

Armin Herkner: Charakterisierung und Identifizierung spezifischer Phosphorylierungsstellen des humanen Grb2 Associated Binder-1 Proteins in vitro. 2001

Das humane Grb2 associated binder-1 (Gab-1)-Protein wurde von Holgado-Madruga et al. (1996) durch Bindung an rekombinantes growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) aus einer cDNA-Expressions-Bibliothek von glialen und medulloblastären Tumoren isoliert. Gab-1 wird neben anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und Kinasen auch durch den Insulin-Rezeptor (IR) und den Insulin-like growth factor Rezeptor 1 (IGF-1R) sowie die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK1/2) phosphoryliert. Dieses Protein scheint so eine wichtige Rolle in der mitogenen und metabolischen Regulation der Zelle zu spielen. Strukturelle und funktionale Eigenschaften von Gab-1 weisen dieses als ein neues Mitglied der Insulin-Rezeptorsubstrat (IRS)-Familie aus. Diese Multisubstrat Docking-Proteine koppeln verschiedene Rezeptorsysteme mit intrazellulären Signalproteinen. Die zur Homogenität gereinigten Fusionsproteine von Gab-1 wurden im ersten Teil der Arbeit in Phosphorylierungsexperimenten mit rekombinanten (r) Kinasedomänen des IR und IGF-1R zur Untersuchung der Signalspezifität eingesetzt. Dazu wurde phosphoryliertes Gab-1 proteolytisch verdaut und die resultierenden Peptide über eine Anionenaustausch HPLC-Analyse getrennt. Zwischen beiden Kinasen konnte kein Unterschied im Phosphorylierungsmuster festgestellt werden, so daß die weitere Identifizierung der bevorzugten Tyrosinphosphorylierungsstellen mit dem rIR erfolgte. Dazu wurde phosphoryliertes Gab-1 proteolytisch verdaut und die resultierenden Peptide über eine zweidimensionale HPLC-Analyse getrennt. Anschließend wurden die Phosphopeptide mittels Matrix unterstützter Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) und/oder automatisiertem Edman-Abbau sequenziert. Es konnten unter katalytischen Bedingungen acht spezifische Tyrosinphosphorylierungsstellen in Gab-1 (Y242, Y285, Y373, Y447, Y472, Y619, Y657, Y689) identifiziert werden. Die Phosphorylierungsstellen (Y447, Y472, Y619) repräsentieren PI-3-Kinase Bindungsstellen und stellen mit 76% Phosphateinbau zugleich die Hauptphosphorylierungsstellen des rIR in Gab-1 dar. Zur Untersuchung des Anbindungsverhaltens von PI-3-Kinase an rIR-phosphoryliertes Gab-1 wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese 3 Einzelmutanten (Y447F, Y472F, Y619F), drei Doppelmutanten (Y447/472F, Y447/619F, Y472/619F) und eine Dreifachmutante (Y447/472/619F) der Hauptphosphorylierungsstellen erzeugt und nach Expression sowie Aufreinigung in GST-Pull Down Experimenten eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß eine PI-3-Kinaseanbindung über zwei der drei Hauptphosphorylierungsstellen erfolgte; diese Anbindung war unabhängig davon, welche der drei Phosphorylierungsstellen mutiert wurde. Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Phosphorylierungsverhalten der extracellulär regulierten Kinasen (ERKinasen) und cJun N-terminal kinases (JNKinasen) auf Gab-1 untersucht. Unter Zuhilfenahme der oben genannten Methoden konnte Gab-1 als spezifisches Substrat dieser mitogen-activated protein kinases (MAPKinasen) identifiziert werden. Die Phosphorylierungsmuster beider Kinasefamilien unterschieden sich nicht voneinander, so daß im Anschluß die Identifizierung der spezifischen Phosphorylierungsstellen in Gab-1 mit ERK2 erfolgte. Mittels des gleichen Verfahrens wie schon beim rIR konnten sechs spezifische Serin-/Threoninphosphorylierungsstellen identifiziert werden (T312, S381, S454, T476, S581, S597). Zur Verifizierung dieser Phosphorylierungsstellen wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese sechs Einzelmutanten erzeugt (T312V, S381A, S454A, T476V, S581A, S597A). Es zeigte sich jedoch, daß sich die Mutante S454A nicht exprimieren ließ und daher wurde eine Mutation von Serin zu Cystein gewählt (S454C). Die aufgereinigten Einzelmutanten wurden in zweidimensionalen HPLC-Analysen eingesetzt; es ließen sich so 5 der 6 ERK2-spezifischen Phosphorylierungsstellen verifizieren (T312, S454, T476, S581, S597). Dabei zeigte sich, daß S454 mit 28% Phosphateinbau die Hauptphosphorylierungsstelle der ERK2-spezifischen Phosphorylierung in Gab-1 darstellte. Durch kinetische Untersuchungen, die ebenfalls mittels zweidimensionaler HPLC-Analysen durchgeführt wurden, ließ sich zudem zeigen, daß der Phosphateinbau gleichmäßig über die Zeit in die Phosphopeptide erfolgte. Die funktionale Analyse mittels rIR- und ERK2-phosphoryliertem Gab-1 in pull down Experimenten zeigte keine Reduktion der PI-3-Kinase Anbindung bzw. des Bindungsstatus von PI-3-Kinase durch Doppelphosphorylierung im Vergleich

