



Analyse der GSK3 β -abhängigen Signaltransduktion durch Identifizierung assoziierter Proteinkomplexe

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Sabine Hamer
aus Hemer

Düsseldorf, November 2012

aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Axel Gödecke
Korreferent: Prof. Dr. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2013

In Erinnerung an meine Mutter

1	Einleitung.....	1
1.1	Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3).....	2
1.2	Regulation von GSK3 β	4
1.3	Substrate von GSK3 β	9
1.4	Kardiale Hypertrophie und GSK3 β	11
1.5	Ziel der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Laborgeräte	14
2.2	Laborchemikalien	15
2.3	Enzyme	15
2.4	Antikörper.....	16
2.5	Grundvektor pGJ3-CSCGW	16
2.6	Prokaryotische Zellen	17
2.6.1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>) XL-1 Blue.....	17
2.7	Eukaryotische-Zellen	17
2.7.1	HEK293T Zellen.....	17
2.7.2	HL-1 Zellen.....	18
2.8	Bearbeitung von Nukleinsäuren.....	18
2.8.1	DNA.....	18
2.8.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
2.8.1.2	<i>In-Fusion</i> PCR Klonierungssystem.....	19
2.8.1.3	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	19
2.8.1.4	DNA-Agarosegelextraktion	20
2.8.1.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	20
2.8.1.6	DNA-Restriktionsendonuklease-Reaktion	20
2.8.1.7	DNA-Ligation	20
2.8.1.8	Weitere Modifikationen von DNA-Fragmenten	20
2.8.1.9	Transformation kompetenter <i>Escheria coli</i> (<i>E.coli</i>) Bakterien	21
2.8.1.10	Kultivierung transformierter <i>E.coli</i> Bakterien.....	21
2.8.1.11	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> Bakterien	21
2.8.2	Sequenzierung.....	21
2.9	Transfektion von Säugerzellen	22
2.9.1	Transiente Transfektion von HEK293T Zellen.....	22
2.9.2	Stabile Infektion von HEK293T und HL-1 Zellen.....	22
2.10	Proteinanalyse.....	23
2.10.1	Aufschluss von Proteinextrakten.....	23
2.10.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA-Assay).....	23
2.10.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	24
2.10.4	Halb-Trocken-Transfermethode und Nass-Transfermethode.....	24
2.10.5	Immundetektion von Proteinen im Western Blot (WB).....	25
2.11	Methoden zur Aufreinigung und Identifizierung von GSK3 β -Interaktionspartnern.....	25

2.11.1 Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP).....	25
2.11.1.1 Tandem-Affinitätssequenz (TAP-Tag)	27
2.11.2 Silbergefärbung	27
2.11.3 Isolation der Proteine aus Silbergelelen zur massenspektrometrischen Analyse	28
2.11.4 Massenspektrometrische-Messung der isolierten Proteine.....	29
2.12 Kinaseaktivität der GSK3 β -Mutanten.....	30
2.13 Gelfiltrationschromatographie	31
2.14 Stimulation oder Inhibition von HEK293T Zellen	32
2.15 GSK3 β Hemmung mit Lithiumchlorid	33
2.16 StrepTactin-Präzipitation (SP).....	33
2.17 PKA-Hemmung und -Aktivierung am isolierten GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplex.....	33
2.18 <i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA).....	34
2.19 Kinaseaktivitätsassay von GSK3 β und PKAI α	35
2.20 Statistik	36
2.21 Verwendete Computerprogramme	36
3 Ergebnisse.....	37
3.1 Allgemeine Strategien zur Analyse von GSK3 β -assoziierten Proteinkomplexen mittels der Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP).....	37
3.1.1 GSK3 β -TAP Konstrukt.....	38
3.1.2 TAP/MS-Analyse in transient transfizierten HEK293T Zellen.....	38
3.1.2.1 pGJ3-S-GSK3 β -TAP	38
3.1.2.2 Charakterisierung des GSK3 β -TAP-Proteins.....	39
3.1.2.3 Überprüfung der GSK3 β -Komplexbildung mit der TAP/MS-Methode in transient transfizierten HEK293T Zellen.....	40
3.2 TAP/MS-Analyse stabil exprimierender GSK3 β -TAP HEK293T und GSK3 β -TAP HL-1 Zellen.....	44
3.2.1 Austausch des SFFV Promotors gegen den CAG Promotor zur stabilen GSK3 β -TAP-Expression in HEK293T und HL-1 Zellen	44
3.2.2 Regulation des GSK3 β -TAP-Proteins.....	48
3.2.3 Generierung einer konstitutiv aktiven und einer inaktiven GSK3 β -Mutante	49
3.2.4 Vergleichende Charakterisierung der GSK3 β -Mutanten in transgenen HEK293T und HL-1 Zellen .	53
3.2.5 Analyse der Kinaseaktivität der aktiven (Ser9) und der inaktiven GSK3 β -TAP-Mutante (KI).....	54
3.2.6 Komplexbildung der GSK3 β -TAP-Mutanten	56
3.2.7 TAP/MS-Analyse der aktiven GSK3 β -Ser9- und der inaktiven GSK3 β -KI-Mutante in HEK293T Zellen	58
3.2.8 TAP-MS-Analyse der aktiven GSK3 β -Ser9- und der inaktiven GSK3 β -KI-Mutante in HL-1 Zellen	61
3.3 Verifizierung der Interaktion von vier ausgewählten GSK3 β -Bindungspartnern mit dem <i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA)	64
3.3.1 Verifizierung des GSK3 β /Filamin A-Komplexes	66
3.3.2 Verifizierung des GSK3 β /ACC1-Komplexes	69
3.3.3 Verifizierung des GSK3 β /PRMT5-Komplexes.....	74
3.3.4 Verifizierung des GSK3 β /PKAI α -Komplexes	76

3.3.5	Auswahl eines potenziellen GSK3 β -Interaktionspartner für funktionelle Untersuchungen.....	80
3.4	Funktionelle Analyse des GSK3 β -PKAI α -Komplexes.....	82
3.4.1	TAP/MS-Analyse zur Identifizierung des GSK3 β -interagierenden Proteins (GSKIP).....	82
3.4.2	StrepTactin-Präzipitation (SP) des GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplexes.....	83
3.4.3	Analyse des GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplexes nach GSK3 β Stimulation/Inhibition.....	85
3.4.4	Einfluss von Lithiumchlorid (LiCl) inhibierter GSK3 β -TAP auf den GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplex.....	86
3.4.5	Untersuchung des GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplexes nach PKAI α Stimulation/Inhibition.....	89
3.4.6	Analyse des GSK3 β und GSK3 β -TAP Phosphorylierungsniveaus nach PKA-Stimulation/Inhibition.....	91
3.4.7	Aktivitätsassays von PKAI α und GSK3 β	93
3.4.8	Auswirkungen einer GSK3 β -Hemmung auf das PKA-Substrat VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein).....	96
4	Diskussion.....	98
4.1	Identifizierung von GSK3 β -assoziierten Proteinen.....	99
4.2	Interaktion von GSK3 β mit Hitzeschockproteinen (HSP).....	102
4.3	Interaktion von GSK3 β mit weiteren Proteinen.....	102
4.3.1	GSK3 β /Filamin A-Komplex.....	103
4.3.2	GSK3 β /PRMT5-Komplex.....	104
4.3.3	GSK3 β /ACC1-Komplex.....	105
4.3.4	GSK3 β /PKAI α -Komplex.....	106
4.4	Funktionelle Bedeutung des GSK3 β /PKAI α -Komplexes.....	106
4.5	Ausblick.....	113
5	Zusammenfassung.....	115
6	Summary.....	116
7	Literatur.....	117
8	Abkürzungsverzeichnis.....	124
9	Anhang.....	127
9.1	Massenspektrometrische Analyse am Beispiel der regulatorischen PKA Untereinheit Typ I α	127
10	Danksagung.....	130

1 Einleitung

Eine Zelle stellt die kleinste lebende Einheit dar, die sich ständig an neue Umweltbedingungen anpassen muss. Mit der Hilfe von verschiedenen Signaltransduktionsmechanismen wird auf extrazelluläre Stimuli reagiert und diese in der Zelle verarbeitet. Die Signalübermittlung erlaubt einerseits Reaktionen auf äußere Einflüsse, wie es bei Einzellern ausschließlich der Fall ist, andererseits kann in höheren Organismen zusätzlich mit Hilfe von Zellkommunikation auf innere Veränderungen reagiert werden. Hierbei wird die Kommunikation zwischen Zellen vorwiegend durch extrazelluläre Signalmoleküle vermittelt. Die Zielzellen erkennen die Signale wie Hormone, Neurotransmitter oder Zytokine häufig mit Hilfe von spezifischen Transmembranrezeptoren. Membranständige Rezeptoren können z.B. Ionenkanal-, G-Protein- oder Enzym-gekoppelte Rezeptoren sein. Diese Rezeptoren verfügen über eine spezifische extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, die z.B. die Bindung von EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) an den EGF-Rezeptor ermöglicht. Diese Bindung führt meistens zu einer Konformationsänderung bzw. im genannten Beispiel zu einer Dimerisierung des Rezeptors. Der auf diese Weise aktivierte Rezeptor bewirkt die Einleitung einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade. Hierbei kann die Signalübertragung durch posttranslationale Modifikation von Proteinen oder mittels Protein-Protein-Interaktionen erfolgen. Die Aktivität der Proteine kann dabei z.B. durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung, welche von Proteinkinasen bzw. Proteinphosphatasen durchgeführt werden, gesteigert oder gehemmt werden. Bei der intrazellulären Signalweiterleitung sind häufig verschiedene Proteinkinasen hintereinander zu einer Signalkaskade angeordnet. Dies erlaubt zum einen eine Signalverstärkung oder -verminderung, zum anderen trägt dies zu einer Signaldiversität bei. Hierbei können sich die verschiedenen Signalkaskaden durch Wechselwirkungen zwischen ihren Proteinkinasen auch gegenseitig in ihrer Signalantwort beeinflussen. Auf diese Weise wird ein Signalnetzwerk zwischen unterschiedlichen Signalwegen gebildet.

Ein Signalnetzwerk ermöglicht beispielsweise dem Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*) durch die Bindung an seinen Rezeptor eine Vielzahl intrazellulärer Signalantworten zu induzieren, wie Hemmung der Apoptose, Steigerung des Zellwachstums oder der -proliferation. In diesem und in anderen Signalnetzwerken spielt die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) eine zentrale Rolle zwischen extrazellulärer und intrazellulärer Signalübermittlung. Abhängig von intrazellulärer Lokalisation, Aktivitätszustand und Protein-Protein-Interaktionen fördert oder inhibiert sie die unterschiedlichsten

Signaltransduktionswege. So ist sie unter anderem auch in die Glykogensynthese, Proteinsynthese oder Modulation der Genexpression involviert (Abb. 1.1). Eine Fehlsteuerung der GSK3-Aktivität kann zu den verschiedensten Erkrankungen wie Alzheimer, Diabetes Typ 2, kardiale Hypertrophie oder Krebs beitragen.

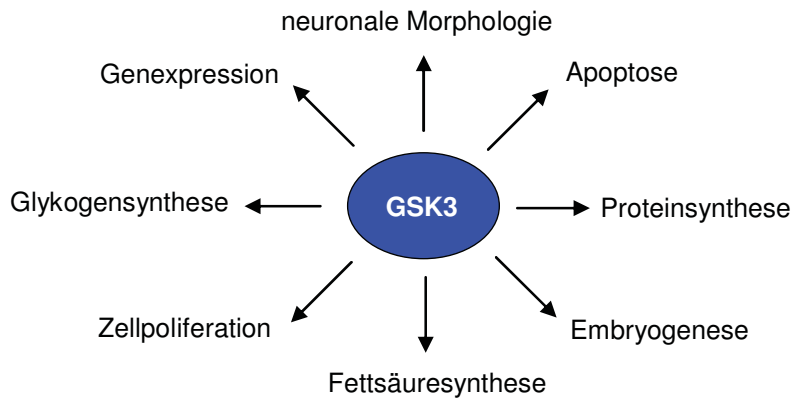


Abb. 1.1: Beispiele von zellulären Prozessen, in denen GSK3 involviert ist.

1.1 Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3)

Die GSK3 ist eine multifunktionale Serin/Threonin Proteinkinase, die erstmals als Regulator des Glykogenmetabolismus identifiziert und beschrieben wurde (Embi et al., 1980). Sie wurde von der Entdeckerarbeitsgruppe als GSK3 bezeichnet, da zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt war, dass die Glykogen Synthase durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) und die Phosphorylase Kinase phosphoryliert werden kann. Später wurden noch zwei weitere Glykogen Synthase Kinasen, die GSK4 und die GSK5 (auch als Casein Kinase 2 bezeichnet), entdeckt (Cohen et al., 1982).

Die GSK3 wird zur Superfamilie der CMGC Kinasen (verwandt mit CDK, MAPK, GSK und CLK) gezählt, die durch eine hohe Homologie in der katalytischen Kinasedomäne, einen verwandten Aktivierungsmechanismus und eine ähnliche Substratspezifität charakterisiert sind (Hanks and Hunter, 1995). GSK3-Homologe sind in fast allen Eukaryonten vorzufinden, und konnten ebenfalls in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (vier Homologe: *regulator of IME2 protein 11* (RIM11), *meiosis and centromere regulatory kinase* (MCK1), *Mds1p related kinase* (MRK1) und *Yeast GSK3* (YGK3)) und in der Fliege *Drosophila melanogaster* (*shaggy*) identifiziert werden. In Säugern sind zwei Isoformen, GSK3 α und GSK3 β , bekannt, die ubiquitär exprimiert werden. Die cDNAs der beiden Isoformen wurden erstmals aus Rattengehirnen isoliert und von Woodgett 1990 beschrieben. GSK3 α wird auf dem humanen Chromosom 19q13.2 (Maus: 7A3) und GSK3 β auf 3q13.3 (16B4) kodiert. Für GSK3 β konnte außerdem eine Splice-Variante GSK3 β 2 beschrieben werden, die zu einer Einlagerung von

13 Aminosäuren in die Kinase-Domäne führt (Mukai et al., 2002). Die Sequenzidentität zwischen den Isoformen liegt bei 85 %, wobei sie in ihren Kinasedomänen eine 93 %-ige Homologie besitzen (Ali et al., 2001). Die beiden Isoformen haben unterschiedliche Molekulargewichte. GSK3 α (51 kDa) besitzt im Vergleich zu GSK3 β (47 kDa) am N-terminalen Ende eine zusätzliche glyzinreiche Domäne (siehe Abb. 1.2). Jede der beiden Kinasen hat zwei Phosphorylierungsstellen, eine an einem Serin (GSK3 α : S21, GSK3 β : S9) am N-terminalen Ende und eine an einem Tyrosin (GSK3 α : T279, GSK3 β : T216) in der Kinase-Domäne. Über die Phosphorylierungsstellen kann die Aktivität von GSK3 gesteuert werden.

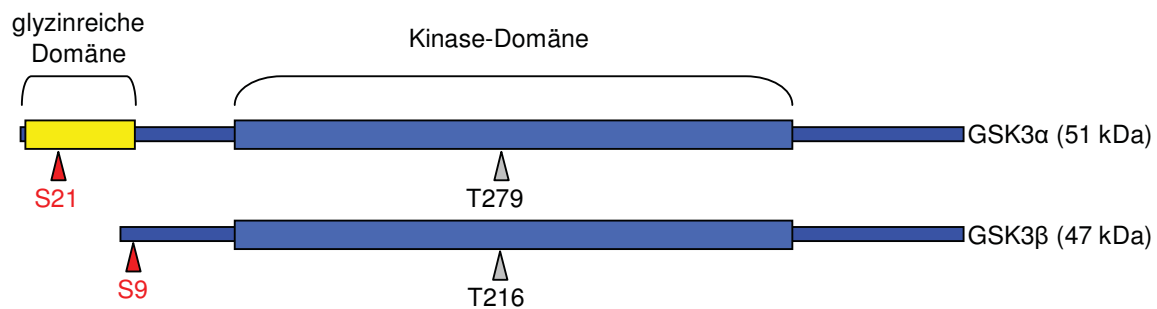


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der GSK3 α - und GSK3 β -Isoformen. Die Serin- (S) Phosphorylierungsstelle ist rot und die Tyrosin- (T) Phosphorylierungsstelle ist grau markiert (modifiziert nach Doble and Woodgett, 2003).

Trotz der hohen Homologie der Isoformen sind diese funktionell nicht identisch. In *Drosophila melanogaster* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die beiden Isoformen *in vivo* keine Redundanz besitzen. Eine Genmutation (*sgg*^{b12}) im GSK3-Homolog *shaggy*, die normalerweise im Larvenstadium letal ist, konnte durch das Einbringen von Säuger-GSK3 β , nicht aber durch -GSK3 α , kompensiert werden (Ruel et al., 1993). Diese Beobachtung konnte ebenfalls in Mäusen bestätigt werden, denn der embryonal letale Phänotyp der GSK3 β -Null-Mutante konnte durch GSK3 α nicht aufgehoben werden. Ursächlich für den Phänotyp ist die verstärkte Apoptoserate in Hepatozyten, die einen tödlichen Leberschaden zur Folge hat (Hoeflich et al., 2000). Dagegen zeigen GSK3 α *Knock-out* Mäuse eher einen milden Phänotyp mit einer reduzierten Fettmasse, erhöhter Insulinsensitivität und Glukosetoleranz (MacAulay et al., 2007).

GSK3 β ist vornehmlich im Gehirn und Herzen exprimiert. Dagegen wird GSK3 α noch zusätzlich stark in den Hoden gebildet (Yao et al., 2002). Im Gehirn wird beispielsweise das Tau-Protein, welches in Alzheimererkrankungen involviert ist, überwiegend von GSK3 β phosphoryliert (Soutar et al., 2010). So zeigte eine murine GSK3 β -Überexpression in den Neuronen des Vorderhirns eine Alzheimer Neuropathologie mit einer Tau-Hyperphosphorylierung, Apoptose der Neuronen, Astrozytose und räumlichen Lerndefiziten

(Engel et al., 2006). In der Herzentwicklung und in der Proliferation von Kardiomyozyten wird GSK3 β ebenfalls eine höhere Bedeutung beigemessen, denn eine murine GSK3 β -Deletion führt zu einer gesteigerten Kardiomyozyten-Proliferation sowohl während der Herzentwicklung als auch im adulten Herz (Kerkela et al., 2008; Woulfe et al., 2010). Diese Anti-Proliferationswirkung von GSK3 β zeigt sich besonders in der kardialen Hypertrophie. Eine konstitutiv aktive GSK3 β , nicht aber eine GSK3 α , schützt in Mäusen vor einer kardialen Hypertrophie (Matsuda et al., 2008).

1.2 Regulation von GSK3 β

Da GSK3 β ein zentrales Schlüsselprotein in den verschiedensten Signaltransduktionswegen ist, setzt dies eine spezifische Regulation der Proteinkinase voraus. Diese wird über eine Kombination von GSK3 β -Phosphorylierung (Serin 9 und Tyrosin 216), -Lokalisation, -Komplexbildung und Substrat-Präphosphorylierung ermöglicht (siehe Abb. 1.3; Jope and Johnson, 2004).

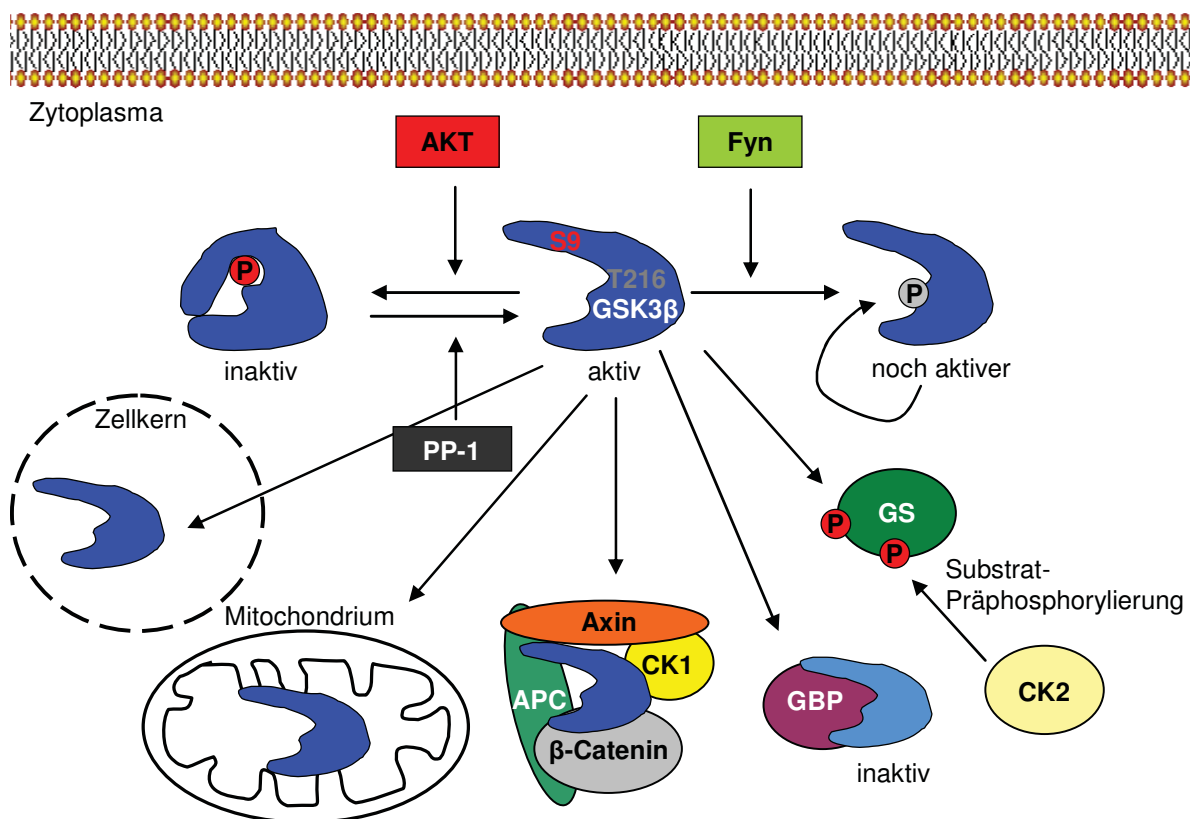


Abb. 1.3: Übersicht über GSK3 β -Regulationsmechanismen. GSK3 β kann über die Serin 9- (S9) Phosphorylierung inhibiert oder über die Tyrosin 216- (T216) Phosphorylierung noch stärker aktiviert werden. Abhängig von der zellulären Lokalisation (Zytoplasma, Zellkern oder Mitochondrium) oder Komplexbildung mit anderen Proteinen übt GSK3 β unterschiedliche Funktionen aus bzw. kann auch ihre Aktivität reguliert werden. Eine Substrat-Präphosphorylierung ist für viele Substrate notwendig, damit GSK3 β diese überhaupt phosphorylieren kann. Weitere detaillierte Erklärungen zu jedem Regulationsmechanismus folgen in den nächsten Abschnitten. AKT: Proteinkinase B, PP-1: Protein Phosphatase-1, APC: *Adenomatous polyposis coli*, GBP: GSK3 β -bindendes Protein, GS: Glykogen Synthase, CK1: Casein Kinase-1; CK2: Casein Kinase-2.

Die konstitutiv aktive GSK3 β wird durch Phosphorylierung am N-terminalen Ende an der Aminosäure Serin 9 (Ser9) inaktiviert. Die Analyse der GSK3 β -Kristallstruktur zeigte, dass der phosphorylierte N-Terminus ein Pseudosubstrat darstellt und somit eine Autoinhibition bewirkt. Hierbei bindet das N-terminale phosphorylierte Ende an die positiv geladene Tasche des katalytischen Zentrums und verhindert somit die Bindung von Substraten an das katalytische Zentrum (Dajani et al., 2001).

In Folge einer erhöhten Insulinausschüttung wird beispielsweise die Glykogensynthese durch GSK3 β -Inaktivierung gefördert. Die Nahrungsaufnahme führt durch den ansteigenden Blutzuckerspiegel zu einer vermehrten Insulin-Ausschüttung. Das Insulin bindet an den Insulin-Rezeptor und initiiert den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) /AKT (Proteinkinase B) - Signalweg (siehe Abb. 1.4). Hierbei phosphoryliert der aktivierte Insulin-Rezeptor PI3K, welche wiederum AKT durch Phosphorylierung aktiviert. Die aktive AKT kann nun GSK3 β am Ser9 phosphorylieren, wodurch diese nicht mehr in der Lage ist ihr Substrat, die Glykogensynthase, durch Phosphorylierung zu inhibieren. Die aktive Glykogensynthase synthetisiert aus UDP (Uridindiphosphat) -Glukose Glykogen, das eine Speicherform der Glukose darstellt (Cross et al., 1995, Frame and Cohen, 2001).

Eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration kann ebenfalls zu einer GSK3 β -Inhibierung führen (siehe Abb. 1.4). Hierbei kann z.B. die membranständige Adenylcyclase durch die Bindung von Adrenalin an den β -Rezeptor aktiviert werden. Diese wiederum synthetisiert dann aus ATP cAMP. Die gesteigerte cAMP-Konzentration aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die dann die GSK3 β phosphoryliert und so inhibiert. Hierbei wird eine direkte Verbindung zwischen cAMP und GSK3 β in der Regulation der Zellproliferation und Apoptose gesehen, denn es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine gesteigerte cAMP-Konzentration als auch eine GSK3 β -Inhibition die Zellproliferation fördern und vor Apoptose schützen. Möglicherweise wird die Zellproliferation und die Apoptose direkt über cAMP, PKA und GSK3 β gesteuert (Fang et al., 2000).

GSK3 β kann aber noch durch weitere Proteinkinasen wie z.B. Proteinkinase C (Fang et al., 2002), MAPK- (Mitogen-aktivierende Proteinkinase) aktivierende Proteinkinase-1 (MAPKAP-K1, Saito et al., 1994) und ribosomale 70 kDa-Protein S6-Kinase-1 (p70S6K, Armstrong et al., 2001), über die Ser9-Phosphorylierung inaktiviert werden (Abb. 1.4). Mit Hilfe der Protein Phosphatase 1 (PP-1, Zhang et al., 2003) und der Protein Phosphatase 2A (PP-2A, Sutherland et al., 1993) kann GSK3 β hingegen wieder dephosphoryliert und somit aktiviert werden. Untersuchungen von PP-1 und GSK3 β konnten zeigen, dass GSK3 β selbst ihre Aktivität über eine PP-1-Phosphorylierung steuern kann. Wahrscheinlich ermöglicht die

Autoregulation über PP-1, dass GSK3 β in ihrem aktiven Zustand in der Zelle verbleibt (Zhang et al., 2003).

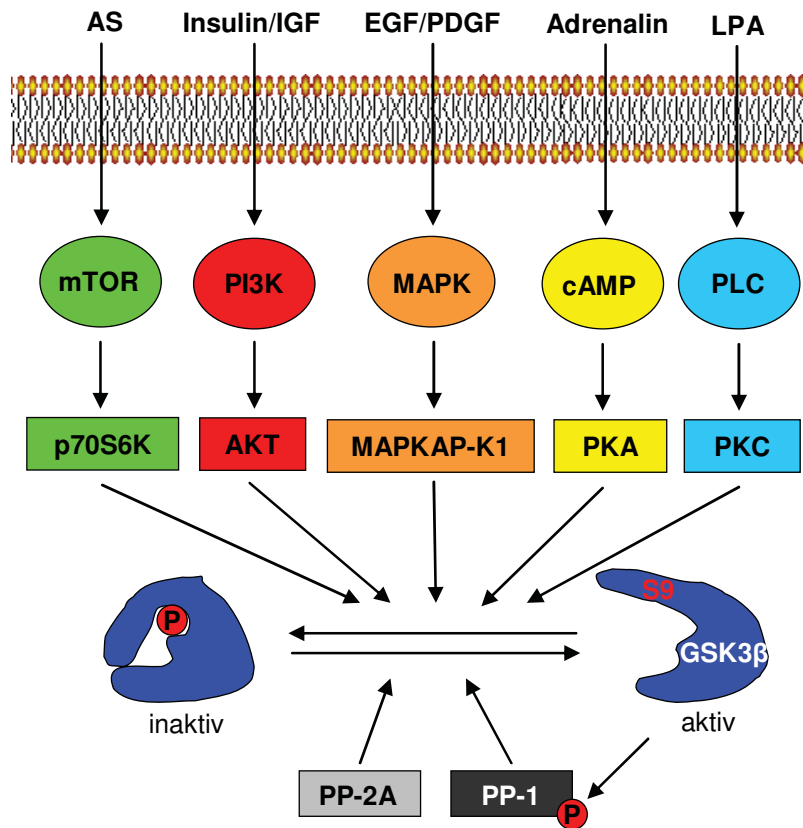


Abb. 1.4: Signalwege, die zur GSK3 β -Inhibition über Serin 9-Phosphorylierung führen. AS: Aminosäure, mTOR: *mammalian target of rapamycin*, p70S6K: 70 kDa-Ribosomalprotein S6-Kinase-1, IGF: Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen, EGF: *Epidermal growth factor*, PDGF: *Platelet-derived growth factor*, MAPKAP-K1: MAPK- (Mitogen-aktivierende Proteinkinase) aktivierende Proteinkinase-1, LPA: Phospholipid, PLC: Phospholipase C, PP: Protein Phosphatasen, P: Phosphat.

Im Gegensatz zur Ser9-Phosphorylierung steigert eine Phosphorylierung in der katalytischen Domäne an Tyrosin 216 (Tyr216) die GSK3 β -Aktivität (Hughes et al., 1993) und/oder führt zu einer GSK3 β Zellkerntranslokation. Die Tyr216-Phosphorylierung kann durch verschiedene Tyrosinkinasen wie ZAK1 (*Dictyostelium discoideum*, Schleimpilz; Kim et al., 1999), Fyn (Lesort et al., 1999), *mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK; Takahashi-Yanaga et al., 2004) oder mittels GSK3 β -Autophosphorylierung erfolgen (Wang et al., 1994). Die Bedeutung der Tyr216-Phosphorylierung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Analyse der Kristallstruktur zeigte, dass GSK3 β trotz einer Tyr216-Dephosphorylierung eine aktive Konformation des katalytischen Zentrums, die eine Substrat-Bindung ermöglichen würde, erreicht. Es wird vermutet, dass die Tyr216-Phosphorylierung lediglich diese Konformation stabilisiert (Dajani et al., 2001).

