca	ggt	<b>tcc</b>	ttc	agg	gtg	cgt	gcc
Basenposition	1521- 1524					1536- 1539					1555- 1557

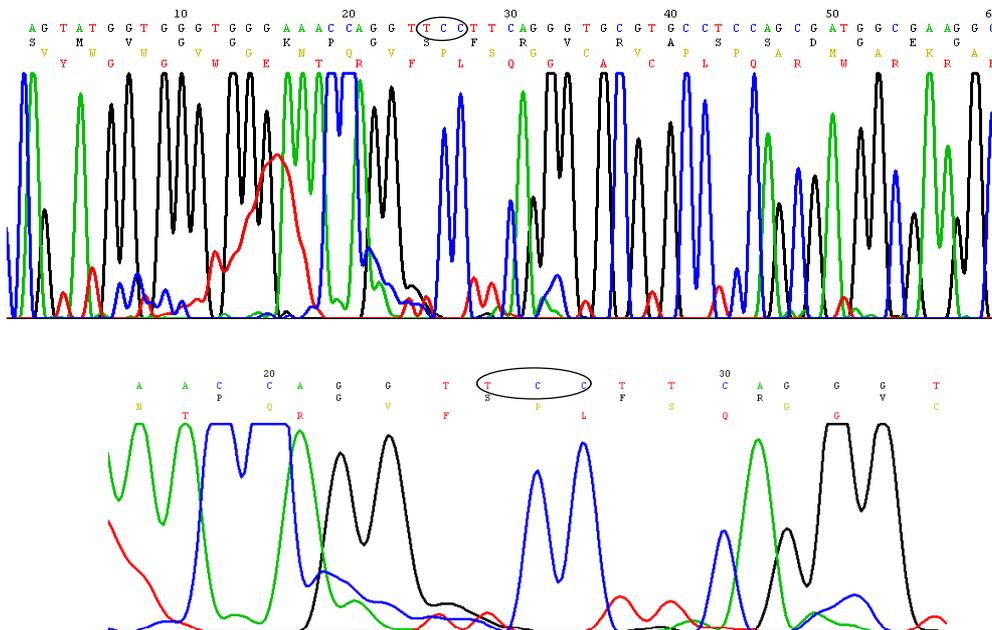
**Tabelle 4.10: Der genetische Standardcode.** Das Triplet für Serin<sup>318</sup> in der Primärstruktur von IRS-1 wurde grau unterlegt, ebenso wie das Triplet für die Mutation an dieser Position durch Alanin. In der Spalten A ist der genetische Standardcode des Basentriplets, in den Spalten B die dazugehörige Aminosäure im Einbuchstabencode und in den Spalten C im Dreibuchstabencode aufgelistet (aus <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>).

A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
ttt	F	Phe	tct	S	Ser	tat	Y	Tyr	tgt	C	Cys
ttc	F	Phe	<b>tcc</b>	<b>S</b>	<b>Ser</b>	tac	Y	Tyr	tgc	C	Cys
tta	L	Leu	tca	S	Ser	taa	Stopp		tga	Stopp	
ttg	L	Leu	tcg	S	Ser	tag	Stopp		tgg	W	Trp
ctt	L	Leu	cct	P	Pro	cat	H	His	cgt	R	Arg
ctc	L	Leu	ccc	P	Pro	cac	H	His	cgc	R	Arg
cta	L	Leu	cca	P	Pro	caa	Q	Gln	cga	R	Arg
ctg	L	Leu	ccg	P	Pro	cag	Q	Gln	cgg	R	Arg
att	I	Ile	act	T	Thr	aat	N	Asn	agt	S	Ser
atc	I	Ile	acc	T	Thr	aac	N	Asn	agc	S	Ser
ata	I	Ile	aca	T	Thr	aaa	K	Lys	aga	R	Arg
atg	M	Met	acg	T	Thr	aag	K	Lys	agg	R	Arg
gtt	V	Val	gct	A	Ala	gat	D	Asp	ggt	G	Gly
gtc	V	Val	<b>gcc</b>	<b>A</b>	<b>Ala</b>	gac	D	Asp	ggc	G	Gly
gta	V	Val	gca	A	Ala	gaa	E	Glu	gga	G	Gly
gtg	V	Val	gcg	A	Ala	gag	E	Glu	ggg	G	Gly

### 4.5.1 Überprüfung der Mutation Ser<sup>318</sup>→Ala<sup>318</sup> durch DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der modifizierten Ketten-Abbruchmethode des „Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing“ nach Sanger in einer Modifikation nach Ansorge [161-163] (siehe Kapitel 3.6.6).

500 ng des Plasmids wurden mit 10 pMol des Primers IRS-1 ala 295 (Tabelle 3.3) nach der Standardvorschrift in 5'→ 3' Richtung sequenziert. Da die verschiedenen ddNTPs durch unterschiedlich fluoreszierende Gruppen modifiziert sind, können sie durch fluorimetrische Detektion analysiert werden. Aus der Migrationsgeschwindigkeit der unterschiedlichen DNA-Fragmente wird die Sequenz bestimmt. Abbildung 4.30 zeigt einen Ausschnitt aus der Sequenzierung von IRS-1. Die verschiedenen Basen werden durch unterschiedliche Farben dargestellt: Thymin als rote, Adenin als grüne, Guanin als schwarze und Cytosin als blaue Linie.

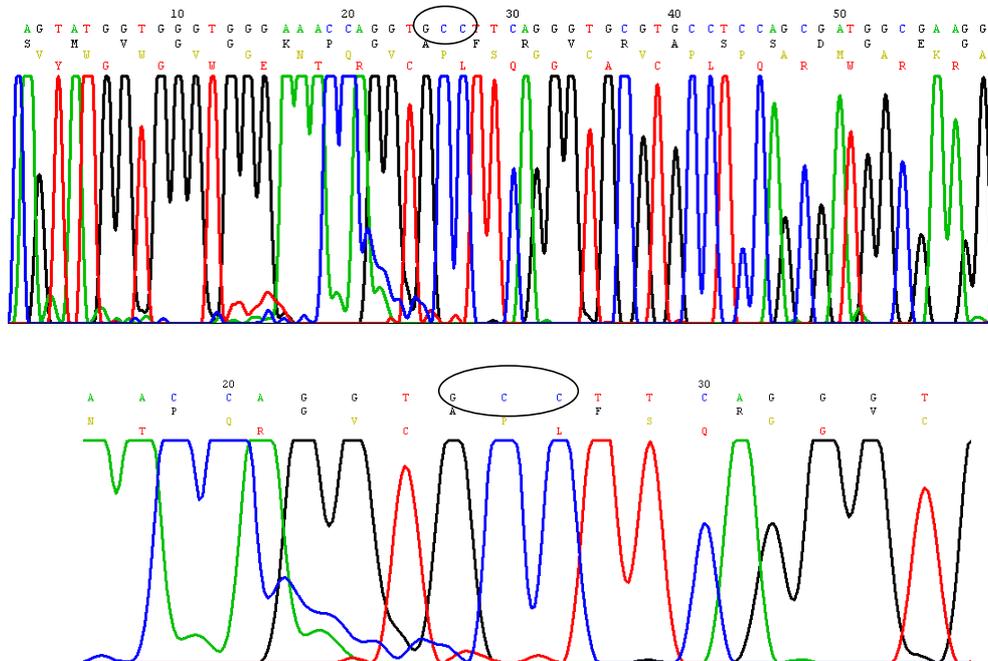


**Abb. 4.30: Sequenzierung von IRS-1 S<sup>318</sup> nach der modifizierten Kettenabbruchmethode des „Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing“** 500 ng IRS-1 A<sup>318</sup> wurde nach der modifizierten Ketten-Abbruchmethode des „Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing“ sequenziert. Nach der PCR wurde der Reaktionsansatz über CENTRI-SEP Säulen gereinigt und kapillarelektrophoretisch getrennt. Thymin wird als rote, Adenin als grüne, Guanin als schwarze und Cytosin als blaue Linie

dargestellt. In der obersten Buchstabenreihe wird die Basensequenz und in der zweiten Reihe die Aminosäuresequenz dargestellt. Die Sequenz an Position 318 ist durch eine Ellipse gekennzeichnet.

Die oberste Buchstabenlinie zeigt die Basensequenz, wobei das Basentriplett  $t_{25}c_{26}c_{27}$  für Serin<sup>318</sup> codiert. In der zweiten Buchstabenreihe wird die dazugehörige Aminosäuren-Sequenz dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung wurde der Sequenzausschnitt um Serin<sup>318</sup> vergrößert.

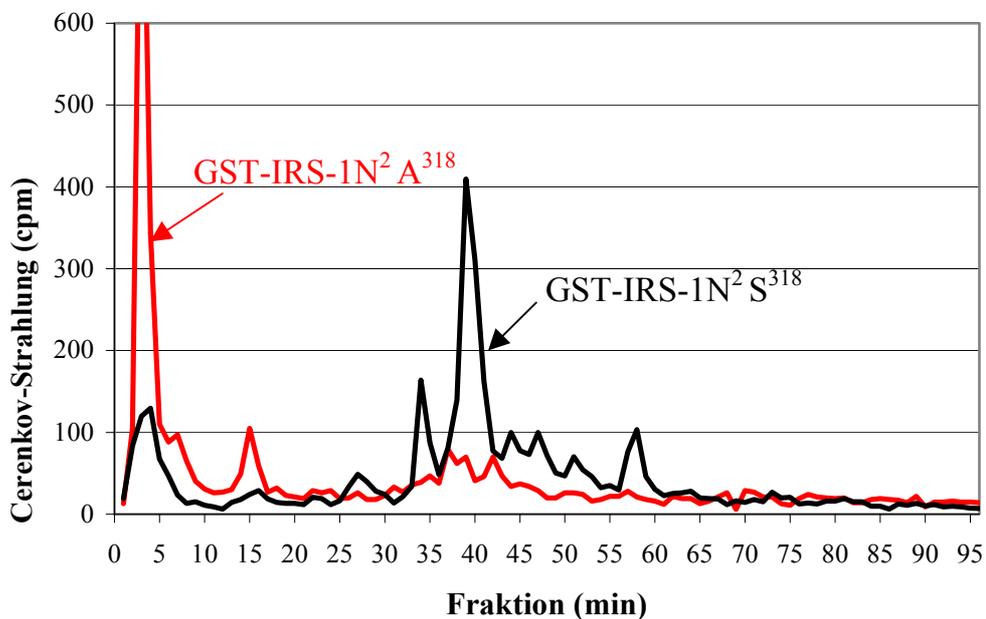
Die Kontrollsequenzierung in Abbildung 4.31 zeigt, dass die Mutation erfolgreich durchgeführt wurde. Die Position 318 wird hier durch das Basentriplett  $g_{25}c_{26}c_{27}$  dargestellt, das für Alanin codiert.



**Abb. 4.31: Sequenzierung von IRS-1 A<sup>318</sup> nach der modifizierten Kettenabbruchmethode des „Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing“** 500 ng IRS-1 A<sup>318</sup> wurde nach der modifizierten Ketten-Abbruchmethode des „Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing“ sequenziert. Nach der PCR wurde der Reaktionsansatz über CENTRI-SEP Säulen gereinigt und kapillarelektrophoretisch getrennt. Thymin wird als rote, Adenin als grüne, Guanin als schwarze und Cytosin als blaue Linie dargestellt. In der obersten Buchstabenreihe wird die Basensequenz und in der zweiten Reihe die Aminosäuresequenz dargestellt. Die Position 318 ist durch eine Ellipse gekennzeichnet

### 4.5.2 Überprüfung der Mutation durch Erstellen der Cerenkov-Pattern

Zur Überprüfung des mutierten Fusionsproteins auf Phosphateinbau wurden GST-IRS-1<sup>N2</sup> S<sup>318</sup> und die mutierte Form GST-IRS-1<sup>N2</sup> A<sup>318</sup> *in vitro* mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert und mit den tryptisch verdauten und gereinigten Peptiden Cerenkov-Pattern erstellt (Kapitel 4.3 und 3.3.9). Der Vergleich der beiden Cerenkov-Pattern in Abbildung 4.32 zeigt, dass nach Mutation von Serin<sup>318</sup> das Fusionsprotein nur noch sehr schwach phosphoryliert wird.



**Abb. 4.32: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>N2</sup> S<sup>318</sup> und GST-IRS-1<sup>N2</sup> A<sup>318</sup>, phosphoryliert mit PKC- $\zeta$  und tryptisch gespalten.** 200  $\mu$ g GST-IRS-1<sup>N2</sup> S<sup>318</sup> bzw. GST-IRS-1<sup>N2</sup> A<sup>318</sup> wurde mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert, über SDS-PAGE gereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die Banden wurden mit Trypsin aus dem Gel verdaut und die Eluate über eine C2/C18 2,1 x 100 mm-Säule mit einem Fluss von 200  $\mu$ L/min getrennt. Als Laufmittel wurde 0,05 % TFA (System A) und 80 % ACN in 0,05 % TFA (System B) verwendet. Die Probe wurde bei 0 % B injiziert und durch folgende Gradientenelution getrennt: 10 min 0 % B, 20 min 10 % B, 60 min 40 % B, 90 min 100 % B, 96 min 0 % System B. Die Säuleneluate wurden in Mikrotiterplatten in 1 min Fraktionen gesammelt und im  $\beta$ -Counter Trilux 1450 MicroBeta<sup>TM</sup> Plus vermessen.

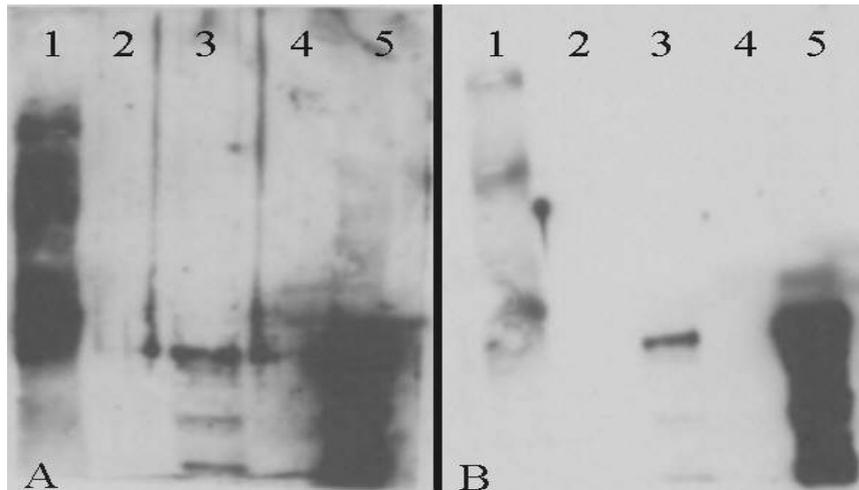
Durch die Mutation verschwindet der Hauptpeak, sowie mehrere kleinere Nebenpeaks. In die nach 3 min eluierte Fraktion wird nach der Mutation mehr Phosphat eingebaut und bei 15 min erscheint ein weiteres schwach phosphoryliertes Peptid.

## 4.6 Generierung und Charakterisierung eines polyklonalen Antikörpers gegen IRS-1 pSer<sup>318</sup>

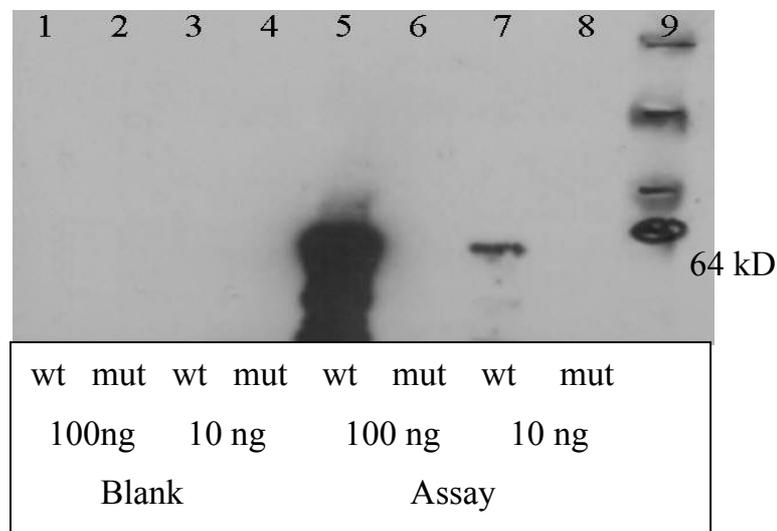
Ein polyklonaler Antikörper gegen das pSer<sup>318</sup> von IRS-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Hubert Kalbacher des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität hergestellt. Dazu wurde das synthetische Phosphopeptid SMVGGKPGSFRVRASSD (310-326) als freies Peptid an KHL gekoppelt und als „multiple antigenic peptide“ zur Immunisierung der Kaninchen verwendet [177]. Die Kaninchenserum wurden über Protein A-Sepharose gereinigt und mittels ELISA auf Spezifität für das phosphorylierte Peptid getestet. Da die Aminosäuresequenzen in dem verwendeten Bereich des IRS-1 von Mensch, Maus und Ratte 100 % homolog sind, ist der Antikörper für alle drei Spezies einsetzbar.

### 4.6.1 *In vitro*-Charakterisierung des Antikörpers gegen pSer<sup>318</sup> von IRS-1

Zur Charakterisierung des Antikörpers wurden *in vitro*-Assays mit GST-IRS-1<sup>N2</sup> S<sup>318</sup> und der Mutante GST-IRS-1<sup>N2</sup> A<sup>318</sup> durchgeführt. Die phosphorylierten Proteine wurden über 7,5 % SDS-PAGE getrennt, „semidry“ geblottet und mit dem Antikörper gegen pSer<sup>318</sup> detektiert (Abbildung 4.33), wobei der zweite Antikörper jeweils 1:20.000 eingesetzt wurde. Die Spezifität des Antikörpers ist nach diesen Resultaten sehr gut, denn er detektiert *in vitro* die phosphorylierte Form von GST-IRS-1<sup>N2</sup> S<sup>318</sup>, nicht aber GST-IRS-1<sup>N2</sup> A<sup>318</sup>. Zur Überprüfung, ob die nicht-phosphorylierten Formen der beiden Fusionsproteine erkannt werden, wurden *in vitro*-Assays durchgeführt. Der erste Antikörper wurde 1:10.000 und der zweite 1:20000 eingesetzt. Zu den Assays wurden Blanks mit aufgetragen, bei denen nur Puffer, Substrat und ATP inkubiert wurden. Durch die in Abbildung 4.34 gezeigten Ergebnisse wurde die Spezifität des Antikörpers bestätigt.



**Abb. 4.33: Bestimmung der Empfindlichkeit des Antikörpers gegen pSer<sup>318</sup> von IRS-1.** GST-IRS-1<sup>N2</sup> S<sup>318</sup> (Spur 3, 10 ng, Spur 5, 100 ng) und die Mutante GST-IRS-1<sup>N2</sup> A<sup>318</sup> (Spur 2, 10 ng, Spur 4, 100ng ) wurden *in vitro* mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert, elektrophoretisch getrennt, auf Nitrocellulosemembran geblottet und mit dem Kaninchenserum gegen IRS-1 pSer<sup>318</sup> detektiert. Das Kaninchenserum wurde auf Film A in einer Verdünnung 1:1.000 auf Film B in einer Verdünnung 1:10.000 eingesetzt. Der zweite Antikörper wurde 1:20.000 verdünnt. Auf Spur 1 wurde jeweils der „prestained“ Marker von Gibco aufgetragen, das unterste Signal erscheint bei 64 kDa.



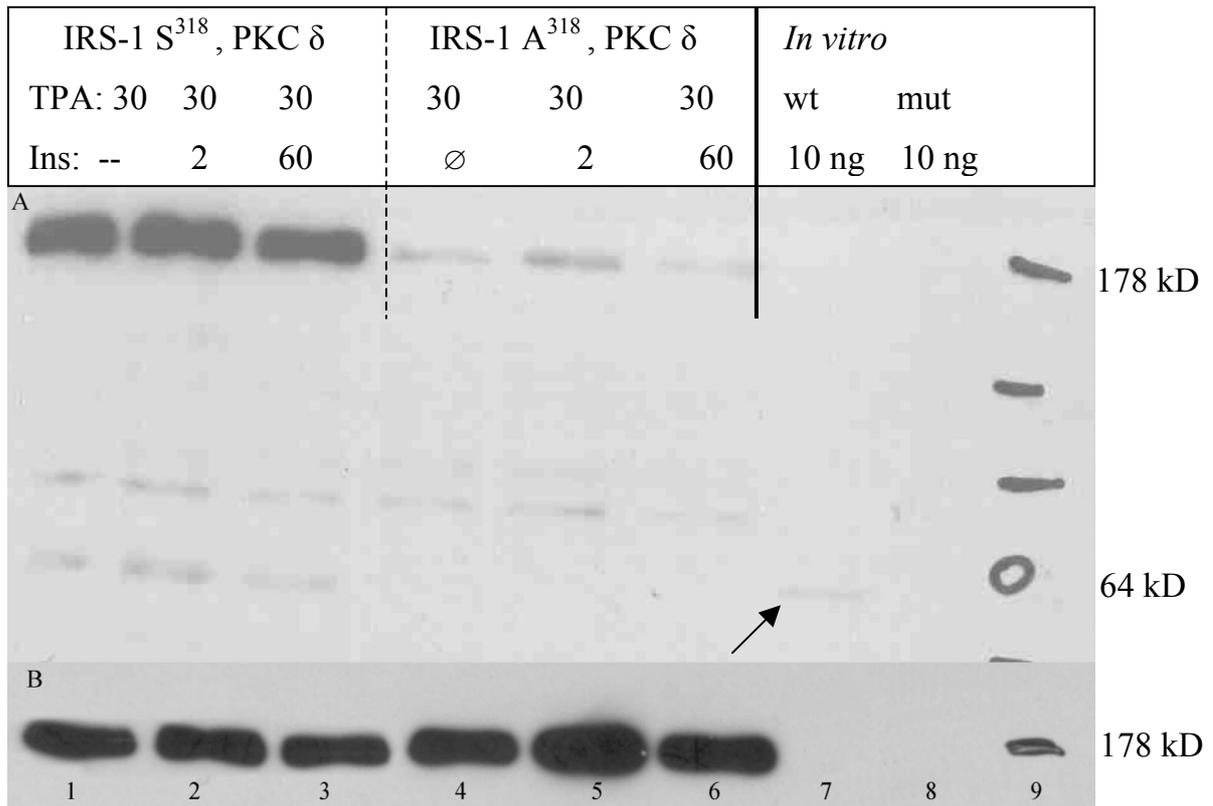
**Abb. 4.34: *In vitro*-Charakterisierung des Antikörpers gegen pSer<sup>318</sup> von IRS-1.** GST-IRS-1<sup>N2</sup> S<sup>318</sup> (Spuren 1, 3, 5 und 7) und die Mutante GST-IRS-1<sup>N2</sup> A<sup>318</sup> (Spuren 2, 4, 6 und 8) wurden in verschiedenen Konzentrationen *in vitro* mit PKC- $\zeta$  oder ohne Enzym phosphoryliert, elektrophoretisch getrennt, auf Nitrocellulosemembran geblottet und mit dem Kaninchenserum gegen IRS-1 pSer<sup>318</sup> detektiert. Das Kaninchenserum wurde in einer Verdünnung 1:10.000, der zweite Antikörper 1:20.000 eingesetzt. Auf Spur 9 wurde der „prestained“ Marker von Gibco aufgetragen, das unterste Signal erscheint bei 64 kDa.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Antikörper weder die mutierte Form (GST-IRS-1<sup>N2</sup> A<sup>318</sup>) noch die nicht-phosphorylierte Form des Wildtyps (Abb. 4.34, Spuren 1-4) detektiert. Zusammenfassend konnte mit den IRS-1 Fusionsproteinen gezeigt werden, dass sich mit dem Antikörper gegen pSer<sup>318</sup> diese Phosphorylierungsstelle hochspezifisch nachweisen lässt.

#### 4.6.2 Charakterisierung des Antikörpers gegen pSerin<sup>318</sup> von IRS-1 in Zellkultur

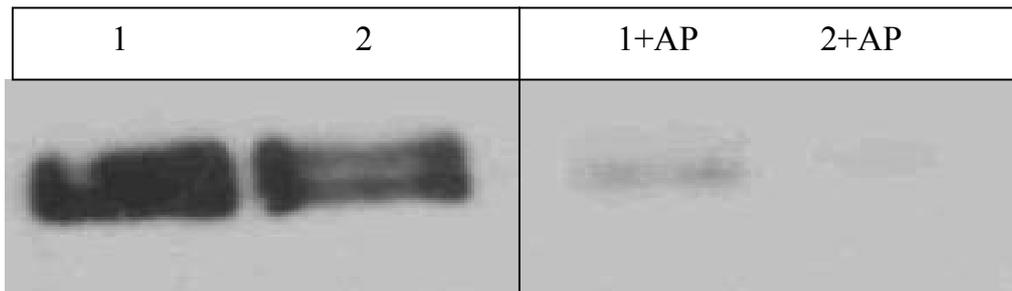
BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> bzw. mit IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  transient transfiziert, 30 min mit 500 nmol TPA vorinkubiert und schließlich mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert. Die Lyse erfolgte mit „Mads“-Lysepuffer. Je 20  $\mu$ g des Zelllysate wurden elektrophoretisch getrennt, geblottet und mit dem Antikörper anti-IRS-1 pSer<sup>318</sup> (1:10.000, 2. Ak Kaninchen 1:20.000) detektiert. Zur Kontrolle wurde ein Reblot gegen IRS-1 mit dem polyklonalen Antikörper sc-560 durchgeführt. Die Abbildung 4.35 zeigt, dass in den Zelllysaten aus Zellen mit transient transfiziertem IRS-1 S<sup>318</sup> ein sehr starkes Signal detektiert wird. In Lysaten von Zellen mit transient transfiziertem IRS-1 A<sup>318</sup> detektiert der Antikörper gegen IRS-1 pSer<sup>318</sup> noch ein schwaches Signal, das vermutlich durch endogenes IRS-1 S<sup>318</sup> verursacht wird.

