

Elfriede Klein: Laminin Binding Protein / p40: Identifizierung und Charakterisierung als neues IRS-1 bindendes Protein. 2001

IRS-1 ist das bisher am besten charakterisierte Mitglied der IRS-Proteinfamilie, zu der neben IRS-2 auch IRS-3, IRS-4 ebenso wie Gab1, Gab2 und wahrscheinlich auch weitere, bisher noch nicht identifizierte Proteine gehören. Ursprünglich als Substrate des Insulin- und des IGF-1 Rezeptors entdeckt, stellte sich im Laufe der Zeit heraus, daß die IRS-Proteine gleichfalls eine wichtige Rolle in den Signaltransduktionswegen einer ganzen Anzahl weiterer Rezeptorsystemen spielen. Eines der wichtigsten Merkmale dieser Proteinfamilie stellen die zahlreichen Tyrosinphosphorylierungsstellen dar, an die spezifisch Signalproteine binden und so Proteinkomplexe bilden, von denen intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden. Neben einer Reihe von Proteinen mit SH2-Domänen, wurden jedoch auch Interaktionspartner identifiziert, deren Bindungsmodus bisher unbekannt ist. In Anbetracht der vielen potentieller Tyrosinphosphorylierungsstellen und der multiplen Insulinwirkungen in unterschiedlichen Zellen und Geweben sind bisher relativ wenige an IRS-1 bindende Proteine entdeckt worden. Ziel dieser Arbeit war es daher, bisher unbekannt, mit IRS-1 interagierende Signalproteine durch Screenen einer cDNA-Expressionsbank zu identifizieren. Hierzu wurden unterschiedliche Domänen des humanen IRS-1, die im ganzen gesehen alle potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen enthielten und als "Sonden" dienen sollten, als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert (hIRS-1-NT580: nt 580 - 1522 , AS 1 - 314; hIRS-1-NT421 nt 1843 - 2374, AS 421-598; IRS-1-MD: nt 2129 - 2914 , AS 517 - 778; hIRS-1-CT510: nt 5867 - 3773 , AS 867 - 1064 und hIRS-1-CT540: nt 3721 - 4309 , AS 1048 - 1243). Nach ihrer affinitätschromatographischen Reinigung wurde zunächst überprüft ob die rekombinanten hIRS-1-Proteine funktional waren, d.h. ob sie Substrate des Insulinrezeptors darstellten und in der Lage waren, bereits bekannte interagierende Signalproteine in GST-Pull-Down-Assays zu binden. Alle hIRS-1-GST-Fusionsproteine wurde bis auf eine Ausnahme (hIRS-1-NT580) sehr effizient vom partiell gereinigten als auch von rekombinanten Insulinrezeptorkinasen phosphoryliert. Um eine möglicherweise bei Protein-Protein-Interaktionen störende Serinphosphorylierung der rekombinanten IRS-1-Proteine durch den Insulinrezeptor zu verhindern, wurden die Phosphorylierungsreaktionen mit katalytischen Mengen an Rezeptor durchgeführt und durch eine anschließende Phosphoaminosäureanalyse die ausschließliche Tyrosinphosphorylierung überprüft. Durch GST-Pull-Down-Assays und anschließenden Western-Blot-Analysen konnte die Bindung der SH2-Proteine p85a an hIRS-1-NT421, hIRS-1-MD und hIRS-1-CT510, die Bindung von Syp an hIRS-1-CT540, sowie die Bindung von Grb2 an hIRS-1-CT510 nachgewiesen werden. Mit den in den GST-Pull-Down-Assays aus Zellextrakten isolierten Bindungspartnern wurden in Far-Western Versuchen die Versuchsbedingungen für das anschließende Screenen einer Fettzellen lTriplEx™-Expressionsbank (Clontech) mit phosphorylierten hIRS-1-Fusionsproteinen optimiert. Das Screenen wurden auf unterschiedliche Weise durchgeführt; zum einen durch den direkten Nachweis der Bindung mit Hilfe radioaktiv phosphorylierter rekombinanter hIRS-1-Proteine sowie zum anderen durch den indirekten Nachweis der gebundenen Fusionsproteine mit Hilfe von Antiphosphotyrosinen. Neben der regulativen Untereinheit der PI 3-Kinase, p85a, sowie einer alternativ gespleißt Form dieses Proteins wurden auch zwei in Bakterien aktivierbare eukaryotische Tyrosinkinasen identifiziert: cFes und die Hematopoietic Cell Kinase (HCK). Neben diesen Proteinen konnte mit Laminin Binding Protein/p40 (LBP/p40) ein neuer Interaktionspartner von IRS-1 identifiziert werden. LBP/p40 ist ein 37 kDa großes Protein mit z.Zt. unklarer funktionaler Bedeutung; es scheint eine Rolle in der Proliferation und der embryonalen Entwicklung, aber auch bei der Entwicklung von Krebs zu spielen. Zwei der scheinbar wichtigsten und bisher am besten untersuchten Charakteristika ist, das Vorläuferprotein des 67 kDa Lamininrezeptors zu sein sowie mit der 40S ribosomalen Untereinheit zu assoziieren. Der 67 kDa Lamininrezeptor assoziiert mit der $\alpha 6$ -Untereinheit von Integrinen und ermöglicht möglicherweise erst den Integrinen $\alpha 6\beta 1$ bzw. $\alpha 6\beta 4$ eine hochaffine Bindung an Laminin. Als ein Protein, das mit der 40S ribosomalen Untereinheit assoziiert ist stellt es möglicherweise eines der Schlüsselenzyme in der Proteinsynthesemaschinerie dar. Damit der Interaktion von LBP/p40 mit IRS-1 eine biologische