Ein weiterer Regulationsmechanismus von GSK3 β stellt ihre intrazelluläre Lokalisation da. Die hauptsächliche Lokalisation von GSK3 β ist das Zytoplasma, jedoch ist sie ebenfalls im Zellkern und in den Mitochondrien vorzufinden (siehe Abb. 1.3). So bewirken z.B. Apoptose-induzierte Stimuli wie ein Hitzeschock oder eine Staurosporin-Behandlung eine GSK3 β -Akkumulation im Nukleus (Bijur and Jope, 2001). Die Analyse des Aktivitätszustands zeigte, dass die GSK3 β in Zellkernen und Mitochondrien eine sehr viel höhere Aktivität (niedrigere Ser9-Phosphorylierung) als zytoplasmatische GSK3 β besitzt (Bijur and Jope, 2003).

Der mitochondrialen GSK3 β wird eine kardioprotektive Wirkung zugesprochen. Hierbei spielt die Ser9-Phosphorylierung von GSK3 β (Inaktivierung), die durch Erythropoietin (EPO) und den PI3K/AKT -Signalweg induziert wird, eine wichtige Rolle. Wird der EPO-Rezeptor, z.B. infolge einer Hypoxie (Sauerstoffarmut), stimuliert, hat dieses eine schützende Wirkung vor oxidativ-induzierter Apoptose (H₂O₂) in Kardiomyozyten. Dies wird durch Inaktivierung von GSK3 β ermöglicht, was den Schwellenwert für die Öffnung der *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP) erhöht. Eine geöffnete mPTP würde zu einer mitochondrialen Translokation von zahlreichen Apoptose-induzierten Proteine wie z.B. *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), *mitochondrial translocation of Bcl-2-associated X protein* (BAX) oder Bcl-2-bindendes Protein (BIS) führen. Der genaue Mechanismus der mPTP-Regulation durch GSK3 β ist noch unklar (Juhaszova et al., 2004; Ohori et al., 2008).

Über Proteininteraktionen mit anderen Proteinen kann GSK3 β ebenfalls gesteuert werden. Hierbei wird GSK3 β über die Bildung eines Komplexes eine räumliche und zeitliche begrenzte Interaktion mit ihren Regulatoren und Substraten erlaubt.

Der wohl am besten erforschte Proteinkomplex von GSK3 β ist der Komplex mit Axin, β -Catenin, Casein Kinase-1 (CK1) und APC (*adenomatous polyposis coli protein*) im kanonischen Wnt-Signalweg (siehe Abb. 1.5). Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Steuerung der Embryonalentwicklung und der Homöostase von Geweben. Im Wnt-Signalweg bilden Axin, β -Catenin, CK1, APC und GSK3 β in unstimulierten Zellen einen Multiproteinkomplex, der über die Gerüstproteine Axin und APC vermittelt wird. Hierbei soll dieser Komplex über die Phosphorylierung von Axin und APC durch GSK3 β stabilisiert werden (Rubinfeld et al., 1996; Yamamoto et al., 1999). Auf diese Weise ist GSK3 β in räumlicher Nähe zu ihrem Substrat β -Catenin, welches sie nach einer vorangegangenen Präphosphorylierung (im nächsten Abschnitt erläutert), die von CK1 durchgeführt wird, phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zu einer Ubiquitinierung mit einer anschließenden Degradation von β -Catenin. Bei Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch

Bindung des Wnt-Proteins an den *Frizzled*- (Fz) und LRP- (LDL (*low density lipoproteine*) - Rezeptor-verwandtes Protein) Rezeptor wird der Multiproteinkomplex von Axin, APC, CK1, GSK3 β und β -Catenin aufgelöst. Hierbei wird vermutet, dass die Bindung des Wnt-Proteins zu einer Konformationsveränderung des Fz-Rezeptors führt und dieser dadurch *Dishevelled* (Dsh) bindet. Andererseits bewirkt die Wnt-Bindung auch eine Phosphorylierung von LRP. Dieser Vorgang der LRP-Phosphorylierung (in Abb. 1.5 nicht eingezeichnet) ist bisher kaum verstanden und kann von zwei Proteinkinasen, GSK3 (Membran assoziierte Form; Zeng et al., 2005) und/oder CK1 γ (Davidson et al., 2005), durchgeführt werden. Hierbei hat die LRP-Phosphorylierung eine Rekrutierung von Axin an LRP zur Folge. Somit können Axin und Dsh direkt miteinander interagieren. Diese Interaktion soll für die Auflösung des Multiproteinkomplexes verantwortlich sein. Dadurch wird die Degradation von β -Catenin inhibiert, dessen zytosolische Konzentration steigt an und es wandert in den Zellkern. Zusammen mit den Transkriptionsfaktoren LEF (*lymphoid enhancer factor*) und TCF (T-Zellenfaktor) wird die Genexpression der Zellzyklusregulatoren c-Myc und Cyclin D1 aktiviert, welche für Zellproliferation und -wachstum verantwortlich sind (Doble and Woodgett, 2003; Logan and Nusse, 2004).

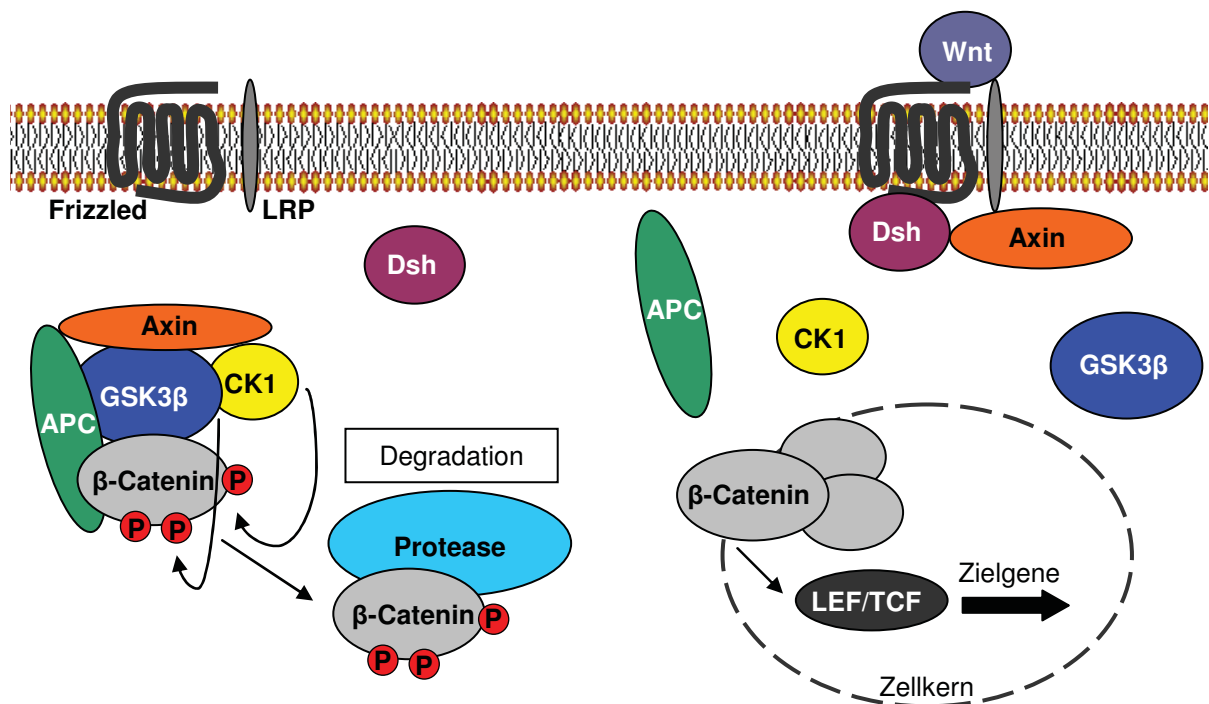


Abb. 1.5: GSK3 β Funktion im Wnt-Signalweg. Bei einer unstimulierten Zelle bildet GSK3 β mit Axin, APC (*Adenomatous polyposis coli protein*), CK1 (Casein Kinase-1) und β -Catenin einen Komplex (links). Durch die Komplexbildung kann GSK3 β , nach vorangegangener β -Catenin-Präphosphorylierung durch CK1, β -Catenin phosphorylieren. Diese Phosphorylierung hat eine Degradation von β -Catenin zur Folge. In einer stimulierten Zelle bindet das Wnt-Protein an den Frizzled- und LRP-Rezeptor, dieses führt zur Dissoziation des Komplexes (rechts). Dadurch kann β -Catenin akkumulieren und in den Zellkern translozieren. Dort aktiviert es mit den Transkriptionsfaktoren LEF (*lymphoid enhancer factor*) und TCF (T-Zellenfaktor) die Genexpression von Zellzyklusregulatoren, die für eine Zellproliferation und -wachstum wichtig sind. LRP: LDL (*low density lipoprotein*) verwandter Rezeptor, Dsh: *Dishevelled*.

GSK3 β besitzt eine ungewöhnliche Präferenz für Substrate, die bereits präphosphoryliert sind. Die Phosphorylierungskonsensus-Sequenz für GSK3 β ist Ser/Thr-x-x-x-Ser/Thr-P (x = beliebige AS). Hierbei phosphoryliert GSK3 β das erste Serin/Threonin selbst, während das zweite Serin/Threonin die Präphosphorylierungsstelle ist, die von anderen Proteinkinasen modifiziert wird. Wenn das Substrat bereits präphosphoryliert ist, steigert es die Phosphorylierung durch GSK3 β um das 100- bis 1000-fache (Thomas et al., 1999). Ein Beispiel hierfür ist das GSK3 β -Substrat Glykogen Synthase (GS). Nur nach vorangegangener Phosphorylierung durch Casein Kinase-2 (CK2) wird GS durch GSK3 β phosphoryliert (Fiol et al., 1987). Die Präphosphorylierung ist indessen nicht immer zwingend notwendig. So kann GSK3 β einige Substrate wie z.B. Presenilin 1 (Twomey and McCarthy, 2006) oder tau (Cho and Johnson, 2003) ebenfalls direkt phosphorylieren. Wahrscheinlich imitieren GSK3 β -Substrate, die keine Präphosphorylierung benötigen, diese durch negative Reste an oder in der Nähe der Präphosphorylierungsstelle (Doble and Woodgett, 2003).

1.3 Substrate von GSK3 β

Mittlerweile wurden zahlreiche Substrate für GSK3 β identifiziert. In Tabelle 1.1 sind die bekannten Substrate von GSK3 β im Säugetier aufgelistet. Es lassen sich vier funktionelle Kategorien bilden: Metabolismus, Signaltransduktion, Zytoskelett und Transkription (Grimes and Jope, 2001).

Tabelle 1.1: Bekannte Substrate von GSK3 β im Säugetier (modifiziert nach Grimes and Jope, 2001).

Metabolismus	Signaltransduktion	Zytoskelett	Transkription
- Acetyl CoA Carboxylase	- Amyloid-Vorläuferprotein	- <i>Dynamine-like protein</i>	- Aktivierendes Protein-1
- ATP-Zitrat-Synthase	- <i>Adenomatous polyposis coli protein</i>	- Mikrotubuli-assoziiertes Protein-1B	- β -Catenin
- Glykogen Synthase	- Axin	- Mikrotubuli-assoziiertes Protein-2	- CCAAT/enhancer-binding protein
- Insulin Rezeptorsubstrat-1	- cAMP-abhängige Proteinkinase (Typ II)	- Neuronales Zelladhäsionsprotein	- cAMP response-binding protein
- Pyruvat Dehydrogenase	- Cyclin D1	- Neurofilamente	- Hitzeschockprotein-1
	- Eukaryotischer Initiierungsfaktor 2B	- Ninein	- Myc
	- Myelin Hauptprotein	- Tau	- Nuklearfaktor von aktivierten T-Zellen
	- Nerven-Wachstumsfaktor Rezeptor		- Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
	- Protein Phosphatase 1		
	- Protein Phosphatase Inhibitor-2		

Eine GSK3 β -vermittelte Phosphorylierung kann verschiedene Auswirkungen auf das Substrat haben. So kann diese eine Degradation des Substrates verursachen, zu einer Veränderung seiner subzellulären Lokalisation führen oder seine Aktivität ändern (siehe Abb. 1.6; Kerkelä et al., 2007).

Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Myc durch GSK3 β führt beispielsweise zu einer Degradation. Auf diese Weise nimmt GSK3 β auf die Zellproliferation Einfluss (Sears et al., 2000). GSK3 β steuert ferner durch Phosphorylierung direkt den Zellkernexport des Transkriptionsfaktors NFAT (Nuklearfaktor von aktivierten T-Zellen), so dass die durch dephosphoryliertes NFAT gesteuerte Transkription von Zytokinen wie Interleukinen gehemmt wird (Neal and Clipstone, 2001).

Eine besondere Stellung nimmt GSK3 β in der Entwicklung des Nervensystems und der Differenzierung von Neuronen ein. Hierbei müssen das Axonwachstum, die zielgerichtete Verschaltung von Nervenzellen und die Synaptogenese präzise koordiniert werden. Der Umbau wird durch die Dynamik der Mikrotubuli und/oder die Reorganisation des Aktinzytoskeletts ermöglicht. GSK3 β ist besonders an Mikrotubuli-Aufbau und -Stabilisierung beteiligt, da sie zahlreiche Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) wie Tau, MAP-2 oder MAP-1B phosphoryliert. MAP-1B reguliert das Axonwachstum dadurch, dass es direkt die Mikrotubuli durch Bindung an sie stabilisiert. Eine Phosphorylierung durch GSK3 β führt zu einer gesteigerten MAP-1B-Bindung an die Mikrotubuli. Dabei nimmt die MAP-1B-Phosphorylierung während der Axonverlängerung im Wachstumkegel besonders zu (Trivedi et al., 2005).

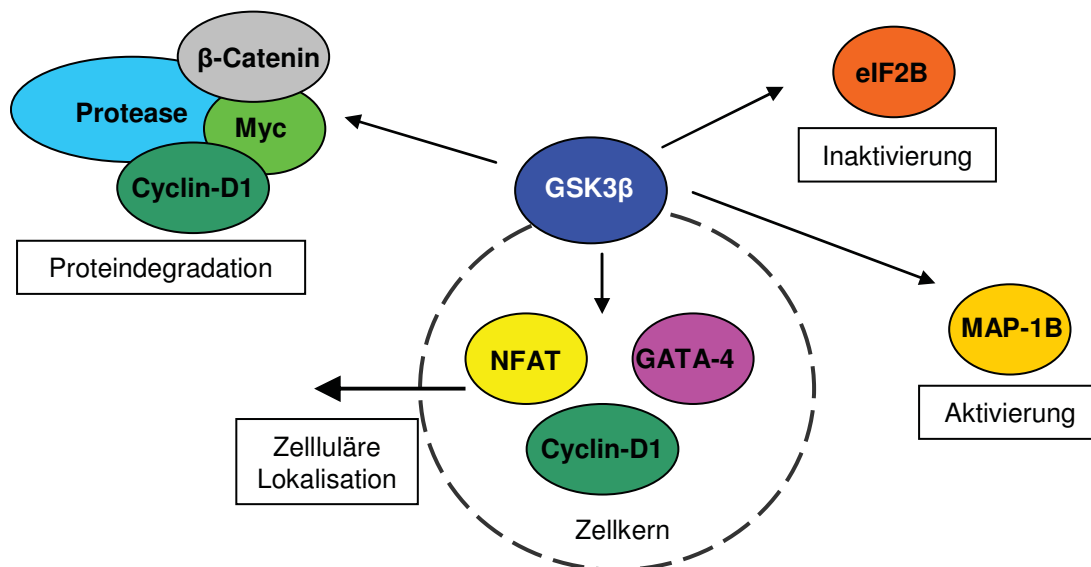


Abb. 1.6: Auswirkungen der Substrat-Phosphorylierung durch GSK3 β . Die GSK3 β -Substrat-Phosphorylierung kann zu einer Degradation, einer Veränderung der zellulären Lokalisation oder einer Aktivitätsänderung des Substrates führen. NFAT: Nuklearfaktor von aktivierten T-Zellen, eIF2B: eukaryotischer Initiierungsfaktor 2B; MAP-1B: Mikrotubuli-assoziierte Proteine-1B (modifiziert nach Kerkelä et al., 2007).

1.4 Kardiale Hypertrophie und GSK3 β

GSK3 β spielt im Herzen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Hypertrophie, d.h. einer Zunahme der Ventrikelmasse in Antwort auf externe Stimuli. Es lassen sich drei verschiedene Formen der kardialen Hypertrophie unterscheiden: die Entwicklungshypertrophie, die physiologische (adaptive) und pathologische (maladaptive) Hypertrophie.

Die Entwicklungshypertrophie bezeichnet das normale postnatale Herzwachstum. Die physiologische Hypertrophie tritt bei einer Schwangerschaft oder bei Ausdauersport ein. Bei diesen genannten Hypertrophie-Formen findet ein koordiniertes Wachstum des Septums, der Ventrikelwand und der Kammerdimension statt. Ursache für diese Volumenvergrößerung ist eine Hypertrophie der Kardiomyozyten, die wiederum eine verbesserte Herzkontraktilität zur Folge hat (Heineke and Molkentin, 2006). Die pathologische Hypertrophie wird durch eine chronische Druck- oder Volumenüberlastung des Herzens hervorgerufen. Dabei wird zunächst die erhöhte Wandspannung durch eine Herzwandverdickung kompensiert. Chronisch führt eine Drucksteigerung zur Dilatation der Ventrikel. Die Auswirkungen dieser pathologischen Hypertrophie sind eine kontraktile Dysfunktion, Fibrose, Herzinsuffizienz, Kardiomyozytennekrose und -apoptose. Ursachen für diese Veränderungen können Erkrankungen wie Bluthochdruck, Myokardinfarkt, Herzklappenerkrankungen, *Diabetes mellitus* oder erblich bedingte Fehlfunktionen sein (Bernardo et al., 2010).

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass GSK3 β sowohl in der physiologisch- als auch in der pathologisch-induzierten Hypertrophie ein negativer Regulator ist. Mit Hilfe einer Kardiomyozyten-spezifischen GSK3 β -Überexpression in der Maus konnte bestätigt werden, dass GSK3 β eine wichtige Rolle im normalen Herzwachstum spielt, da die Überexpression in den untersuchten Mäusen zu einem verkleinerten Herzen führte (Michael et al., 2004). Ebenso konnte bewiesen werden, dass in der Maus eine konstitutiv aktive GSK3 β (Ser9-Mutante, Kardiomyozyten-spezifische Expression oder *Knock-In*) vor einer Isoproterenol-induzierten pathologischen Hypertrophie schützt (Antos et al., 2002; Webb et al., 2010). Hierbei wird vermutet, dass GSK3 β über die Inhibition von Transkriptionsfaktoren, wie β -Catenin (Haq et al., 2003), c-Myc (Xiao et al., 2001), GATA4 (Pikkarainen et al., 2004), NFATc3 (Molkentin et al., 1998) oder des Signalproteins eIF2B (eukaryotischer Initiierungsfaktor 2B; Hardt et al., 2004), anti-hypertroph wirkt.

Die kardiale Regulation von GSK3 β erfolgt ebenfalls über die bekannten Signalwege PI3K/AKT, β -Rezeptor/PKA und PLC/PKC β . Es konnte gezeigt werden, dass die physiologische Hypertrophie ausschließlich über den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK; z.B.

IGF-1-Rezeptor) /PI3K α (Klasse I) / AKT-Signalweg initiiert wird (McMullen et al., 2003). Im Gegensatz dazu verläuft die pathologische Hypertrophie über die Signalwege der G- (G α /11) Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR; z.B. Angiotensin II Rezeptor; Devereux, 2000; Wettchureck et al., 2001). Bei allen genannten Signalwegen wird angenommen, dass die Einleitung der kardialen Hypertrophie über eine GSK3 β -Inaktivierung gesteuert wird (siehe Abb. 1.7). Somit stellt GSK3 β eine wichtige Schaltstelle bei der Entwicklung der beiden Hypertrophie-Typen dar, da sie sowohl die physiologischen als auch die pathologischen Stimuli verarbeitet. Auf welche Weise GSK3 β das entsprechende Signal vermittelt ist momentan noch ungeklärt. Es könnte sein, dass dieses durch eine GSK3 β -Komplexbildung mit den Regulatoren und den prohypertrophen Faktoren gewährleistet wird.

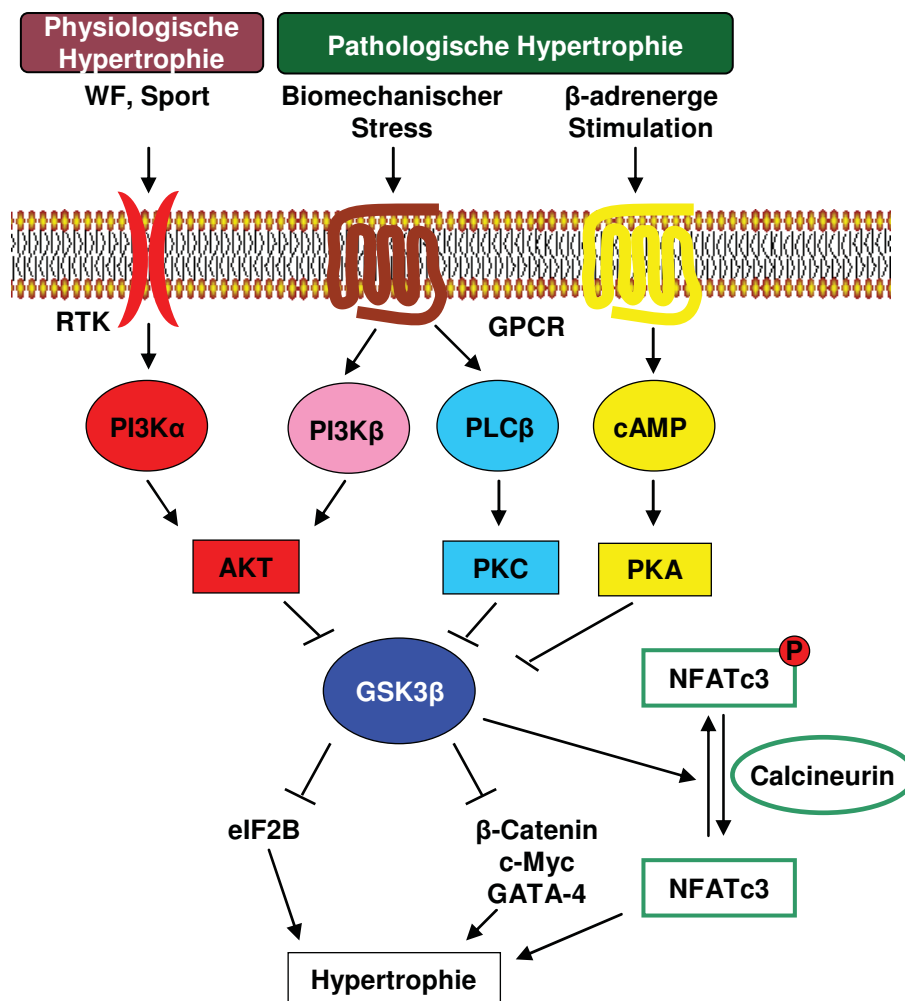


Abb. 1.7: GSK3 β dient als zentraler Schalter in der kardialen Hypertrophie. Über Sport oder Wachstumsfaktoren (WF, z.B. IGF-1) wird die physiologische Hypertrophie über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) wie z.B. IGF-1-Rezeptor und über den PI3K α /AKT-Signalweg eingeleitet. Hingegen wird die pathologische Hypertrophie z.B. durch biomechanischer Stress (Bsp. Aortenligatur) und über G- (G α /11) Protein-gekoppelte (GPCR, z.B. Angiotensin II Rezeptor) Rezeptoren und deren Signalwege vermittelt. PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen, PLC: Phospholipase C, NFAT: Nuklearfaktor von aktivierten T-Zellen, eIF2B: eukaryotischer Initiierungsfaktor 2B.

1.5 Ziel der Arbeit

Wie vorangehend ausgeführt, stellt die Interaktion von Proteinen bzw. deren Organisation in Komplexen ein regulatorisches Prinzip dar, das durch Bündelung funktionell verbundener Proteine eine effiziente Signalübertragung gewährleistet. Ferner ergibt sich damit die Möglichkeit zur Kompartimentierung, d.h. dass entsprechende Signale oder Modulationen von Proteinfunktionen nur in räumlich eng umgrenzten Bereichen einer Zelle ablaufen. Da GSK3 β eine wichtige Schaltstelle ist, die eine Vielzahl unterschiedlicher biologischer Prozesse reguliert, ist die Identifizierung GSK3 β -assoziierter Proteine ein wichtiges Element zum Verständnis der GSK3 β -Funktionen. Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe der Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP), GSK3 β -assoziierte Proteine unter nativen Bedingungen zu isolieren, mittels Massenspektrometrie zu identifizieren und einen Einblick in die Regulation der identifizierten Komplexe zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte

Tabelle 2.1: Verwendete Laborgeräte und ihre Hersteller.

Laborgerät	Hersteller
Analysewaage, EMB 200-2	Kern & Sohn GmbH
Autoklav	Webeco
Brutschrank (Bakterienkulturen)	Haraeus Instruments
Eismaschine	Ziegra
Feinwaage, BP121S	Sartorius
Fluoreszenzkamera, F-View UT-TV0, 5xC-3	Olympus
Fluoreszenzmikroskop (BZ-9000 E)	Keyence
Fluoreszenzmikroskop, Olympus BX50	Olympus
Gefrierschrank (-80°C), UltimaII	REVCO
Gelfiltrationsanlage (Chromatographie-Säule)	Biorad
Heizblock, Thermomixer comfort	Eppendorf
Hellfeldkamera vom Fluoreszenzmikroskop Olympus	Sony
Infrarot-Bildgebungs-System, Odyssey	LI-COR Biosciences
Kühl- und Gefrierschrank (4°C und -20°C)	Privileg
Magnetrührer, MR2002-MR3001	Heidolph
Massenspektrometer, LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific
Mikrowelle, Micromat	AEG
Mini-Zentrifuge	Roth
PCR Thermocycler, Mastercycler gradient	Eppendorf
pH-Meter, MP 220	Mettler
Pipetten (10, 20, 200, 1000, 5000 µl)	Gilson
Plattenphotometer, SpectraCount	Packard
Realtime PCR System, StepOne Plus	Applied Biosystems
Rotator, Roto-Shake-Genie	Scientific Industries
Schüttler	Edmund Bühler
Schüttler für Bakterienerschüttelkulturen	Infors AG
SDS-PAGE vertikale Laufkammer, SE600-SE400	Hofer Instrument
Sorvall Superspeed Zentrifuge, RC-5B	Du Pont Instruments
Spektralphotometer, NanoDrop ND-1000	Peqlab
Sterilbank, Antair BSK	Kendro
Stromquelle 500 Volt power supply	Buchler Instruments
Temperierbad (16°C), Julabo U3	Julabo
Temperierbad (37°C), GFL 1083	GFL
Tischzentrifuge, Centrifuge 5417R, 5810R	Eppendorf
Transferkammer, Fastblot B33-B43	Biometra
UV-Transilluminator, Mighty Bright	Hofer Instrument
UV-Transilluminator, Universal Hood	Bio-Rad
Vakuumpzentrifuge	Eppendorf
Vortexer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserreinigungsanlage, MilliQ	Millipore
Zellkulturschrank, Function Line	Haraeus Instruments

2.2 Laborchemikalien

Tabelle 2.2: Eingesetzte Laborchemikalien und ihre Hersteller. Laborchemikalien, die nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck, Roth und Sigma bezogen.

Laborchemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bis Rotiphorese Gel 40 (29:1)	Roth
Agar	Roth
Agarose <i>electrophoresis grade</i>	Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Biotin	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Serva
BSA	Fluka
Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
Ethidiumbromid	ICN Biomedicals
Lipofectamin	Invitrogen
NP-40	Sigma-Aldrich
Nukleotidmix 25mM	Invitrogen
Odyssey Blocking Puffer	Licor
PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche

2.3 Enzyme

Tabelle 2.3: Verwendete Enzyme und ihre Hersteller.

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Roche
Benzonase	Novagen
EcoRI	Invitrogen
FspI	New England Biolabs
HindIII	New England Biolabs
Klenow (exo-)	New England Biolabs
NheI	New England Biolabs
NotI	New England Biolabs
Platinum <i>Pfx</i> DNA Polymerase	Invitrogen
SacI	New England Biolabs
SbfI	New England Biolabs
SpeI	New England Biolabs
SwaI	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
<i>Taq</i> Polymerase	Invitrogen
Thrombin	Amersham Biosciences
XhoI	Life Technologies

2.4 Antikörper

Tabelle 2.4: Verwendete primäre Antikörper mit den eingesetzten Verdünnungen für die Western Blot (WB) -Analysen.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller	Produktnr.
α -Acetyl Coenzyme A Carboxylase	Kaninchen	1:1000	abcam	ab45174
α -Filamin A (clone PM6/317)	Maus	1:1000	Millipore	MAB1678
α -Flag	Kaninchen	1:5000	Sigma-Aldrich	F7425
α -Flag M2	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich	F1804
α -GSK-3 β	Maus	1:10000	BD Bioscience	610201
α -GSK-3 β (27C10)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9315
α -HA	Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich	H6908
α -HA-Tag (6E2)	Maus	1:1000	Cell Signaling	2367
α -Phospho-Glycogen Synthase (Ser641)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	3891
α -Phospho-GSK-3 β (Ser9)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9336
α -PKA-R1 α	Maus	1:500	BD Bioscience	610610
α -PKA α -cat	Kaninchen	1:1250	Santa Cruz	sc-903
α -PRMT5/Skb1Hs Methyltransferase	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	2252
α -VASP (human)	Kaninchen	1:2000	Alexis	210725-R100

Tabelle 2.5: Verwendete sekundäre Antikörper mit den eingesetzten Verdünnungen für die WB-Analysen.