zu rIR phosphoryliertem Gab-1. Es zeigte sich allerdings ein direkter Einfluß von ERK2 auf den rIR, bei dem dieser durch ERK2 nahezu abgeschaltet wurde. Dieser Mechanismus hatte aber ebenfalls keinen Einfluß auf die Anbindung der PI-3-Kinase, die wie bei rIR-phosphoryliertem Gab-1 erfolgte.

Diese Ergebnisse zeigen:

1. In Gab-1 gibt es acht rIR spezifische Phosphorylierungsstellen. Gab-1 wird unter katalytischen Bedingungen durch den rIR bzw. den rIGFR an den gleichen Tyrosinresten phosphoryliert.
2. Es sind mindestens 2 der 3 identifizierten Hauptphosphorylierungsstellen zur Anbindung der PI-3-Kinase nötig.
3. In Gab-1 gibt es 5 ERK2-spezifische Phosphorylierungsstellen. Gab-1 wird durch ERKinasen bzw. den JNKinasen an Ser-/ Thr-Resten phosphoryliert.
4. Die ERK2-spezifische Phosphorylierung von Gab-1 hat keinen Einfluß auf die PI-3-Kinaseanbindung.
5. ERK2 reduziert direkt die Aktivität vom rIR.

Diese Ergebnisse deuten auf einen gemeinsamen Mechanismus bei der Signalweiterleitung des rIR und rIGF-1R über Gab-1 hin, der auf der Ebene von Gab-1 nicht durch ERK- und JNKinasen beeinflusst zu werden scheint.

Gab-1 is a member of the multifunctional docking protein family, represented by the insulin receptor substrates (IRS)-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4 and Gab-2. Gab-1 acts downstream of a broad range of cytokine and growth factor receptors and link these receptors to different intracellular signal cascades. In order to understand if Gab-1 is also a substrate of the recombinant (r) IR and the rIGF-1R the entire protein (aa 1-727) of human Gab-1 was expressed as glutathione-S-transferase proteins and phosphorylated by these kinases in vitro. Peptide sequencing and mass spectrometry of human Gab-1 protein phosphorylated by recombinant IR showed eight tyrosine phosphorylation sites (Y242, Y285, Y373, Y447, Y472, Y619, Y657, Y689). The tyrosine phosphorylation sites Y447, Y472 and Y619 showed with 76% the major phosphate incorporation. The functional relevance of these results was shown with a GST pull-down assay and Gab-1 fusion proteins in which the identified tyrosine residues were mutated to phenylalanine. Mutation of two of the major tyrosine phosphorylation sites Y447, Y472 and Y619 of IR phosphorylated hGab-1 showed that binding of PI3K was abolished. The second part of this work showed that Gab-1 is a specific substrate of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) family and the cJun N-terminal kinases (JNK). HPLC analysis of tryptic digested Gab-1 revealed an identical phosphorylation pattern between the kinases. Peptide sequencing and mass spectrometry of human Gab-1 protein phosphorylated by ERK2 identified six ser/ thr phosphorylation sites (T312, S381, S454, T476, S581, S594). Using site specific mutagenesis, several mutants were generated as glutathione-S-transferase proteins to verify the phosphorylation sites identified by mass spectrometry. Two dimensional HPLC Analysis could verify only 5 of the six identified phosphorylation sites (T312, S454, T476, S581, S597). S454 appeared to be with 28% of phosphate incorporation the major phosphorylation site in ERK2 phosphorylated Gab-1. However, GST pull down assays didn't show a change in rIR induced PI3K binding to Gab-1 by ERK2 phosphorylation, indicating that other mechanism might exist regulatory signal transduction via IR at the level of Gab-1.