In BHK<sup>IR</sup>-Zellen liegt transfiziertes IRS-1 nach TPA- Inkubation an Serin<sup>318</sup> phosphoryliert vor. Die Phosphorylierung scheint nach zweiminütiger Insulinstimulation stärker zu werden, um dann nach 60 min Insulin wieder abgeschwächt zu werden. Die Proteinmenge ist bei den Zelllysaten nahezu identisch und ist im unteren Teil von Abbildung 4.35 wiedergegeben. Die Sensitivität des Antikörpers wird in den beiden Spuren 7A und B deutlich. Die Phosphorylierung kann noch bei 10 ng GST-IRS-1<sup>N2</sup> S<sup>318</sup> detektiert werden (Pfeil in Abb. 4.35), wobei nur etwa 2 % des Proteins phosphoryliert vorliegt (siehe Kapitel 4.2 und Abbildung 4.11). Der Antikörper gegen IRS-1 detektiert 10 ng Protein dagegen nicht (Abbildung 4.35, Film B, Spur 7).



**Abb. 4.35: Charakterisierung des Antikörpers gegen pSer<sup>318</sup> von IRS-1 in BHK<sup>IR</sup>-Zellen.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> bzw. mit IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  transient transfiziert, 30 min mit 500 nmol TPA vorinkubiert und schließlich mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert. Die Lyse erfolgte mit „Mads“-Lysepuffer. 20  $\mu$ g des Zelllysats wurden elektrophoretisch getrennt, geblottet und im oberen Teil (A) mit dem Antikörper IRS-1 pSer<sup>318</sup> (1:10.000, 2. Ak Kaninchen 1:20.000) detektiert. In Spur 7 wurden 10 ng eines *in vitro*-Assays mit GST-IRS-1<sup>N2</sup> S<sup>318</sup>, in Spur 8 10 ng eines Assays mit GST-IRS-1<sup>N2</sup> A<sup>318</sup> und in Spur 9 10  $\mu$ L des „prestained“ Markers von Gibco aufgetragen. Das gerade noch zu erkennende Signal von 10 ng *in vitro*-phosphoryliertes IRS-1<sup>N2</sup> wurde durch den Pfeil hervorgehoben. Der untere Teil B zeigt den Reblot gegen IRS-1 sc-560. Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 der 2. Antikörper (Kaninchen) 1:20.000 eingesetzt.

Die Phosphatbindung an IRS-1 ist reversibel und kann durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (AP) wieder gespalten werden (Abbildung 4.36).



**Abb. 4.36: Die Phosphatbindung an Ser<sup>318</sup> von IRS-1 ist reversibel und kann mit alkalischer Phosphatase gespalten werden.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  cotransfiziert, mit 0,5  $\mu$ mol TPA vorinkubiert, mit 100 nm Insulin 60 min lang stimuliert und lysiert. Die Proben (je 20  $\mu$ g) auf der linken Seite wurden ohne Vorbehandlung, die auf der rechten Seite nach 30 min Inkubation bei 37 °C mit 1 U/ $\mu$ g alkalischer Phosphatase elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit dem Antikörper IRS-1 pSer<sup>318</sup> (1:10.000, 2. Ak Kaninchen 1:20.000).

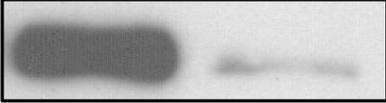
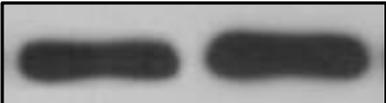
#### 4.6.3 Die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>307</sup> wird nicht durch den Antikörper gegen IRS-1 pS<sup>318</sup> erkannt.

IRS-1 wird an Ser<sup>307</sup> von der c-Jun-NH2-terminalen Kinase (JNK) phosphoryliert, wodurch die Interaktion zwischen IRS-1 und dem Insulinrezeptor gehemmt wird [92-94]. Um auszuschließen, dass der Antikörper gegen pSer<sup>318</sup> diese Position erkennt, wurden BHK<sup>IR</sup>-Zellen mit IRS-1 S<sup>318</sup> bzw. IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  cotransfiziert, mit Insulin 60 min stimuliert und immunchemisch mit Antikörpern gegen die verschiedenen phosphorylierten Positionen analysiert. Sowohl IRS-1 S<sup>318</sup> als auch IRS-1 S<sup>307</sup> sind nach 60 min Insulinstimulation phosphoryliert (Abbildung 4.37).

Ist Ser<sup>318</sup> zu Ala mutiert, ist mit dem Antikörper gegen IRS-1 pSer<sup>318</sup> nur noch ein geringes Signal, verursacht durch endogenes IRS-1, zu erkennen. Ser<sup>307</sup> bleibt unverändert phosphoryliert. Der Antikörper ist spezifisch gegen IRS-1 pSer<sup>318</sup>, IRS-1 pSer<sup>307</sup> wird nicht detektiert.

Transfektion:	IRS-1 S <sup>318</sup>	IRS-1 A <sup>318</sup>	IRS-1 S <sup>318</sup>	IRS-1 A <sup>318</sup>
PKC-ζ:	+	+	+	+
Insulin (min):	60	60	60	60

WB: pSer <sup>318</sup>			WB: pSer <sup>307</sup>
WB: IRS-1			WB: IRS-1

**Abb. 4.37: Die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>307</sup> wird nicht durch den Antikörper gegen IRS-1 S<sup>318</sup> erkannt.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> bzw. mit IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC-ζ transfiziert, mit 100 nm Insulin 60 min lang stimuliert und lysiert. Die Proben (je 20 µg) auf der linken Seite wurden mit dem Antikörper IRS-1 pSer<sup>318</sup> (1:10.000, 2. Ak Kaninchen 1:20.000), die auf der rechten Seite mit dem Antikörper IRS-1 pSer<sup>307</sup> analysiert. Der untere Teil zeigt den jeweiligen Kontrollblot gegen IRS-1.

#### 4.7 Überprüfung der biologischen Relevanz der gefundenen Phosphorylierungsstelle

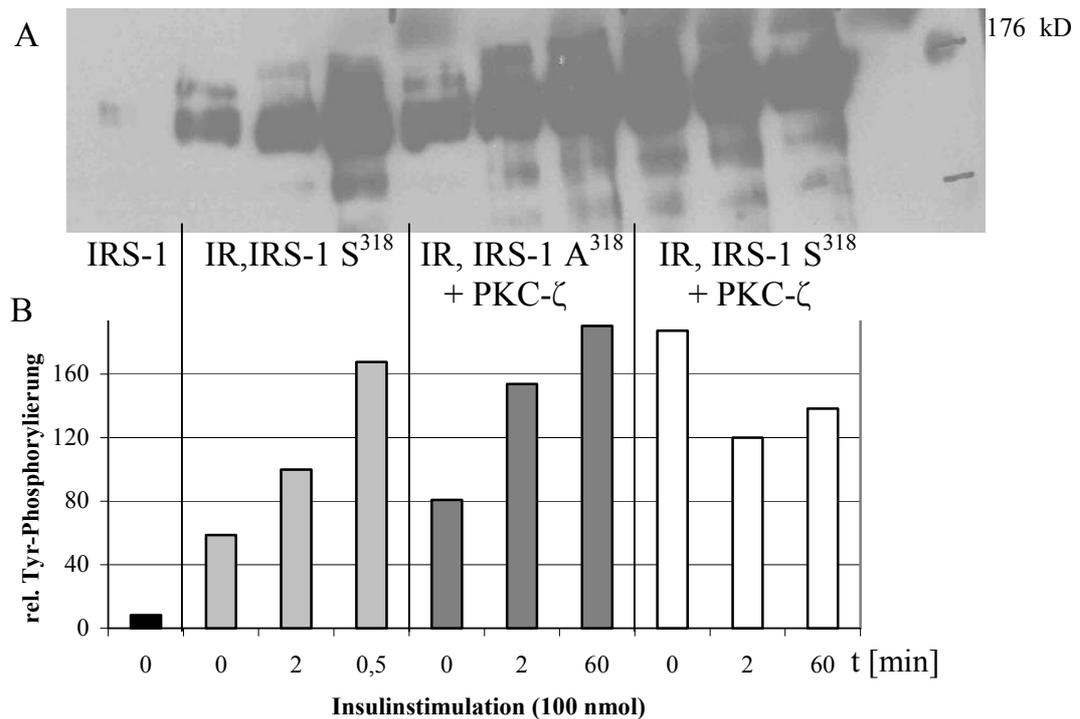
Schon länger ist bekannt, dass Ser- und Thr-Phosphorylierungen von IRS-1 die Insulinsignalübertragung modulieren [76]. Es wurde gezeigt, dass Insulin als Aktivator für die PKC-ζ wirkt [178] und dass IRS-1 durch PKC-ζ phosphoryliert wird, womit unter hyperinsulinämischen Bedingungen die Signalweiterleitung negativ reguliert wird [179;180]. Die genaue(n) Phosphorylierungsstelle(n) im IRS-1 konnte(n) von diesen Gruppen nicht bestimmt werden. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde Ser<sup>318</sup> *in vitro* als Hauptphosphorylierungsstelle von IRS-1 für alle PKC-Isoenzymen und PKD bestimmt (siehe Kapitel 4.4.4 und Abbildung 4.11). Basierend auf diesen Resultaten beruht die Arbeitshypothese darauf, dass es sich bei Ser<sup>318</sup> um die von den Autoren beschriebene Stelle handeln könnte. Zur Untersuchung dieser Annahme wurde IRS-1 S<sup>318</sup> bzw. die Mutante IRS-1 A<sup>318</sup> mit PKC-ζ cotransfiziert und die Effekte auf die Insulinsignalkaskade analysiert. Als Zellsystem wurden BHK-Zellen gewählt, die einen relativ hohen Basalwert an Insulinrezeptor und an IRS-1 haben, jedoch kaum

PKC-Isoenzyme, so dass durch Transfektion der zu untersuchenden PKC-Isoform keine oder nur schwache Effekte durch die anderen Isoformen auftreten [181].

Neben PKC- $\zeta$  wurde als weiterer Kandidat für die Phosphorylierung an Ser<sup>318</sup> PKC- $\delta$  untersucht, da diese PKC durch TPA, Insulin, Glucose und freie Fettsäuren stimulierbar ist [182-184] und in Muskelzellen die Signalweiterleitung beeinflusst [185-187]. Außerdem zeigte PKC- $\delta$  bei den *in vitro*-Versuchen in alle GST-IRS-1-Fusionsproteine hohe Einbauraten (Abbildung 4.11).

#### 4.7.1 Untersuchung der Insulinsignaltransduktion in BHK-Zellen

BHK-Zellen wurden transient mit Insulinrezeptor IRS-1 S<sup>318</sup> bzw. IRS-1 A<sup>318</sup> und mit PKC- $\zeta$  cotransfiziert, mit 100 nm Insulin stimuliert und nach der Standardvorschrift lysiert. Die Immunpräzipitation (IP) wurde mit 4  $\mu$ g Antikörper gegen IRS-1 unter Standardbedingungen durchgeführt. Das elektrophoretisch getrennte Präzipitat wurde elektrogeblottet und immunchemisch mit dem monoklonalen Antikörper 4G10 gegen Phosphotyrosin detektiert. Wurde kein IR transfiziert, so ist basal nur eine schwache Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 zu erkennen (Abbildung 4.38 schwarze Säule). Bei der Cotransfektion von IR und IRS-1 S<sup>318</sup> ist IRS-1 basal tyrosinphosphoryliert, nach 0,5 min Insulinstimulation ist eine deutliche Steigerung zu erkennen, die nach 2 min bereits zurückgeht (hellgraue Säulen). Bei der Cotransfektion von IR mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  (weiße Säulen) ist am IRS-1 basal eine hohe Tyrosinphosphorylierung zu erkennen, die nach Stimulation mit Insulin schwächer wird. Bei der Cotransfektion von IR mit IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  ist die basale Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 etwas schwächer, steigt jedoch durch Stimulation mit Insulin an (dunkelgraue Säulen).



**Abb. 4.38: Untersuchung der Insulinsignaltransduktion in BHK-Zellen.** BHK-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> oder IR und IRS-1 S<sup>318</sup> oder IR, IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC-ζ oder IR, IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC-ζ transient transfiziert, mit 100 nmol Insulin 0,5, 2 oder 60 min stimuliert und lysiert. 400 µg des jeweiligen Lysates wurde mit 4 µg anti-IRS-1 sc-560 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-pTyr 4G10. Abb. A zeigt den Film und B die densitometrische Auswertung.

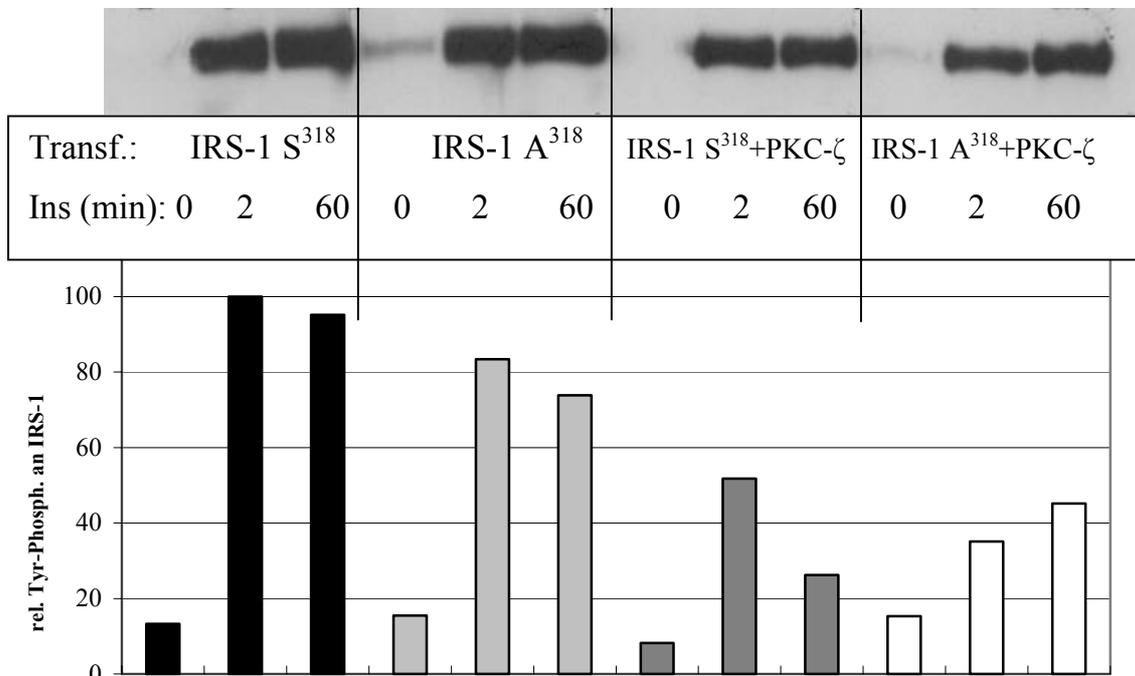
Nach diesen Vorversuchen lässt sich zusammenfassen:

- BHK-Zellen eignen sich nicht zur Untersuchung der insulinstimulierten Signalweiterleitung.
- Bei der Transfektion des Insulinrezeptors ist der Basalwert der Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 bereits sehr hoch.
- Bei der Cotransfektion von IR, IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC-ζ sind die Zellen durch Insulin nicht mehr stimulierbar. Ohne Stimulation mit Insulin wird dabei die höchste Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 erhalten.

### 4.7.2 Untersuchung der Insulinsignaltransduktion in BHK-Zellen mit stabil transfiziertem Insulinrezeptor

Als alternative Zelllinie wurden Babyhamster Nierenzellen mit stabil transfiziertem humanen Insulinrezeptor (BHK<sup>IR</sup>) Zellen untersucht, wodurch die Notwendigkeit einer Dreifachtransfektion entfällt. Zur Untersuchung der Insulinsignaltransduktion wurden BHK<sup>IR</sup>-Zellen mit IRS-1 S<sup>318</sup> oder IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  transient transfiziert und mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert. Für die Kontrollen wurde anstatt PKC- $\zeta$  der Leervektor pcDNA3 transfiziert.

400  $\mu$ g des Zelllysats wurden mit 4  $\mu$ g anti-IRS-1 sc-560 immunpräzipitiert, über ein 7,5 % SDS-Gel getrennt und mit anti-pTyr 4G10 analysiert. Der Film in Abbildung 4.39 zeigt, dass in BHK<sup>IR</sup>-Zellen das Insulinrezeptor-Substrat-1 nur gering tyrosinphosphoryliert vorliegt.



**Abb. 4.39: Untersuchung der Insulinsignaltransduktion in BHK-Zellen mit stabil transfiziertem Insulinrezeptor.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> oder IRS-1 A<sup>318</sup> bzw. mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$ , oder mit IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  transient transfiziert, mit 100 nm Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert und lysiert. 400  $\mu$ g des Lysates wurden mit 4  $\mu$ g anti-IRS-1 sc-560 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektro-

geblottet. Detektion erfolgte mit anti-pTyr 4G10. Abb. A zeigt den Film und B die densitometrische Auswertung.

Durch Stimulation mit Insulin steigt der Phosphorylierungsgrad des IRS-1 schon nach 2 min stark an, um dann bei längerer Insulinstimulation wieder abzufallen. Dabei gibt es zwischen den mit IRS-1 S<sup>318</sup> (Abb. 4.39, schwarze Säulen) und den mit IRS-1 A<sup>318</sup> (Abb. 4.39, hellgraue Säulen) nur geringe Unterschiede.

Bei der Cotransfektion von IRS-1 mit PKC- $\zeta$  fällt die Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 geringer aus. Beim Vergleich IRS-1 S<sup>318</sup> cotransfiziert mit PKC- $\zeta$  (Abb. 4.39, dunkelgraue Säulen) und IRS-1 A<sup>318</sup> cotransfiziert mit PKC- $\zeta$  (Abb. 4.39, weiße Säulen) fällt ein gegenläufiger Phosphorylierungsverlauf auf. Eine genauere Auswertung wird in Kapitel 4.7.5 durchgeführt.

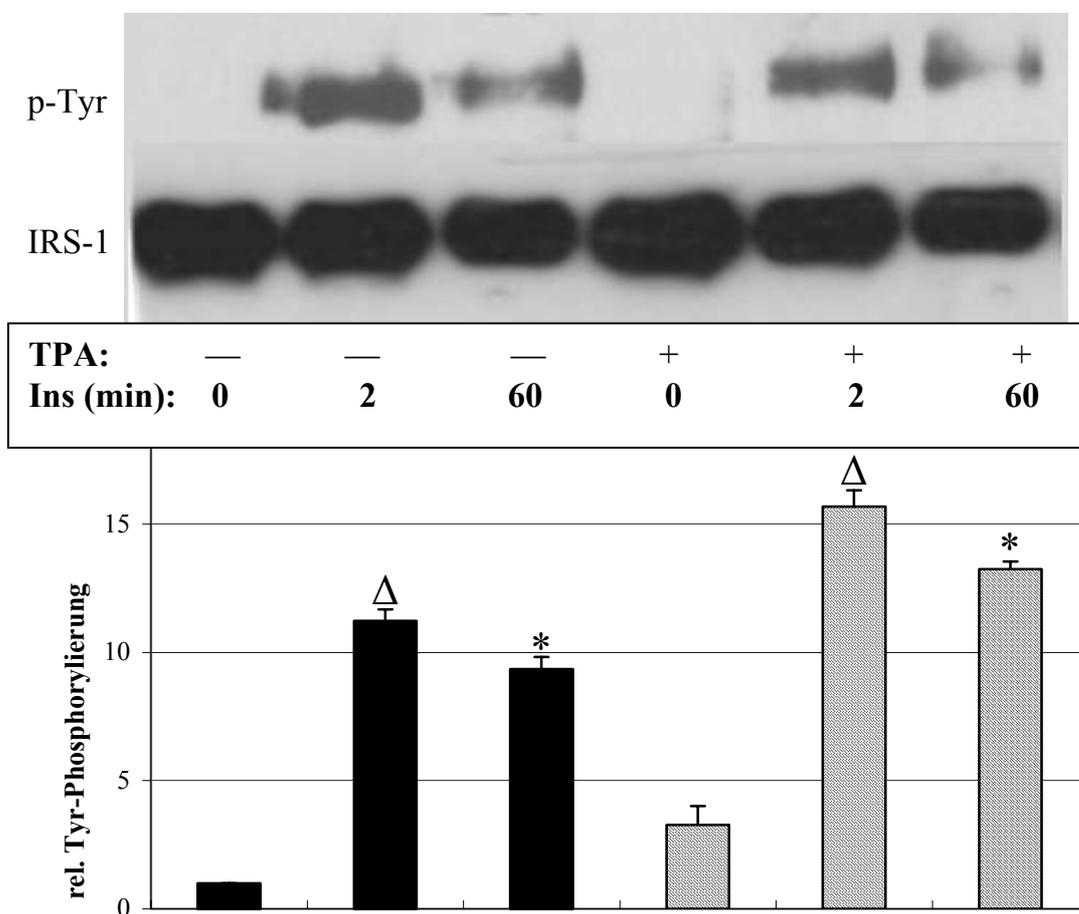
Diese Resultate zeigen, dass im Vergleich zu BHK-Zellen dieses Zellsystem geeignet ist, um die Signaltransduktion nach Insulinstimulation zu analysieren. Für alle weiteren Versuche wurden BHK<sup>IR</sup>-Zellen verwendet.

### **4.7.3 Einfluss der Mutation Ser<sup>318</sup> $\rightarrow$ Ala<sup>318</sup> von IRS-1 auf die Insulinsignalweiterleitung in BHK<sup>IR</sup>-Zellen**

Die Tyrosinphosphorylierung am Insulinrezeptor und an IRS-1 ist ein Maß für die Signalweiterleitung nach Stimulation mit Insulin. BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden in 6-Loch-Platten nach den Standardvorschriften (siehe Kapitel 3.5.1-3.5.5) aufgezogen, transfiziert, stimuliert und lysiert. Immunpräzipitation and Detektion erfolgte, wie in den Kapiteln 3.4.1-3.4.4 beschrieben. Die Zellen wurden 30 min mit 0,5  $\mu$ mol TPA vorinkubiert, bevor sie mit 100 nmol Insulin für 2 bzw. 60 min stimuliert wurden. TPA ist ein starker Aktivator für die klassischen und neuen PKC-Isoenzyme, stimuliert jedoch auch andere Signaltransduktionsmoleküle. Danach erfolgte eine Stimulation mit Insulin, wodurch v.a. PKC- $\beta$ 2, - $\delta$  und  $\zeta$  stimuliert werden. Bei jedem Ansatz wurde eine Transfektionskontrolle durchgeführt, indem 20  $\mu$ g Zellysate elektrophoretisch getrennt, geblottet und gegen die transfizierten Proteine immunchemisch analysiert wurde.

### Transfektion von IRS-1 S<sup>318</sup>

Die Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 in BHK<sup>IR</sup>-Zellen, die mit IRS-1 S<sup>318</sup> transfiziert wurden, nimmt nach Insulinstimulation (Abbildung 4.40) stark und signifikant zu ( $p=0,000068$ ), um dann nach 60 min wieder leicht, jedoch signifikant ( $p=0,028$ ) abzunehmen. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen an Fao-Zellen [179] und an NIH-3T3<sup>IR</sup>-Zellen [180]. Die Vorinkubation mit TPA bewirkt eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1, die Effekte in Abhängigkeit der Insulinstimulation sind jedoch identisch und ebenfalls signifikant ( $p=0,00076$  bei 0-2 min, bzw.  $p=0,016$  bei 2-60 min).

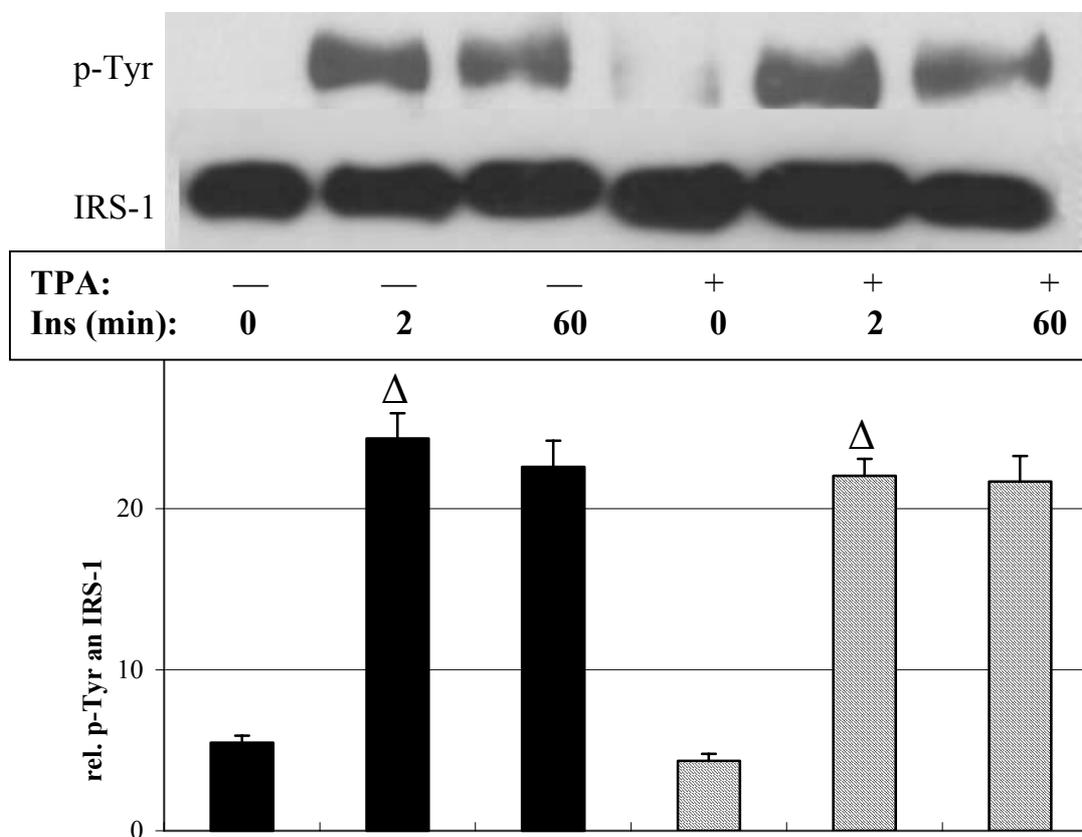


**Abb. 4.40: Insulin- und TPA-stimulierter Einfluss der Transfektion von IRS-1 S<sup>318</sup> in BHK<sup>IR</sup>-Zellen auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> transient transfiziert, mit oder ohne 0,5  $\mu\text{mol}$  TPA vorinkubiert, mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert und lysiert. 400  $\mu\text{g}$  des Lysates wurden mit 4  $\mu\text{g}$  anti-IRS-1 sc-560 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-pTyr 4G10 bzw. IRS-1 sc-560. Das obere Bild zeigt einen charakteristischen Film mit pTyr und IRS-1-Blot und die untere Abbildung die densitometrische Auswertung der pTyr-Blots ( $n=5$ ). Die Werte wurden als Mittelwerte

± SEM ausgewertet; für den Vergleich der Mittelwerte wurde der ungepaarte Studentische t-Test („Student’s-Two-Tailed t-Test“) verwendet. Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet und im Diagramm markiert.