Antikörper	Herkunft	gekoppelt mit:	Verdünnung	Hersteller	Produktnr.
α -Kaninchen	Ziege	IRDye800CW	1:10000	Licor	926-32211
α -Maus	Ziege	IRDye800CW	1:10000	Licor	926-32210
α -Kaninchen	Ziege	IRDye650CW	1:10000	Licor	926-32221
α -Maus	Ziege	IRDye650CW	1:10000	Licor	926-32220

2.5 Grundvektor pGJ3-CSCGW

Die gesamten Klonierungen in dieser Arbeit basieren auf dem lentiviralen Vektor pGJ3-CSCGW (siehe Abb. 2.1, Leurs et al., 2003), der ein freundliches Geschenk von Prof. Dr. Hanenberg war. In diesem Vektor steht das EGFP (*enhanced green fluorescence Protein*) unter der Kontrolle des SFFV (*spleen focus-forming virus*)-Promotors. Für die Selektion besitzt der Vektor bakterielle (Ampicillin (AMP)) und eukaryotische (Zeozin (Zeo)) Antibiotika-Resistenzgene. Diese Resistenzgene stehen wiederum unter der Kontrolle des β -Lactamase Promotors (*bla*) bzw. des EM7-Promotors. Der bakterielle Replikationsursprung pUC ori sorgt für die Herstellung von doppelsträngigen Plasmidkopien in *Escherichia coli* (*E.coli*) und der F1 ori für einzelsträngige Plasmidkopien. Des Weiteren steuert der Cytomegalovirus-Promotor (CMV) mit Hilfe des SV40 (Simian Virus) -Enhancers (SV40, SV40 poly-A-Schwanz) die Transkription der viralen RNA, die in Viruspartikel verpackt werden soll. Dabei werden folgende Gene wie gag (Polyprotein), env (*envelope*, Hüllprotein) und RRE (*REGulator of virion expression*)-responsive-element durch den CMV-Promotor gesteuert.

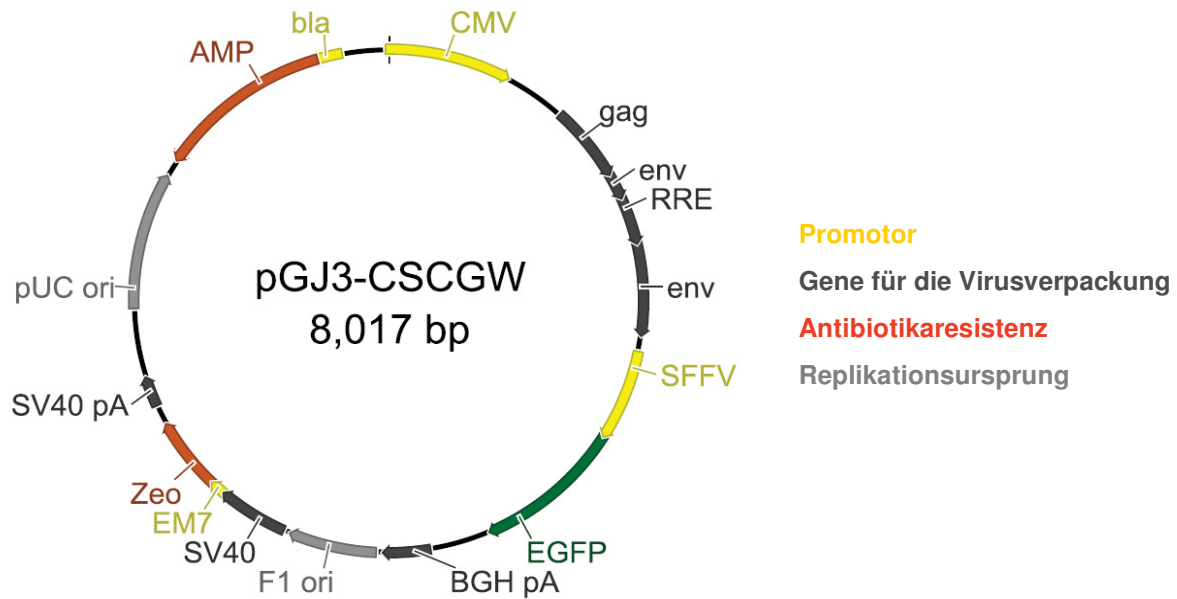


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des lentiviralen Grundvektors pGJ3-CSCGW. Die Beschriftung und Farbkodierung ist für alle Vektorabbildungen in dieser Arbeit gültig. BGH pA: Polyadenylierungssignal des *bovine growth hormone*. Die weiteren Abkürzungen sind im Text dieses Kapitels definiert.

2.6 Prokaryotische Zellen

2.6.1 *Escherichia coli* (*E.coli*) XL-1 Blue

Der XL-1 Blue Bakterienstamm stammt von dem *E.coli* K12 Bakterienstamm (Stratagene) ab.

LB-Medium: 10 g/l Bactotryptone, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g/l Natriumchlorid, 50 µg/ml Ampicillin, pH 7,5

LB-Agarplatten: 15 g Agar / 1 l LB-Medium

2.7 Eukaryotische-Zellen

2.7.1 HEK293T Zellen

HEK293T (HEK, *human embryonic kidney*) Zellen sind humane, embryonale Nierenzellen, die in HEK-Medium kultiviert wurden.

HEK-Medium: *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM, GIBCO), 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS), 2 mM L-Glutamin (Invitrogen), 1x *non-essential amino acids* (Invitrogen), 100 U/ml Penizillin/Streptomycin (Invitrogen)

HEK-Hungermedium: entspricht HEK-Medium ohne FCS

HEK-Einfriermedium: DMEM, 20% FBS, 10% DMSO (**D**imethylsulfoxid)

2.7.2 HL-1 Zellen

Die murine, kardiale Muskel-Zelllinie HL-1 (*heart-like*) war ein freundliches Geschenk von Dr. W. C. Claycomb (Louisiana State University Medical Center, New Orleans, USA). Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach den Angaben von W. C. Claycomb (Claycomb et al., 1998) in HL-1 Medium.

HL-1-Medium: Claycomb-Medium (Sigma-Aldrich), 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS), 100 U/ml Penizillin/Streptomycin, 2 mM Glutamin, 0,1 mM Norepinephrin (Invitrogen)

HL-1-Zellkulturschalen-Beschichtung: 25 µg Fibronectin in 2 ml 0,2 % Gelatine

HL-1-Einfriermedium: 95% FBS, 5% DMSO

2.8 Bearbeitung von Nukleinsäuren

Die im Folgenden aufgeführten Methoden wurden, wenn nicht anders aufgeführt, nach den Standardprotokollen von Sambrook und Russell durchgeführt (Sambrook and Russell, 2001).

2.8.1 DNA

2.8.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion angewandt. Die *Pfx*-DNA-Polymerase weist eine geringe Fehlerrate auf und wurde für eine sehr genaue Amplifikation der DNA-Sequenz für Klonierungen nach Herstellerangaben eingesetzt. Die *Taq*-DNA-Polymerase wurde zur diagnostischen Überprüfung von DNA-Konstrukten oder des Genoms nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.8.1.1.1 PCR zur Generierung der GSK3β-Serin 9 (Ser9) Mutante

Für die Erzeugung der GSK3β-Serin 9 Mutante mittels PCR wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass das vorwärts gerichtete Oligonukleotid den gewünschten Nukleotid austausch beinhaltet (siehe Tabelle 2.6, Klonierungsstrategie siehe Kapitel 3.2.3). Für diese PCR erwies sich die Kombination der *Pfx*-DNA-Polymerase mit dem 10 x *Taq*-DNA-Polymerase Puffer als zielführend.

Tabelle 2.6: Oligonukleotide für die Herstellung der GSK3β-Ser9-Mutante. Der Nukleotid austausch für die Ser9-Mutante ist Fett mit Unterstrich markiert.

Name	Oligonukleotidsequenz
Ser9A vorwärts	GTTATGTCGGGGCGACCGAGAACCACCG <u>CC</u> CTTGC
Ser9A rückwärts	CCACCAACTGATCCACCACTGTCCCCA

2.8.1.2 *In-Fusion* PCR Klonierungssystem

Für die Generierung der GSK3 β -Kinase-Inaktiven (KI) -Mutante wurde das *In-Fusion* PCR Klonierungssystem (Clontech) eingesetzt. Dieses ermöglicht über eine homologe Rekombination das Klonieren eines PCR-Fragments in einen zuvor linearisierten Vektor. Hierbei werden die Oligonukleotide des zu amplifizierenden PCR-Fragments so gewählt, dass sie homolog zu den Enden des linearisierten Zielvektors sind. Mit Hilfe des *In-Fusion*-Enzyms (DNA Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität aus dem Vaccinia Virus) werden das PCR-Fragment und der Vektor homolog rekombiniert (Klonierungsstrategie siehe Kapitel 3.2.3). Die Generierung der Oligonukleotide (Tabelle 2.7) und die *In-Fusion* Reaktion wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 2.7: Oligonukleotide für die *In-Fusion*-Klonierung zur Generierung des Vektors pGJ3-C-KI-TAP. Der Nukleotidaustausch für die KI-Mutante ist Fett mit Unterstrich markiert.

Name	Oligonukleotidsequenz
K85,86A Vektor 5'>3'	CCACCGGTACCATTTAAATCGTTATGTCGG
K85,86A 3'<5' Vektor	GAGGGAATTTGAATTCTGTATAATTGGGTTTCATTCTCT
K85,86A Mutation 5'>3'	GCCATC <u>GCGGC</u> AGTTCTACAGGACAAGCGATT
K85,86A 3'<5' Mutation	AGA <u>ACTGCGC</u> GATGGCAACCAGTTCTCCA

2.8.1.3 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Für eine analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Zur Vorbereitung der DNA-Proben wurden diese mit DNA-Ladepuffer versetzt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren in einem Ethidiumbromid-haltigen (0,006% (v/v)), 1-1,5%-igen Agarosegel in 0,5x TAE-Puffer aufgetrennt. Die Auftrennung wurde bei 5-10 V/cm durchgeführt. Für Fragmentlängen über 500 bp wurde der Lambda/EcoRI/HindIII- und für die Fragmentlängen unter 700 bp der pBluescript/HpaII-Längenstandard verwendet. Die Auswertung der Gele erfolgte unter UV-Licht. Mit Hilfe des Geldokumentationsgerätes (UV-Transilluminator) wurden die Gele photographiert und mit der Computersoftware QuantityOne 4.5.2 (BioRad) analysiert.

DNA-Ladepuffer: 30% (v/v) Glycerol, 0,25% (w/v) Bromphenolblau

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA

DNA-Längenstandards:

Lambda DNA (Invitrogen) geschnitten mit **EcoRI/HindIII** (560, 831, 947, 1375, 1584, 1900, 2027, 4970, 5150, 21000 bp),

pBluescript DNA (Stratagene) geschnitten mit **HpaII** (710, 489, 404, 325, 242, 190, 157, 147, 110, 67, 57, 34, 26 bp)

2.8.1.4 DNA-Agarosegeleextraktion

Das gewünschte DNA-Fragment (PCR-Produkt oder Restriktionsfragment) wurde aus dem Agarosegel mit einem Skalpell unter UV-Licht herausgeschnitten. Die anschließende Aufreinigung des DNA-Fragments erfolgte mit dem QIAquick *Gel Extractions Kit* (Qiagen). Hierbei wird das Gelmaterial zunächst entfernt und anschließend die DNA über eine Anionenaustauscher-Minisäule aufgereinigt.

2.8.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration wurde durch Absorption bei 260 nm (A_{260}) mit dem Spektralphotometer (Nanodrop) bestimmt. Zur Reinheitsüberprüfung der Nukleinsäure wurde der Quotient A_{260}/A_{280} berechnet. Lag dieser für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2, galt die Probe als rein. Mit der zum Nanodrop gehörigen Software ND-1000 3.2.1 wurde die Konzentration und der Reinheitsgrad der Nukleinsäure ermittelt.

2.8.1.6 DNA-Restriktionsendonuklease-Reaktion

Für die sequenzspezifische Spaltung von DNA wurden DNA-Restriktionsendonukleasen verwendet (siehe Tabelle 2.3). DNA-Restriktionsendonuklease-Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (2.8.1.3) wurde die Restriktion der DNA überprüft. Wenn erforderlich, wurden die restringierten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel extrahiert (2.8.1.4).

2.8.1.7 DNA-Ligation

Für die DNA-Ligation wurde die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) eingesetzt. Hierbei wurde die Fragment-DNA zur Vektor-DNA (100-150 ng) im dreifachen molaren Überschuss hinzugegeben. Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde entweder für 4 h bei RT oder über Nacht (ÜN) bei 16°C durchgeführt.

2.8.1.8 Weitere Modifikationen von DNA-Fragmenten

Für manche Klonierungsstrategien wurden weitere DNA-Modifikationen vorgenommen. Zur Verhinderung der Religation einer Vektor-DNA wurde alkalische Phosphatase eingesetzt. Hierbei dephosphoryliert das Enzym die 5'-Phosphat-Enden des Vektors. Für manche

Klonierungen mussten die überhängenden 5'-Enden des DNA-Fragmentes entfernt werden. Für die Glättung des 5'-Endes wurde die Klenow-Polymerase verwendet. Die genannten Enzyme wurden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.8.1.9 Transformation kompetenter *Escheria coli* (*E.coli*) Bakterien

Die kompetenten XL-1-Blue *E. coli* Bakterien (Lagerung -80°C) wurden nach dem langsamen Auftauen auf Eis mit dem Ligationsansatz für 30^omin bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C. Nach 1h Inkubation bei 37°C mit LB-Medium wurden die Zellen auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Für Minikulturen wurden Glasröhrchen, die 2 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium enthielten, mit den entstandenen Kolonien angeimpft. Anschließend wurden diese ÜN bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

2.8.1.10 Kultivierung transformierter *E.coli* Bakterien

Für die *E. coli* Kultivierung wurden 100 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) mit einer Minikultur oder direkt mit einer gepickten Kolonie von einer Agarplatte angeimpft. Anschließend erfolgte eine ÜN Inkubation der Kultur bei 37°C unter Schütteln.

2.8.1.11 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* Bakterien

Die Plasmidpräparation wurde mit dem NucleoBond PC 100 Midi DNA Kit (Macherey Nagel), basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.2 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde vom biologisch-medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm Chromas Lite und der Sequenzvergleich mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

2.9 Transfektion von Säugerzellen

2.9.1 Transiente Transfektion von HEK293T Zellen

Für die transiente Transfektion wurde die Lipofektion verwendet. Hierbei erzeugt das genetische Material mit den kationischen Lipiden Komplexe, die von der Zelle aufgenommen werden (Felgner et al., 1987). 60-80 % konfluente HEK293T Zellen wurden auf einer 10cm-Zellkulturschale mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) und 18 µg Plasmid-DNA nach Herstellerangaben transfiziert.

2.9.2 Stabile Infektion von HEK293T und HL-1 Zellen

Die stabile Integration von Transgenen in Zellen erfolgte über eine Virusinfektion. Hierbei wird die virale RNA durch die sogenannte Absorption in die Wirtszelle aufgenommen. Mit Hilfe der reversen Transkriptase wird die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Nach Eintritt der DNA in den Nukleus wird diese mit der Integrase in das Wirtsgenom stabil integriert.

Für die Virusherstellung wurden zunächst HEK293T transient mit drei Plasmiden ko-transfiziert (Lipofectamin Transfektion; siehe 2.9.1). Aus Sicherheitsgründen befinden sich die Gene für die Erzeugung der infektiösen Viruspartikeln auf drei verschiedenen Plasmiden: Helferplasmid, Verpackungsplasmid und das Plasmid, welches das zu verpackende Konstrukt beinhaltet (GSK3β-Plasmid, siehe auch Grundvektor Abb. 2.1). Auf dem Helferplasmid befinden sich die Gene für die Kapsidproteine (gag), die Expressionsregulatoren (rev, tat) und die Virion-assoziierten Enzyme (pol). Das pol-Gen kodiert für die reverse Transkriptase, Protease und Integrase (Mochizuki et al., 1998). Das Verpackungsplasmid pCZ-VSV-G kodiert für das Hüllprotein Glykoprotein G (env-Gen) des vesikulären-Stomatitisvirus (VSV-G). Dieses erlaubt den viralen Eintritt in die Wirtszelle und die Knospung der Viren (Pietschmann et al., 1999). Das GSK3β-Plasmid beinhaltet, neben dem Selektionsmarker für Puromyzin, Signale für die Verpackung, für die normale und für die reverse Transkription, für die Rekombination (LTRs, *long terminal repeats*) und die Integration (Mochizuki et al., 1998).

Bei der Ko-Transfektion der HEK293T Zellen wurde von jedem der drei Plasmide 5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's Medium*, Invitrogen) und nach weiteren 24 h wurde der virusenthaltende Überstand abgenommen. Zur Infektion wurde der Virusüberstand zunächst mit 0,45 µm Sterilfiltern filtriert. Anschließend wurde der Virusüberstand direkt auf die zu infizierenden HEK293T bzw. HL-1 Zellen gegeben. Hierbei wurde 1 ml Virusüberstand pro 6-Lochplatte

eingesetzt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und mit der Puromyzinselektion (9 µg/ml für HEK293T Zellen und 3 µg/ml für HL-1 Zellen) begonnen. Als Selektionskontrolle dienten nicht infizierte Zellen. Die Selektion erfolgte so lange, bis die Kontrollzellen gestorben waren (ca. 3-5 Tage). Die Expression des GSK3β-Proteins wurde anschließend im Western-Blot untersucht.

IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's Medium*) **-Medium:** 10% *Fetal Calf Serum* (FCS, Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Invitrogen), 1x *non-essential amino acids* (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

2.10 Proteinanalyse

2.10.1 Aufschluss von Proteinextrakten

Für die Gewinnung von Proteinextrakten wurden die Zellen zunächst mit kaltem 1x PBS gewaschen und dann in 200 µl (für 6-Well-Platten), 1 ml (für 10cm-Schale) oder 1,5 ml (für 15cm-Schale) Lysispuffer aufgenommen. Anschließend wurde das Zelllysate mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und dabei lysiert (bei 4°C). Nachdem das Zelllysate 15 min bei 4°C abzentrifugiert wurde, befand sich im Sediment die Zellkernfraktion und im Überstand die zytoplasmatische Fraktion, die für die weiteren Analysen genutzt wurde.

PBS (*Phosphate buffered saline*, pH 7,4): 2,7 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄

Lysispuffer (pH 7,5): 10 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% IGPAL CA-630 (Octylphenoxy-poly-ethoxy-ethanol), 1x Complete (Proteinaseinhibitor, Roche), 1x PhosSTOP (Phosphataseinhibitoren, Roche)

2.10.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA-Assay)

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde nach dem Protokoll von Smith et al., 1985 durchgeführt. Hierzu wurde das *BCA Protein Assay Kit* (Pierce) verwendet. Eine Konzentrationsreihe (25-1000 µg/ml) mit BSA (*Bovine serum albumin*) diente zur Eichung. Unter Verwendung einer 96-Mikrotiterplatte wurde eine Absorptionsmessung der Proben im ELISA-Reader (Spectra-Count) bei 562 nm durchgeführt.

2.10.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese in einer Hoefer-Elektrophoresekammer eingesetzt (Tulchin et al., 1976). Hierbei wurde zur Konzentrierung der Proteine ein 2,5 %-iges Sammelgel verwendet. Die eigentliche Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte im 7,5%- (bei Proteingrößen von über 150 kDa) oder 10 %-igem (bei Proteingrößen von 30-150 kDa) Trenngel bei 50-200 V. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteine vor dem Gelauftrag in 4x Lämmli-Puffer bei 95°C denaturiert.

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend entweder auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (siehe 2.10.4 und 2.10.5) oder direkt im Gel gefärbt (Silberfärbung siehe 2.11.2).

Lämmli-Puffer: 0,25 M Tris (pH 6,8), 8 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 100 mM DTT, 0,1 g/l Bromphenolblau

Sammelgel 2,5 %-ig: 2,5 ml 40 % Acrylamid, 2,5 ml 1 M Tris (pH 6,8), 200 µl 10 % SDS, 30 µl TEMED, 60 µl 10 % APS, 14,9 ml ddH₂O

Trenngel 10 %-ig: 10 ml Acrylamid, 10 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 400 µl 10 % SDS, 80 µl TEMED, 100 µl 10 % APS, 20 ml ddH₂O

SDS-PAGE-Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin (pH 8,3), 0,1 % (w/v) SDS

Proteingrößenstandard: *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas, 170, 130, 100, 70, 55, 43, 34, 15, 10 kDa)

2.10.4 Halb-Trocken-Transfermethode und Nass-Transfermethode

Mit dem Halb-Trocken-Transfer (*semi-dry blotting*) wurden Proteine bis zu einer Größe von 150 kDa auf Nitrozellulose transferiert. Der Transfer erfolgte im Halb-Trocken-Blotpuffer bei einer Spannung von 300 mA (2,5 mA/cm² Membranfläche) für 1,5 h.

Ab einer Proteingröße von über 150 kDa wurde der Nass-Transfer für den Proteintransfer auf Nitrozellulose genutzt. Hierbei wurde der Transfer bei einer Spannung von 300 mA im Nass-Blotpuffer für 16 h durchgeführt.

Halb-Trocken-Blotpuffer: 190 mM Glycin, 25 mM Tris (pH 8,5), 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

Nass-Blotpuffer: 190 mM Glycin, 25 mM Tris (pH 8,5)

2.10.5 Immundetektion von Proteinen im Western Blot (WB)

Für die Immundetektion wurde die Nitrozellulosemembran zunächst mit PBS/Licor-Blockierlösung (1:1) für 1-2 h inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper ÜN oder 2 h bei RT mit der entsprechenden Antikörperkonzentration (siehe Tabelle 2.4) in 5 % BSA/TBST. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (siehe Tabelle 2.5) in PBST/Licor-Blockierlösung (1:1) für 45 min bei RT inkubiert. Dann wurde wieder mehrmals mit TBST und zur Entfernung des Tweens vor der Detektion einmal mit TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von Sekundärantikörpern, die an einen Fluoreszenzfarbstoff (IRDye800CW oder IRDye650CW; siehe 2.4) gekoppelt sind. Hierbei detektiert der Odyssey Scanner (Licor Biosciences) im Infrarot-Bereich bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (700 nm und 800 nm). Dies ermöglicht eine Unterscheidung von zwei Proteinen sogar bei gleichem Molekulargewicht auf einer Membran. Des Weiteren wurden die Proteinbanden quantitativ ausgewertet. Bei der Quantifizierung der Proteinbanden wurden relative Signalintensitäten mittels der Odyssey Software ermittelt.

PBS (pH 7,4): 2,7 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄

PBST (pH 7,4): PBS, 0,1 % Tween-20

TBS (*Tris buffered saline*, pH 7,4): 150 mM NaCl, 25 mM Tris

TBST (pH 7,4): TBS, 0,1 % Tween-20

2.11 Methoden zur Aufreinigung und Identifizierung von GSK3β-Interaktionspartnern

2.11.1 Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP)

Erstmals wurde die Tandem-Affinitätsaufreinigung von Rigaut et al., 1999 beschrieben. Sie erlaubt Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen unter nativen Bedingungen. Hierbei wird das zu untersuchende Protein mit einer kurzen Aminosäuresequenz (Tag) fusioniert. Der Tandem-Affinitätsaufreinigungs-Tag (TAP-Tag) ermöglicht eine Isolierung von Proteinkomplexen nach zwei aufeinander folgenden Affinitätsreinigungen. Durch die zweifache Aufreinigung wird die Anzahl der falsch positiven Interaktionspartner reduziert. Diese Methode erlaubt die direkte Identifizierung der koeluierten Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse.

Für die Analyse von GSK3 β -Interaktionspartnern wurde das modifizierte TAP-Aufreinigungsprotokoll nach Naguib, 2009 verwendet. Hierbei wurde das GSK3 β -Protein C-terminal mit einem HA/StrepII/Flag-Tag (kurz: TAP-Tag) fusioniert (siehe 2.11.1.1). Nach transienter (siehe 2.9.2) oder stabiler Expression (siehe 2.9.1) des GSK3 β Fusionsproteins in HEK293T bzw. HL-1 Zellen erfolgte die TAP.

Für die TAP wurden von den transient transfizierten 10 konfluent bewachsene 10 cm- und von den stabil exprimierenden Zellen 10 konfluent bewachsene 15 cm-Zellkulturschalen eingesetzt. Der Zellaufschluss der Proteinextrakte erfolgte wie im Kapitel 2.10.1 beschrieben. Zur Kontrolle wurden untransfizierte Zellen mit der gleichen Proteinmenge (siehe 2.10.2) wie die modifizierten Zellen für die Analyse verwendet.

Für die Aufreinigung wurde zunächst pro Ansatz 200 μ l M2-Anti-Flag-Agarose mit Lysispuffer (ohne Protease- und Phosphataseinhibitoren) im 50 ml-Falconröhrchen gewaschen und äquilibriert. Dann wurde der Zellextrakt (10-15 ml) für 1 h mit Anti-Flag-Agarose bei 4°C unter ständiger Bewegung (500 rpm) inkubiert. Nach der Sedimentation der Anti-Flag-Agarose wurde der Überstand bis auf ca. 2 ml abgenommen und die restliche Suspension in EconoColumns (Bio-Rad) gefüllt. Nachdem der Durchlauf aufgefangen worden war, wurde die Säule mit 2 ml TBS (2x 1 ml-Schritte) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 ml 100 μ g/ml 3x Flagpeptid in TBS in fünf 200 μ l Schritten. Die Anti-Flag-Agarose wurde für die spätere WB-Analyse in 1 ml TBS aufgenommen. Das Eluat des ersten Aufreinigungsschritts wurde dann auf eine Strep-Tactin (Strep) -Säule (200 μ l Bettvolumen) in fünf 200 μ l Schritten gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 2 ml Strepwaschpuffer gewaschen und die Proteine mit 1 ml 2,5 mM Biotin in Strepwaschpuffer eluiert. Die StrepTactin-Sepharose wurde für die spätere WB-Analyse in 1 ml Strepwaschpuffer aufgenommen. Von jedem der durchgeführten TAP-Aufreinigungsschritte (Ausgangsextrakt, Flag-Überstand, Flag-Wasch, Flag-Kügelchen, Flag-Eluat, Strep-Überstand, Strep-Wasch, Strep-Eluat, Strep-Kügelchen) wurde ein Teil der Probe für eine WB-Analyse vorbereitet. Die aufgereinigten Proteine des Strep-Eluats wurden entweder mit Ionenaustauscher (StrataClean-Beads, Stratagene) unter Rotation ÜN bei 4°C oder mittels Centrifugal Filter Units (10K Membrane, Millipore) nach Angaben des Herstellers konzentriert. Das konzentrierte Eluat wurde über eine SDS-PAGE (siehe 2.10.3) aufgetrennt und mit einer Silberfärbung (siehe 2.11.2) dargestellt.

Lysispuffer (pH 7,5): 10 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1 % IGPAL CA-630, 1x Complete (Proteinaseinhibitor, Roche), 1x PhosSTOP (Phosphataseinhibitoren, Roche)

TBS (pH 7,4): 150 mM NaCl, 25 mM Tris

Strepwaschpuffer: 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)

2.11.1.1 Tandem-Affinitätssequenz (TAP-Tag)

Für die TAP-Analyse von GSK3 β -Interaktionspartnern wurde der TAP-Tag nach Naguib, 2009 verwendet. In Abb. 2.2 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen mit den eingezeichneten Tag-Bereichen und den Proteinase-Schnittstellen des TAP-Tags dargestellt. Für die TAP-Aufreinigung sind der StrepII-Tag (Strep) und der MonoFlag-Tag (Flag) essentiell, da sie eine Aufreinigung des rekombinanten GSK3 β -TAP-Proteins über die Flag- und anschließend im zweiten Schritt über die StrepTactin-Säule ermöglichen. Mit der TEV- bzw. der Thrombin-Protease können alternativ zur Elution mit Flag-Peptid bzw. Biotin die Fusionsproteine und die angereicherten Interaktionspartner mittels proteolytischer Spaltung von der Säule eluiert werden. In diesem Fall erlaubt der HA-Tag eine Detektion des Fusionsproteins im WB.



Abb. 2.2: Nukleotid- und die dazugehörige Aminosäure-Sequenz des verwendeten TAP-Tags mit den eingezeichneten Tag-Bereichen und den Proteinase-Schnittstellen.

2.11.2 Silbergefärbung

Für die Detektierung der Proteine, die mit der TAP-Analyse aufgereinigt und anschließend mit einer SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurde eine Färbung mit Silbernitrat eingesetzt.

Für die Silbergefärbung wurde ein Massenspektrometrie-kompatibles Protokoll nach Shevchenko et al., 1996 verwendet. Zunächst wurde das Gel mit ddH₂O gewaschen um störendes SDS zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Fixierung in Fixierer 1 für 20 min

und dann eine zweimalige Inkubation in Fixierer 2 für 10 min. Nach einer 10 minütigen Waschung mit ddH₂O wurde das Gel für 1 min mit Thiosulfatreagenz behandelt. Nach dem Waschen mit ddH₂O (3x 20 sec) wurde das Gel für 20 min mit Silbernitratreagenz inkubiert. Dann erfolgte wieder ein dreimaliges Waschen für 20 sec mit ddH₂O und eine 5-10 minütige Behandlung mit Entwickler. Nach erneutem Waschen mit ddH₂O (3x 20 sec) wurde die Reaktion mit Stop-Reagenz beendet und das Gel mit Lager-Reagenz inkubiert.

Fixierer 1: 5 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Methanol

Fixierer 2: 50 % (v/v) Methanol

Thiosulfatreagenz: 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat

Silbernitratreagenz: 12 M Silbernitrat, 0,007 % (v/v) Formaldehyd

Entwickler: 30 g/L Natriumcarbonat, 0,019 % (v/v) Formaldehyd, 0,0005 % (w/v) Natriumthiosulfat

Stop-Reagenz: 5 % (v/v) Essigsäure

Lager-Reagenz: 2 % (v/v) Essigsäure

2.11.3 Isolation der Proteine aus Silbergelen zur massenspektrometrischen Analyse

Die Aufarbeitung der Proteine aus den Silbergelen für die spätere massenspektrometrische Messung wurde nach dem Protokoll von Gharahdaghi et al., 1999 durchgeführt. Für dieses Protokoll wurden nur silikonisierte Eppendorf-Gefäße, sogenannte *LowBinding Tubes*, verwendet.