Relevanz zugeschrieben werden kann, müssen beide Proteine in den gleichen Geweben bzw. Zellen exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe von Northern Blot Analysen ein gewebespezifisches LBP/p40-mRNA Expressionsmuster erstellt und mit dem von IRS-1 verglichen. Eine gemeinsame erhöhte mRNA-Expression beider Proteine findet sich nicht nur in insulinempfindlichen Geweben und Organen wie z.B. des Fettgewebes, des Skelettmuskels, des Herzens und des Pankreas sondern auch in sich regenerierender Leber und in einigen malignen Geweben. Die beim Screenen der Fettzellen cDNA-Expressionbank beobachtete Bindung der beiden Proteine konnte in anschließenden Far Western Versuchen, Koimmunpräzipitationen und Untersuchungen mittels des Mammalian Two Hybrid Systems bestätigt werden. Erste in vivo-Analysen mit Hilfe des Mammalian Two Hybrid Systems zeigten, daß die LBP/40-IRS-1-Interaktion insulinstimulierbar ist und offenbar über Bindungsmotive in den AS 421 - 598, AS 517 - 778 und AS 867 - 1067 des IRS-1 vermittelt. Bemerkenswerterweise liegen in diesen Domänen ebenfalls die Bindungsmotive YXXM bzw. YMXM des p85a, was möglicherweise auf eine Konkurrenz der beiden Proteine um die Interaktion mit IRS-1 hindeuten könnte. Wie eine Bindung des LBP/p40 an phosphorylierte Tyrosine des IRS-1 ohne SH2-Domänen zustande kommen kann und welche Region(en) dabei eine Rolle spielen ist bisher noch völlig unklar und bedarf weitergehenden Untersuchungen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen u.a., daß durch Screenen einer Fettzellen cDNA-Expressionsbank ein neues IRS-1 bindendes Protein, das Laminin Binding Protein/p40 (LBP/p40), identifiziert werden konnte. Die Interaktionen beider Proteine könnten sowohl bei der insulinstimulierten Translationskontrolle als auch einen Restriktionsschnittpunkt im Cross Talk des Insulinrezeptors mit den $\alpha 6\beta 1$ bzw. $\alpha 6\beta 4$ Integrinen darstellen.

Members of the IRS-protein family are important convergence points in signal transduction by receptors for insulin, IGF-1, interleukins, interferons and growth factors. After tyrosine phosphorylation IRS-1 serves as a docking protein for signaling proteins containing SH2-domains. However IRS-1 has also been shown to associate physically with non SH2-proteins like the integrin $\alpha V\beta 3$, the Ca²⁺-ATPases in skeletal and cardiac muscles, SERCA1 and SERCA2, as well as the SV40 T-antigen. In order to identify new IRS-1-binding proteins an expression library derived from human fat tissue has been screened with GST-hIRS-1 domains phosphorylated by recombinant insulin receptor kinase. Three plaques producing hIRS-1 binding proteins were identified in 106 clones, purified through three rounds of additional screening, and subjected to Cre-mediated excision. Sequence analysis revealed that one of these clones contained a 1,2 kb cDNA with almost 100 % homology to LBP/p40, which represents a novel IRS-1 binding protein. The non SH2-protein LBP/p40 appears to exhibit multiple functions in various aspects of cell growth, embryonic development and cancer progression. Two of its main functions in cells are (1) as a precursor molecule of the 67 kDa laminin receptor, which might serve as an auxiliary molecule involved in regulating the interactions of laminin with the $\alpha 6\beta 4$ or $\alpha 6\beta 1$ integrins, respectively, and (2) as one of the key components of the protein synthetic machinery associated with 40S ribosomal subunits. Interaction of IRS-1 and LBP/p40 was verified and investigated in far western blotting, coimmunoprecipitations and in the mammalian two hybrid system. Using the mammalian two hybrid system in the human hepatoma cell line HepG2 and the N-terminal SH2-domain of p85a (SH2PI3K) as a positive control insulin stimulated associations of three different IRS-1-domains (hIRS-1/PH-NT421, AS 421 - 598; hIRS-1/PH-MD, AS 517 - 778 and hIRS-1/PH-CT510, AS 867 - 1067) with LBP/p40 were observed. LBP/p40 therefore interacts with tyrosine phosphorylated IRS-1, and shows the same binding preferences as the regulatory subunit of the PI 3-kinase p85a. The association of IRS-1 to LBP/p40 might play a role in the mitogenic response of cells to insulin and IGF-1. Furthermore, it might provide a point of cross talk between signaling pathways involved in the control of cell survival and cellular transformation.