#### Transfektion von IRS-1 A<sup>318</sup>

Bei Zellen mit transient transfizierter mutierter Plasmid-DNA (IRS-1 A<sup>318</sup>), führt eine kurze Insulinstimulation zu einer sehr starken und signifikanten ( $p=0,00037$ ) Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 (Abbildung 4.41).



**Abb. 4.41: Insulin- und TPA-stimulierter Einfluss der Transfektion von IRS-1 A<sup>318</sup> in BHK<sup>IR</sup>-Zellen auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 A<sup>318</sup> transient transfiziert, mit oder ohne 0,5  $\mu\text{mol}$  TPA vorinkubiert, mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min Zeiten stimuliert und lysiert. 400  $\mu\text{g}$  des Lysates wurden mit 4  $\mu\text{g}$  anti-IRS-1 sc-560 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Die Detektion erfolgte mit anti-pTyr 4G10 bzw. IRS-1 sc-560. Das obere Bild zeigt einen charakteristischen Film mit pTyr und IRS-1-Blot und die untere Abbildung die densitometrische Auswertung der pTyr-Blots ( $n = 5$ ). Die Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM ausgewertet; für den Vergleich der Mittelwerte wurde der ungepaarte Studentische t-Test („Student’s-Two-Tailed t-Test“) verwendet. Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet und im Diagramm markiert.

Nach verlängerter Stimulation findet eine schwache, wenig signifikante ( $p=0,036$ ) Abnahme der Tyrosinphosphorylierung statt. Wurden die Zellen zuvor mit TPA vorinkubiert, kommt es zu einem nahezu identischen Ergebnis wobei die Zunahme nach 2 min mit  $p=0,00023$  signifikant, die Abnahme nach 60 min mit  $p=0,771$  nicht signifikant ist. Die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 ist -verglichen mit den Ergebnissen der Zellen, die mit der mutierten Plasmid-DNA transfiziert wurden- um etwa 50 % höher.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Mutation der phosphorylierbaren Aminosäure an Position 318 von IRS-1 die Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 moduliert wird, und zwar ist die Abnahme der Tyrosinphosphorylierung nach verlängerter Insulinstimulation nicht mehr signifikant, und sie nimmt durch die Mutation von Ser<sup>318</sup> zu Ala<sup>318</sup> stark zu.

#### **4.7.4 Wird IRS-1 an Ser<sup>318</sup> durch PKC- $\delta$ phosphoryliert und somit die Insulinsignalweiterleitung moduliert?**

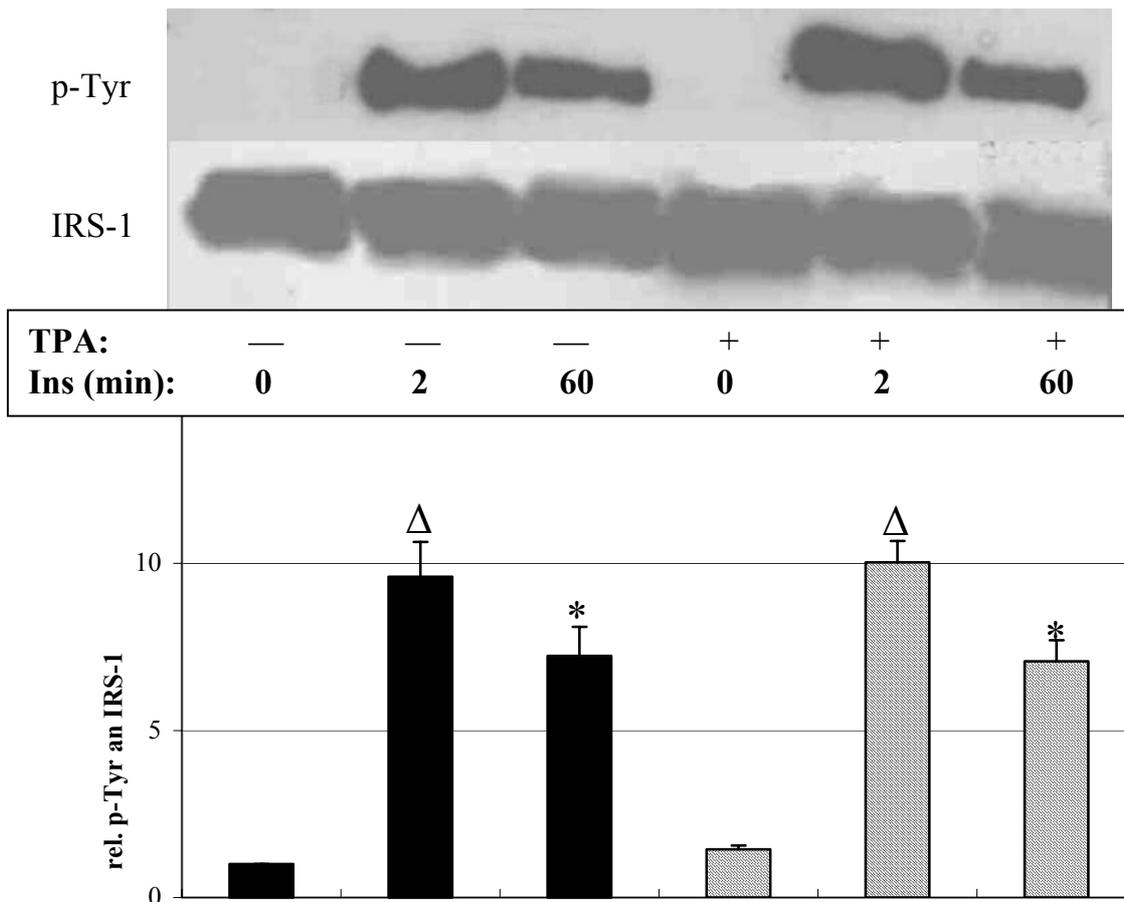
Zur Überprüfung, ob PKC- $\delta$  die Insulin-Signalweiterleitung moduliert, wurde IRS-1 S<sup>318</sup> bzw. IRS-1 A<sup>318</sup> mit PKC- $\delta$  cotransfiziert. Die Zellen wurden nach TPA-Vorinkubation (0,5  $\mu$ mol für 30 min) mit 100 nmol Insulin für 2 bzw. 60 min stimuliert und nach den Standardvorschriften aufgearbeitet.

##### Cotransfektion von IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\delta$

In BHK<sup>IR</sup>-Zellen, die mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  cotransfiziert wurden (Abb. 4.42), wird IRS-1 nach 2 min Insulinstimulation signifikant an Tyrosinresten phosphoryliert ( $p=0,00017$ ). Nach 60 min Insulinstimulation geht die Tyrosinphosphorylierung wieder signifikant zurück ( $p=0,0004$ ).

Nach Vorinkubation mit TPA reagieren die Zellen nahezu identisch auf Insulin. Sowohl die Zunahme der Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 nach kurzer Insulinstimulation, als auch die Abnahme nach 60 min Insulinstimulation sind signifikant ( $p=0,0000057$  bzw. 0,00102). Beim Vergleich von Abbildung 4.42 mit Abbildung 4.40 (nur IRS-1 S<sup>318</sup> wurde transfiziert) fällt auf, dass durch die Cotransfektion von PKC- $\delta$  die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 nach 2 oder

60 minütiger Insulinstimulation um etwa 20 % zurückgeht. Da die Tyrosinphosphorylierung der nichtstimulierten Probe durch die Cotransfektion nicht beeinflusst wird, werden die Effekte nicht durch die Cotransfektion, sondern durch die Stimulation vermittelt. Nach der Vorinkubation mit TPA geht die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 nach 2 oder 60 minütiger Insulinstimulation um etwa 40 % zurück.

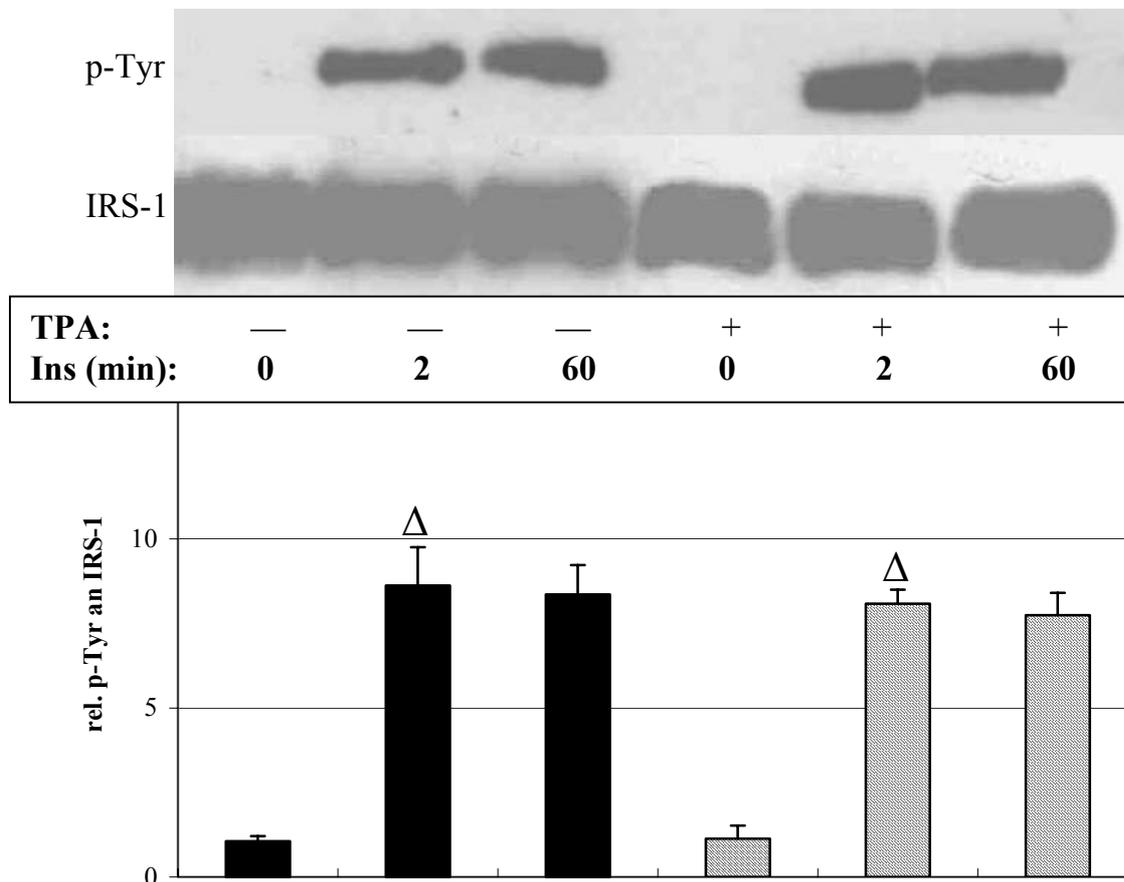


**Abb. 4.42: Insulin- und TPA-stimulierter Einfluss der Cotransfektion von IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  in BHK<sup>IR</sup>-Zellen auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  transient transfiziert, mit oder ohne 0,5  $\mu$ mol TPA 30 min vorinkubiert, mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert und lysiert. 400  $\mu$ g des Lysates wurden mit 4  $\mu$ g anti-IRS-1 sc-560 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-pTyr 4G10 bzw. IRS-1 sc-560. Das obere Bild zeigt einen charakteristischen Film mit pTyr und IRS-1-Blot und die untere Abbildung die densitometrische Auswertung der pTyr-Blots, wobei 7 Versuche eingegangen sind. Die Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM ausgewertet; für den Vergleich der Mittelwerte wurde der ungepaarte Studentische t-Test („Student’s-Two-Tailed t-Test“) verwendet. Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet und im Diagramm markiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PKC- $\delta$  die Signalweiterleitung nach Insulinstimulation durch Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 moduliert. Die Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 wird nach Insulinstimulation um 20 % reduziert und nach Vorinkubation mit TPA und zusätzlicher Insulinstimulation geht sie um 40 % zurück.

#### Cotransfektion von IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\delta$

Wird mutiertes IRS-1 A<sup>318</sup> transfiziert, so findet nach kurzer Insulinstimulation eine signifikante Zunahme der Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 statt (ohne TPA:  $p=0,00035$ , mit TPA:  $p=0,0000422$ ), die nach 60 min leicht, jedoch nicht signifikant reduziert wird ( $p=0,63$  bzw.  $0,46$ ) (Abbildung 4.43).

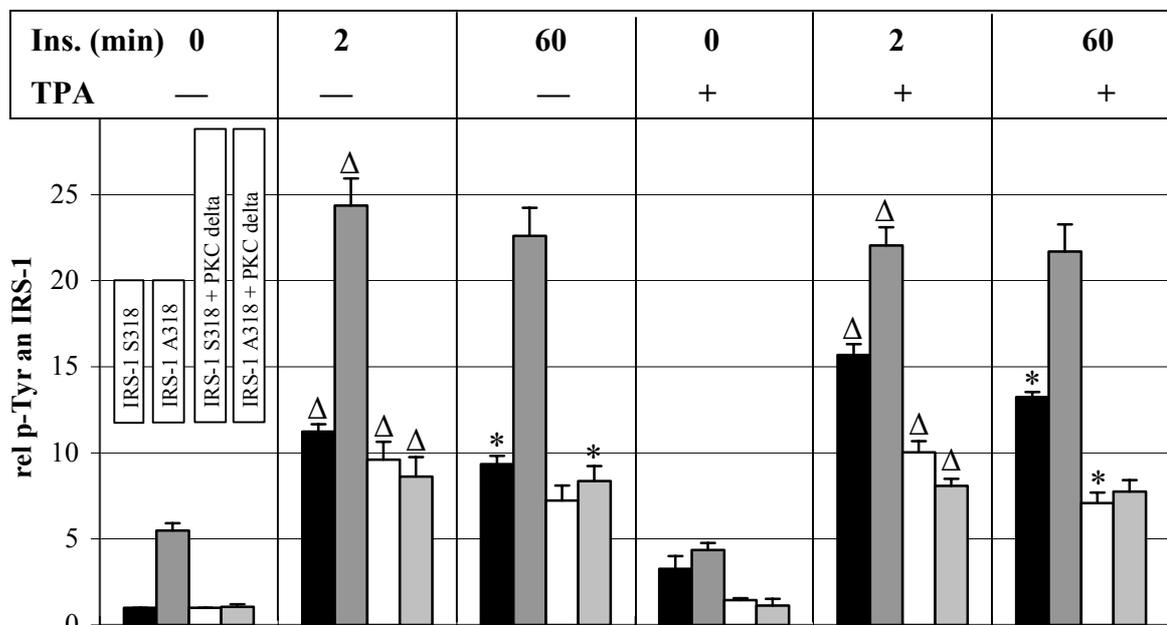


**Abb. 4.43: Insulin- und TPA-stimulierter Einfluss der Cotransfektion von IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  in BHK<sup>IR</sup>-Zellen auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  transient transfiziert, mit oder ohne 0,5  $\mu$ mol TPA vorinkubiert, mit 100 nmol 2 bzw. 60 min stimuliert und lysiert. 400  $\mu$ g des Lysates wurden mit 4  $\mu$ g anti-IRS-1 sc-560 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-pTyr 4G10 bzw. IRS-1 sc-560. Das obere Bild zeigt einen charakteristischen Film mit pTyr und IRS-1-Blot und die

untere Abbildung die densitometrische Auswertung der pTyr-Blots (n=7). Die Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM ausgewertet; für den Vergleich der Mittelwerte wurde der ungepaarte Studentische t-Test („Student's-Two-Tailed t-Test“) verwendet. Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet und im Diagramm markiert.

Auffallend ist, dass die Intensität der Tyrosinphosphorylierung, die durch die Transfektion mit dem mutierten Plasmid stark erhöht war, durch die Cotransfektion mit PKC- $\delta$  wieder auf ein mit den Wildtyp-Proben vergleichbares Niveau abgeschwächt wurde.

In Abbildung 4.44 werden die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.



**Abb. 4.44:** Übersicht über die Insulin- und TPA-stimulierten Effekte in transfizierten BHK<sup>IR</sup>-Zellen auf die Tyrosinphosphorylierung an IRS-1. BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> (schwarze Säulen), IRS A<sup>318</sup> (dunkelgraue Säulen) oder mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  (weiße Säulen) oder IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  (hellgraue Säulen) transient transfiziert, mit oder ohne 0,5  $\mu$ mol TPA vorinkubiert, mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert und lysiert. 400  $\mu$ g des Lysates wurden mit 4  $\mu$ g anti-IRS-1 sc-560 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-pTyr 4G10. Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung (n=5 bzw. 7, siehe oben). Die Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM ausgewertet; für den Vergleich der Mittelwerte wurde der ungepaarte Studentische t-Test („Student's-Two-Tailed t-Test“) verwendet. Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet und im Diagramm markiert.

Aus den Untersuchungen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

- Es ist deutlich zu erkennen, dass durch die Verhinderung der Phosphorylierung an IRS-1 Ser<sup>318</sup> (Mutation S<sup>318</sup> → A<sup>318</sup>) die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 basal stark zunimmt und auch durch Stimulation mit TPA oder Insulin stark erhöht bleibt.
- Durch Cotransfektion mit PKC- $\delta$  wird dieser Effekt wieder aufgehoben.
- Nach Insulinstimulation von 60 min nimmt die Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 ab. Die Abnahme ist jedoch nur signifikant bei den Zellen, die mit dem Wildtyp-Plasmid transfiziert wurden.
- Wenn PKC- $\delta$  und IRS-1 A<sup>318</sup> cotransfiziert werden, so findet nach 60 min Insulinstimulation unabhängig von der TPA-Vorstimulation keine signifikante Abnahme der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 statt.

Die Effekte unterscheiden sich jedoch nur gering. Es ist eindeutig, dass die PKC- $\delta$  die Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 moduliert, ob weitere PKC-Isoenzyme dabei eine Rolle spielen kann nicht ausgeschlossen werden.

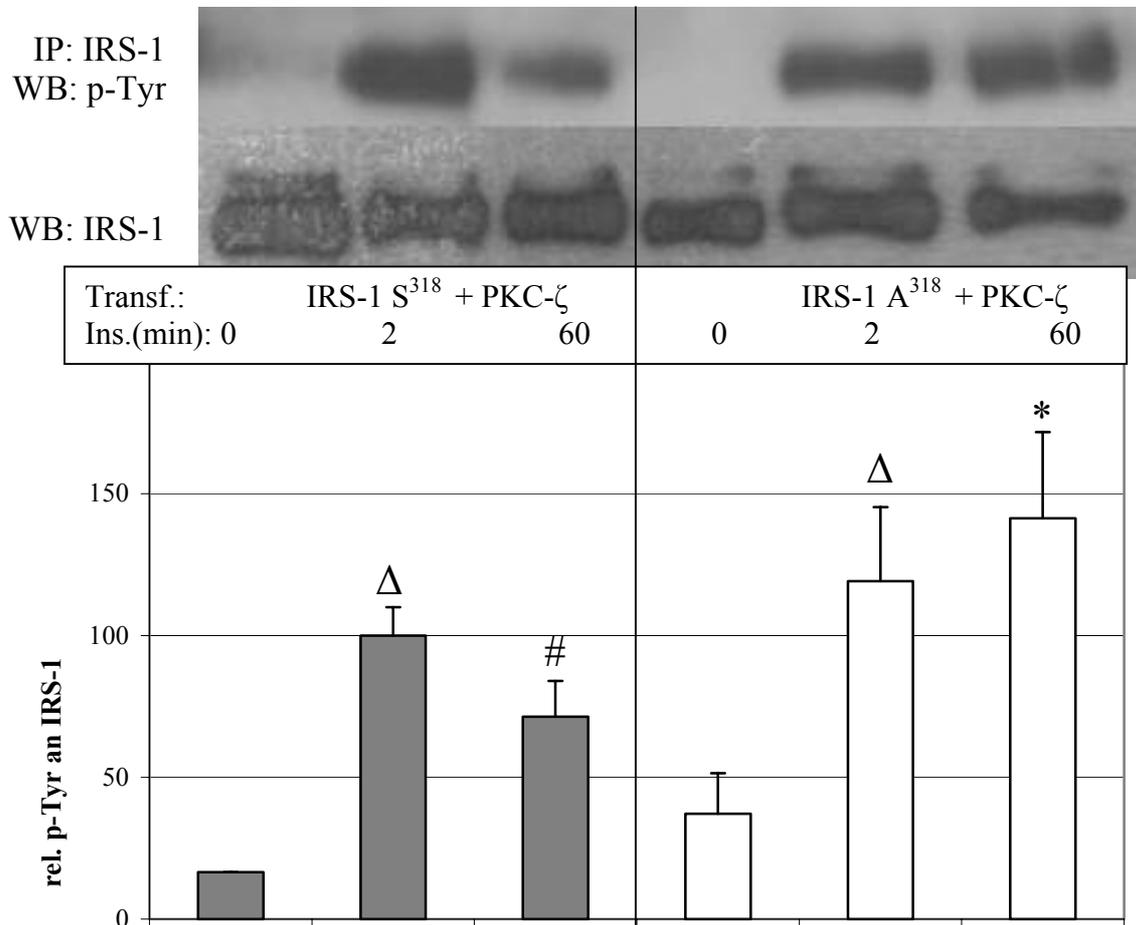
#### **4.7.5 Wird IRS-1 an Ser<sup>318</sup> durch PKC- $\zeta$ phosphoryliert und somit die Insulinsignalweiterleitung moduliert ?**

Zur Überprüfung, ob PKC- $\zeta$  die Signalweiterleitung moduliert, wurde IRS-1 S<sup>318</sup> bzw. IRS-1 A<sup>318</sup> mit PKC- $\zeta$  cotransfiziert und somit überexprimiert. PKC- $\zeta$  ist nicht durch TPA, aber durch Insulin stimulierbar, wodurch für diese Untersuchungen eine Vorinkubation mit TPA nicht notwendig ist. Die Zellen wurden nach den Standardmethoden aufgezogen, mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min lang stimuliert und nach den Standardvorschriften aufgearbeitet.

Bei der Cotransfektion des Wildtyp-Plasmids von IRS-1 (IRS-1 S<sup>318</sup>) und PKC- $\zeta$  steigt nach 2 min Insulinstimulation die Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 stark und signifikant an ( $p=0,0011$ ), und geht dann nach 60 min Insulinstimulation wieder signifikant zurück ( $p=0,001$ ) (Abbildung 4.45).

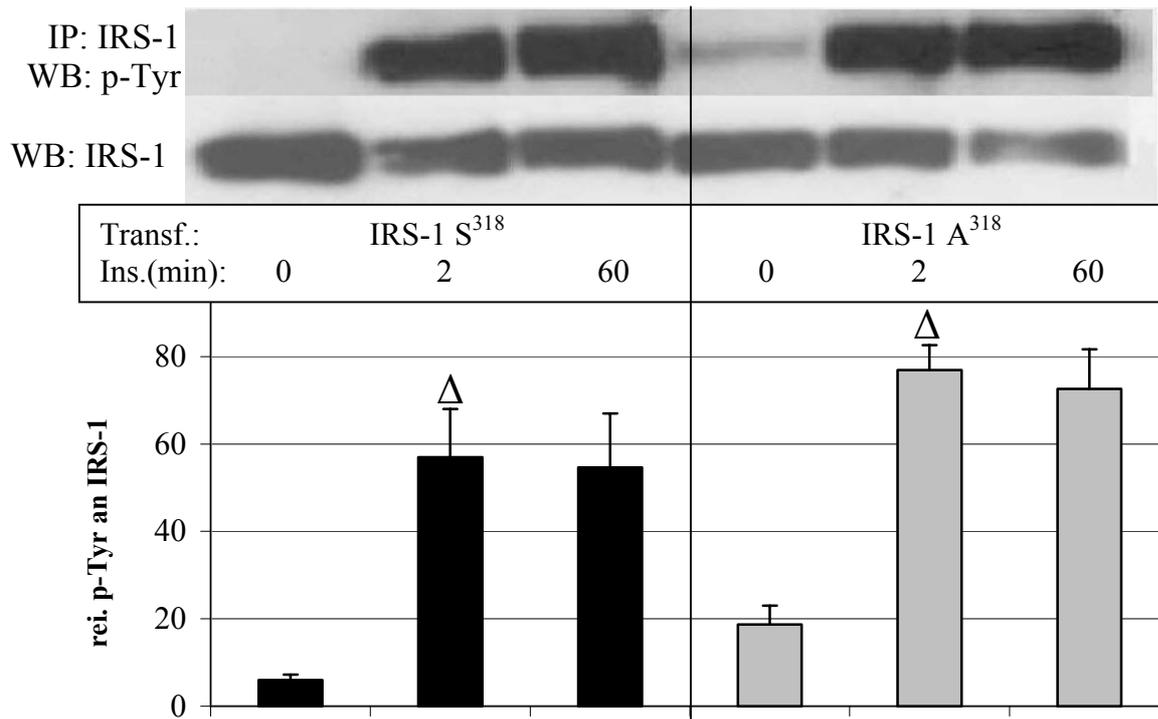
Wurde IRS-1 A<sup>318</sup> mit PKC- $\zeta$  cotransfiziert, dann ist der Anstieg der Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 nach 2 min Insulinstimulation ebenfalls

relevant ( $p=0,0043$ ). Von 2 nach 60 min Insulinstimulation ist weiterhin eine signifikante Zunahme ( $p=0,0069$ ) der Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 zu erkennen.



**Abb. 4.45: Insulinstimulierter Einfluss der Cotransfektion von PKC-ζ und IRS-1 A<sup>318</sup> bzw. IRS-1 S<sup>318</sup> auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC-ζ (dunkelgraue Säulen) oder mit IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC-ζ (weiße Säulen) transient transfiziert, mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert und lysiert. 400 µg des Lysates wurden mit 4 µg anti-IRS-1 12H8 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-pTyr 4G10 bzw. IRS-1 sc-560. Das obere Bild zeigt einen charakteristischen Film und die untere Abbildung die densitometrische Auswertung ( $n=7$ ). Die Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM ausgewertet; für den Vergleich der Mittelwerte wurde der ungepaarte Studentische t-Test („Student’s-Two-Tailed t-Test“) verwendet. Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet und im Diagramm markiert.

Durch den direkten Vergleich mit Zellen, die ohne PKC-ζ transfiziert wurden, kann der auf diese PKC-Isoform beruhende Effekt deutlich gezeigt werden (Abb. 4.46).