Für die Aufarbeitung wurden die gefärbten Proteinbanden mit einem Skalpell aus dem Silbergel herausgeschnitten, in ca. 1 mm³ große Stücke zerkleinert und in Eppendorf-Gefäße gegeben. Anschließend wurden die Proben in der Vakuumentrifuge für 45 min bei 55°C getrocknet. Für die Entfärbung wurden die Gelstücke mit 40 µl eines 30 mM Kaliumhexacyanoferrat/ 100 mM Natriumthiosulfat 1:1-Gemisches inkubiert und dreimal mit 80 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat jeweils für 15 min bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Dann erfolgte eine weitere Dehydrierung der Proben in der Vakuumentrifuge. Für die Reduktion der Disulfidbrücken wurden die Gelstücke mit 40 µl einer 10 mM DTT/100 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung für 15 min bei 55°C inkubiert. Danach wurden die Cysteinreste der Proben mit 40 µl 55 mM Iodacetamid/ 100 mM Ammoniumbicarbonat alkyliert. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung der Proben mit einem Acetonitril/Ammoniumbicarbonat 1:1-Gemisch. Im Anschluss wurde eine weitere Trocknung

der Proben in der Vakuumzentrifuge durchgeführt. Für die Trypsinspaltung wurden die Gelstücke zunächst mit einer Trypsin-Lösung für 45 min auf Eis rehydratisiert. Dann erfolgte die Trypsinspaltung für 16 h bei 37°C mit 5 mM CaCl₂ und 50 mM Ammoniumbicarbonat. Anschließend wurde der Überstand mit den extrahierten Peptiden in einem neuem Eppendorf-Gefäß gesammelt. Für die weitere Peptidextraktion erfolgte eine Behandlung der Proben mit 20 µl 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung für 10 min unter kräftigem Schütteln und eine anschließende 5 minütige Inkubation im Ultraschallbad. Dann wurden die Proben mit 20 µl Acetonitril versetzt, für 10 min kräftig geschüttelt und für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Peptide im Überstand wurden mit dem ersten gesammelten Überstand vereinigt. Es folgten zwei weitere Peptidextraktionsschritte, die aber anstelle der Ammoniumbicarbonatlösung mit 20 µl 5 % Ameisensäure, wie oben beschrieben, durchgeführt wurden. Auch diese Überstände wurden mit den vorangegangenen Peptidüberständen vereinigt und anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Im Anschluss wurden die getrockneten Proben massenspektrometrisch untersucht.

Trypsin-Lösung: 12,5 ng/µl Trypsin, 5 mM CaCl₂, 50 mM Ammoniumbicarbonat

2.11.4 Massenspektrometrische-Messung der isolierten Proteine

Die massenspektrometrische (MS)-Messung zur Identifizierung der isolierten Proteine wurde von Dr. Michael Reinartz (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie) durchgeführt.

Die aus dem Silbergel aufgearbeiteten Proben (siehe 2.11.3) wurden mit Hilfe einer Fused-Silica Vorsäule (100 µm x 2 cm), die zuvor mit C18-Umkehrphasenmaterial (Reprosil-Pur C18 AQ, 3 µm, Dr. Maisch) gefüllt worden war, entsalzt. Danach wurde die Peptidprobe zunächst über eine 15-18 cm lange Fused-Silica Trennsäule (Innendurchmesser 75 µm) aufgetrennt und anschließend mit einer Elektrosprayionisation über einen SilicaTip Emitter (New Objectiv, Woburn, USA) im Massenspektrometer detektiert. Hierbei hatte die Kapillarspitze eine Spannung von 2 kV und eine Temperatur von 140°C. Für die Peptiddetektion wurde ein linearer Lösungsmittelgradient mit einer Flussrate von 230 nl/min verwendet. Der Gradient wurde mit 4-60 % Puffer B1 (84 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure) für mehr als 60 min durchgeführt. Im Anschluß erfolgte die Reinigung mit 99 % Puffer B1 für 5 min und die Äquilibration der Säule mit Puffer A (4 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure).

Die *dynamic-exclusion*-Funktion der Xcalibur-Software erlaubte eine automatisierte datenabhängige MS-Analyse. Hierbei erfolgte nach jedem Übersichtsspektrum (Masse/Ladungsverhältnis m/z 300-2000, Ionenfüllwert 1000000 Ionen, Auflösung $r = 60000$

bei $m/z = 400$) ein Fragmentierungsspektrum (MS/MS) der 10 intensivsten Ionen mit einer CID (Kollisionsinduzierte Dissoziation) von 35 U, mit einer einmaligen Wiederholung in 20 s. Dabei war eine maximale Massenabweichung von 10 ppm erlaubt.

Die Analyse der Fragmentierungsspektren von den identifizierten Proteinen erfolgte mit der *Uniprot human Taxonomie 9609*-Datenbank (83695 Einträge) über den *SEQUEST*-Algorithmus mit der Bioworks-Software (Thermo-Fisher Scientific). Die dafür verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 2.8 gezeigt.

Tabelle 2.8: Verwendete Einstellungen für die Analyse der Fragmentierungsspektren

Enzym	Trypsinspaltung
Massengenauigkeit der Vorläuferionen	10 ppm
Modifikationen	Cystein-Oxidation, Carboxyaminomethylierung, Phosphorylierung von Serin, Threonin, Tyrosin, bei SILAC-Experimenten: Lysin/Arginin
Delta CN	0,1
<i>Cross-correlation-Score vs. Charge state</i>	1,5; 2,0; 2,5; 3,0 für einfach, zweifach, dreifach und vierfach geladene Ionen
Peptidwahrscheinlichkeit	0,05
Nummer der Haupttreffer	1

2.12 Kinaseaktivität der GSK3 β -Mutanten

Die Untersuchung der spezifischen Kinaseaktivität der einzelnen GSK3 β -Protein-Mutanten wurde an aufgereinigten Proteinen aus den stabil exprimierenden HEK293T Zellen durchgeführt. Die Messung der Kinaseaktivität wurde anhand des Einbaus von radioaktivem Phosphat aus [γ -³³P] ATP in ein Substratpeptid gemessen. Das Peptid umfasste dabei die GSK3 β -Phosphorylierungsstelle der Glykogensynthase (GS). Des Weiteren war es nötig, den TAP-Tag der rekombinanten Proteine abzuspalten, da das verwendete Phospho-Glykogensynthase Peptid biotinyliert (Millipore) ist und ebenfalls für die Analyse über StrepTactin-Sepharose aufgereinigt wurde (siehe Kapitel 3.2.5).

Für die Messung wurden je 10 cm-Schalen der stabil exprimierenden HEK293T Zellen eingesetzt. Als Kontrolle wurden wildtypische Zellen verwendet. Nach dem Aufschluss der Zellen (siehe 2.10.1) wurden die GSK3 β -Fusionsproteine über den Flag-Tag aufgereinigt. Hierzu wurden zunächst pro Ansatz 50 μ l M2-Anti-Flag-Agarose mit 1 ml Lysispuffer ohne Inhibitoren gewaschen. Anschließend wurden von allen Zellextrakten die gleichen Proteinmengen (siehe 2.10.2) auf M2-Anti-Flag-Agarose gegeben und für 1 h bei 4°C unter Bewegung (500 rpm) inkubiert. Nach der Bindung wurden die Flag-Kügelchen 3x mit 1 ml Lysispuffer und 2x mit 1 ml Thrombin-Puffer gewaschen. In einem Endvolumen von 100 μ l wurden die Flag-Kügelchen mit 5 Units Thrombin für 16 h bei 20°C, 500 rpm inkubiert. Um

die GSK3 β -Aufreinigung zu überprüfen, wurde jeweils 5 μ l der Proben für eine WB-Analyse vorbereitet (siehe 2.10.3) und die restliche Probe (48 μ l) wurde für die Kinaseaktivitätsanalyse eingesetzt.

Die Kinaseaktivitätsanalyse wurde auf Grundlage der Herstellerangaben des Phospho-Glykogensynthase Peptides durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll leicht verändert und folgendes Pipettierschema pro Messzeitpunkt (3 Messzeiten pro Probe) verwendet:

16 μ l aufgereinigte und gespaltene GSK3 β

10 μ l (120 μ M) Phospho-Glykogensynthase Peptide

10 μ l [γ -³³P] ATP-Lösung

Die Reaktion wurde nach 0 min, 10 min und 20 min durch Zugabe von 50 μ l gewaschener StrepTactin-Sepharose gestoppt. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 30°C. Die Proben wurden 3x mit 400 μ l Lysispuffer (mit Phosphatasesinhibitoren) gewaschen und in 400 μ l PBS aufgenommen. Im Anschluss wurden die Proben mit Szintillationscocktail versetzt und im Szintillationszähler gemessen.

[γ -³³P] ATP-Lösung: 10 μ l [γ -³³P] ATP (Stock: 1mCi/100 μ l, spezifische Aktivität: 3000Ci/mmol), 90 μ l (500 μ M kaltes ATP und 75 mM Magnesiumchlorid in 20 mM MOPS (pH 7.2), 5 mM EGTA, 1 mM DTT (Dithiothreitol))

2.13 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie oder Ausschlusschromatographie ist eine Säulenchromatographie. Die Säulenmatrix besteht aus Sepharose mit einer definierten Porengröße, in die nur kleine Proteine bzw. Proteinkomplexe diffundieren können. Große Proteine bzw. Proteinkomplexe hingegen können nicht in die Matrix eindringen und werden deswegen ausgeschlossen. Auf diese Weise erfolgt eine Trennung der untersuchten Proteinkomplexe nach ihrer Größe und unter nativen Bedingungen.

Für die Gelfiltration wurden Proteinextrakte (siehe 2.10.1) der rekombinanten HEK293T-Zellen eingesetzt. Dabei wurden die Zellpräzipitate in Fraktionen von hoch- bis niedermolekularen Proteinkomplexen aufgetrennt. Hierzu wurde die Superdex200 10/30-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) mit einem Ausschlusslimit von $1,3 \times 10^6$ Da und einem Auftrennungsbereich von 10.000-600.000 Da großen Proteinkomplexen verwendet. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe der ÄKTAexplorer Chromatographie-Anlage (Amersham Pharmacia Biosciences). Hierbei wurde für die mobile Phase Lysispuffer ohne NP40, Protease- und Phosphataseinhibitoren eingesetzt. Es wurden 0,75 ml-Fraktionen unter einem

konstanten Fluss von 0,5 ml/min gesammelt. Hierbei wurde der Druck der Gelfiltrationssäule unter 1,5 MPa gehalten.

Für die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule wurden das *High molecular weight* und *Low molecular weight gel filtration calibration Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) herangezogen. Diese enthielten zusammen 9 Kalibranten: Blue-Dextran2000 (2000 kDa), Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa). Die Größenstandards wurden in verschiedenen Kombinationen auf die Säule gegeben und ihre Elution mittels UV-Detektion registriert. Aus den gemessenen Elutionsvolumina, in denen die einzelnen Standards von der Säule eluierten, wurde eine spezifische Eichkurve für die Säule bestimmt. Diese Eichkurve ermöglichte eine ungefähre Abschätzung der Proteingrößen für jede einzelne Fraktion. Die Lagerung der Säule erfolgte in 20 % Ethanol.

Die gesammelten Fraktionen der Gelfiltrationsläufe wurden in Lämmli-Puffer aufgekocht und eine WB-Analyse durchgeführt.

2.14 Stimulation oder Inhibition von HEK293T Zellen

Für Phosphorylierungsstudien von GSK3 β und Analysen des GSK3 β - PKA α -Komplexes wurden die Zellen mit Insulin, IGF-1, LY294002, 8 Brom-cAMP oder H89 behandelt. Die Zellen wurden auf Sechs-Loch-Zellkulturplatten für die Phosphorylierungs- bzw. für GSK3 β -PKA-Analysen auf zwei 15 cm Schalen ausplattiert und ÜN oder für 4 h in Hungermedium (unter Serumentzug) gehalten. Anschließend erfolgte die Stimulation oder Inhibition mit:

- 60 mU Insulin (Actrapid, Novo Nordisk) für 10 min
- 130 nM IGF-1 (Bulk IGF-1, GIBCO) für 10 min
- 100 μ M LY294002 (Hydrochlorid, PI3-Kinase Inhibitor, Sigma) für 1 h
- 2 mM 8 Brom cAMP (8-Br-cAMP, Biaddin) für 30 min
- 10 μ M H89 (Dihydrochlorid, PKA-Inhibitor, Biaddin) für 30 min

Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen nur in Hungermedium (Serumentzugskontrolle) gehalten.

Nach dem Waschen mit eiskaltem PBS erfolgte der Aufschluss der Zellen mit Lysispuffer (siehe 2.10.1). Für die Proteinmengenbestimmung (siehe 2.10.2) wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Die Proteinextrakte wurden entweder direkt mittels Western Blot (siehe 2.10.3) analysiert oder es erfolgte erst eine Aufreinigung der rekombinanten GSK3 β -Tag Proteine mittels StrepTactin-Präzipitation (SP; siehe 2.16).

2.15 GSK3 β Hemmung mit Lithiumchlorid

Für die Untersuchung der GSK3 β -Komplexe wurden HEK293T und HL-1 Zellen mit Lithiumchlorid behandelt. Lithiumchlorid (LiCl) ist ein GSK3 β -Inhibitor, der über mehrere Wege GSK3 β inaktivieren kann. Zum einen besitzt es eine kompetitive Wirkung auf Magnesiumionen (Mg²⁺), welche für eine Substratphosphorylierung wichtig sind, da GSK3 β die Phosphorylierung von vielen Substraten in Abhängigkeit von Mg²⁺-ATP katalysiert. Des Weiteren inhibiert LiCl Phosphatasen, die für eine Dephosphorylierung von GSK3 β verantwortlich wären (Jope, 2003). LiCl aktiviert aber auch GSK3 β -phosphorylierende Kinasen (PKC α , Akt), die dann GSK3 β verstärkt phosphorylieren und somit inaktivieren (Kirshenboim et al., 2004; O'Brien et al., 2011).

Die Zellen wurden, nach Zugabe von LiCl zum Medium mit einer Endkonzentration von 10 mM bzw. 20 mM, inkubiert. Die Kontrollzellen wurden dementsprechend mit 10 mM bzw. 20 mM Natriumchlorid behandelt. Anschließend wurde eine StrepTactin-Präzipitation (SP; siehe 2.16) oder ein Proximity Ligation Assay (PLA; siehe 2.18) durchgeführt.

2.16 StrepTactin-Präzipitation (SP)

Für Untersuchungen des GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplexes wurden zwei 15 cm Schalen der transfizierten rekombinanten HEK293T Zellen verwendet. Hierzu wurden die Zellen entweder stimuliert/inhibiert (siehe 2.14) oder mit Lithiumchlorid (siehe 2.15) behandelt und im Anschluss lysiert (siehe 2.10.1). Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Nachdem die Proteinkonzentration bestimmt worden war, wurden von jeder Probe gleiche Proteinmengen für die StrepTactin-Präzipitation (SP) eingesetzt. Hierbei wurde pro Probe 50 μ l gewaschene StrepTactin (Strep) -Sepharose verwendet und diese ÜN oder für 4 h bei 4°C rotierend inkubiert. Nachdem die StrepTactin-Matrix 3x mit Lysispuffer (mit Inhibitoren) gewaschen worden waren, wurden diese in Lämmli-Puffer aufgekocht, und es erfolgte eine WB-Analyse.

2.17 PKA-Hemmung und -Aktivierung am isolierten GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplex

Um den GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplex in Abhängigkeit der PKAI α -Aktivität zu untersuchen, wurden zwei 15 cm Schalen der transfizierten rekombinanten HEK293T Zellen eingesetzt. Diese Zellen wurden zunächst für 4 h in Hungermedium (unter Serumentzug) gehalten.

Anschließend wurden die GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplexe wie unter 2.16 beschrieben über eine StrepTactin-Präzipitation isoliert. Nachdem die StrepTactin-Sepharose 3x mit Lysispuffer (mit Inhibitoren) gewaschen worden war, wurde diese mit 2 mM 8-Br-cAMP (Biaffin) oder mit 10 μ M H89 (PKA-Inhibitor, Biaffin) für je 30 min bei 4°C rotierend inkubiert. Die Kontrollproben wurden entsprechend nur mit Lysispuffer behandelt. Anschließend wurde die StrepTactin-Sepharose 1x mit Lysispuffer (mit Inhibitoren) gewaschen, in Lämmli-Puffer aufgekocht und eine WB-Analyse durchgeführt.

2.18 Proximity Ligation Assay (PLA)

Der *Proximity Ligation Assay* (PLA) wurde erstmals von Söderberg et al., 2006 beschrieben und ermöglicht eine direkte Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen *in situ*. Hierbei werden die zu untersuchenden Proteine über spezifische Antikörperreaktionen detektiert und die Komplexbildungen für das Mikroskop sichtbar gemacht. Die Methode kann auf adhärent wachsenden Zellen angewendet werden.

Für die Durchführung des Protokolls werden die zu untersuchenden möglichen Interaktionspartner zunächst mit spezifischen primären Antikörpern detektiert. Hierbei müssen die Antikörper aus verschiedenen Spezies stammen. Anschließend binden an die primären Antikörper Spezies-spezifische sekundäre Antikörper (als PLA Proben bezeichnet), an die kurze Oligonukleotide (DNA-Sequenz) gekoppelt sind. Wenn die zu untersuchenden Proteine sich in unmittelbarer Nähe (< 40 nm, Herstellerangabe) zueinander befinden, wie es bei einer Komplexbildung der Fall ist, kann in einem weiteren Schritt eine Bindung von zwei spezifischen Oligonukleotiden an die DNA-Sequenzen der sekundären Antikörper erfolgen. Die Oligonukleotide können dann mittels Ligation verbunden werden. Der auf diese Weise gebildete Nukleotidring dient im nächsten Schritt der DNA-Polymerase als Matrize. Nach der Amplifikation (*rolling circle amplification*) hybridisieren fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide mit dem Amplifikat und erlauben auf diese Weise eine Sichtbarmachung des Proteinkomplexes unter dem Mikroskop.

Die PLA-Methode wurde mit dem Duolink[®] II Fluorescence-System (Olink Bioscience) nach Herstellerangaben an HEK293T und HL-1 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden je Ansatz $1,5 \times 10^4$ Zellen auf eine $0,25 \text{ cm}^2$ große Kreisfläche, die zuvor mit einem Fettstift (Flüssigkeitsstopper, *Liquid Blocker*, Sigma) gezeichnet worden waren, auf dem Objektträger ausplattiert. Für eine bessere Haftung der HEK293T Zellen wurde der Kreisbereich zuvor mit 0,1% Gelatine und für die HL-1 Zellen mit Fibronectin (siehe 2.7.2) beschichtet. Nachdem

den Zellen 4 h die Möglichkeit zur Adhäsion gegeben wurde, wurden diese mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT. Dann wurde noch einmal für 10 min mit PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden für 10 min durch eine Inkubation mit 0,2% Saponin in PBS permeabilisiert. Die Fortsetzung des Protokolls erfolgte nach Herstellerangaben, wobei die verwendeten primären Antikörper mit dem *Antibody Diluent* des Duolink-Systems 1:100 verdünnt (außer α -PKA-RI α 1:50) und ÜN bei 4°C inkubiert wurden.

PLA Proben: Duolink II PLA Probe α -Kanninchen PLUS

Duolink II PLA Probe α -Maus MINUS

Detektionsreagent: Duolink II Detektionsreagenz Rot (λ_{exc} 594 nm, λ_{em} 624 nm)

2.19 Kinaseaktivitätsassay von GSK3 β und PKA α

Zur Untersuchung des GSK3 β -PKA α -Komplexes wurden Kinaseaktivitätsassays durchgeführt. Hierbei wurde einerseits analysiert, welchen Einfluss die GSK3 β (Millipore) auf die PKA α -Aktivität besitzt (GSK3 β ->PKA α ->Kemptide) und andererseits, ob die PKA α (Biaffin) die GSK3 β -Aktivität beeinflusst (PKA α ->GSK3 β ->GS). Die PKA α -Aktivität wurde durch die Phosphorylierung von Substratpeptiden (Kemptide, PKA Substrat) und die GSK3 β -Aktivität anhand des Phosphorylierungsgrades eines Glykogen Synthase Peptides (GS, GSK3 β -Substrat) ermittelt. Die Messung der Phosphorylierung wurde durch den Einbau von [γ -³³P] ATP ermöglicht.

Für die Versuche wurden folgende Mengen und Konzentrationen eingesetzt:

10 μ l GSK3 β (0,2 Units verdünnt in 50 mM Tris pH7.5, 0,1 mM EGTA, 15 mM DTT)
und/oder

10 μ l PKA α (2 Units verdünnt in 200 μ M ATP, 10 mM MgCl₂)

10 μ l [γ -³³P] ATP-Gemisch

(50 nCi ([γ -³³P] ATP (spezifische Aktivität: 3000Ci/mmol) in 1 mM ATP)

10 μ l GS (200 μ M) oder 10 μ l Kemptide (1 mM)

10 μ l Reaktionspuffer (100 mM MgCl₂, 500 mM MOPS, 2,5mg/ml BSA)

und die Reaktion mit ddH₂O auf 90 μ l (Endvolumen) aufgefüllt

Der Assay wurde durch Zugabe der Enzyme gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten (Messzeiten im Ergebnisteil angegeben) wurden 9 μ l Proben entnommen und direkt auf ein P81-Filter (Whatman) gegeben, der alle Proteine binden kann. Anschließend erfolgten vier Waschschrte des Filters mit 75 mM Phosphorsäure, wobei das überschüssige [γ -³³P] ATP

entfernt wurde. Nach dem Trocknen der P81-Filter wurden diese mit Szintillationscocktail versetzt und im Szintillationszähler gemessen. PKA α wurde 15 min nach Reaktionsstart durch Zugabe von 10 μ l cAMP (10 μ M) aktiviert und im Anschluss direkt eine 9 μ l Probe entnommen. Als Kontrolle wurde die entsprechende Menge ddH₂O eingesetzt.

2.20 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die dazugehörige Standardabweichung ermittelt, und die Signifikanz wurde mittels t-Test oder 2-Wege-ANOVA (*Analysis of Variants*) -Test bestimmt. Die Signifikanz wurde bei einem Wert $p < 0,05$ angenommen.

2.21 Verwendete Computerprogramme

Microsoft Excel, Microsoft Word, Microsoft Powerpoint, Adobe Photoshop, Odyssey 3.0 (Licor Biosciences, Lincoln, USA), Plate Reader Vision 3.0 (Packard Bioscience/Perkin Elmer, Waltham, USA), Geneious, GraphPad Prism4 (2-Wege-ANOVA-Test). Alle weiteren Computerprogramme werden im direkten Kontext des Experiments aufgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Strategien zur Analyse von GSK3 β -assoziierten Proteinkomplexen mittels der Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP)

Für die Analyse einer GSK3 β -abhängigen Signaltransduktion wurden systematisch GSK3 β -assoziierte Proteinkomplexe mit Hilfe der Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP) und der Massenspektrometrie (MS) untersucht. Hierzu wurde die GSK3 β -cDNA am C-Terminus (3'-Ende) mit einem 8 kDa großen HA/StrepII/Flag-Tag (TAP-Tag) fusioniert (siehe Abb. 3.1 A, Sequenz im Kapitel 2.11.1.1 dargestellt) und durch lentivirale Transfektion in humane Nierenepithel-Zellen (HEK293T) sowie murine Kardiomyozyten (HL-1: *heart-like*) eingebracht. Hierbei ermöglichte das StrepII/Flag-Tag eine zweistufige Aufreinigung des rekombinanten GSK3 β -TAP-Proteins und dessen möglichen Interaktionspartner unter nativen Bedingungen. Der isolierte Zellextrakt wurde über eine α -Flag- und eine StrepTactin-Sepharose-Säule aufgereinigt. Hierbei wird die Anzahl der falsch positiven Interaktionspartner durch die zweifache Aufreinigung reduziert. Die Auftrennung des Strep-Eluates erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Silberfärbung der Proteine. Nach der Exzision und Aufreinigung der gefärbten Proteinbanden wurden die koeluierten Proteine mittels einer massenspektrometrischen Analyse (TAP/MS) und Datenbankrecherche identifiziert (siehe Abb. 3.1 B).

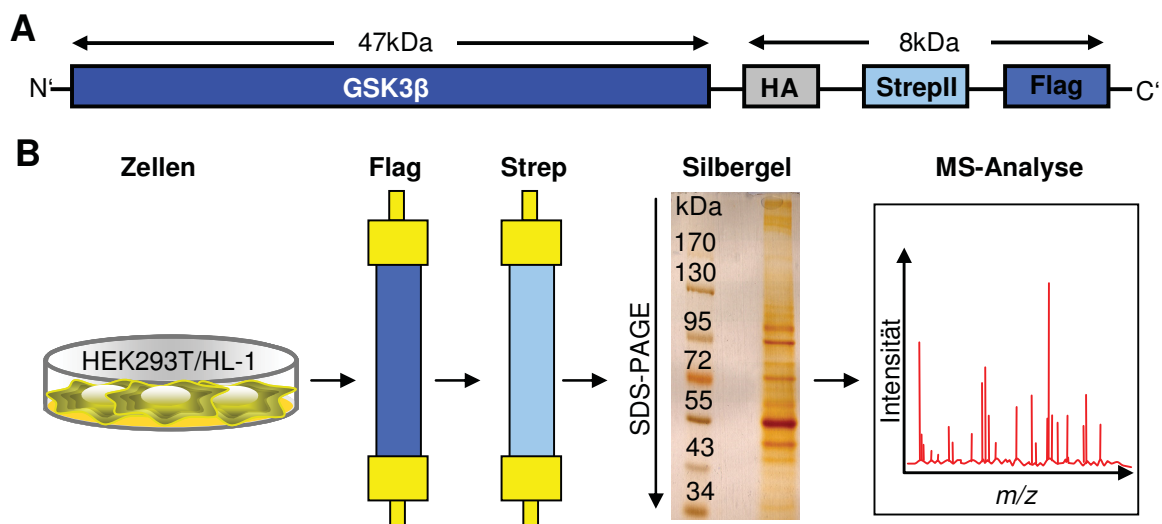


Abb. 3.1: **A) C-terminal getaggtetes GSK3 β (GSK3 β -TAP).** Der 8 kDa große TAP-Tag besteht aus einem HA-, StrepII- und Flag-Tag. Hierbei ermöglichen der StrepII- und Flag-Tag die TAP-Methode **B) Schematisches TAP-Aufreinigungsprotokoll.** Das rekombinante GSK3 β -TAP, welches die HEK293T und HL-1 Zellen bilden, wird im ersten Aufreinigungsschritt auf die Flag-Säule geladen und mit Flagpeptid eluiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Bindung des Flag-Eluats an die StrepTactin- (Strep) Säule. Anschließend wird mit Biotin eluiert. Das Strep-Eluat wird auf einem Acrylamidgel aufgetrennt und die koeluierten Proteine mit Silber gefärbt. Die gefärbten Proteinbanden werden aus dem Gel isoliert und nach massenspektrometrischer (MS) Analyse mittels Datenbankrecherche identifiziert. *m/z*: Masse/Ladung.

3.1.1 GSK3 β -TAP Konstrukt

Für die Analyse von GSK3 β -assoziierten Proteinkomplexen mit der TAP-Methode wurde das GSK3 β -Protein mit einem kurzen Tag (HA/StrepII/Flag-Tag; Naguib, 2009) C-terminal fusioniert. Dieses Tag umfasst je ein HA- und ein Flag-Tag, welche von spezifischen α -HA und α -Flag Antikörpern erkannt werden. Somit erlauben diese Tags die Detektion der Fusionsproteine im Western Blot (WB). Zusätzlich enthält das Tag das StrepII-Tag (Abk. Strep), welches eine Bindung an ein modifiziertes Streptavidin (StrepTactin) ermöglicht. Prinzipiell können alle drei Tags zur Affinitätsaufreinigung unter nativen Bedingungen genutzt werden. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch einen Überschuss kompetierender Peptide (HA/Flag) bzw. mit Biotin (StrepTactin). Hier wurden zur Aufreinigung das Flag- und StrepII-Tag genutzt.

3.1.2 TAP/MS-Analyse in transient transfizierten HEK293T Zellen

3.1.2.1 pGJ3-S-GSK3 β -TAP

Die Fusion des TAP-Tags erfolgte an das C-terminale Ende von GSK3 β , weil sich im N-terminalen Bereich die wichtige Phosphorylierungsstelle (Ser9) befindet und diese möglicherweise durch einen N-terminal gelegenen Tag beeinflusst wird bzw. für andere Interaktionspartner nicht mehr zugänglich sein könnte.

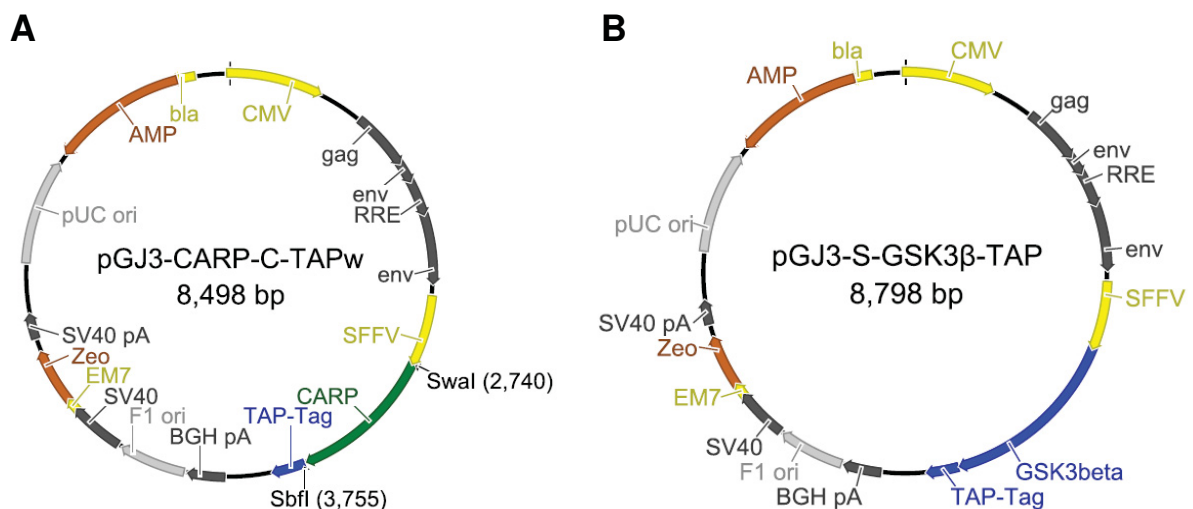


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Plasmide pGJ3-CARP-C-TAPw (A) und pGJ3-S-GSK3 β -TAP (B). Die CARP-Sequenz des Ausgangsplasmids pGJ3-CARP-C-TAPw (A) wurde über die Restriktionsschnittstellen SbfI und Swal ausgeschnitten und gegen die murine GSK3 β -cDNA ausgetauscht (B). Die Abkürzungen und Farbkodierungen sind in Abb. 2.1 erläutert.

Für die Konstruktion wurde die GSK3 β -cDNA aus der Maus mittels PCR amplifiziert. Da eine Fusion der GSK3 β Sequenz mit dem C-terminalen Tag erreicht werden sollte, enthielt

das 3'-Oligonukleotid nicht das Stop-Codon der GSK3 β . Das amplifizierte Fragment wurde in das Plasmid pGJ3-CARP-C-TAP_W (Abb. 3.2 **A**; Naguib, 2009) anstelle der CARP-cDNA über die Restriktionsschnittstellen SbfI und SwaI eingesetzt und unter die Kontrolle des SFFV- (*spleen focus-forming virus*) Promotors gestellt. Das entstandene Plasmid wurde pGJ3-S-GSK3 β -TAP (S: SFFV-Promotor; siehe Abb. 3.2 **B**) genannt und war eine freundliche Gabe von Susanne Küsters, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie.

In Abb. 3.2 ist das Ausgangsplasmid pGJ3-CARP-C-TAP_W (**A**) und das GSK3 β -TAP exprimierende Plasmid pGJ3-S-GSK3 β -TAP (**B**) schematisch dargestellt.

3.1.2.2 Charakterisierung des GSK3 β -TAP-Proteins

Zur Überprüfung der Expression des Plasmides pGJ3-S-GSK3 β -TAP wurde dieses in HEK293T Zellen transfiziert. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob das Fusionsprotein wie die endogene GSK3 β durch Phosphorylierung reguliert wird. Die Expression und die Phosphorylierbarkeit des rekombinanten Proteins wurden mittels WB-Analyse untersucht. Abb. 3.3 **A** zeigt das Ergebnis der WB-Analyse, die mit Antikörpern gegen GSK3 β (rot) und die Ser9 phosphorylierte GSK3 β (Abk. PGSK3 β , grün) durchgeführt wurde. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten GSK3 β -Antikörper werden alle GSK3 β -Proteine (in phosphorylierter bzw. dephosphorylierter Form) erfasst. In Abb. 3.3 **B** ist die WB-Analyse mit dem Antikörper gegen den HA-Tag (grün) dargestellt.

In der WB-Analyse in Abb. 3.3 **A** ist im roten Kanal (α -GSK3 β) für die WT-Zellen ein Signal für das endogene GSK3 β -Protein zu sehen. Nur in den transfizierten Zellen erscheint ein weiteres Signal für das rekombinante GSK3 β -TAP-Protein, welches aufgrund des zusätzlichen Tags größer ist. Im grünen Kanal wurden für die phosphorylierte GSK3 β der WT-Zellen ein Signal und für die transfizierten Zellen zwei Signale detektiert. Das Fusionsbild (gelb) gewährleistet die korrekte Zuordnung der GSK3 β -Proteinvarianten. Die Quantifizierung der Signalintensitäten (**B**) ermöglichte die Abschätzung des Phosphorylierungsgrades beider Proteine. Hierbei wurde das Verhältnis der phosphorylierten GSK3 β -Proteinmenge zur entsprechenden Gesamt-GSK3 β -Proteinmenge ermittelt (**PGSK3 β /GSK3 β**). Für die endogene GSK3 β der WT-Zellen ergab sich ein Wert von 0,24. Dieses Verhältnis wurde auch für transfizierte Zellen berechnet. So ergab sich für das endogene GSK3 β ein Wert von 0,24 und für das Fusionsprotein ein Wert von 0,38 (**PGSK3 β -TAP/GSK3 β -TAP**). Mit α -HA-Antikörpern (**C**) lässt sich wie erwartet nur in den transfizierten Zellen eine Bande für das GSK3 β -TAP-Protein detektieren. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das GSK3 β -TAP-Protein in den HEK293T Zellen gebildet wird

und seine Phosphorylierbarkeit durch das TAP-Tag nicht eingeschränkt ist. Außerdem hat die Expression des Fusionsproteins keine Auswirkungen auf die Bildung und Phosphorylierung der endogenen GSK3 β .

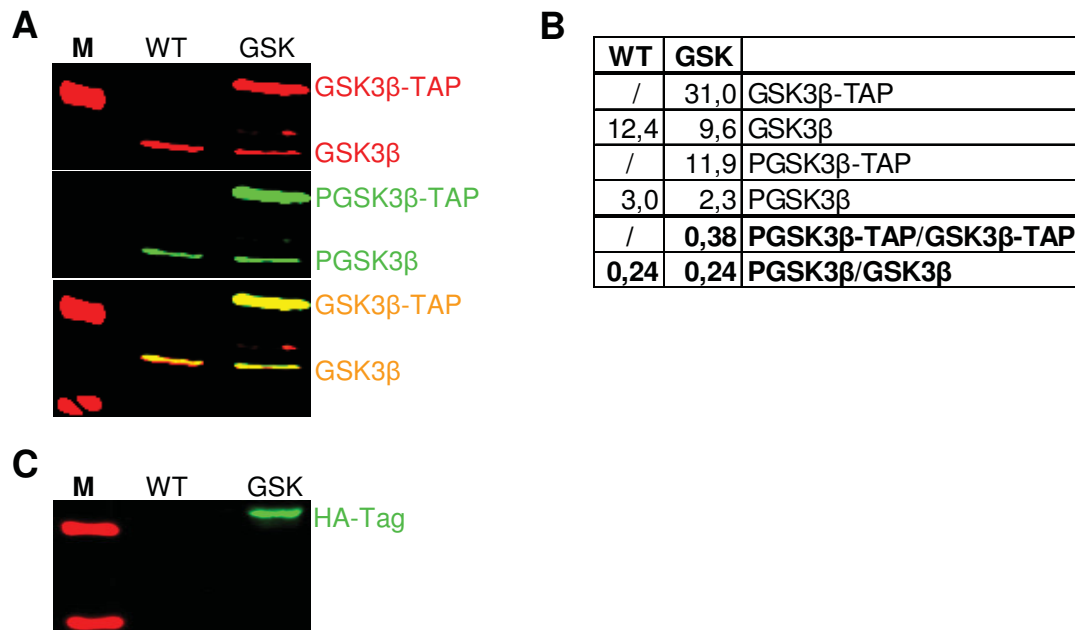


Abb. 3.3: WB-Analysen von transient transfizierten HEK293T-Zellen mit dem pGJ3-S-GSK3 β -TAP. In A ist die WB-Analyse mit den Antikörpern gegen GSK3 β (rot), GSK3 β -Ser9-Phosphorylierung (PGSK3 β , grün) und das Fusionbild (gelb) dargestellt. Für diesen WB ist die Quantifizierung der Signalintensitäten mit der Berechnung des Phosphorylierungsgrades (**PGSK3 β -TAP/GSK3 β -TAP** und **PGSK3 β /GSK3 β**) in B aufgeführt. C zeigt den WB mit dem Antikörper gegen HA (grün). M: Proteingrößenstandard, WT: Wildtyp, GSK: GSK3 β -TAP.

3.1.2.3 Überprüfung der GSK3 β -Komplexbildung mit der TAP/MS-Methode in transient transfizierten HEK293T Zellen

In weiteren Experimenten wurde überprüft, ob das Fusionsprotein effizient mit dem TAP-Protokoll (1. Aufreinigung: α -Flag-Säule; 2. Aufreinigung: StrepTactin-Säule) aufgereinigt werden kann. Dazu wurde das Plasmid pGJ3-S-GSK3 β -TAP zunächst transient in HEK293T Zellen transfiziert. Aus diesen Zellen wurde das GSK3 β -TAP-Protein mit der TAP-Methode isoliert. In den einzelnen Fraktionen und Waschlösungen sowie im verbliebenen Säulenmaterial wurde der Gehalt an GSK3 β -TAP mittels WB-Analyse untersucht. Hierbei wurde der WB mit einem Antikörper gegen GSK3 β (grün) durchgeführt.

Abb. 3.4 zeigt exemplarisch die WB-Analyse einer TAP-Aufreinigung. Hierbei wurden gleiche Anteile jeder TAP-Fraktion aufgetragen, um eine Vergleichbarkeit der Signale zu gewährleisten. Nur vom Gesamtproteinextrakt und vom α -Flag-Überstand wurde jeweils 1/3 des anteiligen Volumens für den WB eingesetzt. In Abb. 3.4 ist zu sehen, dass das Fusionsprotein nahezu vollständig an die α -Flag-Säule gebunden wurde, denn im Flag-

Überstand (Ü) ist nach der Bindung des Proteins im Vergleich zum Gesamtproteinextrakt (P) für GSK3β-TAP-Protein nur ein sehr schwaches Signal zu sehen. In der Waschfraktion (W) wurde kein Signal detektiert, so dass hierbei kein Protein-Verlust stattgefunden hat. Hingegen weisen die Flag-Sepharosekügelchen (F), die nach Elution von GSK3β-TAP mit Flagpeptid in Lämmli Puffer aufgekocht wurden, ein Signal auf. Dieses weist darauf hin, dass nicht die gesamte GSK3β-TAP-Proteinmenge durch Kompetition mit dem Flag-Peptid eluiert werden konnte. Trotzdem zeigt sich im Flag-Eluat (E) ein sehr starkes Signal für GSK3β-TAP. Im zweiten Aufreinigungsschritt über die StrepTactin-Säule sind keine Signale im Überstand (Ü) nach Bindung des Protein und in der anschließenden Waschfraktion (W) zu sehen. Hier hat eine vollständige GSK3β-Bindung an die StrepTactin-Sepharose stattgefunden. Ebenso findet sich kein Protein nach der Elution mit Biotin an der StrepTactin-Sepharose (S). Das Signal im Strep-Eluat zeigt, dass eine hohe GSK3β-TAP Anreicherung stattgefunden hat. Mit einer Quantifizierung der Signalintensitäten (unter dem WB angegeben) wurde die Effizienz der TAP-Aufreinigung bestimmt. Ausgehend vom Gesamtproteinextrakt (1/3 der anteiligen Proteinmenge aufgetragen) wurden im 1. Aufreinigungsschritt mit α-Flag 60 % und im 2. Aufreinigungsschritt mit StrepTactin 12 % des GSK3β-TAP-Proteins aufgereinigt.

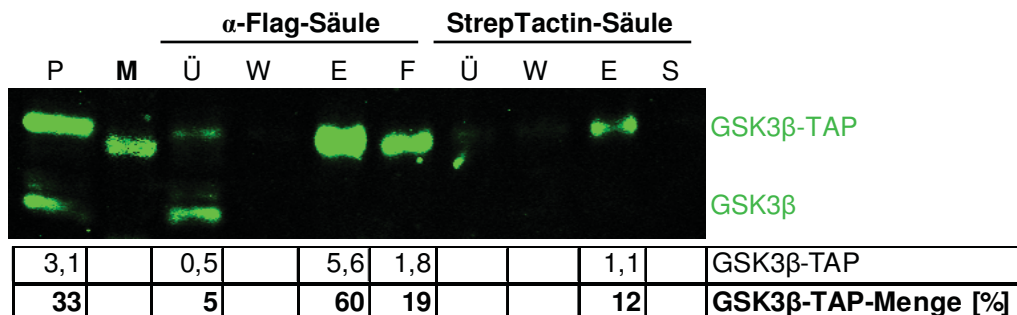


Abb. 3.4: WB-Analyse von einer GSK3β-TAP-Aufreinigung von HEK293T Zellen. Von allen Fraktionen wurden gleiche Anteile, außer vom Gesamtproteinextrakt und vom Flag-Überstand nur 1/3 des Volumens, für den WB eingesetzt. Unterhalb des WB sind die Signalintensitäten und die GSK3β-TAP-Menge in % angegeben. P: Proteinextrakt, Ü: Überstand, W: Waschfraktion, E: Eluat, F: Flag-Sepharose, S: StrepTactin-Sepharose, M: Proteingrößenstandard

Nachdem gezeigt worden war, dass sich das GSK3β-TAP-Protein mit guter Ausbeute durch die TAP reinigen lässt, wurden präparative TAPs von transient transfizierten HEK293T-Zellen durchgeführt. Parallel zum Aufschluss der transfizierten Zellen erfolgte eine Isolierung von Proteinen der gleichen Menge aus untransfizierten Zellen (WT). Die Proteine der Strep-Eluate wurden zunächst durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Silber angefärbt. Eine exemplarische Silberfärbung eines Gels ist in Abb. 3.5 dargestellt. Untransfizierte HEK293T Kontrollzellen (WT) zeigen keinen Hintergrund unspezifisch gereinigter Proteine, was die Spezifität der TAP unterstreicht. Hingegen ist bei den GSK3β-TAP transfizierten Zellen (GSK) zu sehen, dass eine Vielzahl von Proteinen mittels TAP

isoliert wurde. Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass GSK3 β -TAP wie erwartet die intensivste Bande bei ca. 55 kDa darstellte. Die koeluierten Proteine, die mögliche Bindungspartner darstellen, wurden ebenfalls analysiert und identifiziert. So wurden z.B. die Acetyl-CoA Carboxylase 1 und die ATP-Zitrat-Synthase, die als GSK3 β -Substrate bekannt sind, in dieser TAP/MS-Analyse gefunden (Hughes et al., 1992). Des Weiteren wurden auch Proteine wie Endoplasmin oder Filamin A identifiziert, die bisher nicht als GSK3 β -Interaktionspartner bekannt waren.

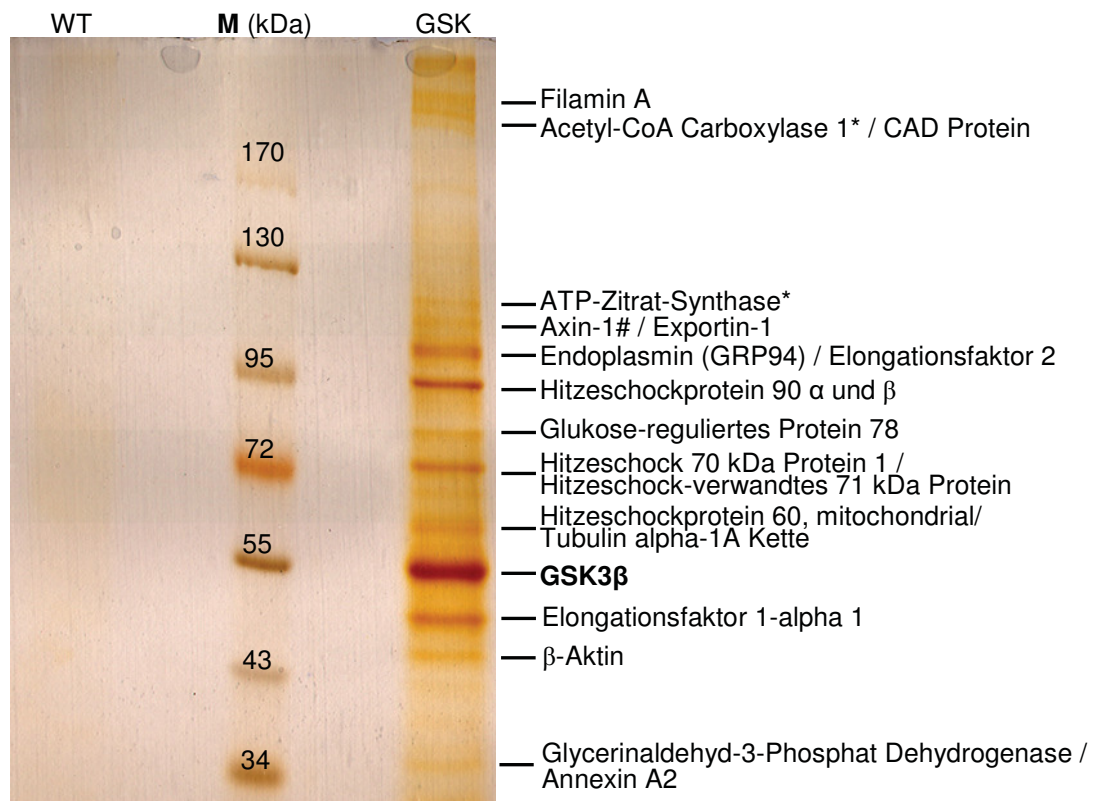


Abb. 3.5: Beispiel einer Silbergel-Analyse eines TAP-Strep-Eluats von transient transfizierten HEK293T Zellen und die Darstellung der koeluierten Proteine. # als GSK3 β -Bindungspartner und * als GSK3 β -Substrat bekannt. WT: Wildtyp-Eluat, GSK: GSK3 β -TAP-Eluat, CAD: Carbamylphosphatase Aspartattranscarbamylase Dihydroorotase, M: Proteingrößenstandard.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden vier TAP/MS-Analysen von transient transfizierten HEK293T Zellen durchgeführt. Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse der vier TAP/MS-Analysen zusammen. Es wurden nur die Proteine aufgelistet, die in mindestens zwei verschiedenen TAP/MS-Analysen und mit einer Peptidhäufigkeit (P) von wenigstens drei verschiedenen Peptiden massenspektrometrisch detektiert wurden. Proteine, die in mindestens drei unterschiedlichen TAP/MS-Analysen identifiziert wurden, sind grau unterlegt.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der TAP/MS-Ergebnisse aller vier transienten Transfektionen der HEK293T Zellen. Es wurden nur die Proteine aufgelistet, die in mindestens zwei TAP-Analysen und mit einer Peptidhäufigkeit von drei und mehr Peptiden massenspektrometrisch detektiert wurden. Zu jedem Protein sind die Identifizierungsnummer (ID-Nr.), das Molekulargewicht (MW) und die Peptidhäufigkeit (P) aufgeführt. Zusätzlich ist die prozentuale Sequenzabdeckung (%) mit der das Protein identifiziert wurde dargestellt. Die grauunterlegten Proteine wurden drei Mal oder häufiger gefunden. CAD: Carbamylphosphatase Aspartattranscarbamylase Dihydroorotase, PKA: cAMP-abhängige Proteinkinase, UE: Untereinheit, VPS13D: *Vacuolar protein sorting-associated protein 13D*. # als GSK3 β -Bindungspartner und * als GSK3 β -Substrat bekannt.

Identifiziertes Protein	ID-Nr.	MW	TAP 1		TAP 2		TAP 3		TAP 4	
			P	%	P	%	P	%	P	%
Acetyl-CoA Carboxylase 1 (ACC1)*	Q13085	265	37	18	137	42	/	/	37	26
<i>Adenomatous polyposis coli protein</i> (APC)#	P25054	312	/	/	20	8	/	/	6	6
A-Kinase-Anker-Protein 11 (AKAP11)#	Q9UKA4	210	/	/	50	23	/	/	14	10
Alanyl-tRNA Synthetase, zytoplasmatisch	P49588	107	25	25	17	16	/	/	/	/
Annexin A2	P07355	39	21	46	/	/	5	13	/	/
ATP-Zitrat-Synthase*	P53396	121	29	28	20	22	/	/	/	/
Axin-1#	O15169	96	12	17	36	28	8	11	/	/
CAD Protein	P27708	243	14	7	37	17	/	/	13	11
Catenin beta-1#	P35222	85	/	/	16	23	/	/	5	8
Catenin gamma (<i>Junction Plakoglobin</i>)	P14923	82	3	5	/	/	11	20	/	/
DNA-abhängige Proteinkinase katalytische UE	P78527	469	/	/	5	2	/	/	7	2
E3 Ubiquitin-Protein Ligase UBR5	O95071	309	/	/	296	46	/	/	45	21
Elongationsfaktor 1-alpha 1	P68104	50	36	19	4	10	/	/	14	20
Elongationsfaktor 2	P13639	95	46	51	22	25	/	/	/	/
Endoplasmin (GRP94)	P14625	92	36	38	47	37	/	/	/	/
Exportin-1	O14980	123	24	28	7	8	/	/	/	/
Filamin A	P21333	281	37	18	38	16	/	/	/	/
Glukose-reguliertes Protein 78 (GRP78)	P11021	72	46	15	83	58	21	37	45	46
Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	P16858	36	16	49	/	/	4	16	/	/
Hitzeschockprotein 60, mitochondrial	P10809	61	24	36	65	60	/	/	/	/
Hitzeschockprotein 70 (HSP70) 1	P08107	70	41	44	48	42	10	16	/	/
Hitzeschockprotein 70 (HSP70) 1L	P34931	70	25	18	39	24	/	/	/	/
Hitzeschockprotein 90 (HSP90) alpha	P07900	85	34	33	44	27	10	12	/	/
Hitzeschockprotein 90 (HSP90) beta	P08238	83	22	22	23	20	7	15	/	/
Hitzeschockprotein 90 Ko-Chaperon Cdc37	Q61081	45	4	12	/	/	/	/	6	15
Hitzeschock-verwandtes 70 kDa Protein-2	P54652	70	7	10	13	9	/	/	/	/
Hitzeschock-verwandtes 71 kDa Protein	P11142	71	30	42	57	45	21	28	/	/
PKA katalytische UE alpha	P17612	47	/	/	/	/	17	42	38	41
PKA regulatorische UE Typ I alpha	P10644	43	/	/	/	/	29	40	54	45
Protein Arginin N-Methyltransferase 5	O14744	73	4	5	11	17	16	30	/	/
Putatives Hitzeschockprotein 90-alpha A5	Q58FG0	39	26	12	8	10	/	/	/	/
Putatives Hitzeschockprotein 90-beta-3	Q58FF1	68	21	12	35	12	/	/	/	/
Stress-70 Protein, mitochondrial	P38646	74	11	21	21	25	5	10	/	/
Tubulin alpha-1A Kette	Q71U36	50	29	52	32	42	19	35	19	39
Tubulin beta Kette	P07437	50	/	/	6	16	/	/	7	11
Tubulin beta-2A Kette	Q13885	50	11	27	20	33	16	25	31	26
VPS13D	Q5THJ4	492	/	/	44	12	/	/	51	22

In den TAP-Analysen wurden insgesamt 37 mögliche GSK3 β -Bindungspartner identifiziert, von denen vier Proteine bereits als GSK3 β -Interaktionspartner bekannt sind. Dazu zählen Axin-1, *Adenomatous polyposis coli protein* (APC), Catenin beta-1 und A-Kinase-Anker-

Protein 11 (AKAP11). Die Identifikation dieser Proteine stellt somit eine Positivkontrolle für die angewendete TAP-Methode dar. Im Wnt-Signalweg bilden GSK3 β , Axin-1, APC und Catenin beta-1 einen Komplex (Logan and Nusse, 2004). Über AKAP11 kann PKA (Typ II) mit GSK3 β inaktivieren (Tanji et al., 2002; Li et al., 2000). Des Weiteren wurde auch ein bereits bekanntes GSK3 β -Substrat, die Acetyl-CoA Carboxylase 1 (ACC1), hier als möglicher GSK3 β -Interaktionspartner in drei verschiedenen TAPs identifiziert. *In vitro* inaktiviert die GSK3 β durch Phosphorylierung die ACC1 (Hughes et al., 1992). Interessanterweise wurden aber auch zahlreiche neue Proteine identifiziert, die bis heute nicht als Interaktionspartner von GSK3 β bekannt waren. Dazu zählen z.B. der Elongationsfaktor 1-alpha 1, Filamin A, Glukose-reguliertes Protein 78, die Protein-Arginin-N-Methyltransferase 5 und die beiden Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinase A I α (PKA I α : regulatorische Untereinheit Typ I alpha und katalytische Untereinheit alpha).

3.2 TAP/MS-Analyse stabil exprimierender GSK3 β -TAP HEK293T und GSK3 β -TAP HL-1 Zellen

3.2.1 Austausch des SFFV Promotors gegen den CAG Promotor zur stabilen GSK3 β -TAP-Expression in HEK293T und HL-1 Zellen

Da bei der transienten Transfektion in der Regel eine große Zahl von Plasmiden in die Zelle gelangt, kommt es häufig zu einer starken Überexpression des rekombinanten Proteins. Dadurch könnte es zu Proteinbindungen kommen, die unter physiologischen Bedingungen nicht auftreten würden. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Untersuchungen stabil transfizierte Zelllinien erzeugt, die das GSK3 β -TAP-Protein nach Integration des Transgens in das Genom exprimierten. Neben den HEK293T Zellen wurde ein zweiter Zelltyp, die Kardiomyozyten Zelllinie HL-1, mit in die Untersuchungen einbezogen, da GSK3 β auch eine wichtige Rolle im Herzen spielt. An den HL-1 Zellen sollte analysiert werden, ob sich hier vergleichbare Interaktionspartner von GSK3 β wie in den HEK293T Zellen identifizieren lassen. Diese Zielsetzung erforderte folgende Maßnahmen: 1) Die transiente Transfektion wurde auf eine stabile lentivirale Infektion umgestellt, da sich in die Kardiomyozyten die Plasmid-DNA nicht wie in die HEK293T Zellen problemlos mittels transients Transfektion einbringen lässt. 2) Da der bisher verwendete SFFV (*spleen focus-forming virus*) -Promotor in Kardiomyozyten fast nicht aktiv ist, wurde dieser gegen den CAG-Promoter (CAGGS, besteht aus Cytomegalovirus-Enhancer, dem Hühner β -Aktin Promotor und dem Kaninchen β -Globin poly-A Signal; Niwa et al., 1991) ausgetauscht. Die Verwendung des etwas stärkeren CAG-

Promotors war auch notwendig, da die GSK3 β -TAP-Expression bei einer stabilen im Vergleich zu einer transienten Transfektion aufgrund der sehr geringen Plasmid-DNA-Kopienzahl vermutlich weit unter den physiologischen Bedingungen liegen würde. 3) Zur Selektion einer stabilen Integration wurde das Puromycin-Resistenzgen als Selektionsmarker eingefügt.

Für die Klonierung des CAG-Promotors und des Puromycin-Resistenzgens wurde als Ausgangsvektor pGJ3-CARP-C-Puro (Naguib, 2009; Abb. 3.6 A) und als Zielvektor pGJ3-S-GSK3 β -TAP (Abb. 3.6 B) verwendet. Im ersten Klonierungsschritt wurde der CAG-Promotor über die Restriktionsschnittstellen NotI und SmaI aus dem pGJ3-CARP-C-Puro ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in den pGJ3-S-GSK3 β -TAP eingefügt. Der auf diese Weise entstandene Vektor wurde als pGJ3-Ü-GSK3 β -TAP bezeichnet (Ü für Übergangsplasmid; Abb. 3.6 C). Im zweiten Klonierungsschritt erfolgte die Exzision des Puromycin-Resistenzgens mit dem Phosphoglyceratkinase (PGK) -Promotor aus dem Plasmid pGJ3-CARP-C-Puro über die Restriktionsschnittstellen FspI und NheI. Zur Integration dieses Fragments in den pGJ3-Ü-GSK3 β -TAP wurden die gleichen Schnittstellen verwendet (jetzt: pGJ3-C-GSK3 β -TAP, C für CAG-Promotor; Abb. 3.6 D). In der Abb. 3.6 E ist die diagnostische Restriktionsanalyse der Ausgangsvektoren pGJ3-CARP-C-Puro, pGJ3-S-GSK3 β -TAP, des Übergangsplasmids pGJ3-Ü-GSK3 β -TAP und des Endprodukts pGJ3-C-GSK3 β -TAP mit dem Restriktionsenzym SpeI dargestellt. Die korrekte Nukleotidsequenz der fusionierten kodierenden Region des pGJ3-C-GSK3 β -TAP wurde mittels Sequenzierung überprüft (nicht gezeigt).

Bevor das neu entstandene Plasmid pGJ3-C-GSK3 β -TAP stabil in die HEK293T und HL-1 Zellen eingebracht wurde, erfolgte erst eine Untersuchung der Expression und Phosphorylierbarkeit des rekombinanten Proteins mittels einer transienten Transfektion. Hierbei sollte das GSK3 β -TAP, unter der Kontrolle des stärkeren CAG-Promotors unter transienten Bedingungen, eine gesteigerte Expression zeigen. Diese Steigerung ist bei der späteren stabilen Transfektion, aufgrund von niedrigerer Kopienzahl, nicht mehr zu erwarten. Für diese Analyse wurden HEK293T Zellen mit dem neuen Plasmid (C-GSK) und als Kontrolle mit dem Ausgangsvektor pGJ3-S-GSK3 β -TAP (S-GSK) transient transfiziert. Mit einem WB wurde die Expression mit einem Antikörper gegen GSK3 β (rot) und die Phosphorylierbarkeit mit einem Antikörper gegen die GSK3 β -Ser9-Phosphorylierung (PGSK3 β , grün) überprüft (siehe Abb. 3.7).