**Abb. 4.46: Insulinstimulierter Einfluss der Transfektion von IRS-1 A<sup>318</sup> bzw. IRS-1 S<sup>318</sup> auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> (schwarze Säulen) oder mit IRS-1 A<sup>318</sup> (hellgraue Säulen) transient transfiziert, mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert und lysiert. 400 µg des Lysates wurden mit 4 µg anti-IRS-1 12H8 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-pTyr 4G10 bzw. IRS-1 sc-560. Das obere Bild zeigt einen charakteristischen Film mit pTyr und IRS-1-Blot und die untere Abbildung die densitometrische Auswertung der pTyr-Blots (n=7). Die Werte wurden als Mittelwerte ± SEM ausgewertet; für den Vergleich der Mittelwerte wurde der ungepaarte Studentische t-Test („Student’s-Two-Tailed t-Test“) verwendet. Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet und im Diagramm markiert.

Nach 2 min Insulinstimulation liegt IRS-1 sowohl in Zellen mit transfiziertem IRS-1 S<sup>318</sup> (p=0,02) als auch in denen mit transfiziertem IRS-1 A<sup>318</sup> signifikant phosphoryliert vor (p=0,00024). Nach 60 min Insulinstimulation nimmt die IRS-1 Tyrosinphosphorylierung nicht signifikant ab (p=0,52 bzw. 0,44).

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- Bei gleichzeitiger Überexpression von IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC-ζ findet nach 60 minütiger Insulinstimulation eine signifikante Abnahme der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 statt.

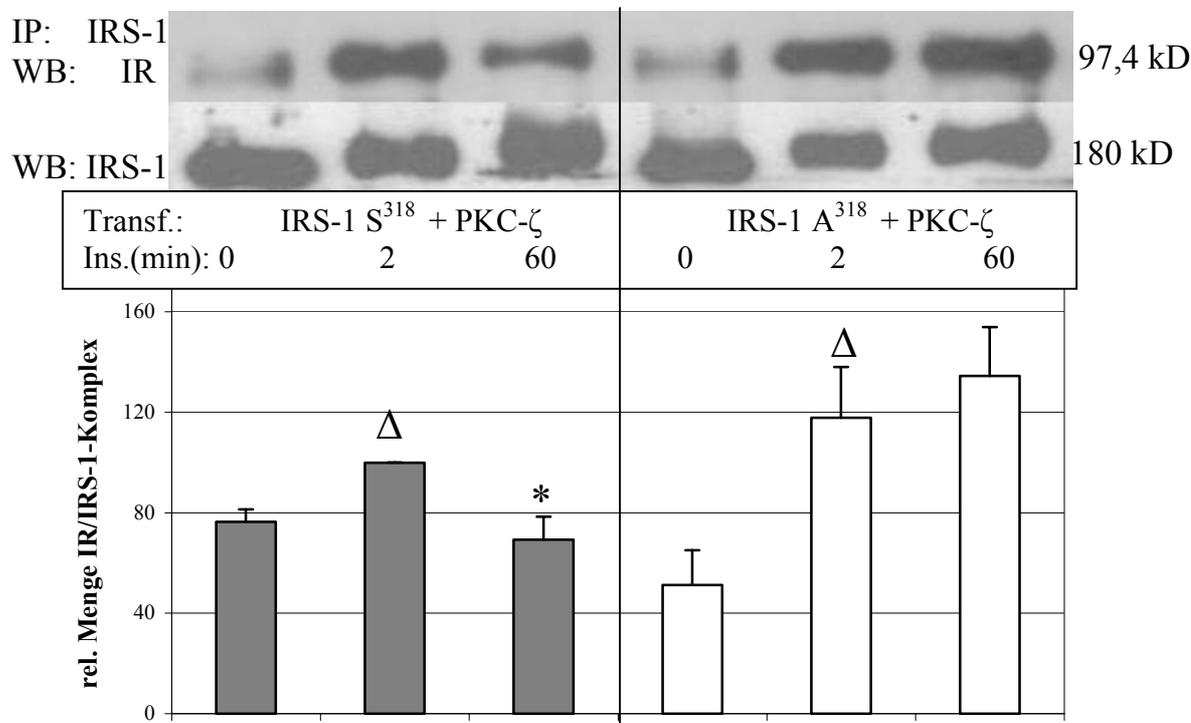
- Bei gleichzeitiger Überexpression der Mutante IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  bleibt nach 60 minütiger Insulinstimulation die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 erhalten.
- **PKC- $\zeta$  moduliert die Tyrosinphosphorylierung am IRS-1 durch eine Phosphorylierung von Serin<sup>318</sup> an IRS-1. Reduzierte Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 wurde in der Literatur als hemmend auf die Insulinsignalweiterleitung beschrieben [179;180]. Diese negative Modulation wird aufgehoben, wenn Serin<sup>318</sup> zu Alanin<sup>318</sup> mutiert wird und diese Stelle nicht durch PKC- $\zeta$  phosphoryliert werden kann.**

#### **4.7.6 Die Phosphorylierung an IRS-1 Serin<sup>318</sup> durch PKC- $\zeta$ vermindert die Wechselwirkung mit dem Insulinrezeptor**

Nach Insulinstimulation kommt es zu einer raschen Autophosphorylierung des Insulinrezeptors als initialen Schritt der Insulinsignalweiterleitung, wodurch die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors gesteuert wird [188]. Durch die PTB-Domäne bindet IRS-1 als Adaptermolekül an das an Tyrosinresten phosphorylierte NPEpY<sup>960</sup>-Motiv des aktivierten Rezeptors [189] und leitet das Signal durch Tyrosinphosphorylierungen an weitere Signaltransduktionsmoleküle wie z.B. die PI3-Kinase, Grb2 oder an die Protein Tyrosin Phosphatase SHP-2 weiter [190]. Die Menge des gebildeten Komplexes aus Insulinrezeptor und IRS-1 ist somit ein Maß für die Signalweiterleitung.

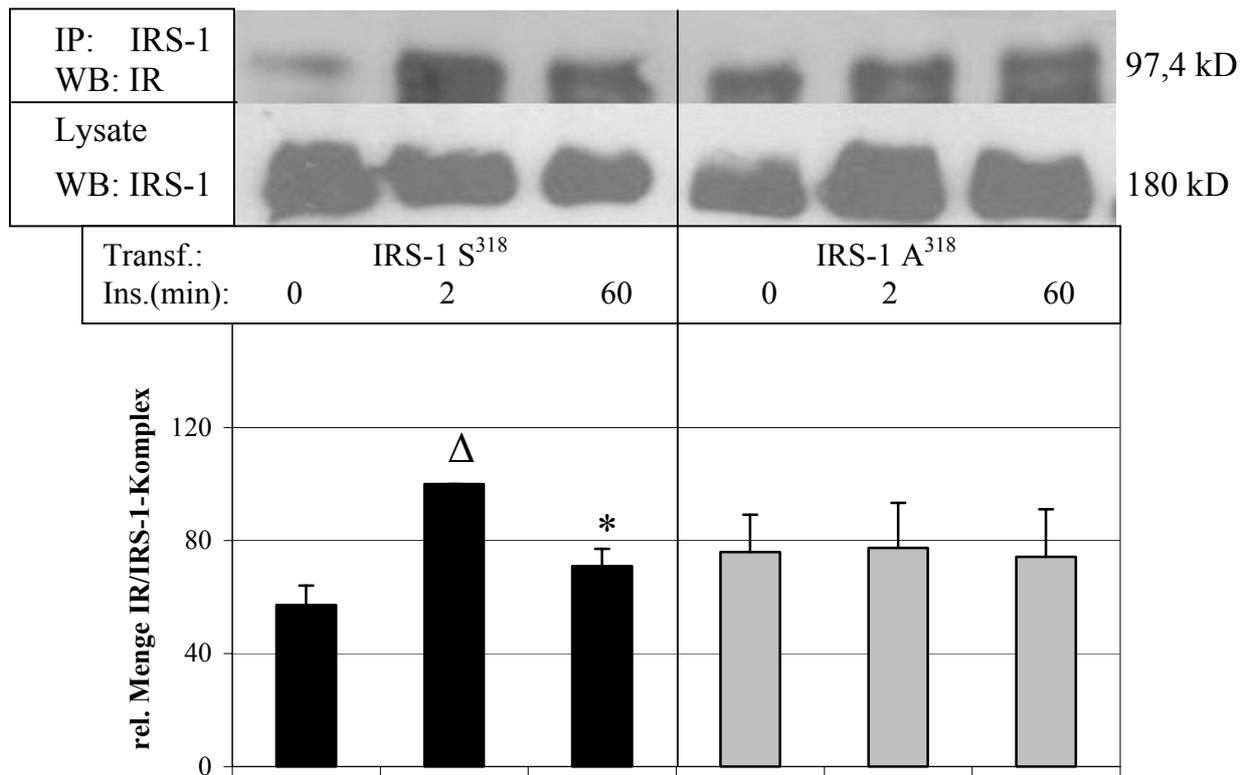
BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> oder IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  cotransfiziert, mit Insulin stimuliert und nach den Standardvorschriften lysiert, immunpräzipitiert, getrennt und mit dem polyklonalen Antikörper sc-711 gegen den Insulinrezeptor und sc-560 gegen IRS-1 detektiert (Abbildung 4.47). Bei der Cotransfektion von PKC- $\zeta$  mit dem Wildtyp-Plasmid (IRS-1 S<sup>318</sup>) nimmt die Komplexbildung nach 2 min Insulinstimulation signifikant zu ( $p=0,003$ ), um dann nach 60 min wiederum signifikant zurückzugehen ( $p=0,015$ ). Wird jedoch PKC- $\zeta$  mit der mutierten Plasmid-DNA cotransfiziert, findet nach 2 min Insulinstimulation ebenfalls eine Zunahme der Komplexbildung ( $p=0,017$ ), nach

60 min Stimulation wird die Abnahme der Komplexbildung jedoch verhindert. Dieser Verlauf korreliert mit der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1, was in Abbildung 4.45 gezeigt wurde.



**Abb. 4.47: Insulinstimulierter Einfluss der Cotransfektion von PKC-ζ und IRS-1 A<sup>318</sup> bzw. IRS-1 S<sup>318</sup> auf die Komplexbildung IR/IRS-1.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC-ζ (dunkelgraue Säulen) oder mit IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC-ζ (weiße Säulen) transient transfiziert, mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert und lysiert. 400 μg des Lysates wurden mit 4 μg anti-IRS-1 12H8 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Die Detektion erfolgte mit anti-IR sc-711 bzw. IRS-1 sc-560. Das obere Bild zeigt einen charakteristischen Film mit pTyr und IRS-1-Blot und die untere Abbildung die densitometrische Auswertung der pTyr-Blots (n=7). Die Werte wurden als Mittelwerte ± SEM ausgewertet, wobei der 2 min-Wert des Wildtyps = 100 gesetzt wurde. Für den Vergleich der Mittelwerte wurde der ungepaarte Studentische t-Test („Student’s-Two-Tailed t-Test“) verwendet. Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet und im Diagramm markiert.

Wurde nur das Wildtyp-Plasmid transfiziert, so nimmt nach 2 min Insulinstimulation die relative Menge des Komplexes IR/IRS-1 signifikant zu (p=0,00065), um dann bis 60 min wiederum signifikant (p=0,0028) abzunehmen (Abbildung 4.48). Die Transfektion des mutierten Plasmids verhindert jegliche Änderung der Menge des Komplexes nach Insulinstimulation.



**Abb. 4.48: Insulinstimulierter Einfluss der Transfektion von IRS-1 A<sup>318</sup> bzw. IRS-1 S<sup>318</sup> auf die Komplexbildung IR/IRS-1.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> (schwarze Säulen) oder mit IRS-1 A<sup>318</sup> (hellgraue Säulen) transient transfiziert, mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert und lysiert. 400 µg des Lysates wurden mit 4 µg anti-IRS-1 12H8 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-IR sc-711 (oberer Film). Zur Kontrolle wurden je 20 µg der Lysate elektrophoretisch getrennt und mit anti-IRS-1 sc-560 detektiert (unterer Film). Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der IP-Blots (n=8). Die Werte wurden als Mittelwerte ± SEM ausgewertet, wobei der 2 min-Wert des Wildtyps = 100 gesetzt wurde. Für den Vergleich der Mittelwerte wurde der ungepaarte Studentische t-Test („Student’s-Two-Tailed t-Test“) verwendet. Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet und im Diagramm markiert.

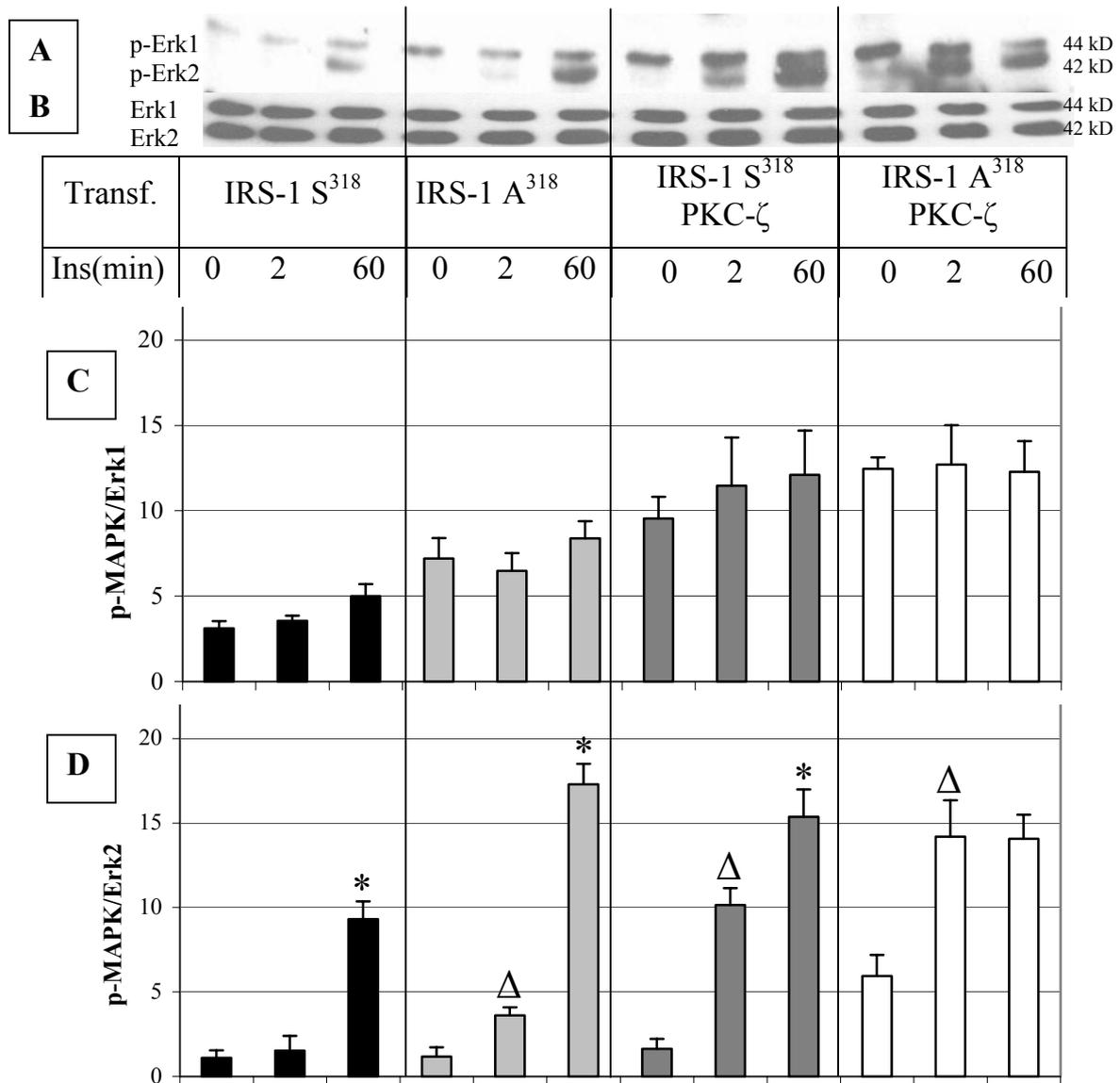
Ein Vergleich der Versuche, bei denen nur IRS-1 S<sup>318</sup>- oder A<sup>318</sup>-Plasmid transfiziert wurde (Abb. 4.46) mit den Resultaten, bei denen zusätzlich PKC-ζ transfiziert wurde (Abb. 4.47), zeigt, **dass auch bei der Bildung des Komplexes IRS-1/IR, ebenso wie bei der Tyrosinphosphorylierung des IRS-1, ein eindeutiger PKC-ζ abhängiger Effekt zu erkennen ist.** Bei der Cotransfektion des Wildtyp-Plasmids IRS-1 S<sup>318</sup> mit PKC-ζ nimmt nach 2 min Insulinstimulation die Menge des IRS-1/IR-Komplexes signifikant zu, um dann nach 60 min wieder abzunehmen. Wird jedoch das mutierte Plasmid IRS-1 A<sup>318</sup> mit PKC-ζ

cotransfiziert so ist nach 60 min Insulinstimulation keine verminderte Komplexbildung zwischen IRS-1 und dem Insulinrezeptor nachweisbar.

#### **4.7.7 Die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> durch PKC- $\zeta$ hat keinen Einfluss auf die Aktivität der MAP-Kinase Erk1, jedoch einen aktivierenden Effekt auf die MAP-Kinase Erk2 nach 2 min Insulinstimulation**

Die durch PKC- $\zeta$  katalysierte Phosphorylierung von IRS-1 S<sup>318</sup> vermindert sowohl die Komplexbildung des IRS-1 mit dem Insulinrezeptor als auch die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 und moduliert somit die Initialschritte der Insulinsignaltransduktion. Mitogene Prozesse, wie z.B. Zellwachstum oder Genexpression werden über den Signaltransduktionsweg Shc, Grb2, Sos, Ras, Raf, MEK und MAP-Kinase von IRS-1 beeinflusst [191]. MAP-Kinasen sind Serin-/Threonin-Kinasen, die PXS/TP-Motive in Proteinen phosphorylieren. Zu den MAP-Kinasen gehört die MAP-Kinase1/Erk1 (=p44 MAPK) und die MAP-Kinase2/Erk2 (=p42 MAPK). Die Aktivierung der MAPK erfolgt durch Phosphorylierung eines Tyrosin- und eines Threoninrestes durch MEK1 oder MEK2. Aktivierte MAPK phosphorylieren u.a. Proteine im Zytoskelett, Translationsregulatoren, Transkriptionsfaktoren und die Rsk Proteinkinasen [192-194]. Die Aktivierung der MAPK kann durch einen Antikörper detektiert werden, der spezifisch für die beiden phosphorylierten Formen in Erk1 und Erk2 ist.

BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> oder IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  transfiziert, mit Insulin stimuliert und nach den Standardvorschriften aufgearbeitet. Je 20  $\mu$ g der Lysate wurden elektrophoretisch getrennt, geblottet und analysiert (Abbildung 4.49). Die insulinstimulierte Tyrosinphosphorylierung von Erk1 und Erk2 zeigt deutliche Unterschiede. Bei Erk 1 wird die Phosphorylierung an Tyr<sup>180</sup> nach 2 min Insulin nicht, nach 60 min Insulin nur minimal stimuliert. Durch die Mutation von Ser<sup>318</sup> zu Ala<sup>318</sup> in IRS-1 ist die Phosphorylierung an Tyr<sup>180</sup> von Erk1 erhöht, ebenso wie nach Cotransfektion mit PKC- $\zeta$ .



**Abb. 4.49: Insulinstimulierter Einfluss der Cotransfektion von PKC-ζ und IRS-1 A<sup>318</sup> bzw. IRS-1 S<sup>318</sup> auf die Aktivierung von Erk1/Erk2.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> oder IRS-1 A<sup>318</sup> bzw. mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC-ζ oder mit IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC-ζ transient transfiziert, mit 100 nmol Insulin 2 bzw. 60 min stimuliert und lysiert. 20 µg der Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-MAPK/Erk1/2pY<sup>180</sup> (Film A bzw. anti-MAPK (Film B)). Das Diagramm C zeigt die densitometrische Auswertung (n=3) gegen p-MAPK/Erk1, das Diagramm D die gegen p-MAPK/Erk2. Die Werte wurden als Mittelwerte ± SEM ausgewertet. Für den Vergleich der Mittelwerte wurde der ungepaarte Studentische t-Test („Student’s-Two-Tailed t-Test“) verwendet. Unterschiede mit p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet und im Diagramm markiert.

Erk2 hingegen verhält sich anders. Diese MAPK wird durch Insulin stimuliert. Nach Transfektion des Wildtyp-Plasmids (IRS-1 S<sup>318</sup>) wird Erk2 erst nach 60 min Insulinstimulation signifikant an Tyr<sup>180</sup> phosphoryliert (p=0,0027). Die

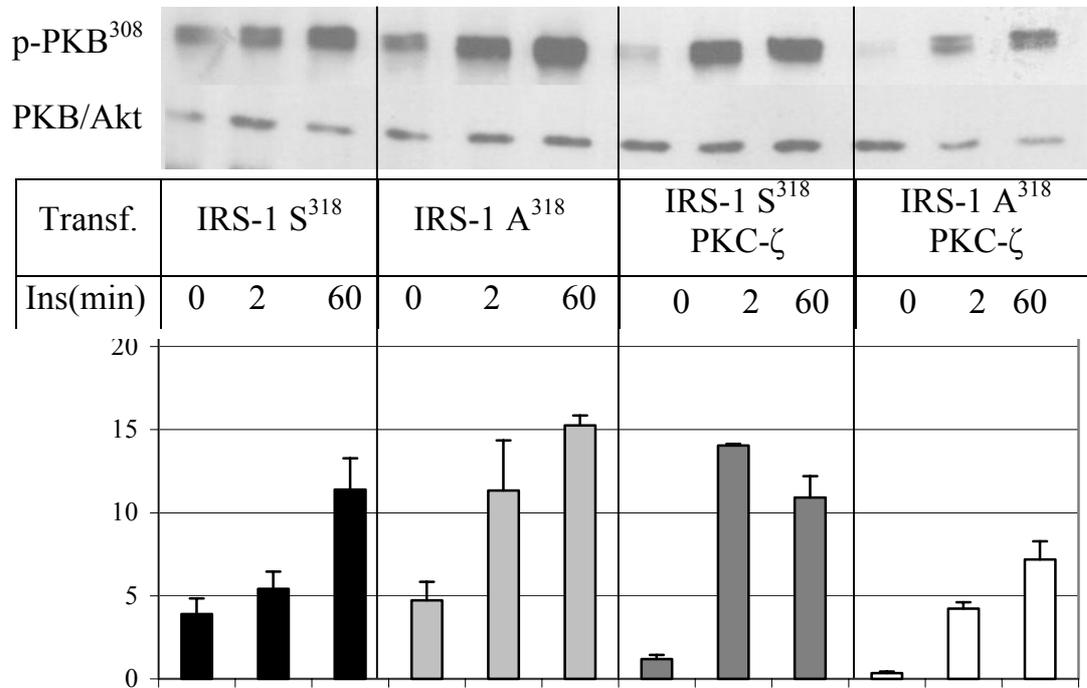
Mutation von IRS-1 Ser<sup>318</sup> zu Ala<sup>318</sup> bewirkt, dass Erk2 bereits nach 2 min Insulinstimulation schwach, jedoch signifikant phosphoryliert vorliegt ( $p=0,0084$ ).

Die Cotransfektion von IRS-1 S<sup>318</sup> mit PKC- $\zeta$  bewirkt, dass Erk2 schon nach 2 min Insulinstimulation stark und signifikant an Tyr<sup>180</sup> phosphoryliert vorliegt ( $p=0,0065$ ). Nach 60 min Insulinstimulation findet eine weitere signifikante Zunahme der Tyrosinphosphorylierung an Erk2 statt ( $p=0,019$ ). BHK<sup>IR</sup>-Zellen, die mit IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  cotransfiziert wurden, sind basal schon intensiv an Erk2 Tyr<sup>180</sup> phosphoryliert. Auch hier bewirkt PKC- $\zeta$ , dass die Tyrosinphosphorylierung schon nach 2 min signifikant und intensiv zunimmt ( $p=0,045$ ). Die Intensität der Erk2-Phosphorylierung nach 2 min hat bereits das Niveau der maximalen im Wildtyp zu erreichenden Phosphorylierung, d.h. nach 60 min Insulinstimulation, erreicht. In der Mutante bleibt die Phosphorylierung zwischen 2 und 60 min Insulinstimulation konstant (Abb. 4.49).

#### **4.7.8 Die Phosphorylierung an IRS-1 durch PKC- $\zeta$ ist ein negativer Regulator der PKB-Aktivität**

Ebenso wie Grb2 bindet die regulatorische p85 Untereinheit der PI3-Kinase über eine SH2 Domäne an tyrosinphosphoryliertes IRS-1, wodurch die PI3-Kinase aktiviert wird [195]. Durch die katalytische Aktivität der p110 Untereinheit dieser Kinase werden verschiedene 3'-Phospholipide gebildet, wodurch eine Translokation von Serinkinasen zur Plasmamembran katalysiert wird [47]. Dazu gehören die phospholipidabhängigen Kinasen PDK1 und PDK2 und die Proteinkinase B (PKB/Akt). Während der Colokalisation wird PKB durch die PDK-Isoenzyme durch Phosphorylierungen an Thr<sup>308</sup> und Serin<sup>473</sup> aktiviert. Aktivierte PKB dissoziiert von der Membran und phosphoryliert verschiedene Substrate sowohl im Cytosol, als auch im Zellkern [196]. Dadurch beeinflusst PKB verschiedene Prozesse, wie z.B. Proteinsynthese, Glucosetransport, Zellproliferation und Glycogensynthese [197;198]. Die Aktivierung der Proteinkinase B wurde mit einem spezifische Antikörper gegen die pThr<sup>308</sup>

untersucht. Die Co-Immunpräzipitation von IRS-1 mit der PI3-Kinase gelang in diesem Zellsystem nicht. Bei der Transfektion von IRS-1 S<sup>318</sup> bzw. IRS-1 A<sup>318</sup> liegt PKB an Thr<sup>308</sup> basal phosphoryliert vor (Abbildung 4.50).