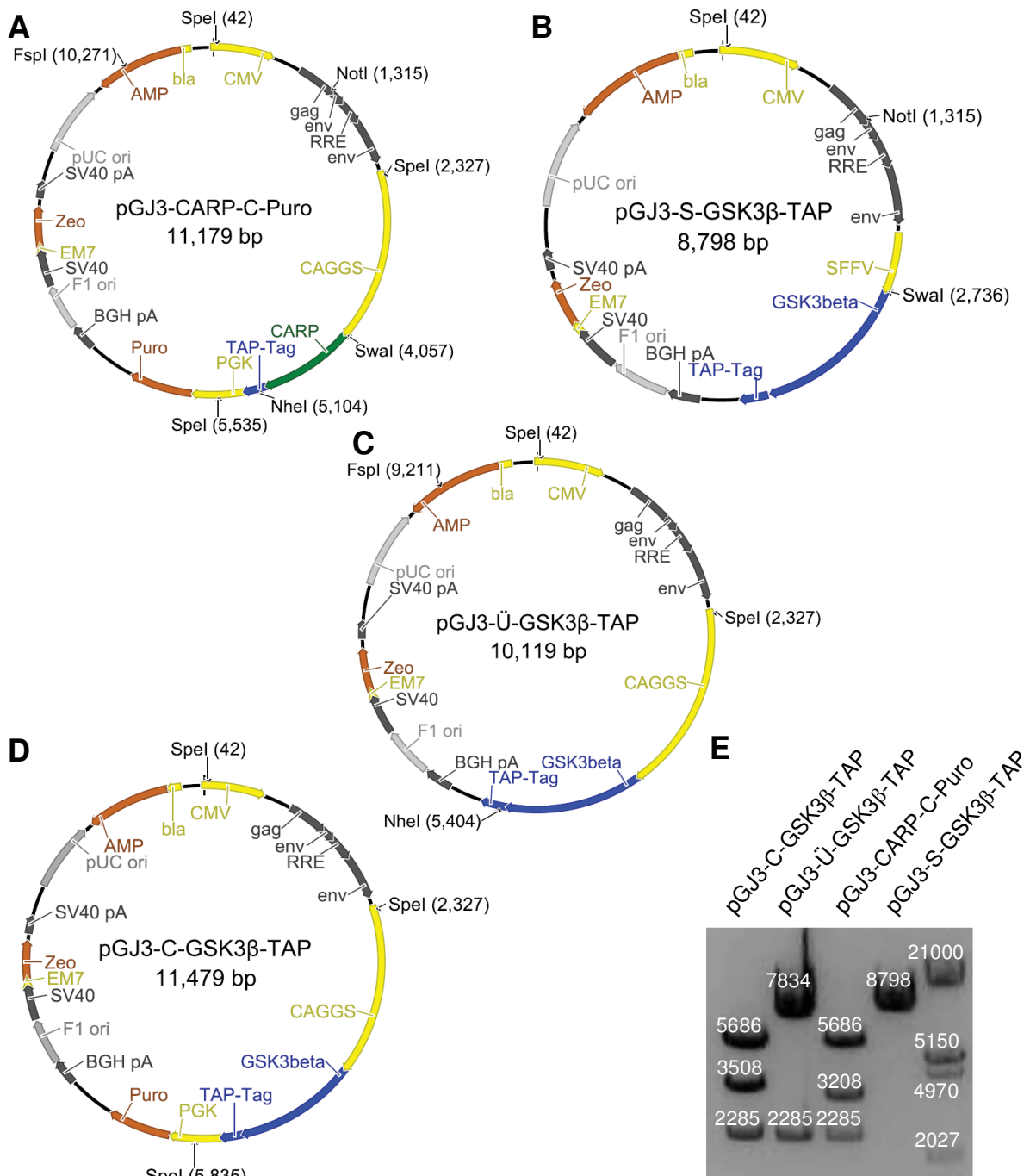


Abb. 3.6: Klonierung des pGJ3-C-GSK3 β -TAP und dessen diagnostische Restriktionsanalyse. Im ersten Klonierungsschritt wurde der CAG-Promotor (CAGGS) über NotI und SwaI aus dem pGJ3-CARP-C-Puro (Naguib, 2009; A) ausgeschnitten und über diese Schnittstellen in den pGJ3-S-GSK3 β -TAP (B) eingebracht (jetzt: pGJ3-Ü-GSK3 β -TAP; C). Im zweiten Schritt wurde das Puromycin-Gen mit dem dazugehörigen Phosphoglycerat (PGK)-Promotor über NheI und FspI aus dem pGJ3-CARP-C-Puro (A) herausgeschnitten und ebenfalls über diese Schnittstellen in den pGJ3-Ü-GSK3 β -TAP eingesetzt (jetzt: pGJ3-C-GSK3 β -TAP, C für CAG-Promotor). D) Struktur des pGJ3-C-GSK3 β -TAP Plasmids, das für die Produktion von lentiviralen Partikeln genutzt wurde. Die Abkürzungen und Farbkodierungen der Plasmide sind in Abb. 2.1 erläutert. E) Diagnostische Restriktionsanalyse mit SpeI von den Ausgangsvektoren pGJ3-CARP-C-Puro (A; erwartete Fragmentgrößen: 5686 bp, 3208 bp, 2285 bp) und pGJ3-S-GSK3 β -TAP (B; erwartete Bande: 8798 bp), dem Übergangsplasmid pGJ3-Ü-GSK3 β -TAP (C; erwartete Fragmentgrößen: 7834 bp, 2285 bp) und dem entstandenen pGJ3-C-GSK3 β -TAP (D; erwartete Banden: 5686 bp, 3508 bp, 2285 bp). Rechts ist der Größenstandard λ -EcoRI/HindIII zu sehen.

In WT-Zellen, wie auch in S-GSK und C-GSK transfizierten Zellen, ist im roten Kanal ein Signal für die endogene GSK3 β zu sehen. Für S-GSK zeigt sich das Zusatzsignal für GSK3 β -TAP und für C-GSK ist ebenfalls ein etwas stärkeres Signal auf derselben Höhe zu erkennen. Außer dem Signal für das endogene und das rekombinante GSK3 β -Protein sind für C-GSK noch zwei weitere Signale (zwischen GSK3 β -TAP/GSK3 β und unterhalb von GSK3 β) sichtbar. Im grünen Kanal (PGSK3 β) sind für die WT-Zellen ein Signal, für die S-GSK transfizierten zwei und für die C-GSK transfizierten Zellen vier Signale zu sehen. Somit zeigen die zuvor detektierten GSK3 β -, GSK3 β -TAP-Signale und auch die Zusatzbanden eine Ser9-Phosphorylierung. Folglich bestätigt die WB-Analyse, dass durch den Promotorwechsel (SFFV zu CAG) die GSK3 β -TAP-Expression gesteigert wurde und die bestehende Phosphorylierbarkeit nicht beeinflusst wurde. Jedoch lassen die Zusatzsignale für C-GSK auf eine C-terminale Degradation des rekombinanten GSK3 β -Proteins schließen, da sie vom Antikörper gegen die Ser9-Phosphorylierung erkannt wurden. Vermutlich ist die starke GSK3 β -TAP-Überexpression (vgl. endogenes und rekombinantes GSK3 β -Signal), die durch die transiente Transfektion und den CAG-Promotor verursacht wurde, für die Instabilität verantwortlich.

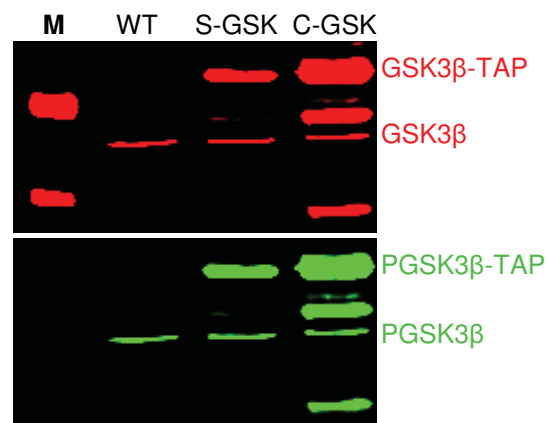


Abb. 3.7: WB-Analyse der transienten Transfektion von pGJ3-S-GSK3 β -TAP (S-GSK) und pGJ3-C-GSK3 β -TAP (C-GSK). Die Analyse erfolgte mit den Antikörpern gegen GSK3 β (rot) und gegen GSK3 β -Ser9-Phosphorylierung (PGSK3 β , grün). M: Proteingrößenstandard, WT: Wildtyp.

In weiteren Analysen wurde die Expression der GSK3 β -TAP-Proteine nach Integration der lentiviralen Vektoren (pGJ3-C-GSK3 β -TAP) in die genomische DNA in HEK293T und murinen Kardiomyozyten (HL-1) untersucht.

Die WB-Analyse ergab, dass nach lentiviraler Transfektion das GSK3 β -TAP-Protein sowohl in HEK293T (Abb. 3.8, linker WB) als auch in HL-1 Kardiomyozyten (Abb. 3.8, rechter WB) exprimiert werden. Dabei entspricht das Expressionsniveau in etwa dem der endogenen GSK3 β (vgl. GSK3 β -TAP- mit GSK3 β -Signale im roten Kanal). Die Untersuchung der Ser9-

Phosphorylierung (grüner Kanal) zeigt, dass ebenso wie bei den transienten Transfektionen, die getaggte GSK3 β phosphoryliert wird (vgl. Abb. 3.7).

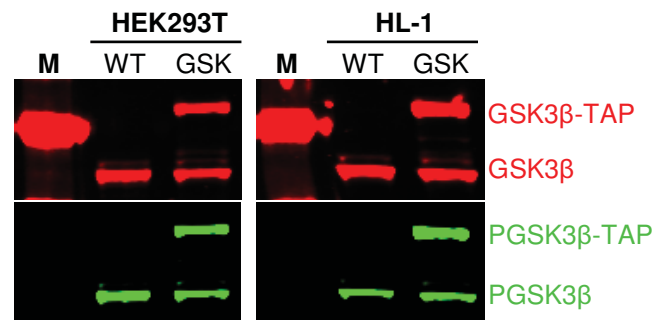


Abb. 3.8: WB-Analyse der stabil transfizierten HEK293T und HL-1 Zellen mit pGJ3-C-GSK3 β -TAP nach erfolgreicher Puromyzynelektion. Die WBs wurden mit den Antikörpern gegen GSK3 β (rot) und gegen GSK3 β -Ser9-Phosphorylierung (PGSK3 β , grün) umgesetzt. M: Proteingrößenstandard, WT: Wildtyp, GSK: GSK3 β -TAP.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch den Promotorwechsel und die stabile Transfektion das gewünschte physiologische Expressionsniveau erreicht wurde.

3.2.2 Regulation des GSK3 β -TAP-Proteins

Für eine spätere TAP/MS-Analyse der GSK3 β -Bindungspartner in Abhängigkeit der GSK3 β -Aktivität wurde untersucht, ob das rekombinante wie das endogene GSK3 β -Protein über den PI3K/AKT-Signalweg reguliert werden kann. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden die stabilen HEK293T-GSK3 β -TAP Zellen entweder mit LY294002 (PI3-Kinase Inhibitor) oder mit Insulin bzw. IGF-1 behandelt. LY294002 sollte durch Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs zu einer weniger stark phosphorylierten und somit aktiveren GSK3 β führen. Im Gegensatz dazu induziert Insulin bzw. IGF-1 über ihre Rezeptoren den PI3K/AKT-Signalweg. Dadurch sollte GSK3 β verstärkt durch AKT phosphoryliert und somit inaktiviert werden (siehe Einleitung Abb. 1.4).

Die Zellen wurden mit LY294002 für 1 h (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M), mit Insulin (72 nM, 216 nM, 432 nM) oder IGF-1 (25 nM, 50 nM, 100 nM) für 10 min unter Serumentzug inkubiert. Anschließend wurden die Proteinextrakte der Zellen im WB mit den Antikörpern gegen GSK3 β (rot) und gegen die Ser9-Phosphorylierung (PGSK3 β ; grün) analysiert (Abb. 3.9). Zur Quantifizierung der Effekte wurde der Phosphorylierungsgrad (Signalintensität PGSK3 β / Signalintensität GSK3 β) bestimmt. Die Quotienten wurden auf die Werte der Ausgangszellen (Serumentzug, SE) normiert.

Abb. 3.9 zeigt die Expression der GSK3 β -Proteine (rot), sowie das dazugehörige Phosphorylierungssignal (grün) nach Behandlung der Zellen. Im Vergleich zur parallel

behandelten Kontrollkultur, die nur durch Serumentzug (SE) vorbereitet wurde, führt die LY294002-Behandlung bei allen eingesetzten Konzentrationen zu einer Reduktion des Phosphorylierungssignals sowohl für das endogene als auch für das rekombinante GSK3 β -Protein (ca. 20 % Restintensität). Hingegen sind bei der Insulin- bzw. IGF-Behandlung die PGSK3 β -Signale bei allen verwendeten Konzentrationen nur schwach verstärkt. Mit dem Einsatz von 432 nM Insulin bzw. 25 nM IGF-1 wurde PGSK3 β auf 130 % bzw. auf 139 % gesteigert. Für das rekombinante GSK3 β -Protein zeigte sich ein ähnlicher Phosphorylierungsanstieg auf 134 % für Insulin und 142 % für IGF-1. Mit diesem Ergebnis wurde gezeigt, dass das rekombinante wie das endogene GSK3 β -Protein über die Initiierung des PI3K/AKT-Signalweg durch Phosphorylierung gesteuert werden kann. Für beide Kinasen wurde jedoch keine vollständige GSK3 β -Dephosphorylierung erreicht. Die Phosphorylierung der GSK3 β konnte durch Insulin bzw. IGF-1 nur mäßig gesteigert werden.

Es ist also nicht möglich, die Ser9-Phosphorylierung von GSK3 β bzw. GSK3 β -TAP vollständig durch die Modulation des PI3K/AKT-Signalweges zu regulieren. Dies liegt vermutlich daran, dass die GSK3 β -Aktivität auch über die anderen Signalwege wie beispielsweise den MAPK/MAPKAP-K1 oder PLC/PKC Signalweg gesteuert wird (siehe Einleitung Abb. 1.4).

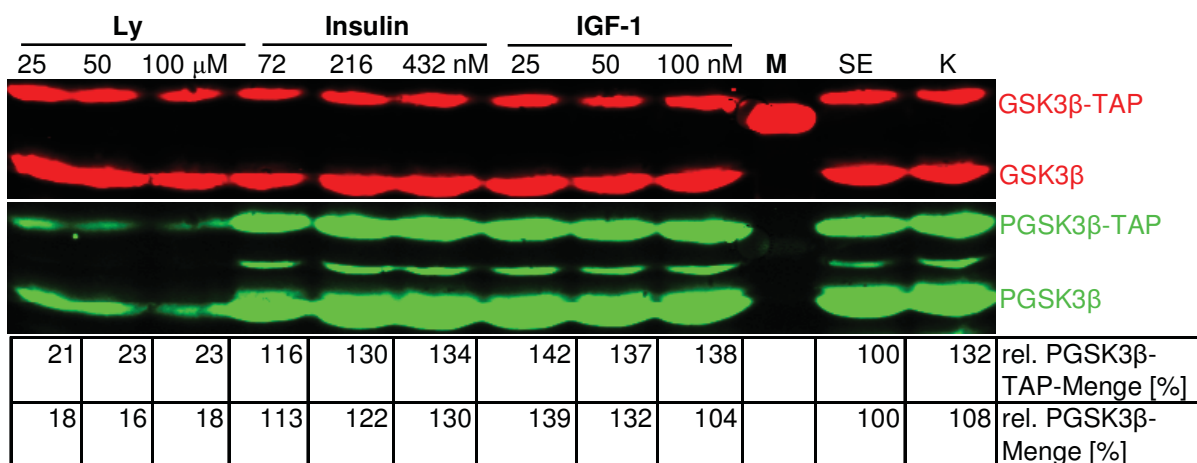


Abb. 3.9: WB-Analyse der stabilen GSK3 β -TAP HEK293T-Zellen nach Stimulation mit LY294002 (1 h) und Inhibition mit Insulin oder IGF-1 (10 min). Die Zellen wurden mit jeweils drei verschiedenen Konzentrationen behandelt und die Zelllysate mit einem WB analysiert (α -GSK3 β (rot) und α -PGSK3 β (Ser9-Phosphorylierung; grün)). Für die Bestimmung des GSK3 β -Phosphorylierungsgrades (relative PGSK3 β -Menge) wurden die PGSK3 β - durch die GSK3 β -Signale dividiert. Das Verhältnis der Serumentzugskontrolle (SE) wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte auf diesen bezogen. Die gleiche Berechnung wurde für die relative PGSK3 β -TAP-Menge durchgeführt. Ly: LY294002, K: Kontrollzellen, rel.: relative, M: Proteingrößenstandard.

3.2.3 Generierung einer konstitutiv aktiven und einer inaktiven GSK3 β -Mutante

Da sich die GSK3 β -Aktivierung bzw. -Inaktivierung mit LY294002 bzw. Insulin/IGF-1 nicht als effizient erwies, wurden konstitutiv aktive und inaktive GSK3 β -Mutanten generiert. Diese

Mutanten sollten es erlauben, die Bildung von GSK3 β -assoziierten Proteinkomplexen in Abhängigkeit von der GSK3 β -Aktivität zu untersuchen.

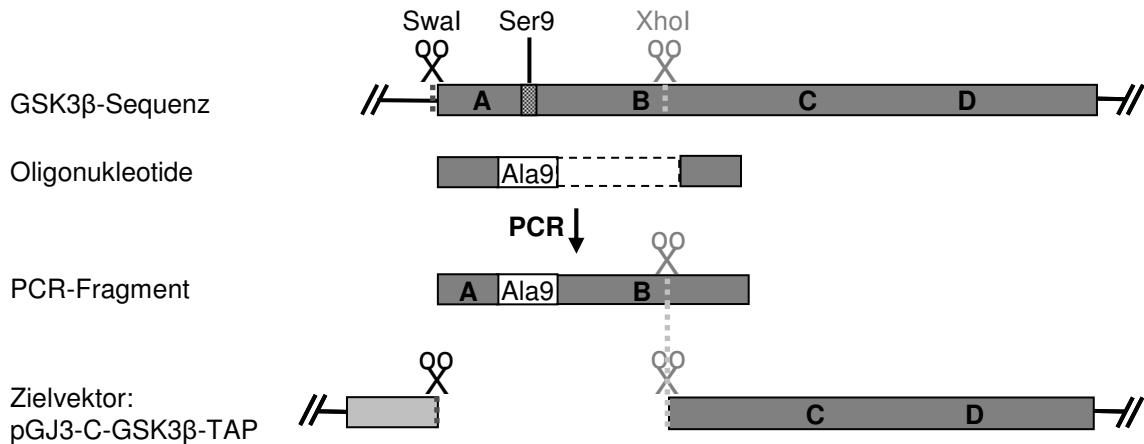
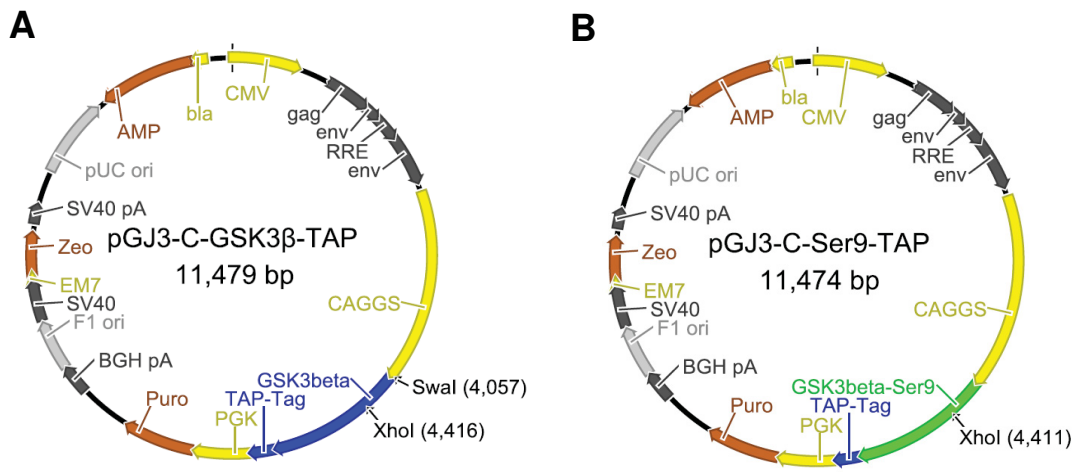


Abb. 3.10: Klonierungsschema zur Herstellung des pGJ3-C-Ser9-TAP. Es wurden Oligonukleotide verwendet, bei denen das vorwärts Oligonukleotid den Basenaustausch für die Ser9-Mutation und das rückwärts Oligonukleotid die XhoI Restriktionsschnittstelle trugen. Das mit XhoI geschnittene Ala 9-PCR-Fragment wurde in den mit SwaI und XhoI geöffneten pGJ3-C-GSK3 β -TAP eingebracht und gegen die entsprechende Ser9-Sequenz ausgetauscht. Die grauen Balken symbolisieren das GSK3 β Gen (A-D).

Die Aktivität der GSK3 β wird über die Phosphorylierung von Ser9 gehemmt. Durch einen Aminosäuren- (AS) Austausch von Ser9 zu Ala9 (Alanin 9), kann die GSK3 β nicht mehr phosphoryliert werden und würde somit konstitutiv in der aktiven Form vorliegen (Eldar-Finkelman et al., 1996).



C

AS-Position:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GSK3β DNA-Sequenz:	ATG	TCG	GGG	CGA	CCG	AGA	ACC	ACC	TCC	TTT
GSK3β AS-Sequenz:	M	S	G	R	P	R	T	T	S	F
Ser9 DNA-Sequenz:	ATG	TCG	GGG	CGA	CCG	AGA	ACC	ACC	GCC	TTT
Ser9 AS-Sequenz:	M	S	G	R	P	R	T	T	A	F

Abb. 3.11: Schematische Darstellung des pGJ3-C-GSK3 β -TAP (A), des pGJ3-C-Ser9-TAP (B) und der Ser9-Sequenz (C). Die Abkürzungen und Farbkodierungen der Plasmide sind in Abb. 2.1 erläutert. In C ist DNA- und AS-Ausgangssequenz von GSK3 β und die mutierte DNA- und AS-Zielssequenz von Ser9 (grün) abgebildet. AS: Aminosäure.

Für die Ser9-Mutation erfolgte der Basenaustausch von TCC (Ser9) zu GCC (Ala9) mit einer PCR am pGJ3-C-GSK3 β -TAP. Diese PCR wurde mit einem vorwärts gerichteten Oligonukleotid durchgeführt, das den Basenaustausch trug und zu der Restriktionsschnittstelle SmaI des pGJ3-C-GSK3 β -TAP benachbart war. Das rückwärts gerichtete Oligonukleotid trug eine Restriktionsschnittstelle für XhoI (siehe Klonierungsschema Abb. 3.10). Nach Amplifikation wurde das Fragment mit der Ala9-Mutation mit der Restriktionsschnittstelle XhoI geschnitten und mit dem zuvor über SmaI und XhoI geöffneten pGJ3-C-GSK3 β -TAP fusioniert. Der resultierende Vektor wurde pGJ3-C-Ser9-TAP genannt.

In Abb. 3.11 sind der Ausgangsvektor pGJ3-C-GSK3 β -TAP (**A**) und das entstandene Plasmid pGJ3-C-Ser9-TAP (**B**) schematisch dargestellt. Der Nukleotidaustausch für die Ser9-Mutation und die fusionierten kodierenden Regionen wurden mittels Sequenzanalyse bestätigt. In **C** ist der wichtige DNA- und AS-Sequenzausschnitt der GSK3 β -Ausgangssequenz und der korrekten Ser9-Mutation dargestellt.

Um eine defekte GSK3 β -Mutante (Kinase inaktiv: KI) zu erzeugen, wurden beide Lysine (K) 85 und 86 der ATP-bindenden Domäne durch Alanine ausgetauscht (K85,86 \rightarrow A85,86). Die Konsensussequenz von Proteinkinasen enthält in der ATP-Bindungsstelle das Motiv: GxGxxG -16 x- K (x: beliebige Aminosäure). Dabei stellt Lysin (K) einen essentiellen Bestandteil einer funktionstüchtigen Kinase dar, denn diese Aminosäure ist direkt an der Phosphattransferreaktion beteiligt (siehe Hanks et al., 1995). Bei der GSK3 β befindet sich im Konsensusbereich an Position 85 und 86 ein Lysin (K85,86).

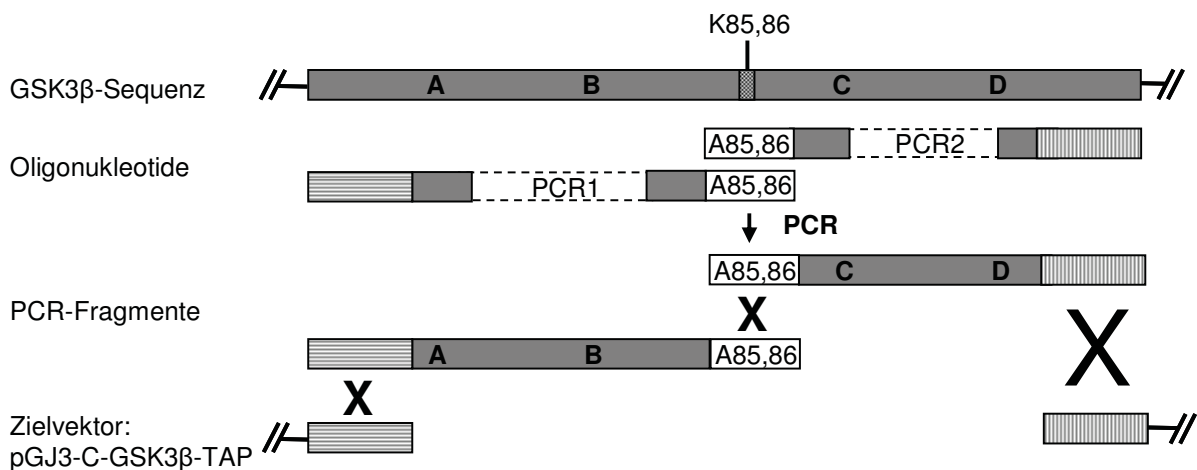


Abb. 3.12: Klonierungsschema zur Herstellung des pGJ3-C-KI-TAP. Es wurden Oligonukleotide verwendet, die einerseits in ihren homologen Bereichen die KI-Mutation (A85,86) beinhalteten und andererseits eine Homologie zur Vektorsequenz trugen. Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden durch das *In-Fusion* Enzym über homologe Rekombination in den geöffneten Zielvektor integriert. Die gestreiften Balken symbolisieren die homologen Sequenzbereiche des Vektors und die grauen Balken (A-D) stellen das GSK3 β -Gen dar.

Für die Erzeugung der KI-Mutante wurde das *In-Fusion* PCR Klonierungssystem (Clontech) verwendet (siehe Kapitel 2.8.1.2). Als Ausgangs- und Zielvektor diente der Vektor pGJ3-C-GSK3 β -TAP. Für die KI-Mutation wurden zwei PCR-Fragmente amplifiziert, die im Bereich der gewünschten Mutation überlappen. Hierbei tragen die Oligonukleotide die entsprechenden Basenaustausche (siehe Abb. 3.12). Die flankierenden Oligonukleotide waren so gewählt, dass sie ihrerseits um 13 Basen mit den Enden des mit *Swa*I und *Eco*RI geöffneten Plasmids pGJ3-C-GSK3 β -TAP überlappen. Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden über eine 3-Fragment-Homologe Rekombination mit Hilfe des *In-Fusion* Enzyms in den zuvor mit *Swa*I und *Eco*RI geöffneten Zielvektor eingebracht. Dieser neu entstandene Vektor wurde pGJ3-C-KI-TAP genannt.

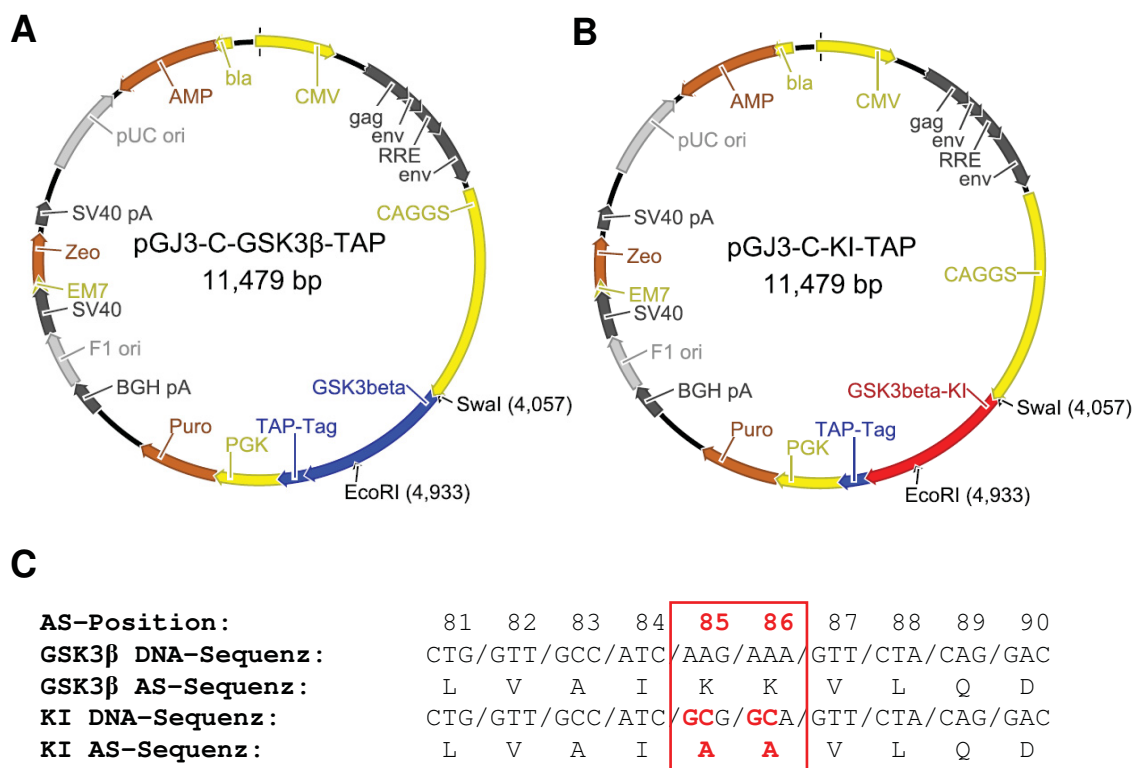


Abb. 3.13: Schematische Darstellung des pGJ3-C-GSK3 β -TAP (A), des pGJ3-C-KI-TAP (B) und der Kinase-Inaktiv (KI) -Sequenz (C). Die Abkürzungen und Farbkodierungen der Plasmide sind in Abb. 2.1 aufgeführt. Die DNA- und AS-Ausgangssequenz von GSK3 β und die mutierte DNA- und AS-Zielsequenz der KI-Mutante (rot) ist in C dargestellt.

Der Ausgangsvektor pGJ3-C-GSK3 β -TAP (A) und der entstandene pGJ3-C-KI-TAP (B) sind in Abb. 3.13 schematisch zu sehen. Für die Überprüfung des Nukleotidaustausches wurde eine Sequenzanalyse der mutierten Region und den rekombinierten kodierenden Sequenzen durchgeführt. Der essentielle DNA- und AS-Sequenzausschnitt der GSK3 β -Ausgangssequenz und der KI-Mutation ist in C abgebildet.

3.2.4 Vergleichende Charakterisierung der GSK3 β -Mutanten in transgenen HEK293T und HL-1 Zellen

Durch lentivirale Transfektion wurden HEK293T und HL-1 Zelllinie erzeugt, die die GSK3 β -TAP-Mutanten (GSK3 β -Ser9-TAP (Ser9) und GSK3 β -KI-TAP (KI)) und GSK3 β -TAP (nicht mutiert) stabil exprimieren.

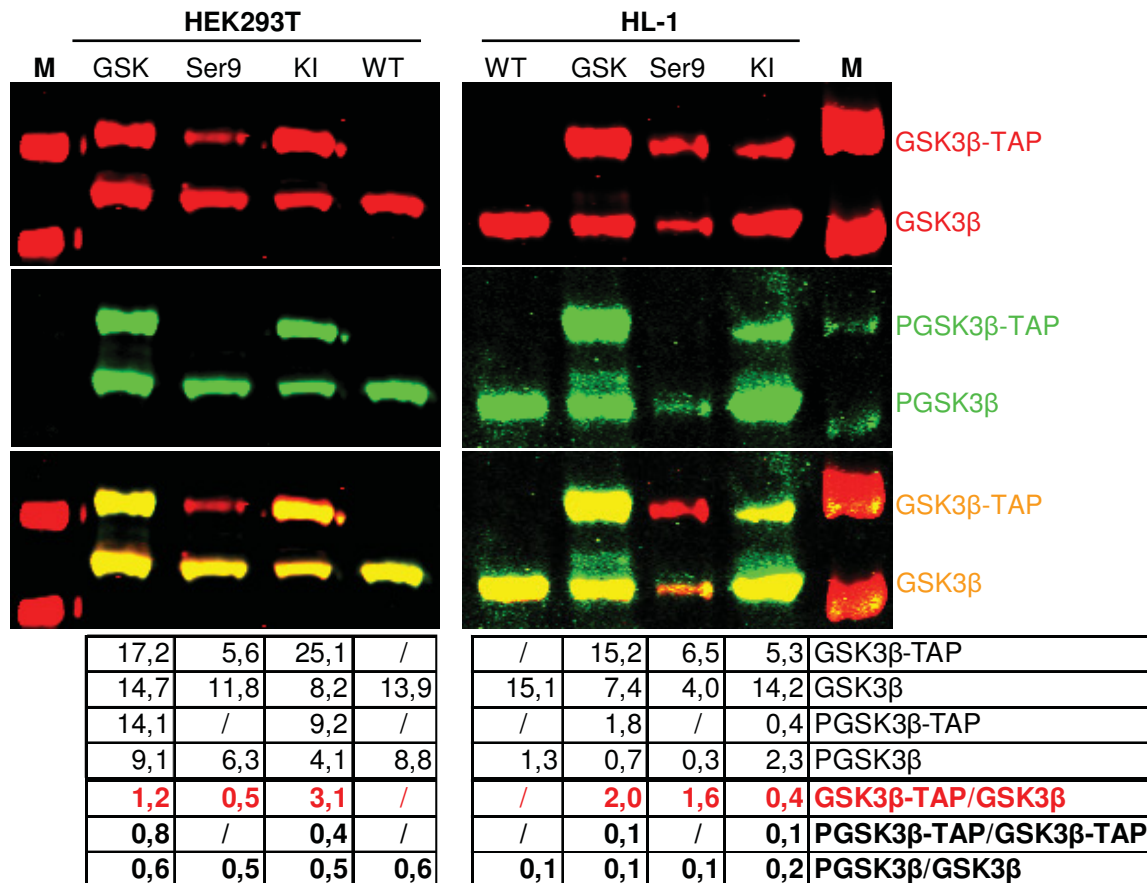


Abb. 3.14: WB-Analyse der stabil exprimierenden GSK3 β -TAP HEK293T und HL-1 Zellen. Diese wurde mit den Antikörpern gegen GSK3 β (rot) und gegen GSK3 β -Ser9-Phosphorylierung (PGSK3 β , grün) durchgeführt. In gelb ist das Fusionsbild dargestellt. Unter der WB-Analyse sind die jeweiligen Intensitäten der Signale, das relative Expressionsniveau der rekombinanten GSK3 β -TAP im Verhältnis zum endogenen GSK3 β (**GSK3 β -TAP/GSK3 β**), sowie die Berechnung des Phosphorylierungsgrades (**PGSK3 β /GSK3 β** bzw. **PGSK3 β -TAP/GSK3 β -TAP**) aufgeführt. M: Proteingrößenstandard, WT: Wildtyp, GSK: GSK3 β -TAP, Ser9: GSK3 β -Ser9-TAP, KI: GSK3 β -KI-TAP.

Der WB in Abb. 3.14 zeigt das Ergebnis der Expressionsanalyse (roter Kanal). Sowohl die Ser9- als auch die KI-Mutante wurde in den HEK293T bzw. HL-1 Zellen exprimiert, allerdings zeigten sich quantitative Unterschiede (vgl. unter dem WB angegebene Signalintensitäten). Normierung auf die endogene GSK3 β ergab (**GSK3 β -TAP/GSK3 β**), dass in den HEK293T Zellen das GSK3 β -TAP-Protein fast im Verhältnis 1:1 gebildet wird. Hingegen beträgt das Expressionsniveau des Ser9-Proteins 50 % und des KI-Proteins 300 % des endogenen GSK3 β -Proteins. In HL-1 Zellen ist das Proteinniveau des GSK3 β -TAP-

Proteins 200 %, des Ser9-Proteins 160 % und des KI-Proteins 50 % im Vergleich zum endogenen GSK3 β -Protein.

Die Analyse der Ser9-Phosphorylierung (grüner Kanal) zeigte, dass die Ser9-Mutante wie erwartet nicht mehr phosphoryliert werden kann. Sowohl in den HEK293T als auch in den HL-1 Zellen wurde kein Phosphorylierungssignal des GSK3 β -Ser9-TAP Proteins nachgewiesen (vgl. auch Fusionsbild (gelb)). Dagegen wurden für alle anderen rekombinanten Proteine Phosphorylierungssignale detektiert. Der Phosphorylierungsgrad (PGSK3 β -TAP/GSK3 β) der rekombinanten Proteine (nur GSK3 β -TAP und KI-Mutante) entsprach dabei in etwa dem der endogenen GSK3 β , so dass die getaggtten Proteine ähnlich wie die endogene GSK3 β einer Regulation durch Phosphorylierung unterworfen zu sein scheinen.

3.2.5 Analyse der Kinaseaktivität der aktiven (Ser9) und der inaktiven GSK3 β -TAP-Mutante (KI)

In weiteren Untersuchungen wurde die Kinaseaktivität der exprimierten GSK3 β -TAP-Varianten analysiert. Hierzu wurde mit den stabil exprimierenden Ser9- und KI-HEK293T Zellen ein Kinaseaktivitäts-Assay durchgeführt. Die GSK3 β -TAP-HEK293T Zellen, die das nicht mutierte GSK3 β -Fusionsprotein bilden, sowie untransfizierte Wildtypzellen wurden als Kontrollen eingesetzt.

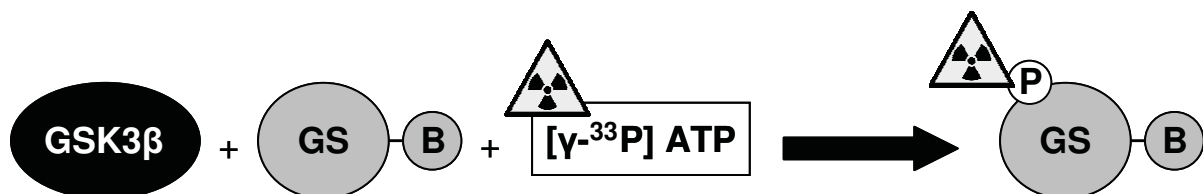


Abb. 3.15: Schematische Darstellung der GSK3 β -Kinaseaktivitätsanalyse. GSK3 β steht für die verschiedenen GSK3 β -Fusionsproteine. GS: Glykogensynthasepeptid, B: Biotin, P: Phosphat

Für die Kinaseaktivitätsanalyse wurden die GSK3 β -Fusionsproteine zunächst mit α -Flag-Sepharose aus dem Proteinextrakt der rekombinanten Zellen isoliert. Anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Proteine durch proteolytische Spaltung an den Thrombinschnittstellen des TAP-Tags mit Thrombin (vgl. Abb. 2.2). Diese erlaubte unter anderem den TAP-Tag, der sonst die spätere StrepTactin-Aufreinigung des GSK3 β -Substrats stören würde, zu entfernen. Um die Effizienz der GSK3 β -TAP-Aufreinigung zu ermitteln, wurde mit einem Teil der Probe (1/10) eine WB-Analyse mit einem Antikörper gegen GSK3 β (grün) durchgeführt. Die restliche Probe des isolierten GSK3 β -TAP-Proteins wurde zusammen mit einem GSK3 β -Substratpeptid und mit radioaktivem ATP ($[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP) für 0, 10 und 20 min inkubiert (siehe Abb. 3.15). Hierbei wurde die GSK3 β -Kinaseaktivität anhand

des Einbaus von radioaktivem Phosphat in das Substratpeptid gemessen. Für diesen Assay wurden biotinylierte Glykogensynthasepeptide (GS) als GSK3 β -Substratpeptid eingesetzt. Über das gekoppelte Biotin wurden die Peptide an StrepTactin-Sepharose gebunden, das überschüssige radioaktive ATP durch Waschen entfernt und die eingebaute Radioaktivität gemessen. Die Normierung der Messergebnisse erfolgte über die Mengenbestimmung des jeweiligen aufgereinigten GSK3 β -TAP-Proteins mittels WB-Quantifizierung (Abb. 3.16 A).

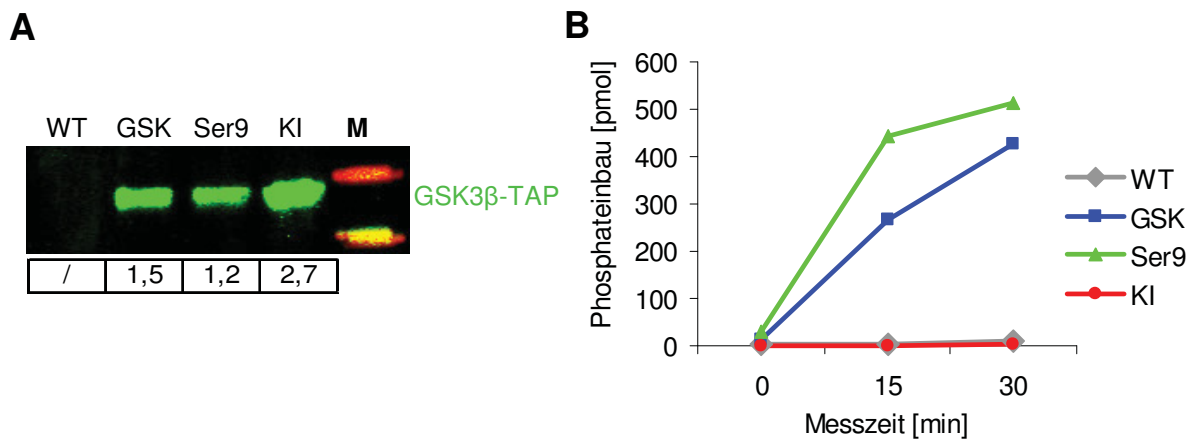


Abb. 3.16: A) WB-Analyse der aufgereinigten GSK3 β -Proteine. Diese wurde mit dem Antikörper gegen GSK3 β (grün) durchgeführt. Unter der WB-Analyse sind die jeweiligen Intensitäten der Signale aufgeführt. M: Größenstandard **B) Messung der katalytischen Kinaseaktivität der Ser9- und KI-Mutante.** Die Messergebnisse wurden auf die aufgereinigte Ser9-Proteinmenge der WB-Analyse normiert. In pmol ist die eingebaute Phosphatmenge und in min sind die Messzeitpunkte angegeben. WT: Wildtyp, GSK: GSK: GSK3 β -TAP, Ser9: GSK3 β -Ser9-TAP, KI: GSK3 β -KI-TAP.

Die WB-Analyse der aufgereinigten GSK3 β -Fusionsproteine und die dazugehörige Quantifizierung ist in Abb. 3.16 A dargestellt. Es ist zu sehen, dass nur die rekombinanten Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollzellen (WT) ein Signal für das GSK3 β -Fusionsprotein zeigen. Die Aufreinigungen waren frei von kontaminierender endogener GSK3 β , da kein weiteres Signal für die endogene GSK3 β detektiert wurde. Die Quantifizierung der Signalintensitäten (unterhalb des WBs angegeben) zeigte, dass unterschiedliche Mengen der drei GSK3 β -Fusionsproteine aufgereinigt wurden. Im Diagramm in Abb. 3.16 B ist der zeitliche Verlauf des Phosphateinbaus der untersuchten GSK3 β -TAP-Varianten zu sehen. Da unterschiedliche Proteinmengen der Fusionsproteine isoliert worden waren (WB-Quantifizierung: GSK 1,5; Ser9 1,2; KI 2,7), erfolgte eine Normierung der Messergebnisse. Hierbei wurden die GSK3 β -TAP- und KI-Werte durch 1,25 bzw. 2,25 geteilt, um die Mengenverhältnisse zu der niedrigeren Ser9-Proteinmenge anzugleichen. Die Ser9-Mutante zeigte den höchsten Phosphateinbau, der nach 15 min und auch nach 30 min über dem des GSK3 β -TAP-Proteins lag. Das GSK3 β -TAP-Protein, das sowohl in der phosphorylierten (inaktiven) als auch in der dephosphorylierten (aktiven) Form vorliegen kann, besaß daher vermutlich eine etwas niedrigere Kinaseaktivität als die Ser9-

Mutante. Bei der KI-Mutante, wie auch bei der Kontrolle (WT, keine GSK3 β isoliert), wurde kein Phosphateinbau und folglich keine Kinaseaktivität gemessen.

Als Teilergebnis lässt sich zusammenfassen, dass die Mutagenese der GSK3 β zu einer hoch aktiven Ser9-Mutante und zu einer inaktiven KI-Mutante geführt hat.

3.2.6 Komplexbildung der GSK3 β -TAP-Mutanten

Um nun die Frage zu klären, ob die GSK3 β -Formen im aktiven bzw. inaktiven Zustand Proteinkomplexe ausbilden, wurden Gelfiltrationsanalysen durchgeführt. Hierzu wurden Zelllysate der Ser9-TAP und KI-TAP HEK293T Zellen über eine Superdex200-Säule aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen auf den GSK3 β -Gehalt analysiert. Durch Eichung der Säule mit Proteinen mit definierten Molekulargewichten (Abb. 3.17) konnte die Masse der Proteinkomplexe abgeschätzt werden.

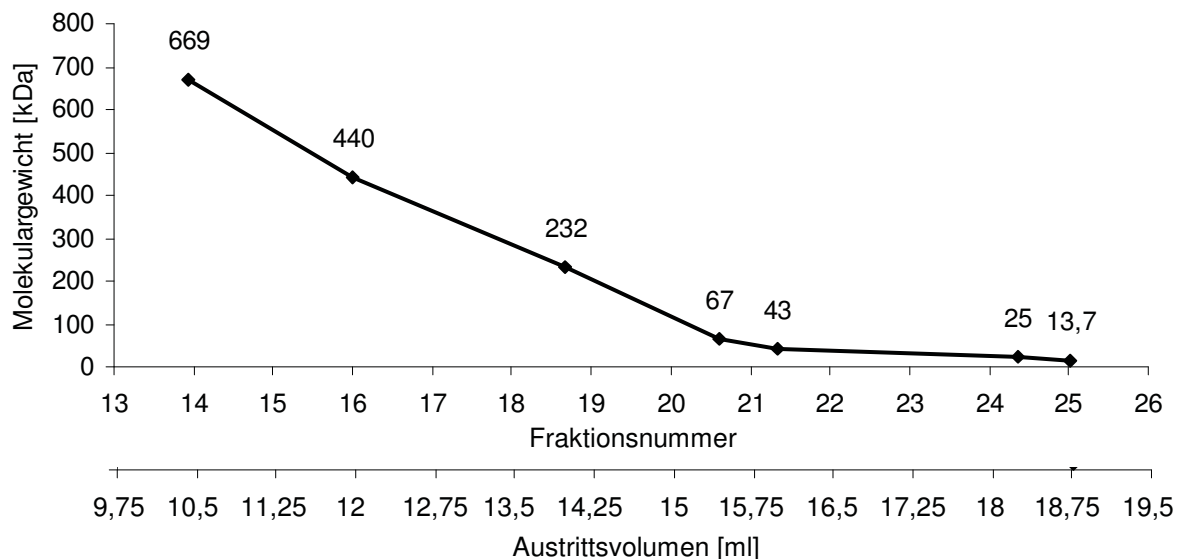


Abb. 3.17: Eichkurve der Gelfiltrationssäule. Es sind die Molekulargewichte der sieben Kalibranten (Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa), Ribonuklease A (13,7 kDa)) in kDa entsprechend der Fraktionsnummer bzw. des Austrittsvolumens in ml aufgetragen.

Die Fraktionen (13-26) der Gelfiltrationsläufe und die jeweiligen Ausgangsextrakte wurden mit einem Antikörper gegen GSK3 β (grün) im WB analysiert (Abb. 3.18). Für jede GSK3 β -TAP-Mutante wurde jeweils derselbe WB mit einer normalen (**1**) und einer verstärkten Signalintensität (**2**) dargestellt. Die WB-Analyse in Abb. 3.18 A zeigt die Verteilung von GSK3 β -Ser9-TAP und endogener GSK3 β . Beide Proteine sind vor allem im niedermolekularen Bereich zu finden (Ser9: Fraktion 21-23; endogene GSK3 β : Fraktion 22-24). Diese Signale repräsentieren vermutlich die monomere Form der Ser9-Mutante bzw. der endogenen GSK3 β . Es zeigte sich aber, insbesondere nach Verstärkung der Signale (**A2**), dass

ein Teil der endogenen GSK3 β wie auch der Ser9-Mutante in den hochmolekularen Fraktionen zu sehen ist (Ser9: bis Fraktion 15 \triangleq bis 550 kDa; endogene GSK3 β : bis Fraktion 14 \triangleq bis 669 kDa). Dies spricht dafür, dass ein Teil der Ser9-Mutante ähnlich wie die endogene GSK3 β in Proteinkomplexen organisiert zu sein scheint. Der WB der KI-Zellen in Abb. 3.18 **B** zeigt eine ähnliche Verteilung der Signale für die endogene GSK3 β wie für die endogene GSK3 β der Ser9-Zellen (**B2**; endogene GSK3 β : Fraktion 14-26 \triangleq 669-13,7 kDa). Hier ist die vermutete Monomerform der endogenen GSK3 β ebenfalls von Fraktion 22-24 zu finden. Jedoch ist das KI-Protein mit relativ gleich starken Signalintensitäten in den Fraktionen 14-23 (\triangleq 669-23 kDa) zu sehen (**B1**). Hier zeigen sich neben der besonders hohen Anreicherung in Fraktion 22, in der wahrscheinlich die monomere Form der KI-Mutante zu finden ist, noch weitere in den hochmolekularen Fraktionen 16-18 (\triangleq 440-300 kDa).

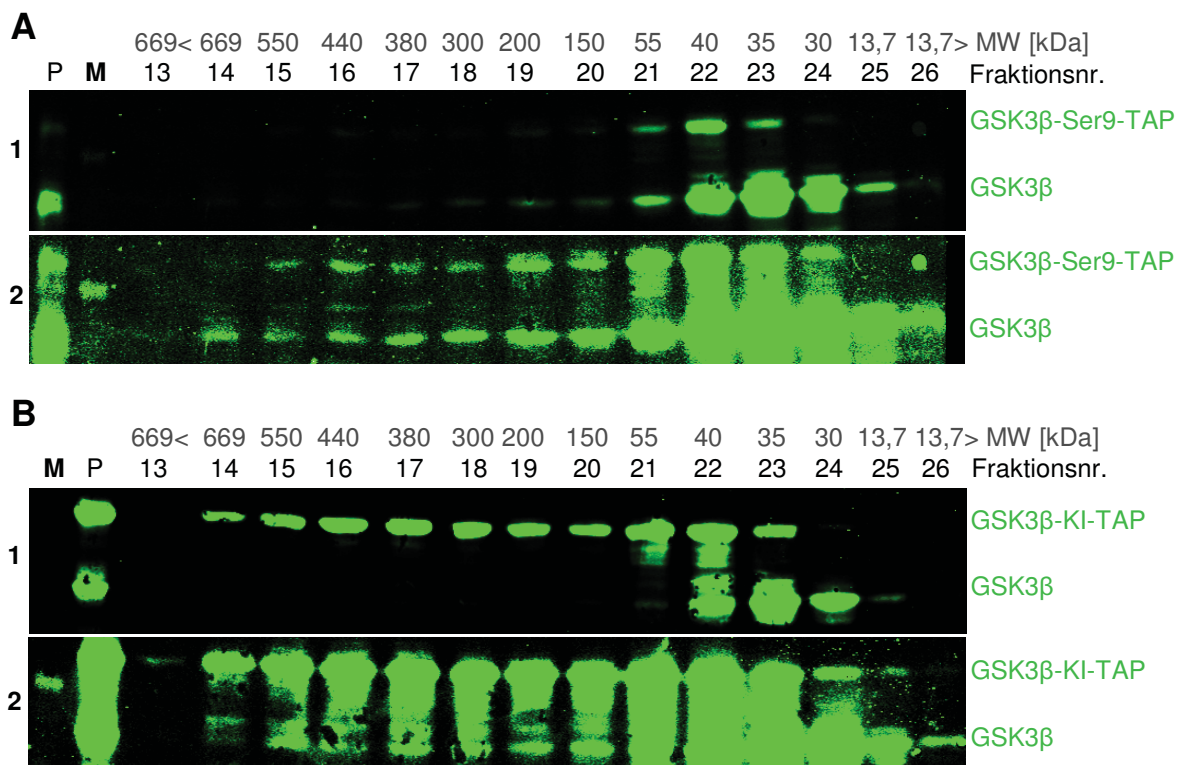


Abb. 3.18: WB-Analyse der Gelfiltrationsläufe von den rekombinanten GSK3 β -Ser9-TAP- und GSK3 β -Ser9-TAP-HEK293T Zellen. Es wurden die Fraktionen 13-26 von Ser9- (**A**) und KI-HEK293T Zellen (**B**) zu gleichen Mengen aufgetragen. Die WB-Analyse wurde mit dem GSK3 β -Antikörper (grün) durchgeführt. Hierbei wurde jeweils derselbe WB in einer normalen (**1**) und einer verstärkten Signalintensität (**2**) dargestellt. Oberhalb der Fraktionsnummer (schwarz) ist das entsprechende Molekulargewicht (MW, in grau) in kDa angegeben. P: Ausgangsextrakt, M: Proteingrößenstandard.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die endogene GSK3 β als auch die Ser9-Mutante in den niedermolekularen und in den hochmolekularen Fraktionen der Gelfiltrationsanalyse detektiert wurden. Somit verhielt sich das rekombinante Protein ähnlich wie das endogene Protein und bildete mit anderen Proteinen hochmolekulare Komplexe.

Hingegen scheinen die Komplexe der KI-Mutante im Vergleich zur Ser9-Mutante viel stärker ausgeprägt zu sein, was Unterschiede in der Komplexbildung vermuten lässt.

3.2.7 TAP/MS-Analyse der aktiven GSK3 β -Ser9- und der inaktiven GSK3 β -KI-Mutante in HEK293T Zellen

Um der Fragestellung nachzugehen, ob die GSK3 β -Komplexbildung von deren Kinaseaktivität abhängig ist, wurden die Zelllysate der stabil infizierten HEK293T Zellen, die das aktive GSK3 β -Ser9-TAP und das inaktive GSK3 β -KI-TAP Protein bilden, mit TAP/MS-Analysen untersucht. Als Kontrolle wurden die GSK3 β -TAP-HEK293T Zellen, die das nicht mutierte GSK3 β -Fusionsprotein stabil exprimieren, und untransfizierte WT-Zellen eingesetzt.

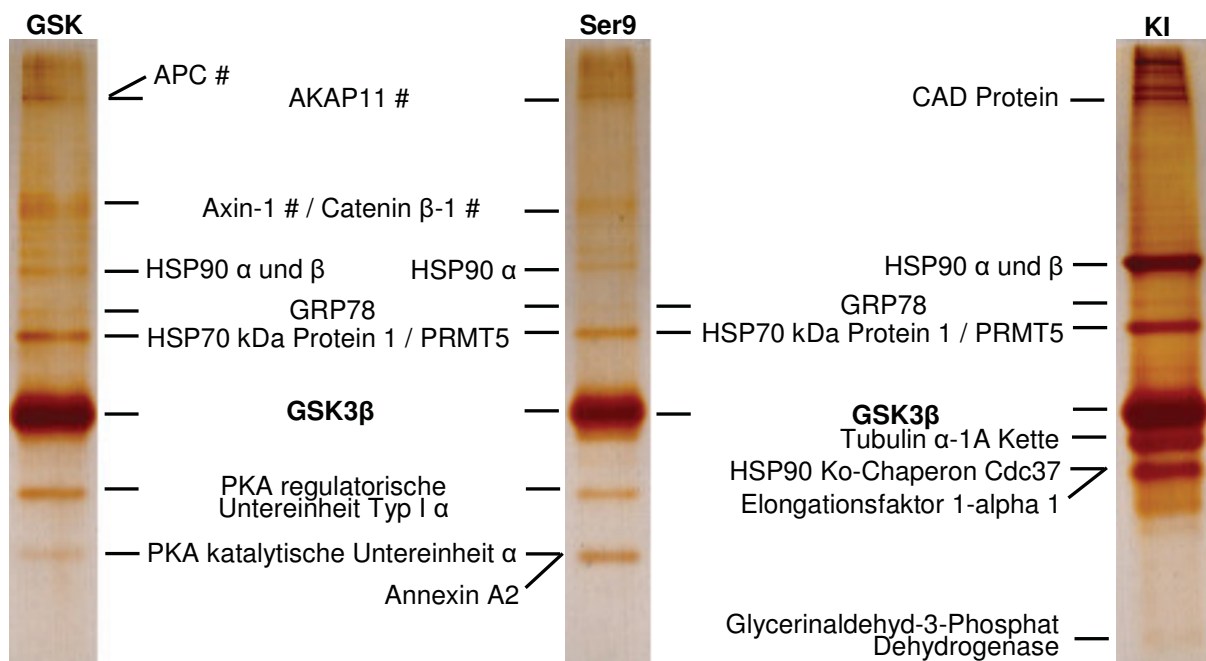


Abb. 3.19: Beispiel einer Silbergel-Analyse der TAP-Eluate von stabil transfizierten HEK293T Zellen der drei GSK3 β -TAP-Varianten und die Darstellung der koeluierten Proteine. GSK: GSK3 β -TAP-Eluat, Ser9: GSK3 β -Ser9-Eluat, KI: GSK3 β -KI-Eluat, AKAP11: A Kinase Anker Protein 11, HSP90: Hitzeschockprotein, HSP: Hitzeschockprotein, GRP78: Glukose-reguliertes Protein 78, PRMT5: Protein Arginin N-Methyltransferase 5, PKA: Proteinkinase A, CAD: Carbamylphosphatase Aspartattranscarbamylase Dihydroorotase, # als GSK3 β -Bindungspartner bekannt.

In Abb. 3.9 ist exemplarisch ein Silbergel von einem TAP-Durchgang (ein Durchgang mit je GSK3 β -TAP-, GSK3 β -Ser9-TAP- und GSK3 β -KI-TAP-Zelllysate) dargestellt. Die WT-Kontrolle (untransfizierte HEK293T-Zellen) ist nicht abgebildet, da die Kontrolle wie die der vorangegangenen TAP-Analysen der HEK293T-Zellen keine unspezifische Anreicherung von Proteinen zeigte (vgl. Abb. 3.5). In der Silbergelabbildung sind die identifizierten Proteine der TAP/MS-Analyse aufgeführt. Ein Vergleich der Elutionsmuster ergab, dass mit der GSK3 β -TAP (GSK) und der GSK3 β -Ser9-TAP (Ser9) ähnliche Proteine koeluiert wurden. Im

Gegensatz dazu steht das Bandenmuster der KI-Mutante, welches deutliche Unterschiede aufwies. Auffällig ist, dass die Bandenintensitäten stärker als in den TAPs der aktiven GSK3 β -Formen war. Es zeigten sich aber auch qualitative Unterschiede: So sind z.B. kurz unterhalb der GSK3 β -Bande zwei Banden zu sehen, die bei GSK3 β -TAP und GSK3 β -Ser9-TAP nicht zu finden sind. Umgekehrt treten bei GSK3 β -TAP und GSK3 β -Ser9-TAP im niedermolekularen Bereich zwei Banden auf, die nicht bei der GSK3 β -KI-TAP erscheinen.

Die MS-Analyse der Banden erlaubte die Identifizierung der möglichen Interaktionspartner. Hier zeigte sich, dass die aktive (Ser9) und die inaktive (KI) Mutante ein unterschiedliches Bindungsverhalten besitzen. In dem hier gezeigten Experiment koeluierten Axin-1, Catenin β -1, die regulatorische Untereinheit Typ I α und die katalytische Untereinheit α der Proteinkinase A nur mit GSK3 β -TAP und der Ser9-Mutante. Indessen wurden das Hitzeschockprotein (HSP) 90 Ko-Chaperon Cdc37 und der Elongationsfaktor 1-alpha 1 nur in der GSK3 β -KI-TAP, aber nicht bei der GSK3 β -TAP und GSK3 β -Ser9-TAP gefunden. Bei den TAP-Analysen aller drei GSK3 β -TAP-Varianten wurden z.B. die HSP90 α und β , Glukose-reguliertes Protein 78 (GRP78) und die Protein Arginin N-Methyltransferase 5 (PRMT5) detektiert.