**Abb. 4.50: Insulinstimulierter Einfluss der Cotransfektion von PKC-ζ und IRS-1 A<sup>318</sup> bzw. IRS-1 S<sup>318</sup> auf die Aktivierung von PKB.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> oder IRS-1 A<sup>318</sup> bzw. mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC-ζ oder mit IRS-1 A<sup>318</sup> und PKC-ζ transient transfiziert, mit 100 nmol Insulin für 2 bzw. 60 min stimuliert und lysiert. 20 µg der Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-PKB pThr<sup>308</sup> (oberer Film) bzw. anti-PKB/Akt (unterer Film). Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der pThr-Blots (n=2).

Die Phosphorylierung an PKB Ths<sup>308</sup> steigt nach Insulinstimulation an. Wird jedoch PKC-ζ und IRS-1 S<sup>318</sup> cotransfiziert, so findet nach längerer Insulinstimulation eine Abnahme der T<sup>308</sup>-Phosphorylierung an PKB/Akt statt und somit eine negative Regulation. Dies bestätigt Ergebnisse, die in CHO-Zellen erhalten wurden [199]. Bei der Cotransfektion der mutierten Plasmid-DNA IRS-1 A<sup>318</sup> mit PKC-ζ findet diese negative Regulation nicht statt und es wird ein ähnlicher Phosphorylierungsverlauf (korrigiert gegen den Proteinblot) wie bei der alleinigen Transfektion von IRS-1 erhalten. Die Phosphorylierung an pSer<sup>473</sup>

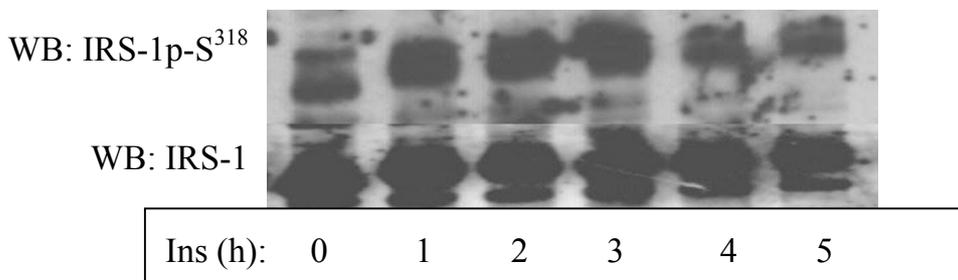
wurde ebenfalls untersucht, doch mit dem verwendeten Antikörper konnte die Phosphorylierung nur schwach und nicht stimulierbar detektiert werden.

Zusammenfassend: PKC- $\zeta$  ist ein negativer Regulator der PKB-Aktivität. Diese negative Regulation kann aufgehoben werden, indem die Phosphorylierung von S<sup>318</sup> von IRS-1 verhindert wird.

#### 4.7.9 Die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> in BHK<sup>IR</sup>-Zellen wird durch Insulin und TPA stimuliert.

Mit Hilfe des spezifischen Antikörpers gegen IRS-1 pSer<sup>318</sup> kann der Verlauf der Phosphorylierung nach Insulinstimulation verfolgt werden.

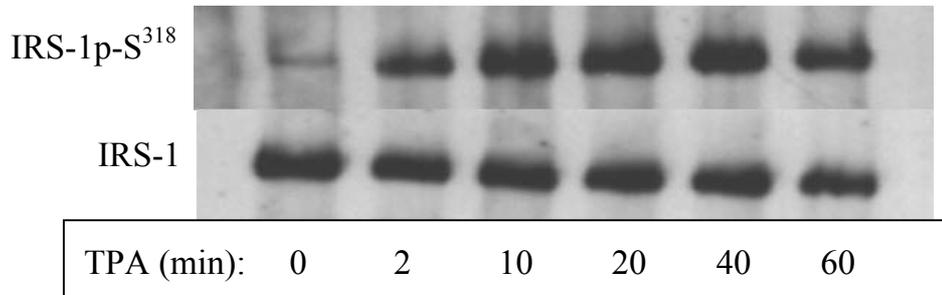
Dazu wurden BHK<sup>IR</sup>-Zellen mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  cotransfiziert und mit 100 nmol Insulin 7 h stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probe lysiert und nach den Standardvorschriften aufgearbeitet. Je 60  $\mu$ g der Zelllysate wurden elektrophoretisch getrennt, elektrogeblottet und mit dem Antikörper gegen pSer<sup>318</sup> analysiert (Abbildung 4.51).



**Abb. 4.51: Die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> in BHK<sup>IR</sup>-Zellen wird durch Insulin stimuliert.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  transient transfiziert, mit 100 nmol Insulin 1-5 h stimuliert und lysiert. Je 60  $\mu$ g der Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-IRS-1 pSer<sup>318</sup> (oberer Film) bzw. anti-IRS-1 06-248 (unterer Film).

In BHK<sup>IR</sup>-Zellen, die mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\zeta$  cotransfiziert wurden, konnte durch Stimulation mit 100 nmol Insulin nach 1 h die höchste Phosphorylierung an Ser<sup>318</sup> erreicht werden. Diese Phosphorylierung bleibt etwa 3 h konstant hoch und nimmt nach längerer Insulinstimulation leicht ab.

Zur Analyse der TPA-Abhängigkeit der S<sup>318</sup>-Phosphorylierung wurden BHK<sup>IR</sup>-Zellen mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  cotransfiziert und mit 0,5  $\mu$ mol TPA stimuliert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben lysiert, nach den Standardvorschriften immunpräzipitiert und analysiert (Abbildung 4.52).



**Abb. 4.52: Die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> in BHK<sup>IR</sup>-Zellen wird durch TPA stimuliert.** BHK<sup>IR</sup>-Zellen wurden mit IRS-1 S<sup>318</sup> und PKC- $\delta$  transient transfiziert, mit 500 nmol TPA in den angegebenen Zeiten stimuliert und lysiert. Je 400  $\mu$ g der Lysate wurden mit 4  $\mu$ g anti-IRS-1 12H8 immunpräzipitiert, elektrophoretisch getrennt und elektrogeblottet. Detektion erfolgte mit anti-IRS-1 pS<sup>318</sup> (oberer Film) bzw. anti-IRS-1 06-248 (unterer Film).

Die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> wird durch TPA stimuliert. Nach 2 min steigt die Serinphosphorylierung stark an und nach 10 min wird der höchste Phosphorylierungsgrad erreicht. Danach nimmt die Phosphorylierung wieder ab. Diese beiden Resultate zeigen, dass die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> sowohl durch Insulin, als auch durch TPA stimuliert werden kann.

#### 4.8 Detektion sieben weiterer *in vitro*-Phosphorylierungsstellen von IRS-1 durch ESI-TOF

Während eines Forschungsaufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Roepstorff gab es unter Betreuung von Allan Stensballe die Möglichkeit, Proben an einem Q-TOF Ultima Massenspektrometer (Micromass, England) kombiniert mit einem nano-HPLC-System (LC Packings, Holland) zu vermessen.

IRS-1<sup>N1</sup>, IRS-1<sup>M</sup> und IRS-1<sup>C</sup> wurden nach den Standardvorschriften mit PKC- $\delta$  phosphoryliert, elektrophoretisch gereinigt und tryptisch im Gel (ohne Reduktion

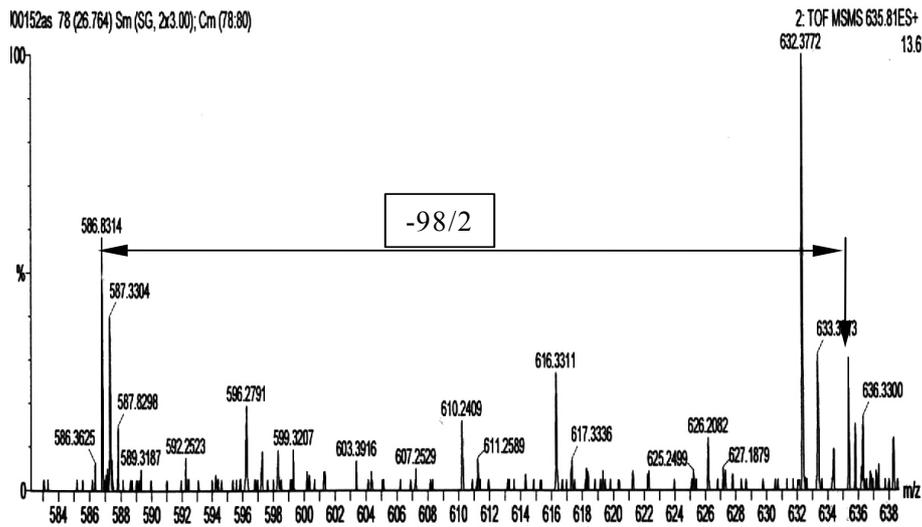
und Alkylierung) verdaut. Die eluierten Fraktionen wurden in der Vakuumentrifuge bis zur Trockne eingengt und kurz vor Verwendung in 1  $\mu$ L System A aufgenommen. Etwa 5 pMol des Eluats wurden auf eine 8 cm „fused silica“ Säule mit 75  $\mu$ m Innendurchmesser, gefüllt mit Zorbax® SB-C 18 3,5  $\mu$ m (Agilent, Waldbronn) injiziert. Die Peptidtrennung erfolgte mit einem Fluss von 175 nL/min mit einem Gradienten, der von 5-38 % Acetonitril in 120 min anstieg. Die Scanzeit für die MS-Spektren betrug 1 sec mit m/z 350-1500 und maximal 4 sec für die MS/MS-Spektren im Bereich m/z 50-2000. Sequenzierte Massen wurden für die nächsten 60 sec nicht nochmals sequenziert. Datenanalyse wurde mit MassLynx/ProteinLynx durchgeführt und die resultierenden MS/MS Daten wurden im pkl-Format exportiert. Die Proteinidentifikation wurde aus den resultierenden Massenspektren über Mascot (Matrix Sciences, England) durchgeführt, wobei in IRS-1 die in Tabelle 4.11 aufgeführten Phosphopeptide detektiert werden konnten:

**Tabelle 4.11: Übersicht über die mit einem Q-TOF Ultima Massenspektrometer gefundenen PKC- $\delta$ -katalysierten *in vitro*-Phosphorylierungsstellen von IRS-1.** Die Fusionsproteine IRS-1<sup>N1</sup>, IRS-1<sup>M</sup> und IRS-1<sup>C</sup> wurden mit PKC- $\delta$  phosphoryliert, elektrophoretisch gereinigt und tryptisch im Gel verdaut. Durch nano-HPLC/Q-TOF-MS-Analyse konnten folgende Peptide sequenziert werden.

Sequenz	m/z	Ladung	Masse	AS-Sequenz	Phospho-AS
21-27	468,24	+2	934,44	KPKSMHK	S <sup>24</sup>
282-297	635,00	+3	1901,94	HHLNNPPPSQVGLTRR	T <sup>295</sup>
781-792	722,89	+2	1443,67	HQHLRLSSSSGR	S <sup>787</sup>
786-794	521,79	+2	1041,5	LSSSSGRLR	S <sup>790</sup>
839-849	635,83	+2	1269,57	KVDTAAQTNSR	T <sup>846</sup>
1074-1085	694,86	+2	1387,62	VNLSPNHNQSAK	S <sup>1083</sup>
1098-1108	650,31	+2	1298,53	HSSETFSAPTR	T <sup>1102</sup>

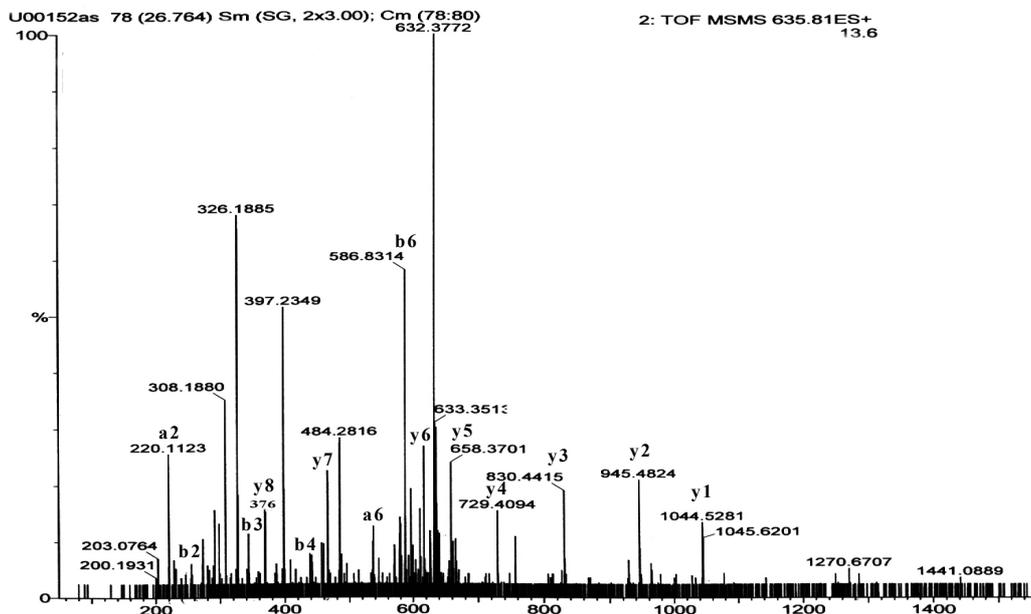
Im Folgenden wird beispielhaft auf die Sequenzierung des Peptids K<sub>839</sub>VDTAAQTNSR<sub>849</sub> genauer eingegangen.

In Abbildung 4.53 ist deutlich der Neutralverlust von 98/2 Da des zweifach geladenen Fragmentions mit m/z 635,83 zu sehen.



**Abb. 4.53: Gasphasendephosphorylierung von  $H_3PO_4$  des zweifach geladenen Fragmentions mit  $m/z$  635,83.** GST-IRS-1<sup>M</sup> wurde mit PKC- $\delta$  phosphoryliert, elektrophoretisch gereinigt, tryptisch verdaut und wie im Text beschrieben analysiert. Die Abbildung zeigt das Produkt-Ionen-Spektrum des Fragmentions bei  $m/z$  635,83. Gezeigt wird ein vergrößerter Ausschnitt, um den Neutralverlust von  $H_3PO_4$  (98/2) hervorzuheben.

Das Produkt-Ionenspektrum in Abbildung 4.54 zeigt intensive y-Ionen, wohingegen die a- und b-Ionen relativ schwach zu sehen sind.



**Abb. 4.54: Produkt-Ionen-Spektrum (MS<sup>3</sup>-Experiment) des Fragmentions bei  $m/z$  635,81** GST-IRS-1<sup>M</sup> wurde mit PKC- $\delta$  phosphoryliert, elektrophoretisch gereinigt, tryptisch verdaut und wie im Text beschrieben analysiert. Die Abbildung zeigt das Produkt-Ionen-Spektrum des Fragmentions bei  $m/z$  635,81. Die gefundenen a-, b- und y-Ionen wurden in das Spektrum eingetragen.

Die theoretische Auswertung in Tabelle 4.11 zeigt, dass die Massenkombination 729,364 (y4) und 376,194 (y8) nur auftritt, wenn der Threoninrest an Position 846 phosphoryliert vorliegt.

**Tabelle 4.12: Theoretische Fragmentierung des Peptids K<sup>839</sup>VDTAAQTNSR<sup>849</sup>.** Das Peptid wurde mit Hilfe der Software GPMAW 5.0 theoretisch fragmentiert. In der ersten Spalte sind die phosphorylierten Aminosäuren aufgeführt. In den Spalten dahinter stehen die theoretisch gebildeten y-, a- und b-Ionen. Die eindeutig identifizierten Fragmente, die durch pThr<sup>846</sup> entstehen können, wurden grau unterlegt.

	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8
KVDTAAQTNSR	101.108	200.176	315.203	416.251	487.288	558.325	686.384	787.431
KVDpT <sup>842</sup> AAQTNSR	101.108	200.176	315.203	398.240	469.277	540.315	668.373	769.421
KVDpTAAQpT <sup>846</sup> NSR	101.108	200.176	315.203	416.251	487.288	558.325	668.373	769.421
KVDpTAAQTNpS <sup>848</sup> R	101.108	200.176	315.203	416.251	487.288	558.325	668.373	787.431
	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8
KVDTAAQTNSR	129.103	228.171	343.198	444.246	515.283	586.320	714.379	815.426
KVDpT <sup>842</sup> AAQTNSR	129.103	228.171	343.198	426.235	497.272	586.320	696.368	797.416
KVDpTAAQpT <sup>846</sup> NSR	129.103	228.171	343.198	444.246	515.283	586.320	714.379	797.416
KVDpTAAQTNpS <sup>848</sup> R	129.103	228.171	343.198	444.246	515.283	586.320	714.379	815.426
	y1	y2	y3	y4	y5	y6	y7	y8
KVDTAAQTNSR	1.062.518	963.450	848.423	747.375	676.338	605.301	477.242	376.194
KVDpT <sup>842</sup> AAQTNSR	1.044.507	945.439	830.412	747.375	676.338	605.301	477.242	376.194
KVDpTAAQpT <sup>846</sup> NSR	1.044.507	945.439	830.412	729.364	658.327	587.290	459.232	376.194
KVDpTAAQTNpS <sup>848</sup> R	1.044.507	945.439	830.412	729.364	658.327	587.290	459.232	358.184

Neben den sieben gefundenen Phosphorylierungsstellen gibt es noch Hinweise auf 10-15 weitere Phosphorylierungsstellen, die jedoch während des kurzen Forschungsaufenthaltes nicht verifiziert werden konnten.

## 5 Diskussion

### 5.1 Entwicklung eines *in vitro*-PKC-Assays

Der *in vivo*-Phosphorylierungsgrad von Signaltransduktionsmolekülen, die meist nur in niedriger Kopienzahl in der Zelle vorliegen, ist häufig sehr gering. Außerdem finden Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen oft zeitgleich statt [200]. Obwohl in der Analytik von Proteinmodifikationen, v.a. durch die Massenspektrometrie und Mikro-HPLC in den letzten Jahren große Sensitivitätssteigerungen erreicht wurden, ist es aus diesen Gründen notwendig, ein *in vitro*-Testsystem zu etablieren [170;171]. Serin- und Threoninphosphorylierungen von IRS-1 durch PKC-Isoformen spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Insulinresistenz (siehe Kapitel 1.4). Die Detektion der qualitativ nachgewiesenen Serin- und Threoninphosphorylierungsstellen ist mit klassischen Methoden sehr aufwändig und wegen der Komplexität des IRS-1 mit 278 phosphorylierbaren Aminosäureresten nahezu nicht realisierbar. Zur Reduktion dieser Komplexität wurde ein *in vitro*-Phosphorylierungssystem entwickelt. Dazu gehört die Expression und Aufreinigung von rekombinanten Fusionsproteinen in *E. coli*, die zellfreie Phosphorylierung mit PKC-Isoenzymen und die Aufarbeitung und Vorbereitung für eine massenspektrometrische Analyse. Die zur Zeit intensiv untersuchte Phosphorylierung von Serin<sup>307</sup> von IRS-1 konnte ebenfalls durch einen *in vitro*-Ansatz gefunden werden [92]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass dieses Position in Zellkultur und *in vivo* für die Insulinsignalweiterleitung essentiell ist [93;94]. Es ist jedoch bekannt, dass Kinasen *in vitro*-Motive phosphorylieren, die *in vivo* nicht erkannt werden [201]. Für das *in vitro*-Testsystem wurde IRS-1 in vier GST-Fragmenten in *E. coli* exprimiert. Die Expression und Aufreinigung wurde nach leicht modifizierten Standardmethoden durchgeführt [134], wobei zwischen 4 und 12 mg Protein pro Liter Bakteriensuspension erhalten wurde. Die Reinheit (siehe Abb. 4.3–4.7) der

erhaltenen Fusionsproteine war für eine Einzschrittreinigung ausreichend, doch es konnten viele GST-modifizierte Abbauprodukte gezeigt werden. Durch Gelfiltration könnte die Reinheit erhöht werden, doch bei GST-modifizierten Proteinen ist bei längeren Reinigungsprozeduren die Gefahr durch proteolytischen Abbau relativ hoch [202]. Zwischen dem jeweiligen Fusionsprotein und dem GST-Tag liegt eine Thrombinschnittstelle. Zur weiteren Verringerung der Komplexität könnte das gereinigte Protein vom GST-Teil getrennt werden. Da bei allen massenspektrometrischen Analysen kein Phosphoprotein im GST-Teil gefunden wurde, wurde auf die Abspaltung des GST-Fragments verzichtet. Durch den GST-Tag gelingt nicht nur die Reinigung, sondern das Fusionsprotein wird auch stabilisiert und hydrophobe Proteine bleiben in Lösung [202].

## **5.2 Bestimmung der ATP-Einbaurate in GST-IRS-1-Fusionsproteine durch verschiedene PKC-Isoenzyme**

Die Stöchiometrie bei Phosphorylierungsreaktionen ist häufig gering, so dass bei der Untersuchung von IRS-1 zu der oben diskutierten Komplexität der vielen verschiedenen Phosphorylierungsmöglichkeiten erschwerend noch die nicht-phosphorylierten IRS-1 Proteine im Überschuss dazukommen, deren Peptide aus dem tryptischen Verdau bei einer HPLC-Trennung oft mit den entsprechenden Phosphopeptiden coeluiieren.

Die Bestimmung der Einbaurate im *in vitro*-Experiment bildete die Grundlage für eine erfolgreiche Strategie zur Identifizierung von Phosphorylierungsstellen von IRS-1. Für die meisten PKC-Isoformen wurde die Aktivierbarkeit durch Substanzen, die die Insulinsignalweiterleitung hemmen können, gezeigt (siehe Kapitel 1.4.7). In letzter Zeit werden v.a. PKC- $\zeta$  [180;179] und PKC- $\delta$  [183] als wichtige negative Effektoren der Insulinsignalweiterleitung diskutiert.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass durch PKC- $\delta$  in die Fusionsproteine GST-IRS-1<sup>N1</sup> (AS 2-304), GST-IRS-1<sup>M</sup> (AS 526-859) und GST-IRS-1<sup>C</sup> (AS 900-1235) im *in vitro*-Versuch die höchste Radioaktivität eingebaut wird (siehe Abbildung 4.11). In GST-IRS-1<sup>N2</sup> (AS 265-522) wird durch PKC- $\zeta$

die höchste Radioaktivität eingebaut. Die neuen PKC-Isoformen phosphorylieren alle vier Fusionsproteine am intensivsten, wohingegen die konventionellen und die atypischen PKC-Isoformen sehr viel geringere Einbauraten zeigen. PKC- $\mu$  (PKD) zeigt die schwächste Einbaurate, doch unter den gewählten Versuchsbedingungen ist die strukturell von den PKC-Isoformen abweichende PKD nur schlecht aktivierbar [203]. Betrachtet man den Einbau in die einzelnen Fusionsproteine, so zeigt sich, dass die Phosphateinbaurate in GST-IRS-1<sup>N2</sup> etwa fünffach höher ist, verglichen mit den anderen Fusionsproteinen. Eine Ausnahme ist hierbei die Phosphorylierung mit PKC- $\delta$ . Auch mit dieser PKC-Isoform wird in GST-IRS-1<sup>N2</sup> die höchste Radioaktivität eingebaut, in GST-IRS-1<sup>N1</sup> etwa 80 %, in GST-IRS-1<sup>M</sup> 40 % und in GST-IRS-1<sup>C</sup> nur noch 20 %. Trotz optimierter Versuchsbedingungen (siehe Kapitel 4.1.3) betrug der maximale Phosphorylierungsgrad 27 pMol/nMol Substrat, d.h. 2,7 % des Substrates liegen phosphoryliert und 97,3 % nicht-phosphoryliert vor.

Anhand der *in vitro* bestimmten Einbauraten zeigt sich, dass IRS-1 durch PKC-Isoenzyme vor allem C-terminal der PTB-Domäne (AS 131-331) phosphoryliert wird. In der PH-Domäne (AS 13-115) findet nur mit PKC- $\delta$  ein nennenswerter Phosphateinbau statt. Die erhöhten Phosphateinbaurate in der Nähe der PTB-Domäne könnte ein Hinweis auf eine direkte Regulation durch diese Phosphorylierungsstellen an der Interaktion mit anderen Molekülen sein. Durch Röntgenstrukturanalyse der PH-PTB-Domäne von IRS-1 wurde gezeigt, dass die Peptidbindungsstelle der PTB-Domäne vollständig exponiert vorliegt und somit als Angriffspunkt für Enzyme leicht erreichbar ist [204]. In der PH-Domäne, die mit der PTB-Domäne durch eine ungeordnete 46 AS lange Schleife verbunden ist, findet man große kationische Bereiche exponiert, die zur Bindung von Phospholipiden notwendig sind, jedoch kaum Angriffsflächen für Enzyme bieten [204]. Im mittleren und im C-terminalen Teil des IRS-1 gibt es mehrere SH2-Domänen als Bindungsstellen für Bindungspartner des IRS-1, doch keine Hinweise auf regulatorische Domänen, wodurch die geringe Phosphateinbaurate in diese Abschnitte des Proteins erklärbar sein könnte.

### 5.3 Cerenkov-Pattern der verschiedenen IRS-1-Fragmente

Durch die Einbaurate bekommt man eine Übersicht, wie viel Phosphat in die einzelnen Fusionsproteine eingebaut wird, doch nur einen groben Hinweis auf die Anzahl der phosphorylierten Aminosäurereste. Aus den Cerenkov-Pattern in Kapitel 4.3 (siehe Abbildungen 4.13, 14, 16, 18, 19, 21, 22 und Tabelle 4.6) kann die Anzahl der Phosphopeptide abgeschätzt werden. Dabei wurde subjektiv zwischen Haupt- und Nebenpeaks unterschieden, wobei jedes Cerenkov-Pattern einzeln ausgezählt wurde. Die subjektive Abschätzung der Peakhöhe kann nur für jedes Cerenkov-Pattern getrennt vorgenommen werden, so dass der Vergleich zwischen den einzelnen Cerenkov-Pattern nur grob erfolgt.

Tryptisch fehlgeschnittene Peptide und Modifikationen, wie z.B. Methionin-oxidationen führen zu Peptiden, die unterschiedlich eluieren können, jedoch alle zu der selben Phosphorylierungsstelle gehören (Kapitel 4.4 und [153]).

Durch PKC- $\zeta$  werden die wenigsten Motive im IRS-1 phosphoryliert, und wie in Kapitel 4.4.4 gezeigt wurde, handelt es sich bei mindestens drei Nebenpeaks um Modifikationen eines einzelnen Peptids. Im Gegensatz dazu phosphorylieren die PKC-Isoenzyme  $\delta$  und  $\theta$  *in vitro* deutlich mehr Stellen von IRS-1. Dies bestätigt eine kürzlich erschienene Publikation [205], in der mit einer Strategie, bestehend aus *in vitro*-Assay, MALDI-TOF-MS („matrix-assisted laser-desorption) und Nanospray-MS mit einem Q-TOF2 achtzehn Phosphopeptide gefunden wurden, die durch PKC- $\delta$  und teilweise auch durch PKC- $\theta$  generiert wurden. Es konnte in Zellkultur weder eine biologische Relevanz gezeigt noch die Kinase bestätigt werden. Erste Untersuchungen mit den in dieser Arbeit entwickelten experimentellen Techniken, weisen bei der *in vitro*-Analyse des IRS-1<sup>N1</sup>-Fragments auf mindestens eine weitere Phosphorylierungsstelle von PKC- $\delta$  hin (siehe auch Kapitel 4.8 und 5.4.1). Aus der Analyse der Cerenkov-Pattern wird deutlich, dass alle verwendeten PKC-Isoformen IRS-1 in allen vier Fragmenten phosphorylieren und dass die meisten Isoenzyme nahezu identische Cerenkov-Pattern generieren. Es gibt jedoch auch deutliche Unterschiede in der Intensität

der Phosphorylierung und der Anzahl der phosphorylierten Stellen. Die Gruppe der neuen PKC-Isoenzyme generiert die meisten Phosphopeptide, aber auch die höchsten Einbauraten in einzelne Phosphopeptide, wohingegen die atypische PKC- $\zeta$  nur wenige Stellen bevorzugt phosphoryliert.

## **5.4 Detektion und Identifizierung von Serin<sup>318</sup> als *in vitro*-Phosphorylierungsstelle von IRS-1**

In GST-IRS-1<sup>N2</sup> wird am meisten Phosphat eingebaut und durch alle PKC-Isoformen nur eine oder zwei Stellen in diesem Fusionsfragment phosphoryliert (siehe Abbildungen 4.11 und 4.16). Da für PKC- $\zeta$  der Beweis publiziert wurde, dass IRS-1 ein direktes Substrat der insulinstimulierten PKC- $\zeta$  ist [179;180], wurde die Identifizierung mit dem von PKC- $\zeta$  phosphorylierten Fusionsprotein durchgeführt.

### **5.4.1 Detektion von Phosphopeptiden durch alkalische Negativ-Ionen $\mu$ LC/ES-API-CID-MS-Hybrid Scan Technik**

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. A. Beck aus unserer Arbeitsgruppe ein zweidimensionales RP-HPLC-Verfahren mit anschließender MS-Analyse zur Anreicherung und Identifizierung der Phosphorylierungsstelle nach dem Einbau von <sup>32</sup>P-ATP entwickelt [131]. Dazu wurde der tryptische Verdau des phosphorylierten Proteins unter sauren Bedingungen fraktioniert und anhand der Cerenkov-Strahlung detektiert. Die <sup>32</sup>P-markierten Fraktionen wurden eingeeengt und mittels Negativ-Ionen-RP-LC/ESI-MS unter alkalischen Bedingungen analysiert. Durch die Entwicklung einer neuen alkalischen Negativ-Ionen  $\mu$ LC/ES-API-CID-MS Hybridscan-Analyse konnte in der Folge auf eine radioaktive Markierung der Proteine verzichtet werden [153]. Zur Erzeugung der phosphospezifischen Markerionen ( $(\text{PO}_3^-)$  mit  $m/z=79$ , bzw.  $(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$  mit  $m/z=97$ ) [206], wurde im negativen Ionenmodus im Skimmerbereich ein Potential von 140 V angelegt und über den Bereich von  $m/z$  75-100

gescannt. Der Vergleich mit dem Basis-Peak-Chromatogramm zeigt eine deutliche Reduktion der Komplexität (siehe Abbildung 4.2.6). Durch die alkalischen Bedingungen wird die Intensität, d.h. die Ionisierungseffizienz der phosphorylierten Markerionen gegenüber sauren Bedingungen um den Faktor drei bis vier erhöht, das Signal zu Rauschen-Verhältnis verbessert und während des ESI-Prozesses die Fragmentierung der Phosphopeptide in der Skimmerregion erleichtert [154].

#### **5.4.2 Sequenzierung tryptischer Phosphopeptide von PKC- $\zeta$ -phosphoryliertem GST-IRS-1<sup>N2</sup> durch Nanospray-Ionenfallen-MS-Analyse**

Die Ionenfalle hat gegenüber anderen MS-Techniken folgende Vorteile:

- In der Ionenfalle können die Ionen akkumuliert werden, wodurch dessen Nachweisgrenze, v.a. bei MS<sup>2</sup>-Spektren drastisch gesteigert wird.
- Die durch kollisionsinduzierten Zerfall generierten Ionen werden in einer Ionenfalle nicht weiter fragmentiert, da sie außerhalb der für die Aktivierung notwendigen Resonanzfrequenz liegen. Es entstehen dabei intensive Neutralverlustionen aus den Phosphopeptiden, die weiter fragmentiert werden können, wodurch es zu intensiven Fragmenten kommt, die eine eindeutige Identifizierung der phosphorylierten Aminosäure zulassen [153]. Durch den Neutralverlust kann ein phosphorylierter Serinrest im MS<sup>3</sup>-Spektrum als Dehydroalanin detektiert werden [155].

In GST-IRS-1<sup>N2</sup> konnten zwei Aminosäurereste identifiziert werden, die *in vitro* durch PKC- $\zeta$  phosphoryliert werden (siehe Kapitel 4.4.4). Als Hauptphosphorylierungsstelle wurde dabei Serin<sup>318</sup> detektiert. Nach Mutation dieser Stelle durch „Overlap extension“-PCR wurde diese Stelle nicht mehr phosphoryliert. Interessanterweise wird gleichzeitig der Phosphorylierungsgrad des zweiten identifizierten Aminosäurerestes (Serin<sup>436</sup>) durch die Mutation an Ser<sup>318</sup> erhöht (siehe Abbildung 4.32). Das Verschwinden von sechs Phosphopeptiden nach der Mutation konnte durch die Sequenzierung dieser Fragmente aufgeklärt werden. Auch die vier Hauptpeptide, die beim tryptischen Verdau des phosphorylierten

GST-IRS-1<sup>N2</sup> generiert wurden, sind einer gemeinsamen Peptidsequenz zuzuordnen. Neben dem tryptisch richtig geschnittenen Peptid wurde ein Peptid sequenziert, das N-terminal fehlgeschnitten wurde und somit um zwei Aminosäurereste verlängert war. Bei den restlichen beiden Peptiden handelt es sich um die methioninoxidierten Analoga.

Serin<sup>318</sup> liegt in unmittelbarer Sequenznähe der PTB-Domäne von IRS-1 und könnte somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Signalweiterleitung spielen, wie z.B. die durch JNK-katalysierte Phosphorylierung von Serin<sup>307</sup>, für die inzwischen eine hemmende Wirkung auf die Insulinsignalweiterleitung *in vivo* [93;94] aber auch ein hemmender Effekt auf den proteolytischen Abbau von IRS-1 [95] gezeigt werden konnte. In einer kürzlich erschienen Publikation wird der Phosphorylierung an Serin<sup>302</sup> eine Regulation bei der nahrungsabhängigen Insulinregulation zugesprochen [207]. Alle drei Serinreste liegen in einem einzigen tryptischen Spaltpeptid mit der Sequenz TES<sup>302</sup>ITATS<sup>307</sup>PAS MVGGKPGS**318**FR, das dem Peptid P1 in Abbildung 4.26 entspricht. Inklusive der in dieser Arbeit gefundenen Phosphorylierungsstelle an Ser<sup>318</sup> gibt es inzwischen eine Vielzahl von Hinweisen [92-94;207-211], dass es sich bei diesem Sequenzabschnitt von IRS-1 um eine „Hot-spot“-Region für die Signalmodulation des IRS-1 handelt.

Als weitere phosphorylierte Aminosäure wurde von uns Serin<sup>436</sup> in IRS-1 identifiziert. Diese Aminosäure liegt ebenfalls in einem PKC-Konsensusmotiv. Eine Detail-Charakterisierung dieser Phosphorylierungsstelle wird derzeit durchgeführt.

#### **5.4.3 Detektion von sieben weiteren *in vitro*-Phosphorylierungsstellen in IRS-1 durch ESI-TOF**

Bisher wurden die bekannten PKC-Konsensusstellen [212] noch nicht mit allen PKC-Isoformen überprüft. So wird z.B. die IκB Kinase-β durch PKC-ζ an Ser<sup>177</sup> und Ser<sup>181</sup> phosphoryliert. Diese Phosphorylierungsstellen liegen weder in einem allgemeinen Konsensusmotiv für PKC, noch in einem PKC-ζ Motiv, bestimmt

durch Suche in Peptid-Bibliotheken [125]. Die im Rahmen dieser Dissertation gefundenen PKC- $\zeta$ -katalysierten Phosphorylierungsstellen (S<sup>318</sup> und S<sup>436</sup>) liegen beide in einer Konsensussequenz von Proteinkinasen C.

Durch einen anderen analytischen Ansatz (Nano-LC in Verbindung mit einem Q-TOF Ultima Massenspektrometer) konnten in den Fragmenten IRS-1<sup>N1</sup>, IRS-1<sup>C</sup> und IRS-1<sup>M</sup> nach *in vitro*-Phosphorylierung mit PKC- $\zeta$  weitere sieben phosphorylierte Peptide gefunden werden, die nicht in Konsensusstellen von PKC-Isoformen liegen. Mit einem *in vitro*-Ansatz mit IRS-1, aus Zellkulturmaterial präzipitiert, und mit PKC- $\delta$  phosphoryliert, konnte die Gruppe um Richard Roth 18 phosphorylierte Aminosäurereste von IRS-1 sequenzieren [205], wovon vier phosphorylierte Positionen mit den in Kapitel 4.8 beschriebenen Peptiden übereinstimmen. Diese Ergebnisse zeigen die Überlegenheit dieser Analytik gegenüber der Ionenfallenanalyse, bedingt durch die erhöhte Massengenauigkeit und die verbesserte Auflösung.

Von den durch diesen Ansatz gefundenen Phosphorylierungsstellen in IRS-1 sind S<sup>24</sup> und T<sup>295</sup> sehr interessant, da sie in der PH- bzw. in der PTB-Domäne liegen. S<sup>24</sup> liegt in der PH-Domäne zwischen zwei  $\beta$ -Faltblattstrukturen mitten in einem kationischen Bereich mit der Aminosäuresequenz **KPKS<sup>24</sup>MHKR**. Durch Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass an diesen Bereich Phosphoinositole binden können [204]. Welche Rolle diese Bindungen an IRS-1 spielen ist weitgehend unklar [119]. Dabei könnte Ser<sup>24</sup> durch seine Lage in der Bindungsdomäne eine regulatorische Rolle spielen.

## **5.5 Generierung und Charakterisierung eines polyklonalen Antikörpers gegen IRS-1 pSer<sup>318</sup>**

Ein spezifischer polyklonaler Antikörper gegen pSer<sup>318</sup> in IRS-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Hubert Kalbacher des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität Tübingen hergestellt und charakterisiert. Die Generierung von phosphospezifischen Antikörpern gestaltet sich wegen der hydrolytischen Labilität der

Phosphatgruppe und der alkalischen Phosphataseaktivität im Kaninchenblut häufig schwierig. Zur Umgehung dieses Problems wurde das synthetische Phosphopeptid SMVGGKPGpSFRVRASSD (310-326) als freies Peptid an KHL gekoppelt und als „multiple antigenic peptide“ zur Immunisierung der Kaninchen verwendet [177]. Zusätzlich wurden dem Kaninchen Phosphatasehemmer verabreicht. Das Antiserum zeigt nach Aufreinigung über Protein A-Sepharose hohe Spezifität gegen das Phosphoprotein, aber nicht gegen das nicht-phosphorylierte Protein (Abbildung 4.33) oder die Alanin-Mutante (Abbildung 4.34). In transfizierten Zellen detektiert der Antikörper nur die Proben, die mit dem Wildtyp-Plasmid transfiziert wurden, die Proben mit transfiziertem mutierten Plasmid werden nur sehr schwach detektiert, wobei es sich vermutlich um endogenes IRS-1 handelt (siehe Abbildung 4.35). Die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> ist mit alkalischer Phosphatase hydrolysierbar. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Antikörper nicht die Phosphorylierung an Ser<sup>307</sup> detektiert (Abbildung 4.37). Mit dem polyklonalen Antikörper gegen pSer<sup>318</sup> von IRS-1 wurde ein sensitives und hochspezifisches Werkzeug zur Untersuchung der Regulation der Phosphorylierung an Ser<sup>318</sup> entwickelt, welches erlaubt, seine Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz und des Diabetes mellitus Typ 2 zu untersuchen. Mit Hilfe des Antikörpers konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> in BHK<sup>IR</sup>-Zellen sowohl durch Insulin, als auch durch TPA stimuliert werden kann (Abbildung 4.51 und 4.52).

## 5.6 Überprüfung der biologischen Relevanz von Ser<sup>318</sup> in IRS-1

Die Strategie zuerst einen *in vitro*-Ansatz durchzuführen vereinfachte die Analyse der Phosphorylierungsstellen von IRS-1 deutlich. Zur Untersuchung der biologischen Relevanz wurde Gesamt-IRS-1 an Serin<sup>318</sup> durch einen einzigen Basenaustausch zu Alanin<sup>318</sup> mutiert und mit oder ohne PKC- $\delta$  oder - $\zeta$  in BHK<sup>IR</sup>-Zellen exprimiert. Zur Untersuchung der Weiterleitung des Insulinsignals wurde die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 analysiert. Die Hemmung der

Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 ist ein Hinweis für die gestörte Übertragung des Insulinsignals [84].

### 5.6.1 Beeinflussung der Insulinsignalweiterleitung durch PKC- $\delta$

PKC- $\delta$  scheint bei der Insulinsignalweiterleitung eine duale Rolle auszuüben. Die Arbeitsgruppe um Richard A. Roth konnte neulich eine durch PKC- $\delta$  vermittelte Hemmung des Insulinsignals durch verminderte Phosphorylierung an IRS-1 zeigen [205]. In HEK-Zellen wurde gezeigt, dass Serin- und Threoninphosphorylierungen von IRS-1 durch die PKC-Isoformen  $\beta$ ,  $\delta$  und  $\theta$  zu einer Reduktion der Insulinsignalweiterleitung führen [213], wohingegen Heled et al. durch Experimente an diabetischen Sandratten (*Psammomys obesus*) erst kürzlich gezeigt haben, dass durch erhöhte körperliche Aktivität die PKC- $\delta$ -Aktivität erhöht und dadurch die Insulinantwort verstärkt wird [214]. PKC- $\delta$  spielt bei der Glucoseaufnahme eine wichtige Rolle. Durch Überexpression einer Kinase-inaktiven Mutante oder durch Hemmung mit Rottlerin, einem Inhibitor für PKC- $\delta$ , wird in primären Rattenmuskelzellen die Glucoseaufnahme und die Translokation des Glucosetransporters GLUT-4 zur Membran gehemmt [186]. Die in dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen zeigen eine relevante, negative Modulation der Insulinsignalweiterleitung durch PKC- $\delta$ . Nach 2 min Insulinstimulation steigt die Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 stark an und geht nach 60 min Stimulation wieder signifikant zurück. Nach Mutation von Ser<sup>318</sup> zu Ala<sup>318</sup> und der dadurch verhinderten Phosphorylierung an dieser Position, ändert sich die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 zwischen 2 und 60 min nur schwach und nicht signifikant. Diese Effekte sind unabhängig von der TPA-Vorstimulation, durch welche die PKC- $\delta$  stimuliert wird. Es ist eindeutig, dass PKC- $\delta$  die Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 moduliert, ob weitere PKC-Isoenzyme dabei eine Rolle spielen, kann nicht definitiv ausgeschlossen werden.

### 5.6.2 Beeinflussung der Insulinsignalweiterleitung durch PKC- $\zeta$

IRS-1 wird in FaO und NIH-3T3<sup>IR</sup>-Zellen durch PKC- $\zeta$  phosphoryliert, wodurch unter hyperinsulinämischen Bedingungen die Signalweiterleitung negativ reguliert wird [179;180]. Die genauen Phosphorylierungsstellen in IRS-1 konnten von diesen Gruppen nicht bestimmt werden. Basierend auf den *in vitro*-Resultaten wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass es sich bei Ser<sup>318</sup> um die von den Autoren beschriebene Aminosäureposition handeln könnte.

Die von diesen Gruppen beschriebene starke Zunahme der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 nach 2 min Insulinstimulation und die Abnahme der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 und seiner Komplexbildung mit dem Insulinrezeptor nach 60 min Insulinstimulation konnte in BHK<sup>IR</sup>-Zellen durch Cotransfektion des IRS-1 Wildtyp-Plasmids mit PKC- $\zeta$  ebenfalls gezeigt werden (siehe Kapitel 4.7.5 und [208]). In den Kontrollzellen, die nur mit IRS-1 Wildtyp-Plasmid transfiziert wurden, konnte nach 60 min Insulinstimulation eine leichte Abschwächung der Tyrosinphosphorylierung beobachtet werden.

Wurde die Phosphorylierung von Position 318 durch Mutation Ser<sup>318</sup>→Ala<sup>318</sup> verhindert, so fand nach 2 min Insulinstimulation ebenfalls eine starke Zunahme der Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 und der Komplexbildung mit dem Insulinrezeptor statt, nach 60 min Stimulation stiegen die Werte jedoch weiterhin an (siehe Abbildung 4.45 und 4.47 und [208]). In den Kontrollzellen ohne PKC- $\zeta$  trat eine Reduktion der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 und eine Abnahme der Komplexbildung mit dem Insulinrezeptor nach 60 min Insulinstimulation nicht ein. Das deutet darauf hin, dass Serin<sup>318</sup> notwendig ist, um eine PKC- $\zeta$  modulierte Reduktion der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 und der Komplexbildung mit dem Insulinrezeptor zu bewirken. In Fao-Zellen [179] und NIH 3T3<sup>IR</sup>-Zellen [180] wurden diese Effekte bereits beschrieben, ohne jedoch die relevante Phosphorylierungsstelle beweisen zu können. In beiden Zelllinien konnte durch Co-Immunpräzipitation gezeigt werden, dass IRS-1 ein Substrat der PKC- $\zeta$  ist. Die Menge des IR/IRS-1-Komplexes wurde durch Insulinstimulation verdoppelt [179;180].

Die neulich publizierte Phosphorylierung an Serin<sup>302</sup> durch eine noch unbekannt mTOR-abhängige Kinase [207] und die intensiv untersuchte JNK-katalysierte Phosphorylierung an Serin<sup>307</sup> [92-94;209-211] zeigen mit der in dieser Dissertation gefundenen PKC-katalysierten Phosphorylierung an Serin<sup>318</sup> [208], dass verschiedene Kinasen über verschiedene Stoffwechselwege die Phosphorylierung an verschiedenen nahezu benachbarten Serinresten katalysieren und dass die Phosphorylierung jedes einzelnen Serinrestes zu einer Modulation des Insulinsignals führt. In unserer Arbeitsgruppe konnte in humanen Myotuben gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> nach TPA-Stimulation zunimmt, nach Stimulation mit Anisomycin oder TNF- $\alpha$  findet keine Änderung statt. Da Anisomycin und TNF- $\alpha$  Aktivatoren der JNK sind, zeigen diese Resultate, dass die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>307</sup> und IRS-1 S<sup>318</sup> unabhängig voneinander reguliert werden (noch nicht publiziert).

Fasst man die in dieser Dissertation erhaltenen und von anderen gefundenen Resultate zusammen, so scheint der PTB-Domäne direkt benachbart liegende Peptidabschnitt TES<sup>302</sup>ITATS<sup>307</sup>PAS<sup>310</sup>MVGGKPGS<sup>318</sup>FR in IRS-1 einen Schlüsselbereich zur Aufklärung der Regulation der Insulinweiterleitung darzustellen.

## **5.7 Auswirkung der Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> durch PKC- $\zeta$ für die Signalweiterleitung**

IRS-1 spielt eine Schlüsselrolle in der Insulinsignalweiterleitung (siehe Kapitel 1.4.4). Die Aktivierung der MAP-Kinasen geht über die Kaskade: IR-IRS-1-Grb-2-SOS-Ras-Raf und MEK, das schließlich die MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 aktiviert. Über aktivierte MAP-Kinasen werden z.B. die p90 ribosomale S6Kinase (p90<sup>rsk</sup>), Phospholipase A oder Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Elk-1 phosphoryliert, wodurch Genexpression induziert wird [66].

Die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> durch PKC- $\zeta$  hat keinen Einfluss auf die Aktivität der MAP-Kinase Erk1, jedoch einen aktivierenden Effekt auf die MAP-Kinase Erk2 nach 2 min Insulinstimulation (siehe Abbildung 4.49). Während die

Phosphorylierung von Erk1 nur sehr schwach durch Insulin stimuliert wird, findet in Erk2 eine starke Zunahme der Phosphorylierung nach verlängerter Insulinstimulation statt. Durch die Transfektion von PKC- $\zeta$  findet schon nach 2 min Insulinstimulation eine intensive Phosphorylierung statt, die nach 60 min weiterhin signifikant ansteigt. Wird die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> verhindert, so findet nach 2 min keine weitere Zunahme der Phosphorylierung an Erk2 statt. Diese Ergebnisse bestätigen Beobachtungen an Rattenadipozyten, die zeigen, dass PKC- $\zeta$  für die Insulin-induzierte Aktivierung von Erk2 notwendig ist [215]. In dieser Publikation wurde gefolgert, dass in Rattenadipozyten PI3-Kinase, PDK-1, PKC- $\zeta$ , SOS, Ras, Raf und MEK1 für die Aktivierung von Erk2 notwendig sind. Die Aktivierung von Erk2 erfolgt dabei vermutlich über ein Insulinrezeptor-Substrat und die PI3-Kinase. Die Aktivierung von Erk2 könnte dabei durch die Phosphorylierung an Ser<sup>318</sup> von IRS-1 durch PKC- $\zeta$  moduliert werden, da Cotransfektion von PKC- $\zeta$  mit IRS-1 S<sup>318</sup> schon nach 2 min Insulinstimulation eine deutliche Aktivierung an Erk2 zu erkennen ist, die bis 60 min weiter ansteigt. Wird die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> durch die Mutation zu Ala<sup>318</sup> verhindert, so wird schon nach 2 min die maximale Aktivierung von Erk2 erreicht und es findet keine weitere Zunahme der Phosphorylierung an Erk2 statt. Über die verschiedenen Funktionen von Erk1 und Erk2 ist bisher nahezu nichts veröffentlicht worden. Man nimmt an, dass sie überlappende, wenn nicht sogar identische Signaltransduktionswirkungen [216] zeigen. Durch die in dieser Dissertation erhaltenen Resultate kann diese Aussage erweitert werden, d.h. durch die Beobachtung, dass Erk1 und Erk2 über verschiedene Stoffwechselwege oder Stimuli aktiviert werden.

Die Phosphorylierung von IRS-1 durch PKC- $\zeta$  ist ein negativer Regulator der PKB-Aktivität. Durch Insulin findet eine Aktivierung von PKB durch Phosphorylierung an Thr<sup>308</sup> statt, die nach 2 min Stimulation signifikant erhöht ist und bis 60 min weiter signifikant zunimmt. Die Cotransfektion von PKC- $\zeta$  bewirkt, dass die Phosphorylierung nach 2 min ihren Höhepunkt hat und danach abnimmt. Dies bestätigt bereits publizierte Ergebnisse in CHO-Zellen [199], wo gezeigt wurde, dass PKB direkt mit PKC- $\zeta$  assoziiert. Durch die Mutation von

Ser<sup>318</sup> zu Ala<sup>318</sup> in IRS-1 wird dieser inhibitorische Effekt jedoch aufgehoben. Da IRS-1 ebenfalls ein direktes Substrat der PKC- $\zeta$  ist [179;180] könnte durch ein Zusammenspiel von IRS-1 und PKC- $\zeta$  die Hemmung der PKB bewirkt werden, wobei die Phosphorylierung von Serin<sup>318</sup> aktivierend auf die PKC- $\zeta$ -induzierte negative Regulation von PKB wirkt.

## 6 Zusammenfassung

Die Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus (DM), dessen Krankheitsbild sich aus einer Kombination kardiovaskulärer Risikofaktoren, assoziiert mit Insulinresistenz und Hyperinsulinämie zusammensetzt, ist bisher nur teilweise aufgeklärt. Im Menschen konnten genetische Defekte nachgewiesen werden, die mit Frühstadien des DM Typ 2 im Zusammenhang stehen, doch für die meisten Fälle der Entstehung des DM Typ 2 konnte kein allgemeiner Mechanismus gefunden werden. Die Insulinrezeptor-Substrate spielen eine zentrale Rolle bei der Insulinsignal-Übertragung und durch Untersuchungen an “knockout“-Mäusen konnte gezeigt werden, dass sie bei der Entwicklung des Diabetes Typ 2 eine zentrale Rolle spielen. Serin/Threoninphosphorylierungen an Signaltransduktionsmolekülen scheinen häufig eine negative regulierende Rolle in der Insulinsignalweiterleitung zu spielen, wodurch es zu Insulinresistenz und letztendlich zur Ausprägung von Diabetes mellitus Typ 2 kommt. Die Erforschung der Modulation der Insulinsignalweiterleitung durch Serin- und Threoninkinasen-vermittelte Phosphorylierungen an den Insulinrezeptor-Substraten ist ein Schlüssel zur Aufklärung der zugrundeliegenden Pathomechanismen. Vertreter der Proteinkinase C-Familie (PKC) scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen, denn Faktoren durch die Insulinresistenz ausgelöst wird, sind meist auch Aktivatoren für PKC-Isoenzyme. Die Rolle der Proteinkinasen C bei der Entstehung der Insulinresistenz konnte durch pharmakologische Studien gezeigt werden. Dabei bewirkt TPA, ein PKC-Aktivator, eine Hemmung der Insulin-Signalübertragung, wohingegen durch PKC-Inhibitoren die Signalweiterleitung verbessert wird.

Ziel der Dissertation war die massenspektrometrische Identifizierung von Proteinkinase C-abhängigen Serin- und Threoninphosphorylierungsstellen von IRS-1 *in vitro* und die molekular- und zellbiologische Aufklärung der biologischen Funktion dieser Phosphorylierungen.

Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit ein *in vitro*-Phosphorylierungssystem entwickelt, um GST-Fusionsproteine aus IRS-1 mit neun PKC-Isoformen zu phosphorylieren. Die Fusionsproteine GST-IRS-1<sup>N1</sup> (Aminosäure 2-304 in der IRS-1 Sequenz), GST-IRS-1<sup>N2</sup> (265-522), GST-IRS-1<sup>M</sup> (526-859), und GST-IRS-1<sup>C</sup> (900-1235) wurden in *E. coli* exprimiert und über Affinitätschromatographie gereinigt. Die PKC-spezifischen Phosphateinbauraten in die vier GST-IRS-1-Fragmente waren sehr unterschiedlich. In das N2-Fragment erfolgte ein etwa vierfach höherer Einbau. Im Gegensatz zu den anderen Isoformen zeigte PKC- $\delta$  bei der Phosphorylierung der vier Fragmente hohe Einbauraten, der Phosphateinbau in GST-IRS-1<sup>N2</sup> wurde von der PKC- $\zeta$  am besten katalysiert. Aufgrund der Ergebnisse dieser Versuche wurden die PKC-Isoformen  $\delta$  und  $\zeta$  für die massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierungsstellen von IRS-1 ausgewählt.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Detektion und Lokalisierung von Serin<sup>318</sup> als *in vitro*-Phosphorylierungsstelle für PKC- $\zeta$  im Insulinrezeptor-Substrat-1. Dazu wurde GST-IRS-1<sup>N2</sup> mit PKC- $\zeta$  zellfrei phosphoryliert, und gelelektrophoretisch aufgereinigt. Das phosphorylierte Protein wurde tryptisch im Gel gespalten. Die Detektion der Phosphorylierung in GST-IRS-1<sup>N2</sup> erfolgte durch eine neu entwickelte alkalische Negativionen  $\mu$ LC/ES-API-CID-MS-Hybrid Scan Technik, wobei die Phosphopeptide durch phosphospezifische Markerionen nachgewiesen wurden. Durch die alkalischen Bedingungen wird die Intensität der Markerionen gegenüber sauren Bedingungen um den Faktor drei bis vier erhöht und das Signal zu Rauschen-Verhältnis für das Molekülion und das phosphospezifische Markerion verbessert. Die Sequenzierung der fraktionierten Phosphopeptide wurde mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer durchgeführt. Dabei wurden in IRS-1<sup>N2</sup> Ser<sup>318</sup> und Ser<sup>436</sup> als *in vitro*-Phosphorylierungsstellen für die PKC- $\zeta$  durch Sequenzierung der Fragmente S<sup>298</sup>RTESITATSPASMVGGKPGpSFR<sup>320</sup> und S<sup>435</sup>pSFR<sup>438</sup> identifiziert.

Während eines Forschungsaufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Roepstorff an der Universität von Odense/Dänemark konnten mit einem Q-TOF

Ultima Massenspektrometer Serin<sup>24</sup>, Threonin<sup>295</sup>, Serin<sup>787</sup>, Serin<sup>790</sup>, Threonin<sup>846</sup>, Serin<sup>1083</sup> und Threonin<sup>1102</sup> als weitere PKC-spezifische *in vitro*-Phosphorylierungsstellen von IRS-1 identifiziert werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde Serin<sup>318</sup> in GST-IRS-1<sup>N2</sup> und im Gesamt-IRS-1 zu Alanin mutiert und durch Sequenzierung überprüft. Durch den Vergleich der Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1<sup>N2</sup> S<sup>318</sup> und GST-IRS-1<sup>N2</sup> A<sup>318</sup>, die *in vitro* mit PKC- $\zeta$  phosphoryliert wurden und den bestimmten Einbauraten, konnte gezeigt werden, dass Serin<sup>318</sup> die Haupt-*in vitro*-Phosphorylierungsstelle von IRS-1 ist.

In Kooperation mit der AG von Dr. Kalbacher wurde ein spezifischer Antikörper gegen IRS-1 pSer<sup>318</sup> entwickelt, mit welchem sich die an Ser<sup>318</sup> phosphorylierten Formen des IRS-1 nachweisen lassen. Nicht-phosphoryliertes IRS-1 und die Alanin-Mutante wurden von dem Antikörper nicht detektiert. Mit Hilfe dieses Antikörpers wurde Serin<sup>318</sup> als erste *in vivo*-PKC-Phosphorylierungsstelle von IRS-1 nachgewiesen.

Im vierten Teil der Arbeit wurde durch die Anwendung der Ser<sup>318</sup>  $\rightarrow$  Ala<sup>318</sup> Punktmutante von IRS-1 die biologische Relevanz dieser Phosphorylierungsstelle überprüft. Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung an Ser<sup>318</sup> von IRS-1 in BHK<sup>IR</sup>-Zellen in denen IRS-1-Wildtyp oder die Mutante mit PKC- $\delta$  cotransfiziert wurde, schwache Hemmeffekte auf die Insulinsignalweiterleitung ausübt. Im Gegensatz dazu moduliert PKC- $\zeta$  die Tyrosinphosphorylierung am IRS-1 durch Phosphorylierung von Serin<sup>318</sup>. Reduzierte Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 und reduzierte Komplexbildung mit dem Insulinrezeptor wurde in der Literatur als deaktivierend auf die Insulinsignalweiterleitung beschrieben. Diese negative Modulation wird aufgehoben, wenn Serin<sup>318</sup> zu Alanin<sup>318</sup> mutiert wird, und eine Phosphorylierung an dieser Position nicht mehr möglich ist. Dadurch wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass Serin<sup>318</sup> in IRS-1 der verantwortliche Aminosäurerest für die bereits beschriebene negative Regulation der Insulinsignalweiterleitung durch PKC- $\zeta$  ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an IRS-1 Ser<sup>318</sup> keinen Effekt auf Erk1, jedoch einen hemmenden Effekt auf Erk2 und PKB ausübt. Dadurch könnte die Phosphorylierung an IRS-1 S<sup>318</sup> durch PKC- $\zeta$  sowohl eine Modulation der Regulation der Genexpression und des Zellwachstums, als auch der Glykogensynthese und des Glukosetransports bewirken. Diese Hypothese ist ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen und weiterer Identifizierungen von Phosphorylierungsstellen von IRS-1.

Die in der vorliegenden Arbeit etablierten Verfahren, sowie die damit durchgeführten *in vitro*- und *in vivo*-Experimente tragen zum besseren Verständnis des komplexen Ablaufs der Insulinsignalübertragung durch posttranslationale Modifikationen an einer Schlüsselstelle der Signalkaskade bei. Darüber hinaus wurde Serin<sup>318</sup> als erste PKC- $\zeta$ -katalysierte Phosphorylierungsstelle von IRS-1 detektiert, funktionell charakterisiert und die Regulation mit Hilfe des Antikörpers nachgewiesen.

Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit erste wichtige Grundlagen zum Verständnis der PKC-vermittelten zellulären Insulinresistenz durch Phosphorylierung von IRS-1 geleistet werden.

## 7 Literatur

1. **Hummel,C.** Das Kind und seine Krankheiten in der griechischen Medizin. Von Aretaios bis Johannes Actuarius. Dissertation, Universität Freiburg (1998)
2. **Major & RH.** Classic Descriptions of Disease. Classics of Medicine Library, New York (1994).
3. **Kahn,B.B. & Rossetti,L.** Type 2 diabetes--who is conducting the orchestra? *Nat. Genet.* **20**, 223-225 (1998).
4. **Zimmet,P., Alberti,K.G. & Shaw,J.** Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782-787 (2001).
5. **Campbell,I.W.** Type 2 diabetes mellitus: the silent killer. *Practical Diabetes International* **18**, 187-191 (2001).
6. **Massi-Benedetti,M.** The Cost of Diabetes in Europe - Type II: the CODE-2 Study. *Diabetologia* **45**, S1 S4 (2002).
7. **Fischer,E.H. & Krebs,E.G.** Conversion of Phosphorylase b to Phosphorylase a in Muscle Extracts. *J Biol Chem* **216**, 121-132 (1955).
8. **Sutherland,E.W. & Wosilait,W.D.** Inactivation and Activation of Liver Phosphorylase. *Nature* **175 (4447)**, 169-170 (1955).
9. **Voet,D., Voet,J.G. & Pratt C.W.** Lehrbuch der Biochemie. Wiley-VCH Verlag GmbH (2002).
10. **Hunter,T.** A thousand and one protein kinases. *Cell* **50**, 823-829 (1987).
11. **Hunter,T.** Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127 (2000).
12. **Cohen,P.** The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 596-601 (2000).
13. **Barik,S.** Protein phosphorylation and signal transduction. *Subcell. Biochem* **26**, 115-164 (1996).
14. **Zawalich,W.S. & Rasmussen,H.** Control of insulin secretion: a model involving Ca<sup>2+</sup>, cAMP and diacylglycerol. *Mol Cell Endocrinol* **70**, 119-137 (1990).
15. **Myers,M.G.J. & White,M.F.** Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 615-658 (1996).

16. **Hubbard,M.J. & Cohen,P.** On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends. Biochem. Sci.* **18**, 172-177 (1993).
17. **White,M.F.** The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* **40 Suppl 2**, S2-17 (1997).
18. **Van Obberghen,E., Ksauga,M., Le Cam,A. et al.** Biosynthetic labeling of insulin receptor: studies of subunits in cultured human IM-9 lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 1052-1056 (1981).
19. **Tennagels,N.** Die duale Aktivität des Insulinrezeptors: Mechanistische Untersuchungen an der rekombinanten Insulinrezeptorkinase. Dissertation, Institut für Biochemie an der Universität zu Köln (1998)
20. **Shoelson,S.E., White,M.F. & Kahn,C.R.** Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alpha-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control. *J Biol Chem* **263**, 4852-4860 (1988).
21. **Villalba,M., Wentz,S.R., Russell,D.S. et al.** Another version of the human insulin receptor kinase domain: expression, purification and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7848-7852 (1989).
22. **Häring,H.U., Kasuga,M. & Kahn,C.R.** Insulin receptor phosphorylation in intact adipocytes and in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* **108**, 1538-1545 (1982).
23. **Tornqvist,H.E., Gunsalus,J.R., Nemenoff,R.A. et al.** Identification of the insulin receptor tyrosine residues undergoing insulin-stimulated phosphorylation in intact rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 350-359 (1988).
24. **Tavare,J.M. & Denton,R.M.** Studies on the autophosphorylation of the insulin receptor from human placenta. Analysis of the sites phosphorylated by two-dimensional peptide mapping. *Biochem. J.* **252**, 607-615 (1988).
25. **White,M.F., Shoelson,S.E., Keutmann,H. et al.** A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **263**, 2969-2980 (1988).
26. **Feener,E.P., Backer,J.M., King,G.L. et al.** Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *J Biol Chem* **268**, 11256-11264 (1993).
27. **Kohanski,R.A.** Insulin receptor autophosphorylation. I. Autophosphorylation kinetics of the native receptor and its cytoplasmic kinase domain. *Biochemistry* **32**, 5766-5772 (1993).

28. **Tennagels,N., Telting,D., Parvaresh,S. et al.** Identification of Ser(1275) and Ser(1309) as autophosphorylation sites of the human insulin receptor in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 387-393 (2001).
29. **Kellerer,M., Lammers,R. & Häring,H.U.** Insulin signal transduction: possible mechanisms for insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **107**, 97-106 (1999).
30. **Vogel,W. & Ullrich,A.** Multiple in vivo phosphorylated tyrosine phosphatase SHP-2 engages binding to Grb2 via tyrosine 584. *Cell Growth Differ* **7**, 1589-1597 (1996).
31. **Eck,M.J., Dhe-Paganon,S., Trub,T. et al.** Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* **85**, 695-705 (1996).
32. **Winnay,J.N., Bruning,J.C., Burks,D.J. et al.** Gab-1-mediated IGF-1 signaling in IRS-1-deficient 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* **275**, 10545-10550 (2000).
33. **Pertwee,R.G.** Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem* **6**, 635-664 (1999).
34. **Veillette,A., Thibaudau,E. & Latour,S.** High expression of inhibitory receptor SHPS-1 and its association with protein-tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages. *J Biol Chem* **273**, 22719-22728 (1998).
35. **Virkamaki,A., Ueki,K. & Kahn,C.R.** Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* **103**, 931-943 (1999).
36. **Sesti,G., Federici,M., Hribal,M.L. et al.** Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* **15**, 2099-2111 (2001).
37. **Cai,D., Dhe-Paganon,S., Melendez,P.A. et al.** Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J. Biol. Chem.* **278**, 25323-25330 (2003).
38. **Lavan,B.E., Fantin,V.R., Chang,E.T. et al.** 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).
39. **Fantin,V.R., Sparling,J.D., Slot,J.W. et al.** Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 10726-10732 (1998).

40. **Zhou,L., Chen,H., Xu,P. et al.** Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol Endocrinol* **13**, 505-514 (1999).
41. **Lavan,B.E., Lane,W.S. & Lienhard,G.E.** 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).
42. **Xu,P., Jacobs,A.R. & Taylor,S.I.** Interaction of Insulin Receptor Substrate 3 with Insulin Receptor, Insulin Receptor-related Receptor, Insulin-like Growth Factor-1 Receptor, and Downstream Signaling Proteins. *J Biol Chem* **274**, 15262-15270 (1999).
43. **Araki,E., Lipes,M.A., Patti,M.E. et al.** Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* **372**, 186-190 (1994).
44. **Tamemoto,H., Kadowaki,T., Tobe,K. et al.** Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* **372**, 182-186 (1994).
45. **Khamzina,L., Gruppuso,P.A. & Wands,J.R.** Insulin signaling through insulin receptor substrate 1 and 2 in normal liver development. *Gastroenterology* **125**, 572-585 (2003).
46. **Sawka-Verhelle,D., Baron,V., Mothe,I. et al.** Tyr624 and Tyr628 in insulin receptor substrate-2 mediate its association with the insulin receptor. *J Biol. Chem.* **272**, 16414-16420 (1997).
47. **Withers,D.J. & White,M.F.** Perspective: The Insulin Signaling System—A Common Link in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes . *Endocrinology* **141**, 1917-1921 (2000).
48. **White,M.F., Maron,R. & Kahn,C.R.** Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature* **318**, 183-186 (1985).
49. **Sun,X.J., Rothenberg,P., Kahn,C.R. et al.** Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73-77 (1991).
50. **Sun,X.J., Miralpeix,M., Myers-MG,J. et al.** Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *J. Biol. Chem.* **267**, 22662-22672 (1992).
51. **Fasshauer,M., Klein,J., Kriauciunas,K.M. et al.** Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol Cell Biol* **21**, 319-329 (2001).

52. **Porzio,O., Federici,M., Hribal,M.L. et al.** The Gly972-->Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Clin Invest* **104**, 357-364 (1999).
53. **Songyang,Z., Carraway,K.L., III, Eck,M.J. et al.** Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* **373**, 536-539 (1995).
54. **Pawson,T.** Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* **373**, 477-478 (1995).
55. **Sun,X.J., Crimmins,D.L., Myers,M.G.J. et al.** Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* **13**, 7418-7428 (1993).
56. **Greene,M.W. & Garofalo,R.S.** 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).
57. **White,M.F.** IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* **283**, E413-E422 (2002).
58. **Le Roith,D. & Zick,Y.** Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* **24**, 588-597 (2001).
59. **Skolnik,E.Y., Batzer,A., Li,N. et al.** The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* **260**, 1953-1955 (1993).
60. **Skolnik,E.Y., Lee,C.H., Batzer,A. et al.** 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).
61. **Pronk,G.J. & Bos,J.L.** The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim. Biophys Acta* **1198**, 131-147 (1994).
62. **Roy,S., McPherson,R.A., Apolloni,A. et al.** 14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Biol* **18**, 3947-3955 (1998).
63. **Crews,C.M., Alessandrini,A. & Erikson,R.L.** The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**, 478-480 (1992).
64. **Marshall,C.J.** Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-185 (1995).

65. **Krauss,G.** Biochemistry of Signal Transduction and regulation. Wiley-VCH Verlag GmbH (2001).
66. **Taha,C. & Klip,A.** The insulin signaling pathway. *J Membr. Biol* **169**, 1-12 (1999).
67. **Khokhlatchev,A.V., Canagarajah,B., Wilsbacher,J. et al.** Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**, 605-615 (1998).
68. **Nave,B.T., Siddle,K. & Shepherd,P.R.** Phorbol esters stimulate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate production in 3T3-L1 adipocytes: implications for stimulation of glucose transport. *Biochem J* **318 ( Pt 1)**, 203-205 (1996).
69. **Walker,K.S., Deak,M., Paterson,A. et al.** Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 *in vitro*: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem J* **331 ( Pt 1)**, 299-308 (1998).
70. **Alessi,D.R. & Cohen,P.** Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 55-62 (1998).
71. **Matozaki,T. & Kasuga,M.** Roles of protein-tyrosine phosphatases in growth factor signalling. *Cell Signal.* **8**, 13-19 (1996).
72. **Yamauchi,K., Milarski,K.L., Saltiel,A.R. et al.** Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 664-668 (1995).
73. **Kharitonov,A., Schnekenburger,J., Chen,Z. et al.** Adapter function of protein-tyrosine phosphatase 1D in insulin receptor/insulin receptor substrate-1 interaction. *J Biol Chem* **270**, 29189-29193 (1995).
74. **Lee,C.H., Li,W., Nishimura,R. et al.** Nck associates with the SH2 domain-docking protein IRS-1 in insulin-stimulated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11713-11717 (1993).
75. **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).
76. **Tanti,J.F., Gremeaux,T., Van-Obberghen,E. et al.** Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J Biol Chem* **269**, 6051-6057 (1994).
77. **Hotamisligil,G.S., Peraldi,P., Budavari,A. et al.** IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665-668 (1996).

78. **Folli,F., Kahn,C.R., Hansen,H. et al.** Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest* **100**, 2158-2169 (1997).
79. **Jullien,D., Tanti,J.F., Heydrick,S.J. et al.** Differential effects of okadaic acid on insulin-stimulated glucose and amino acid uptake and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Biol Chem* **268**, 15246-15251 (1993).
80. **Roth,R.A., Liu,F. & Chin,J.E.** Biochemical mechanisms of insulin resistance. *Horm. Res* **41 Suppl 2**, 51-55 (1994).
81. **Johnston,A.M., Pirola,L. & Van Obberghen,E.** Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *FEBS Lett.* **546**, 32-36 (2003).
82. **Lehmann,R., Beck,A., Moeschel,K. et al.** Protein kinase C- zeta phosphorylates serine/threonine residues at the C-terminal binding motif of the tyrosine phosphatase SHP-2 of insulin receptor substrate 1. *Signal Transduction* **2**, 40-45 (2002).
83. **Tanasijevic,M.J., Myers,M.G., Jr., Thoma,R.S. et al.** Phosphorylation of the insulin receptor substrate IRS-1 by casein kinase II. *J Biol Chem* **268**, 18157-18166 (1993).
84. **Paz,K., Hemi,R., LeRoith,D. et al.** A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **272**, 29911-29918 (1997).
85. **Paz,K., Liu,Y.F., Shorer,H. et al.** Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem* **274**, 28816-28822 (1999).
86. **Jakobsen,S.N., Hardie,D.G., Morrice,N. et al.** 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).
87. **Qiao,L.Y., Zhande,R., Jetton,T.L. et al.** 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).
88. **Kolter,T., Uphues,I. & Eckel,J.** Molecular analysis of insulin resistance in isolated ventricular cardiomyocytes of obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.* **36**, E59-E67. (1997).

89. **De Fea,K. & Roth,R.A.** Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry* **36**, 12939-12947 (1997).
90. **Li,J., DeFea,K. & Roth,R.A.** Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* **274**, 9351-9356 (1999).
91. **Miele,C., Riboulet,A., Maitan,M.A. et al.** 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).
92. **Aguirre,V., Uchida,T., Yenush,L. et al.** The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* **275**, 9047-9054 (2000).
93. **Rui,L., Aguirre,V., Kim,J.K. et al.** Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest* **107**, 181-189 (2001).
94. **Aguirre,V., Werner,E.D., Giraud,J. et al.** 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).
95. **Greene,M.W., Sakaue,H., Wang,L. et al.** Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 8199-8211 (2003).
96. **Abe,H., Yamada,N., Kamata,K. et al.** Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest* **101**, 1784-1788 (1998).
97. **Kido,Y., Burks,D.J., Withers,D. et al.** Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* **105**, 199-205 (2000).
98. **Stumvoll,M., Fritsche,A., Tschritter,O. et al.** Adipositas und Insulinresistenz. *Med. Welt* **53**, 135-139 (2002).
99. **Yalow,R.S., Glick,S.M., Roth,J. et al.** Plasma insulin and growth hormone levels in obesity and diabetes. *Ann. N. Y. Acad Sci* **131**, 357-373 (1965).

100. **Bergman,R.N.** New concepts in extracellular signaling for insulin action: the single gateway hypothesis. *Recent Prog. Horm. Res* **52**, 359-385 (1997).
101. **Oakes,N.D., Cooney,G.J., Camilleri,S. et al.** Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* **46**, 1768-1774 (1997).
102. **Nolan,J.J., Freidenberg,G., Henry,R. et al.** Role of human skeletal muscle insulin receptor kinase in the in vivo insulin resistance of noninsulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J Clin. Endocrinol. Metab* **78**, 471-477 (1994).
103. **Krook,A., Bjornholm,M., Galuska,D. et al.** Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 284-292 (2000).
104. **Pederson,T.M., Kramer,D.L. & Rondinone,C.M.** Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes*, 24-31 (2001).
105. **Chin,J.E., Liu,F. & Roth,R.A.** Activation of protein kinase C alpha inhibits insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *Mol. Endocrinol.* **8**, 51-58 (1994).
106. **Chin,J.E., Dickens,M., Tavare,J.M. et al.** Overexpression of protein kinase C isoenzymes alpha, beta I, gamma, and epsilon in cells overexpressing the insulin receptor. Effects on receptor phosphorylation and signaling. *J Biol. Chem.* **268**, 6338-6347 (1993).
107. **Sykiotis,G.P. & Papavassiliou,A.G.** Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol Endocrinol* **15**, 1864-1869 (2001).
108. **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).
109. **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).
110. **Formisano,P. & Beguinot,F.** The role of protein kinase C isoforms in insulin action. *J. Endocrinol. Invest* **24**, 460-467 (2001).
111. **Griffin,M.E., Marcucci,M.J., Cline,G.W. et al.** Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* **48**, 1270-1274 (1999).

112. **Houdali,B., Nguyen,V., Ammon,H.P. et al.** Prolonged glucose infusion into conscious rats inhibits early steps in insulin signalling and induces translocation of GLUT4 and protein kinase C in skeletal muscle. *Diabetologia* **45**, 356-368 (2002).
113. **Schmitz-Peiffer,C.** Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal* **12**, 583-594 (2000).
114. **Schmitz-Peiffer,C.** Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **967**, 146-157 (2002).
115. **Takai,Y., Kishimoto,A., Inoue,M. et al.** Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J. Biol. Chem.* **252**, 7603-7609 (1977).
116. **Nishizuka,Y.** The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**, 693-698 (1984).
117. **Coussens,L., Parker,P.J., Rhee,L. et al.** Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* **233**, 859-866 (1986).
118. **Parker,P.J., Coussens,L., Totty,N. et al.** The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor. *Science* **233**, 853-859 (1986).
119. **Ron,D. & Kazanietz,M.G.** New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* **13**, 1658-1676 (1999).
120. **Storz,P., Doppler,H., Johannes,F.J. et al.** Tyrosine phosphorylation of protein kinase D in the pleckstrin homology domain leads to activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 17969-17976 (2003).
121. **Mosior,M. & Newton,A.C.** Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters. Reversibility and nature of membrane association. *J Biol Chem* **270**, 25526-25533 (1995).
122. **Newton,A.C.** Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **270**, 28495-28498 (1995).
123. **Dutil,E.M. & Newton,A.C.** Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *J Biol Chem* **275**, 10697-10701 (2000).

124. **Shao,X., Davletov,B.A., Sutton,R.B. et al.** Bipartite Ca<sup>2+</sup>-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* **273**, 248-251 (1996).
125. **Nishikawa,K., Toker,A., Johannes,F.J. et al.** Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem* **272**, 952-960 (1997).
126. **Wettenhall,R.E., Aebersold,R.H. & Hood,L.E.** Solid-phase sequencing of <sup>32</sup>P-labeled phosphopeptides at picomole and subpicomole levels. *Methods Enzymol.* **201**, 186-199 (1991).
127. **Jensen,O.** Modification-specific proteomics: systematic strategies for analysing post-translationally modified proteins. *Proteomics: A Trends Guide* (2000).
128. **Stensballe,A., Andersen,S. & Jensen,O.N.** Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis. *Proteomics.* **1**, 207-222 (2001).
129. **Hunter,A.P. & Games,D.E.** Chromatographic and mass spectrometric methods for the identification of phosphorylation sites in phosphoproteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* **8**, 559-570 (1994).
130. **Jaffe,H., Veeranna & Pant,H.C.** Characterization of serine and threonine phosphorylation sites in beta-elimination/ethanethiol addition-modified proteins by electrospray tandem mass spectrometry and database searching. *Biochemistry* **37**, 16211-16224 (1998).
131. **Beck,A.** Entwicklung von massenspektrometrischen und chromatographischen Mikro-Methoden zur Analyse von Proteinphosphorylierungen. Dissertation, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen (2002)
132. **Gronborg,M., Kristiansen,T.Z., Stensballe,A. et al.** A Mass Spectrometry-based Proteomic Approach for Identification of Serine/Threonine-phosphorylated Proteins by Enrichment with Phospho-specific Antibodies: Identification of a Novel Protein, Frigg, as a Protein Kinase A Substrate. *Mol Cell Proteomics* **1**, 517-527 (2002).
133. **Amersham Biosciences.** The Recombinant Protein Handbook. (2000)
134. **Smith,D.B. & Johnson,K.S.** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40 (1988).

135. **Bradford,M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
136. **Jakubke,H.D. & Jeschkeit,H.** Lexikon der Biochemie. Verlag Chemie, Weinheim (1981).
137. **Schächtele C.** PKC-Kinase-Assay für Mikrotiterplatten (persönliche Mitteilung). (2000)
138. **Laemmli,U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
139. **Rehm,H.** Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. (2000).
140. **Hames,B.D. & Rickwood,D.** Gel Electrophoresis of Proteins - A Practical Approach Second Edition. Oxford University Press (1990)
141. **Blum,H., Beier,H. & Gross,H.J.** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99 (1987).
142. **Shevchenko,A., Wilm,M., Vorm,O. et al.** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-858 (1996).
143. **Poehling,H. & Neuhoff,V.** Visualization of proteins with a silver stain. a critical analysis. *Electrophoresis* **2**, 141-147 (1981).
144. **Pingoud,A., Urbanke,C., Hoggett,J. et al.** Biochemical Methods. Wiley-VCH Verlag GmbH (2002).
145. **Rosenfeld,J., Capdevielle,J., Guillemot,J.C. et al.** In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* **203**, 173-179 (1992).
146. **Immler,D., Gremm,D., Kirsch,D. et al.** Identification of phosphorylated proteins from thrombin-activated human platelets isolated by two-dimensional gel electrophoresis by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Electrophoresis* **19**, 1015-1023 (1998).
147. **Patterson,S.D. & Aebersold,R.** Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis* **16**, 1791-1814 (1995).
148. **Fujise,A., Mizuno,K., Ueda,Y. et al.** Specificity of the high affinity interaction of protein kinase C with a physiological substrate,

- myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate. *J Biol Chem* **269**, 31642-31648 (1994).
149. **Graff,J.M., Rajan,R.R., Randall,R.R. et al.** Protein kinase C substrate and inhibitor characteristics of peptides derived from the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein phosphorylation site domain. *J Biol Chem* **266**, 14390-14398 (1991).
150. **Herget,T., Oehrlein,S.A., Pappin,D.J. et al.** The myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) is sequentially phosphorylated by conventional, novel and atypical isoforms of protein kinase C. *Eur J Biochem* **233**, 448-457 (1995).
151. **Ohmori,S., Sakai,N., Shirai,Y. et al.** Importance of protein kinase C targeting for the phosphorylation of its substrate, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate. *J Biol Chem* **275**, 26449-26457 (2000).
152. **Zappacosta,F., Huddleston,M.J., Karcher,R.L. et al.** Improved sensitivity for phosphopeptide mapping using capillary column HPLC and microionspray mass spectrometry: comparative phosphorylation site mapping from gel-derived proteins. *Anal. Chem.* **74**, 3221-3231 (2002).
153. **Beck,A., Moeschel,K., Deeg,M. et al.** Identification of an *in vitro* insulin receptor substrate-1 phosphorylation site by negative-ion muLC/ES-API-CID-MS hybrid scan technique. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 401-405 (2003).
154. **Beck,A., Deeg,M., Moeschel,K. et al.** Alkaline liquid chromatography/electrospray ionization skimmer collision-induced dissociation mass spectrometry for phosphopeptide screening. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 2324-2333 (2001).
155. **DeGnore,J.P. & Qin,J.** Fragmentation of phosphopeptides in an ion trap mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 1175-1188 (1998).
156. **Reid,G.E., Simpson,R.J. & O'Hari,R.A.** Leaving group and gas phase neighboring group effects in the side chain losses from protonated serine and its derivatives. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, 1047-1060 (2000).
157. **Salinovich,O. & Montelaro,R.C.** Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **156**, 341-347 (1986).
158. **Chen,C. & Okayama,H.** High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2745-2752 (1987).
159. **Quiagen.** Plasmid Purification Handbook. (2000)

160. **Wilfinger,W.W., Mackey,K. & Chomczynski,P.** Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**, 474-481 (1997).
161. **Sanger,F., Nicklen,S. & Coulson,A.R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467 (1977).
162. **Ansorge,W., Sproat,B., Stegemann,J. et al.** Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **15**, 4593-4602 (1987).
163. **Ansorge,W., Sproat,B.S., Stegemann,J. et al.** A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *J. Biochem. Biophys. Methods* **13**, 315-323 (1986).
164. **Ho,S.N., Hunt,H.D., Horton,R.M. et al.** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59 (1989).
165. **Horton,R.M., Raju,R. & Conti-Fine,B.M.** Designing PCR primers to amplify specific members or subgroups of multigene families. *Methods Mol. Biol.* **67**, 459-479 (1997).
166. **Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F. et al.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354 (1985).
167. **Mullis,K.B. & Faloona,F.A.** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350 (1987).
168. **Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S. et al.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
169. **Sambrook,J., Fritsch,E.F. & Maniatis,T.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* (1989)
170. **Watts,J.D., Affolter,M., Krebs,D.L. et al.** Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J Biol Chem* **269**, 29520-29529 (1994).
171. **Watts,J.D., Affolter,M., Krebs,D.L. et al.** In *Biological and biotechnological applications of electrospray ionization mass spectrometry.* pp. 381-407. ACS Symposium Series, (1996).

172. **Qiao,L.Y., Goldberg,J.L., Russell,J.C. et al.** Identification of enhanced serine kinase activity in insulin resistance. *J Biol Chem* **274**, 10625-10632 (1999).
173. **Huang,K.X. & Paudel,H.K.** Ser67-phosphorylated inhibitor 1 is a potent protein phosphatase 1 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5824-5829 (2000).
174. **Dammeier,S., Lovric,J., Eulitz,M. et al.** Identification of the smooth muscle-specific protein, sm22, as a novel protein kinase C substrate using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry [In Process Citation]. *Electrophoresis* **21**, 2443-2453 (2000).
175. **Katta,V., Chowdhury,S.K. & Chait,B.T.** Use of a single-quadrupole mass spectrometer for collision-induced dissociation studies of multiply charged peptide ions produced by electrospray ionization. *Anal. Chem.* **63**, 174-178 (1991).
176. **Roepstorff,P. & Fohlman,J.** Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).
177. **Schittek,B., Hipfel,R., Sauer,B. et al.** Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* **2**, 1133-1137 (2001).
178. **Mendez,R., Kollmorgen,G., White,M.F. et al.** Requirement of protein kinase C zeta for stimulation of protein synthesis by insulin. *Mol Cell Biol* **17**, 5184-5192 (1997).
179. **Liu,Y.F., Paz,K., Herschkovitz,A. et al.** Insulin stimulates PKCzeta - 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).
180. **Ravichandran,L.V., Esposito,D.L., Chen,J. et al.** PKC- $\{zeta\}$  phosphorylates IRS-1 and impairs its ability to activate PI 3-kinase in response to insulin. *J Biol Chem* (2000).
181. **Lammers,R.** persönliche Mitteilung. (2002)
182. **Fontayne,A., Dang,P.M., Gougerot-Pocidallo,M.A. et al.** Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* **41**, 7743-7750 (2002).
183. **Lam,T.K., Yoshii,H., Haber,C.A. et al.** Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* **283**, E682-E691 (2002).

184. **Tsuru,M., Katagiri,H., Asano,T. et al.** Role of PKC isoforms in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes: insignificance of atypical PKC. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* **283**, E338-E345 (2002).
185. **Braiman,L., Alt,A., Kuroki,T. et al.** Insulin induces specific interaction between insulin receptor and protein kinase C delta in primary cultured skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* **15**, 565-574 (2001).
186. **Braiman,L., Alt,A., Kuroki,T. et al.** Protein kinase Cdelta mediates insulin-induced glucose transport in primary cultures of rat skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* **13**, 2002-2012 (1999).
187. **Rosenzweig,T., Braiman,L., Bak,A. et al.** 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).
188. **Hubbard,S.R., Wei,L., Ellis,L. et al.** Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **372**, 746-754 (1994).
189. **Gustafson,T.A., Moodie,S.A. & Lavan,B.E.** The insulin receptor and metabolic signaling. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **137**, 71-190 (1999).
190. **Ogawa,W., Matozaki,T. & Kasuga,M.** Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling. *Mol. Cell Biochem.* **182**, 13-22 (1998).
191. **White,M.F. & Yenush,L.** The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top. Microbiol Immunol.* **228**, 179-208 (1998).
192. **Grammer,T.C. & Blenis,J.** Evidence for MEK-independent pathways regulating the prolonged activation of the ERK-MAP kinases. *Oncogene* **14**, 1635-1642 (1997).
193. **Watanabe,T., Waga,I., Honda,Z. et al.** Prostaglandin F2 alpha stimulates formation of p21ras-GTP complex and mitogen-activated protein kinase in NIH-3T3 cells via Gq-protein-coupled pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 8984-8990 (1995).
194. **Boulton,T.G., Yancopoulos,G.D., Gregory,J.S. et al.** An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* **249**, 64-67 (1990).
195. **Ruderman,N.B., Kapeller,R., White,M.F. et al.** Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 1411-1415 (1990).
196. **Lizcano,J.M. & Alessi,D.R.** The insulin signalling pathway. *Curr. Biol.* **12**, R236-R238 (2002).

197. **Yenush,L. & White,M.F.** The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *Bioessays* **19**, 491-500 (1997).
198. **Alessi,D.R. & Downes,C.P.** The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta* **1436**, 151-164 (1998).
199. **Doornbos,R.P., Theelen,M., Van Der Hoeven,P.C. et al.** Protein kinase Czeta is a negative regulator of protein kinase B activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 8589-8596 (1999).
200. **Goodlett,D.R., Aebersold,R. & Watts,J.D.** Quantitative *in vitro* kinase reaction as a guide for phosphoprotein analysis by mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**, 344-348 (2000).
201. **Kusmann,M., Hauser,K., Kissmehl,R. et al.** Comparison of *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of the exocytosis-sensitive protein PP63/parafusin by differential MALDI mass spectrometric peptide mapping. *Biochemistry* **38**, 7780-7790 (1999).
202. **Terpe,K.** Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523-533 (2003).
203. **Johannes,F.J., Prestle,J., Dieterich,S. et al.** Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C mu. *Eur J Biochem* **227**, 303-307 (1995).
204. **Dhe,P.S., Ottinger,E.A., Nolte,R.T. et al.** Crystal structure of the pleckstrin homology-phosphotyrosine binding (PH-PTB) targeting region of insulin receptor substrate 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8378-8383 (1999).
205. **Greene,M.W., Morrice,N., Garofalo,R.S. et al.** Modulation of human insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by protein kinase Cdelta. *Biochem. J.* **15**; 378, 105-116 (2004).
206. **Huddleston,M.J., Annan,R.S., Bean,M.F. et al.** Selective Detection of Phosphopeptides in Complex Mixtures by Electrospray Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* **4**, 710 (1993).
207. **Giraud,J., Leshan,R.L., Lee,Y.H. et al.** Nutrient-dependent and insulin-stimulated phosphorylation of IRS-1 on SER302 correlates with increased insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 3447-3454 (2004).
208. **Moeschel,K., Beck,A., Weigert,C. et al.** Protein Kinase C-zeta-Induced Phosphorylation of Ser318 in Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) Attenuates the Interaction with the Insulin Receptor and the Tyrosine Phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem In Revision* (2004).

209. **Gual,P., Gremeaux,T., Gonzalez,T. et al.** 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).
210. **Jiang,G., Dallas-Yang,Q., Liu,F. et al.** Salicylic acid reverses phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA)- and tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced insulin receptor substrate 1 (IRS1) serine 307 phosphorylation and insulin resistance in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 180-186 (2003).
211. **Lee,Y.H., Giraud,J., Davis,R.J. et al.** c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol. Chem.* **278**, 2896-2902 (2003).
212. **Pearson,R.B. & Kemp,B.E.** Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* **200**, 62-81 (1991).
213. **Kellerer,M., Mushack,J., Seffer,E. et al.** Protein kinase C isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (HEK 293 cells). *Diabetologia* **41**, 833-838 (1998).
214. **Heled,Y., Shapiro,Y., Shani,Y. et al.** Physical exercise enhances protein kinase C delta activity and insulin receptor tyrosine phosphorylation in diabetes-prone psammomys obesus. *Metabolism* **52**, 1028-1033 (2003).
215. **Sajan,M.P., Standaert,M.L., Bandyopadhyay,G. et al.** Protein kinase C-zeta and phosphoinositide-dependent protein kinase-1 are required for insulin-induced activation of ERK in rat adipocytes. *J Biol Chem* **274**, 30495-30500 (1999).
216. **Cobb,M.H. & Goldsmith,E.J.** Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci* **25**, 7-9 (2000).

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Schlüsselrolle des IRS-1 in der Insulinsignaltransduktion.	10
Abb. 1.2:	Positive und negative Modulation von IRS-1 durch Ser- und Thr-Phosphorylierungen.	13
Abb. 1.3:	Einteilung der PKC-Isoformen.	19
Abb. 1.4:	Aktivierung von konventionellen PKC-Isoformen am Beispiel von PKC- $\beta$ 2 durch Phosphorylierung, Translokation, Membranbindung und Freisetzung des Pseudosubstrates.	20
Abb. 3.1:	Schematische Plasmidkarte des Vektors pGEX-2T.	43
Abb. 3.2:	„Overlap extension“-PCR Mutagenese von IRS-1 S <sup>318</sup> zu IRS-1 A <sup>318</sup> .	72
Abb. 4.1:	Bereiche des IRS-1 Proteins, die die verwendeten GST-Fusionsproteine IRS-1 <sup>N1</sup> , IRS-1 <sup>N2</sup> , IRS-1 <sup>M</sup> und IRS-1 <sup>C</sup> umfassen.	76
Abb. 4.2:	Zeitlicher Verlauf des Wachstums von <i>E. coli</i> , transformiert mit den verschiedenen GST-Fusionsproteinen von IRS-1.	77
Abb. 4.3:	Expression von GST-IRS-1 <sup>C</sup> in <i>E. coli</i> in Abhängigkeit der Zeit.	78
Abb. 4.4:	Reinigung von GST-IRS-1 <sup>C</sup> über Glutathion-Sepharose.	79
Abb. 4.5:	Reinigung von GST-IRS-1 <sup>M</sup> über Glutathion-Sepharose.	81
Abb. 4.6:	Reinigung von GST-IRS-1 <sup>N1</sup> und GST-IRS-1 <sup>N2</sup> durch Affinitätschromatographie.	82
Abb. 4.7:	Detektion der GST-haltigen Abbaufragmente bei der Reinigung der GST-IRS-1-Fusionsproteine.	83
Abb. 4.8:	<i>In vitro</i> -Phosphorylierungskinetik des Fusionsproteins GST-IRS-1 <sup>C</sup> (MG 62 kDa) mit PKC- $\beta$ 1 und den GST-PKC-Isoformen - $\beta$ 1, - $\theta$ , und - $\iota$ .	84
Abb. 4.9:	<i>In vitro</i> -Phosphorylierungskinetik des Fusionsproteins GST-IRS-1 <sup>C</sup> (MG 62 kDa) mit den GST-PKC-Isoformen $\theta$ und $\beta$ 1.	86
Abb. 4.10:	<i>In vitro</i> -Phosphorylierungskinetik des Fusionsproteins GST-IRS-1 <sup>C</sup> (MG 62 kDa) mit GST-PKC- $\theta$ .	88
Abb. 4.11:	Phosphateinbau durch PKC-Isoformen in GST-Fusionsproteine von IRS-1.	90
Abb. 4.12:	UV-Diagramm von GST-IRS-1 <sup>N1</sup> , mit PKC- $\delta$ phosphoryliert und tryptisch gespalten.	92
Abb. 4.13:	Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>N1</sup> , mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 phosphoryliert und tryptisch gespalten.	93

Abb. 4.14: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>N1</sup> , mit PKC- $\theta$ , - $\delta$ und - $\zeta$ phosphoryliert und tryptisch gespalten.	94
Abb. 4.15: UV-Diagramm von GST-IRS-1 <sup>N2</sup> , mit PKC- $\theta$ phosphoryliert und tryptisch gespalten.	95
Abb. 4.16: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>N2</sup> , mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\theta$ , - $\delta$ und - $\zeta$ phosphoryliert und tryptisch gespalten.	96
Abb. 4.17: UV-Diagramm von GST-IRS-1 <sup>M</sup> , mit PKC- $\delta$ phosphoryliert und tryptisch gespalten.	97
Abb. 4.18: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>M</sup> , mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 phosphoryliert und tryptisch gespalten.	98
Abb. 4.19: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>M</sup> , mit PKC- $\theta$ , - $\delta$ und - $\zeta$ phosphoryliert und tryptisch gespalten.	99
Abb. 4.20: UV-Diagramm von GST-IRS-1 <sup>C</sup> , mit PKC- $\zeta$ phosphoryliert und tryptisch gespalten.	100
Abb. 4.21: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>C</sup> , mit PKC- $\alpha$ , - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 phosphoryliert und tryptisch gespalten.	100
Abb. 4.22: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>C</sup> , mit PKC- $\theta$ , - $\delta$ und - $\zeta$ phosphoryliert und tryptisch gespalten.	101
Abb. 4.23: Positiv-Ionen- $\mu$ LC/ESI-MS-Analyse (TSQ 700) von „MARCKS-PSD“-Peptid, das 30 min mit PKC- $\beta$ 1 phosphoryliert wurde.	104
Abb. 4.24: Positiv-Ionen- $\mu$ LC/ESI-MS-Analyse (TSQ 700) von „MARCKS-PSD“-Peptid.	105
Abb. 4.25: Verdaukontrolle von tryptisch gespaltenen GST-IRS-1 <sup>N2</sup> , <i>in vitro</i> mit PKC- $\zeta$ phosphoryliert.	106
Abb. 4.26: Alkalische Negativ-Ionen $\mu$ LC/ES-API-CID-MS Hybridscan-Analyse am Finnigan TSQ 700 von 25 pMol des tryptischen Verdaus von GST-IRS-1 <sup>N2</sup> <i>in vitro</i> phosphoryliert mit PKC- $\zeta$ .	108
Abb. 4.27: Offline Ionenfallen-Negativ-Ionenspektrum (Esquire 3000 <sup>Plus</sup> Ionenfallen-MS) der Phosphopeptid-Fraktion P2 (Abb. 4.26) des tryptischen Verdaus von 25 pMol GST-IRS-1 <sup>N2</sup> <i>in vitro</i> phosphoryliert mit PKC- $\zeta$ .	109
Abb. 4.28: Offline Ionenfallen-Positiv-Ionen-MS <sup>2</sup> -Spektrum der Phosphopeptid-Fraktion P2 des tryptischen Verdaus von 25 pMol GST-IRS-1 <sup>N2</sup> <i>in vitro</i> phosphoryliert mit PKC- $\zeta$ .	110
Abb. 4.29: Produkt-Ionen-Spektrum (MS <sup>3</sup> -Experiment) des Fragmentions bei m/z 769,3, das durch Gasphasendephosphorylierung von H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> aus dem Elternion mit m/z 802,0 entstanden war.	111
Abb. 4.30: Sequenzierung von IRS-1 S <sup>318</sup> nach der modifizierten Kettenabbruchmethode des „Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing“.	115

Abb. 4.31: Sequenzierung von IRS-1 A <sup>318</sup> nach der modifizierten Kettenabbruchmethode des „Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing“.	116
Abb. 4.32: Cerenkov-Pattern von GST-IRS-1 <sup>N2</sup> S <sup>318</sup> und GST-IRS-1 <sup>N2</sup> A <sup>318</sup> , phosphoryliert mit PKC-ζ und tryptisch gespalten.	117
Abb. 4.33: Bestimmung der Empfindlichkeit des Antikörpers gegen pSer <sup>318</sup> von IRS-1.	119
Abb. 4.34: <i>In vitro</i> -Charakterisierung des Antikörpers gegen pSer <sup>318</sup> von IRS-1.	119
Abb. 4.35: Charakterisierung des Antikörpers gegen pSer <sup>318</sup> von IRS-1 in BHK <sup>IR</sup> -Zellen.	121
Abb. 4.36: Die Phosphatbindung an Serin <sup>318</sup> von IRS-1 ist reversibel und kann mit alkalischer Phosphatase gespalten werden.	122
Abb. 4.37: Die Phosphorylierung an IRS-1 S <sup>307</sup> wird nicht durch den Antikörper gegen IRS-1 S <sup>318</sup> erkannt.	123
Abb. 4.38: Untersuchung der Insulinsignaltransduktion in BHK-Zellen.	125
Abb. 4.39: Untersuchung der Insulinsignaltransduktion in BHK-Zellen mit stabil transfiziertem Insulinrezeptor.	126
Abb. 4.40: Insulin- und TPA-stimulierter Einfluss der Transfektion von IRS-1 S <sup>318</sup> in BHK <sup>IR</sup> -Zellen auf die Tyr-Phosphorylierung von IRS-1.	128
Abb. 4.41: Insulin- und TPA-stimulierter Einfluss der Transfektion von IRS-1 A <sup>318</sup> in BHK <sup>IR</sup> -Zellen auf die Tyr-Phosphorylierung von IRS-1.	129
Abb. 4.42: Insulin- und TPA-stimulierter Einfluss der Cotransfektion von IRS-1 S <sup>318</sup> und PKC-δ in BHK <sup>IR</sup> -Zellen auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.	131
Abb. 4.43: Insulin- und TPA-stimulierter Einfluss der Cotransfektion von IRS-1 A <sup>318</sup> und PKC-δ in BHK <sup>IR</sup> -Zellen auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.	132
Abb. 4.44: Übersicht über die Insulin- und TPA-stimulierten Effekte in transfizierten BHK <sup>IR</sup> -Zellen auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.	133
Abb. 4.45: Insulinstimulierter Einfluss der Cotransfektion von PKC-ζ und IRS-1 A <sup>318</sup> bzw. IRS-1 S <sup>318</sup> auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.	135
Abb. 4.46: Insulinstimulierter Einfluss der Transfektion von IRS-1 A <sup>318</sup> bzw. IRS-1 S <sup>318</sup> auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.	136
Abb. 4.47: Insulinstimulierter Einfluss der Cotransfektion von PKC-ζ und IRS-1 A <sup>318</sup> bzw. IRS-1 S <sup>318</sup> auf die Komplexbildung IR/IRS-1.	138

Abb. 4.48: Insulinstimulierter Einfluss der Transfektion von IRS-1 A <sup>318</sup> bzw. IRS-1 S <sup>318</sup> auf die Komplexbildung IR/IRS-1.	139
Abb. 4.49: Insulinstimulierter Einfluss der Cotransfektion von PKC- $\zeta$ und IRS-1 A <sup>318</sup> bzw. IRS-1 S <sup>318</sup> auf die Aktivierung von Erk1/Erk2.	141
Abb. 4.50: Insulinstimulierter Einfluss der Cotransfektion von PKC- $\zeta$ und IRS-1 A <sup>318</sup> bzw. IRS-1 S <sup>318</sup> auf die Aktivierung von PKB.	143
Abb. 4.51: Die Phosphorylierung an IRS-1 S <sup>318</sup> in BHK <sup>IR</sup> -Zellen wird durch Insulin stimuliert.	144
Abb. 4.52: Die Phosphorylierung an IRS-1 S <sup>318</sup> in BHK <sup>IR</sup> -Zellen wird durch TPA stimuliert.	145
Abb. 4.53: Gasphasen-Dephosphorylierung von H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> des zweifach geladenen Fragmentions mit m/z 635,83.	147
Abb. 4.54: Produkt-Ionen-Spektrum (MS <sup>3</sup> -Experiment) des Fragmentions bei m/z 635,81.	147

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Pipettierschema der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele.	50
Tabelle 3.2: Laufbedingungen der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele.	50
Tabelle 3.3: Primer, die für die Kontrollsequenzierungen der Plasmid-DNA verwendet wurden.	71
Tabelle 3.4: Primer die für die Mutation IRS-1 Ser <sup>318</sup> →Ala <sup>318</sup> verwendet wurden.	73
Tabelle 3.5: PCR-Zyklen für die „overlap Extension“ Mutagenese.	73
Tabelle 4.1: Zeitlicher Verlauf des Wachstums von <i>E. coli</i> , transformiert mit den verschiedenen GST-Fusionsproteinen von IRS-1.	76
Tabelle 4.2: Molekulargewichte der einzelnen GST-IRS-1-Fusionsproteinfragmente und Ausbeuten von Aufreinigungen aus 1 L <i>E. coli</i> -Suspension.	82
Tabelle 4.3: <sup>32</sup> P-ATP Einbaurrate (in cpm) in GST-IRS-1 <sup>C</sup> in Abhängigkeit der Enzymzugabe.	87
Tabelle 4.4: Molekulargewichte der verwendeten GST-IRS-1-Fragmente und Mengenangaben zur Berechnung der Phosphateinbaurrate.	89
Tabelle 4.5: Phosphateinbau durch PKC-Isoformen in die GST-Fusionsproteine von IRS-1.	90
Tabelle 4.6: Anzahl der Cerenkov-Peaks bestimmt anhand der Cerenkov-Pattern der vier Fusionsproteine von IRS-1, phosphoryliert mit 6 PKC-Isoformen.	102
Tabelle 4.7: Molekülmassen/Ladungszahl, die bei der Fragmentierung von „MARCKS-PSD-derived“ Peptid entstehen.	104
Tabelle 4.8: Theoretische Fragmentierung des Peptids S <sup>298</sup> RTESITATSPASMVGGKPGSFR <sup>320</sup> .	112
Tabelle 4.9: Proteinprimärsequenz und die dazugehörigen Basentriplets der Aminosäuren 313-323 von IRS-1.	114
Tabelle 4.10: Der genetische Standardcode.	114
Tabelle 4.11: Übersicht über die mit einem Q-TOF Ultima MS gefundenen PKC-δ-katalysierten <i>in vitro</i> -Phosphorylierungsstellen von IRS-1.	146
Tabelle 4.12: Theoretische Fragmentierung des Peptids K <sup>839</sup> VDTAAQTNSR <sup>849</sup> .	148



Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

E. Bayer	Organische Chemie
H. Bisswanger	Physiologische Chemie
P. Bohley	Physiologische Chemie
V. Braun	Mikrobiologie
W. Büsen	Genetik
K. Eisele	Physiologische Chemie
K.-U. Fröhlich	Physiologische Chemie
R. Gebhardt	Physiologische Chemie
F. Götz	Genetik
H.-P. Hagenmaier	Organische Chemie
B. Hamprecht	Physiologische Chemie
M. Hanack	Organische Chemie
V. Hoffmann	Physikalische Chemie
G. Jung	Peptidchemie
P. Krauß	Analytische Chemie
E. Lindner	Anorganische Chemie
W. Mayer	Botanik
D. Mecke	Physiologische Chemie
H. Metzner	Pflanzenphysiologie
W. Nakel	Physik
D. Oelkrug	Physikalische Chemie
W. Pfeiffer	Zoologie
H. Pommer	Mathematik
K. Poralla	Mikrobiologie
H. Probst	Physiologische Chemie
K. Reutter	Anatomie
T. Schewe	Physiologische Chemie
B. Schink	Mikrobiologie
H.-U. Schnitzler	Zoologie
F. Seelig	Theoretische Chemie
W. Seyffert	Genetik
G. Staudt	Physik
J. Strähle	Anorganische Chemie
W. Voelter	Physikalische Biochemie
G. Wagner	Physik
U. Weber	Anorganische Biochemie
U. Weser	Anorganische Biochemie
G. Winkelmann	Mikrobiologie
H. Zähler	Mikrobiologie