Die gesamten TAP/MS-Ergebnisse der stabil exprimierenden HEK293T Zellen von fünf separaten TAP-Durchgängen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Hierbei wurden die ersten beiden TAP-Analysen (TAP 1 und 2) ohne die KI-Mutante durchgeführt. In der Tabelle sind die Proteine aufgeführt, die bereits in den TAP-Analysen der transient exprimierenden HEK293T-Zellen oder in wenigstens drei verschiedenen TAP-Durchgängen mit einer Peptidhäufigkeit von mindestens drei verschiedenen Peptiden massenspektrometrisch detektiert wurden (siehe auch beispielhafte MS-Analyse im Anhang 9.1).

Die Tabelle 3.2 zeigt deutlich, dass viele der bereits identifizierten Proteine aus den transient transfizierten HEK293T-Zellen (vgl. Tabelle 3.1) wiederum in den stabilen Zellen als GSK3 β -Interaktionspartner gefunden wurden. So wurden von den zuvor ermittelten 37 Proteinen insgesamt 24 erneut detektiert. Besonders häufig (in mindestens vier verschiedenen TAPs, grau unterlegt) wurden z.B. AKAP11, Axin-1, GRP78, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, HSP70-Isoformen, HSP90-Isoformen, PRMT5, Tubulin alpha-1 Kette und beide PKA α -Untereinheiten (regulatorische UE Typ I α und katalytische UE α) identifiziert. Zusätzlich wurde eine neue Hitzeschock-Isoform, putatives HSP90-beta-2, gefunden (fett gedruckt).

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der TAP/MS-Ergebnisse von fünf TAP-Analysedurchgängen der stabilen HEK293T-Zellen. Es wurden die Proteine aufgelistet, die in wenigstens drei TAP-Durchgängen oder bereits in den vorangegangenen TAP-Analysen und mit einer Peptidhäufigkeit (P) von drei unterschiedlichen Peptiden massenspektrometrisch detektiert wurden. CAD: Carbamylphosphatase Aspartattranscarbamylase Dihydroorotase PKA: Proteinkinase A, grau: > drei TAPs gefunden, Fettdruck: nicht in den transienten TAPs identifiziert, GSK: GSK3β-TAP Zellen, Ser9: Ser9-TAP Zellen, KI: KI-TAP Zellen, ID-Nr.: Identifizierungsnummer, MW: Molekulargewicht, %: prozentuale Sequenzabdeckung. # als GSK3β-Bindungspartner und * als GSK3β-Substrat bekannt.

Identifiziertes Protein	ID-Nr.	MW	TAP 1			TAP 2			TAP 3			TAP 4			TAP 5		
			GSK		Ser9	GSK		Ser9	GSK		Ser9	GSK		Ser9	GSK		Ser9
			P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %
Acetyl-CoA Carboxylase 1 (ACC1) *	Q13085	265	/	/	/	8	3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Adenomatous polyposis coli Protein (APC)</i> #	P25054	312	/	/	/	/	/	/	/	/	15	6	/	/	/	/	/
A-Kinase-Anker-Protein 11 (AKAP11) #	Q9UKA4	210	/	/	/	4	3	/	/	/	18	12	15	10	/	4	4
Annexin A2	P07355	39	6	20	4	15	4	12	/	3	9	/	/	5	18	/	/
ATP-Citratsynthase *	P53396	121	5	7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Axin-1 #	O15169	96	/	/	/	19	18	15	19	/	/	20	23	17	21	/	13
CAD Protein	P27708	243	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	40	19
Catenin beta-1 #	P35222	85	/	/	/	/	/	/	/	/	/	15	20	13	31	/	/
Catenin gamma (<i>Junction Plakoglobin</i>)	P14923	82	10	15	4	7	13	23	9	18	4	7	/	/	4	7	4
Elongationsfaktor 1-alpha 1	P10126	50	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4	10	/	11	17
Glukose-reguliertes Protein 78	P11021	72	3	4	4	4	12	31	11	22	/	6	14	6	14	13	25
Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	P04406	36	/	/	/	3	13	4	17	/	/	3	13	/	/	4	15
Hitzeschockprotein 70 (HSP70) 1	P08107	70	60	45	81	48	5	6	12	29	4	8	4	8	21	21	9
Hitzeschockprotein 70 (HSP70) 1L	P34931	70	39	22	66	33	7	5	13	15	6	11	7	14	18	19	8
Hitzeschockprotein 90 alpha	P07900	85	10	12	52	37	/	/	5	7	/	3	5	44	19	7	9
Hitzeschockprotein 90 beta	P08238	83	/	/	30	15	/	/	7	7	/	/	19	16	3	6	/
Hitzeschockprotein 90 Ko-Chaperon Cdc37	Q16543	45	38	35	4	15	/	/	/	/	/	11	26	/	/	21	27
Hitzeschock-verwandtes 70 kDa Protein-2	P54652	70	8	6	/	/	8	8	/	/	/	11	8	4	3	3	10
Hitzeschock-verwandtes 71 kDa Protein	P11142	71	35	43	39	38	6	9	14	26	10	20	7	16	26	30	10
PKA katalytische Untereinheit alpha	P17612	41	/	/	3	9	10	27	25	27	/	6	15	/	16	23	12
PKA regulatorische Untereinheit Typ I alpha	P10644	43	/	/	/	19	40	45	46	5	13	12	35	/	26	46	34
Protein Arginin N-Methyltransferase 5	O14744	73	4	8	/	/	16	28	8	17	3	5	4	7	17	25	10
Putatives Hitzeschockprotein 90-alpha A2	Q14568	39	/	/	14	9	/	/	/	/	/	6	5	/	/	6	9
Putatives Hitzeschockprotein 90-alpha A5	Q58FG0	39	/	/	12	10	/	/	/	/	/	11	10	/	13	10	/
Putatives Hitzeschockprotein 90-beta-2	Q58FF8	44	/	/	26	18	/	7	15	/	/	18	8	5	15	/	35
Putatives Hitzeschockprotein 90-beta-3	Q58FF1	68	/	/	33	15	/	/	6	9	/	/	34	12	4	7	4
Tubulin alpha-1A Kette	Q71U36	50	6	17	13	36	9	60	11	26	/	/	19	29	/	/	33
Tubulin beta-2A Kette	Q13885	50	8	24	/	/	/	/	/	/	/	12	25	/	/	35	32

Für einige Proteine lassen sich deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Bindung zu den GSK3 β -Mutanten nachweisen. So zeigte sich, dass der Elongationsfaktor 1-alpha 1 nur an die inaktive KI-Mutante bindet. Andererseits wurde Axin-1 nicht als Interaktionspartner in der KI-Mutante, sondern nur in der GSK3 β -TAP und in der Ser9-Mutante gefunden. Dieser Befund ist interessant, da bereits gezeigt wurde, dass Axin nur mit der aktiven GSK3 β interagiert (Ikeda et al., 1998). Das gleiche Bild zeigte sich für die Proteinkinase A I α mit ihren zwei Untereinheiten (regulatorische UE Typ I α (RI α) und katalytische UE α). Sie wurden ausschließlich bei der GSK3 β -TAP und der Ser9-Mutante, nicht aber bei der inaktiven KI-Mutante als Bindungspartner identifiziert. Für die regulatorische PKA-Isoform Typ II α (RII α) wurde bereits eine Interaktion mit GSK3 β gezeigt, die über AKAP11 vermittelt wird (Tanji et al., 2002). In dieser Arbeit wurde aber nun eindeutig die RI α massenspektrometrisch identifiziert (siehe Anhang 9.1). Zusätzlich konnten die drei anderen bekannten, humanen Isoformen (RI β , RII α , RII β) durch einen Aminosäuresequenzvergleich ausgeschlossen werden (Anhang 9.1 Abb. 9.5).

Es wurden indessen auch Proteine gefunden, die mit allen GSK3 β -Fusionsproteinen einen festen Komplex bilden, wie z.B. GRP78, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, HSP70-Isoformen, HSP90-Isoformen, PRMT5 oder Tubulin alpha-1A Kette. Diese Bindungspartner scheinen somit eine von der GSK3 β -Kinaseaktivität unabhängige Interaktion mit GSK3 β einzugehen.

3.2.8 TAP-MS-Analyse der aktiven GSK3 β -Ser9- und der inaktiven GSK3 β -KI-Mutante in HL-1 Zellen

In weiteren Analysen wurde untersucht, ob GSK3 β in einem anderen Zelltyp ein ähnliches Interaktionsmuster zeigt und ob Zelltyp-spezifische Interaktionspartner von GSK3 β identifiziert werden können. Hierzu wurden die Zelllysate der murinen HL-1 Kardiomyozyten mit TAP/MS-Analysen analysiert. Die HL-1 Kardiomyozyten exprimieren wie die HEK293T Zelllinien die getaggte WT-GSK3 β , die konstitutiv aktive GSK3 β -Ser9-Mutante und die inaktive GSK3 β -KI-Mutante exprimieren.

Abb. 3.20 zeigt exemplarisch ein Silbergel eines TAP-Durchganges der verschiedenen GSK3 β -TAP Zelllysaten (WT-, GSK3 β -TAP-, Ser9-, KI-Zelllysate) mit den entsprechenden identifizierten Proteinen. Die als Kontrolle analysierten untransfizierten HL-1-WT-Zellen zeigten wie bei den HEK293T Zellen kein entsprechendes Bandenmuster. Somit haben auch in diesem Zelltyp keine Proteine unspezifisch an die Flag- bzw. StrepTactin-Säule gebunden.

Der Vergleich zwischen dem TAP-Elutionsmuster der GSK3 β -TAP- und der Ser9-Probe zeigte eine hohe Ähnlichkeit. Im Gegensatz dazu steht die inaktive KI-Mutante, bei der sich das Elutionsmuster durch einige Banden von dem der aktiven Formen unterschied. Mit Hilfe der MS-Analyse wurden die Banden der möglichen GSK3 β -Interaktionspartner identifiziert. In diesem Experiment wurde z.B. Axin-1 nur bei GSK3 β -TAP und der Ser9-Mutante gefunden. Hingegen wurde das Hitzeschockprotein 90 Ko-Chaperon Cdc37 ausschließlich bei der KI-Mutante detektiert. Es wurden aber auch Proteine in allen TAP-Analysen gefunden wie z.B. die Hitzeschockproteine 90 α und β , Glukose-reguliertes Protein 78 oder Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Untereinheit alpha (mitochondrial), die also eine aktivitätsunabhängige Interaktion mit GSK3 β eingehen.

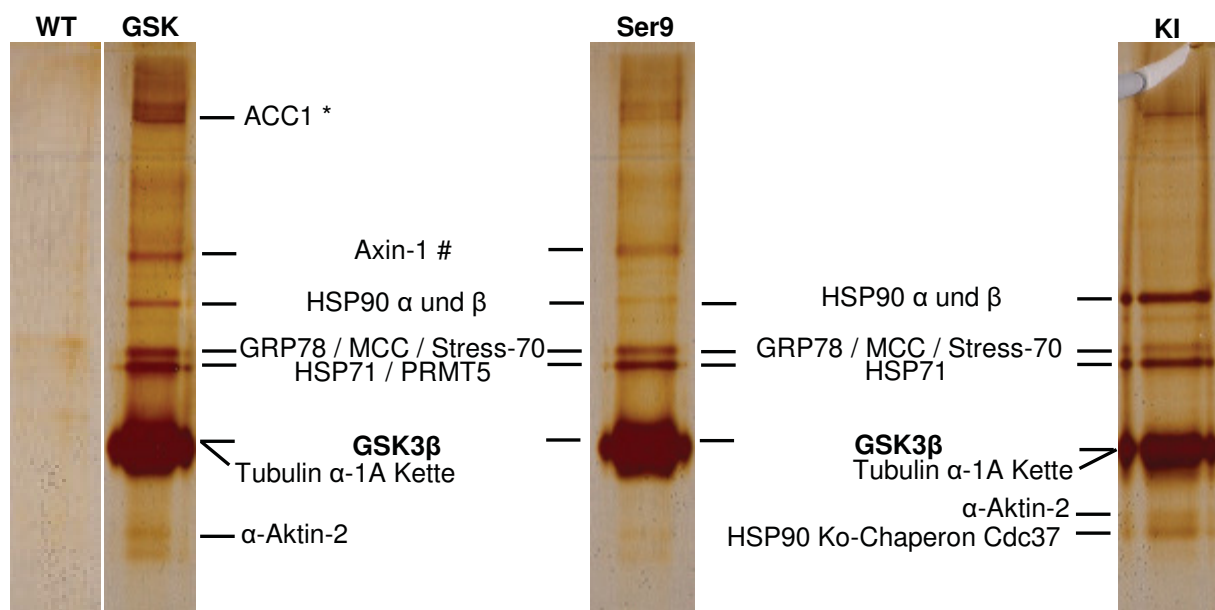


Abb. 3.20: Beispiel einer Silbergel-Analyse der TAP -Eluate von stabil transfizierten HL-1 Zellen der drei GSK3 β -TAP-Varianten und die Darstellung der koeluierten Proteine. WT: Wildtyp-Eluat, GSK: GSK3 β -TAP-Eluat, Ser9: GSK3 β -Ser9-Eluat, KI: GSK3 β -KI-Eluat, ACC1: Acetyl-CoA Carboxylase 1, HSP: Hitzeschockprotein, GRP78: Glukose-reguliertes Protein 78, MCC: Methylcrotonyl CoA Carboxylase, PRMT5: Protein Arginin N-Methyltransferase 5, PKA: cAMP-abhängige Proteinkinase. # als GSK3 β -Interaktionspartner und * als GSK3 β -Substrat bekannt.

In Tabelle 3.3 sind alle TAP/MS-Ergebnisse der HL-1 Zellen von vier unabhängigen TAP-Durchgängen zusammengefasst. Es wurden nur die Proteine in die Tabelle aufgenommen, die in wenigstens drei verschiedenen HL-1-TAPs und mit einer Peptidhäufigkeit von mindestens drei verschiedenen Peptiden massenspektrometrisch identifiziert wurden. Außerdem wurden Kandidaten aufgenommen, die bereits in den vorangegangenen TAP-Analysen der HEK293T-Zellen identifiziert wurden.

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der TAP/MS-Ergebnisse von vier TAP-Analysedurchgängen der stabilen HL-1 Zellen. Es wurden nur die Proteine in die Tabelle aufgenommen, die in wenigstens drei TAP-Durchgängen oder bereits in den vorangegangenen TAP-Analysen der HEK293T Zellen und mit einer Peptidhäufigkeit (P) von drei unterschiedlichen Peptiden massenspektrometrisch detektiert wurden. PKA: Proteinkinase A, UE: Untereinheit, grau: > drei TAPs gefunden, Fettdruck: nicht in den HEK293T-TAPs identifiziert, G: GSK3β-TAP Zellen, S: Ser9-TAP Zellen, K: KI-TAP Zellen, ID-Nr.: Identifizierungsnummer, MW: Molekulargewicht, %: prozentuale Aminosäureabdeckung. # als GSK3β-Interaktionspartner und * als GSK3β-Substrat bekannt.

Identifiziertes Protein	Nr.	MW	TAP 1			TAP 2			TAP 3			TAP 4												
			GSK	Ser9	KI	GSK	Ser9	KI	GSK	Ser9	KI	GSK	Ser9	KI										
			P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %	P %										
alpha-Aktin-2	P62737	42	8	17	12	29	5	13	5	18	12	37	1	1	5	16	10	18	1	1	9	15		
Acetyl-CoA Carboxylase 1 (ACC1) *	Q5SWU9	265	20	11	/	/	7	4	13	7	13	7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Annexin A2	P07355	39	/	/	4	14	/	/	/	/	3	11	5	20	/	3	18	/	/	/	/	/	/	
Axin-1 #	O35625	96	12	12	12	12	/	/	/	/	/	/	10	9	6	8	/	/	/	/	/	/	/	
Desmoplakin-3 (Junction Plakoglobin)	Q02257	82	/	/	/	/	19	25	3	7	17	23	4	8	12	18	10	19	16	18	7	11	/	
Glukose-reguliertes Protein 78	P20029	72	/	/	34	39	13	24	6	14	17	13	3	7	22	37	11	22	/	15	18	/	5	
Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	P16858	36	/	/	/	/	/	/	/	/	3	13	6	51	/	/	/	/	/	/	3	12	/	
Histon H4	P62806	11	1	1	1	1	5	30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	41	1	1	3	31	
Hitzechock 70 kDa Protein-1A	Q61696	70	1	1	3	6	1	1	1	1	1	1	4	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Hitzechockprotein 90 alpha	P07901	85	14	15	7	10	25	33	8	22	4	6	17	22	7	10	/	15	28	/	/	13	11	32
Hitzechockprotein 90 beta	P11499	83	5	8	3	5	13	15	4	8	/	10	14	4	8	/	/	26	19	/	/	5	6	24
Hitzechockprotein 90 Ko-Chaperon Cdc37	Q61081	45	/	/	/	/	7	16	/	/	/	8	25	/	/	/	/	2	7	/	/	/	/	20
Hitzechock-verwandtes 70 kDa Protein-2	P17156	70	5	6	9	8	7	7	3	3	/	/	/	3	3	/	/	4	6	/	/	5	6	
Hitzechock-verwandtes 71 kDa Protein	P63017	71	25	32	19	24	23	39	17	24	11	17	8	14	29	31	14	22	17	18	/	12	16	
Methylcrotonyl-CoA Carboxylase beta Kette, mito.	Q3ULD5	61	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19	37	8	16	13	30	1	1	1	1	1	
Methylcrotonyl-CoA Carboxylase UE alpha, mito.	Q99MR8	79	19	32	28	35	9	18	21	39	22	43	18	35	12	18	3	5	10	35	1	1	1	
PKA regulatorische Untereinheit Typ I alpha	Q9DBC7	43	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	23	38	10	29	/	/	4	5	/	/	/	/
Protein Arginin N-Methyltransferase 5	Q8CIG8	73	4	8	3	5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Stress-70 Protein, mitochondrial	P38647	74	6	12	14	21	6	12	4	7	7	14	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Tubulin alpha-1A Kette	P68369	50	23	37	/	14	29	5	15	3	9	5	13	3	9	/	4	12	6	12	/	/	/	
Tubulin beta-2A Kette	Q7TMM9	50	/	/	/	3	5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7	18	/	/	/	/	

Die TAP/MS-Ergebnisse in Tabelle 3.3 zeigen sehr deutlich, dass viele der zuvor detektierten Proteine aus den HEK293T-TAPs auch in den HL-1 Zellen gefunden wurden. So wurden 16 Proteine abermals und fünf Proteine zusätzlich detektiert. Zu den neu identifizierten Proteinen zählen α -Aktin-2, Histon H4, Hitzeschock 70 kDa Protein-1A und zwei Methylcrotonyl CoA Carboxylase-Isoformen (Fettdruck).

Wie bei den HEK293T Zellen, lassen sich auch für die GSK3 β -assoziierten Proteine drei Gruppen unterscheiden. Die 1. Gruppe bindet ausschließlich an die aktiven, die 2. Gruppe an die inaktive GSK3 β -TAP-Form und die 3. Gruppe interagiert unabhängig von der Aktivität mit GSK3 β . So wurde Axin-1 und regulatorische PKA UE Typ I α , wie in den HEK293T Zellen, nur in GSK3 β -TAP und der Ser9-Mutante, aber nicht in der KI-Mutante identifiziert. Indessen koeluierte das Hitzeschockprotein 90 Ko-Chaperon Cdc37 lediglich mit der KI-Mutante. Es wurden auch viele Proteine gefunden, die von der GSK3 β -Aktivität unabhängig sind, wie beispielsweise die Hitzeschockprotein-Isoformen 70 und 90, Methylcrotonyl-CoA Carboxylase UE alpha (mitochondrial) oder Tubulin alpha-1A Kette.

3.3 Verifizierung der Interaktion von vier ausgewählten GSK3 β -Bindungspartnern mit dem *Proximity Ligation Assay* (PLA)

Um die Interaktion von GSK3 β mit den identifizierten Bindungspartnern zu verifizieren, sollte eine Methode eingesetzt werden, die sich von dem Aufreinigungsprinzip der TAP unterscheidet. Zu diesem Zweck wurde der *Proximity Ligation Assay* (PLA) eingesetzt. Der PLA erlaubt einen Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in situ*. Hierbei wird eine Komplexbildung zwischen zwei Proteinen über spezifische Antikörperreaktionen in adhärent wachsenden Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (Prinzip siehe Abb. 3.21).

Für die Verifizierung mit dem PLA wurden aus dem Spektrum der GSK3 β -bindenden Proteine vier Proteine ausgewählt:

Filamin A (FLNA), wurde ausschließlich in den transienten TAP/MS-Analysen von HEK293T Zellen identifiziert.

Acetyl-CoA-Carboxylase 1 (ACC1), wurde sowohl in HEK293T als auch in HL-1 Zellen unabhängig von der GSK3 β -Kinaseaktivität in insgesamt 8 TAP/MS-Analysen detektiert.

Protein Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5) wurde ebenfalls unabhängig von der GSK3 β -Kinaseaktivität aus beiden Zelltypen 12 mal koeluiert.

Proteinkinase A Typ I α (PKAI α) wurde nur im Komplex mit GSK3 β in HEK293T und HL-1 Zellen gefunden, wenn GSK3 β in der aktiven Form vorlag. Somit scheint interessanterweise der GSK3 β /PKAI α -Komplex durch die GSK3 β -Kinaseaktivität reguliert zu sein.

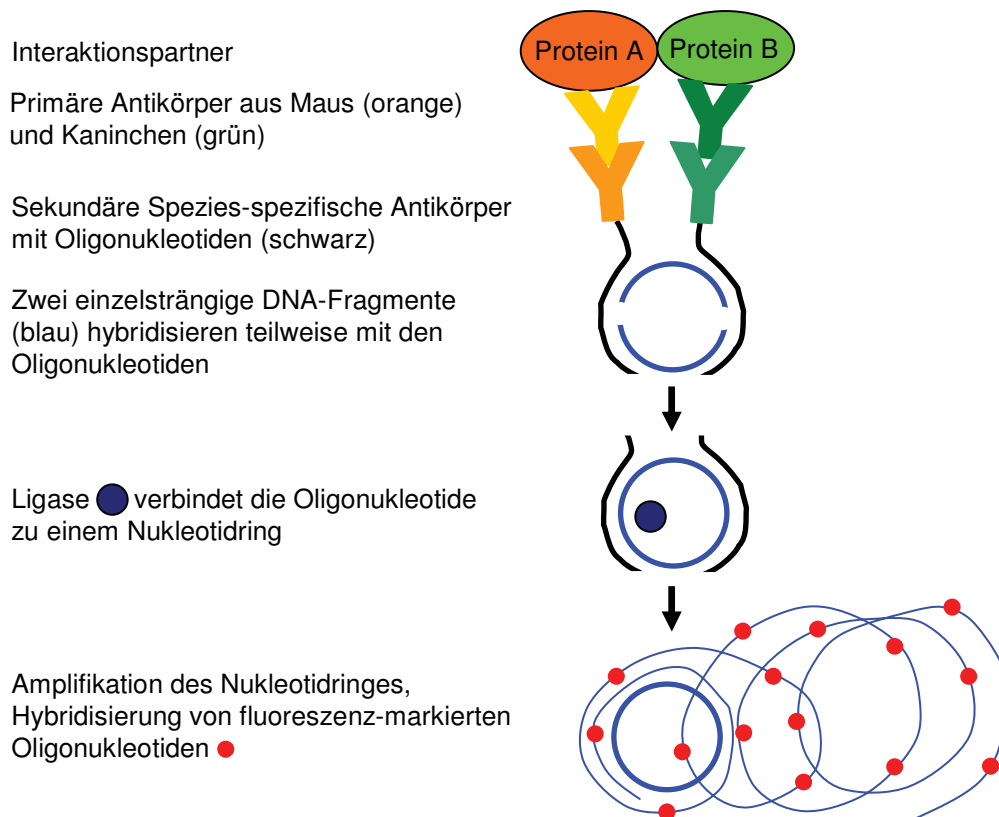


Abb. 3.21: Proximity Ligation Assay (PLA). Zunächst werden die zu untersuchenden Interaktionspartner (Protein A und B) mit spezifischen Antikörpern detektiert. Hierbei müssen die Antikörper aus verschiedenen Spezies (orange: Maus, grün: Kaninchen) stammen. Die primären Antikörper werden dann von modifizierten sekundären Antikörpern, die an spezifische Oligonukleotide (schwarz) gekoppelt sind, gebunden. An diese Oligonukleotide werden zwei einzelsträngige DNA-Fragmente (blau) hybridisiert, die teilweise komplementär zu den beiden Oligonukleotiden sind. Durch eine anschließende Ligation werden die DNA-Fragmente zu einem Nucleotidring geschlossen. Durch den Einsatz der DNA-Polymerase kann nun nach dem *rolling circle* Mechanismus eine vielfältige Kopie der zirkulären DNA hergestellt werden. An dieses Amplifikat hybridisieren Fluoreszenzfarbstoff-markierte Oligonukleotide (rote Punkte). Dies führt zu einer massiven Signalverstärkung, so dass einzelne Protein-Protein-Interaktionen mit der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden können. Zur einfacheren Darstellung wurden die primären und sekundären Antikörper nur oben gezeigt. Alle genannten Schritte finden lokal an den Antikörpern gebunden statt.

Für die PLA-Versuche wurde jeweils ein primärer Antikörper aus Maus bzw. Kaninchen eingesetzt. Hierbei gaben PLAs mit nur einem Antikörper Aufschluss über die jeweilige unspezifische Antikörperbindung und wurden als Kontrollexperimente für alle PLAs in dieser Arbeit durchgeführt. Für die quantitative Auswertung wurden pro PLA-Ansatz je fünf unterschiedliche Mikroskopaufnahmen in 60-facher Vergrößerung mit ca. 20-70 Zellkernen (DAPI-Färbung) fotografiert und die dazugehörigen roten Signale ausgezählt. Daraus ließ sich der durchschnittliche Mittelwert der PLA-Signale pro Zellkern (ZK) berechnen. Dieser Wert wurde in den folgenden PLA-Ergebnissen angegeben. Die exemplarischen

Mikroskopaufnahmen, die jeweils abgebildet wurden, zeigen von einer Mikroskopaufnahme 11 % der ausgewerteten Fläche.

3.3.1 Verifizierung des GSK3 β /Filamin A-Komplexes

Mit Hilfe der TAP/MS-Analyse wurde eine Interaktion von Filamin A und GSK3 β -TAP in HEK293T Zellen nachgewiesen. Mittels PLA sollte nun überprüft werden, ob sich dieses Ergebnis bestätigen lässt und dieser Komplex möglicherweise durch die unterschiedlichen GSK3 β -Aktivitäten der getaggtten GSK3 β -Mutanten in der Zelle beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurden die rekombinanten HEK293T Zellen (GSK3 β -TAP, GSK3 β -Ser9-TAP, GSK3 β -KI-TAP Zellen) mit PLAs untersucht. Es wurden auch die rekombinanten HL-1 Zellen analysiert, da dieser Komplex möglicherweise in diesem Zelltyp schwach ausgeprägt ist und deswegen nicht mit der TAP/MS-Methode detektiert werden konnte. Die PLAs wurden mit Antikörpern gegen den TAP-Tag (α -HA, Kaninchen) und gegen Filamin A (FLNA, Maus) durchgeführt. Die Ergebnisse der HEK293T- sind in Abb. 3.22 und die der HL-1 Zellen sind in Abb. 3.23 dargestellt. In **A-C** sind exemplarisch Mikroskopaufnahmen der PLAs (**A1**, **B1**, **C1**: primäre Antikörper: α -HA und α -Filamin A) sowie der Kontrollreaktionen (**A2**, **B2**, **C3**: nur α -HA; **A3**, **B3**, **C3**: nur α -Filamin A) gezeigt.

Die PLA-Probe von den GSK3 β -TAP HEK293T Zellen in Abb. 3.22 **A1** zeigt sehr viele rote Signale, die eine enge Nachbarschaft von GSK3 β -TAP und Filamin A nachweisen. In den dazu gehörigen Kontrollen HA (**A2**) und FLNA (**A3**) sind nur wenige schwache Signale zu sehen. Dieses spiegelt sich auch in der beispielhaft für die Ser9-Mutante dargestellten Auszählung wider (**D**). In beiden Kontrollen wurden weniger als 5 Signale pro ZK im Gegensatz zu der PLA-Probe mit fast 50 Signalen ausgezählt. Somit zeigen die Kontrollen wenige unspezifische Bindungen. Die Bilder der Ser9-Mutante sind der von GSK3 β -TAP sehr ähnlich. Auch hier sind viele Signale in der PLA-Probe (**B1**) und einige wenige Signale in den Kontrollen (**B2** und **B3**) zu erkennen. Im Gegensatz dazu steht die KI-Mutante, die beim PLA (**C1**) und den Kontrollen (**C2** und **C3**) fast keine Signale zeigt. Diese Beobachtung wird durch die quantitative Auswertung von zwei PLA-Experimenten bestätigt (siehe Abb. 3.22 **E**). Für die Auswertung wurden jeweils die PLA-Ergebnisse der GSK3 β -TAP-Zellen auf 100 % gesetzt und die Werte der anderen Ser9- und KI-Mutante darauf normiert. Diese Art der PLA-Quantifizierung wurde für die gesamte Arbeit durchgeführt. So zeigen die GSK3 β -TAP und Ser9-Mutante ein relatives Signal von 100 % bzw. 80 % im Vergleich zur KI-Mutante, bei der das relative Signal bei nur 10 % liegt. Folglich scheinen die aktiven GSK3 β -TAP-Formen eine starke Interaktion mit Filamin A zu haben, dagegen ist diese mit der inaktiven KI-

Mutante sehr gering ausgeprägt. Mit diesem Experiment wurde somit der vorherige Befund der TAP/MS-Analysen, dass GSK3 β -TAP mit Filamin A interagiert, mit einer unabhängigen Methode bestätigt. Hierbei scheint die Interaktion von der GSK3 β -Aktivität abhängig zu sein.

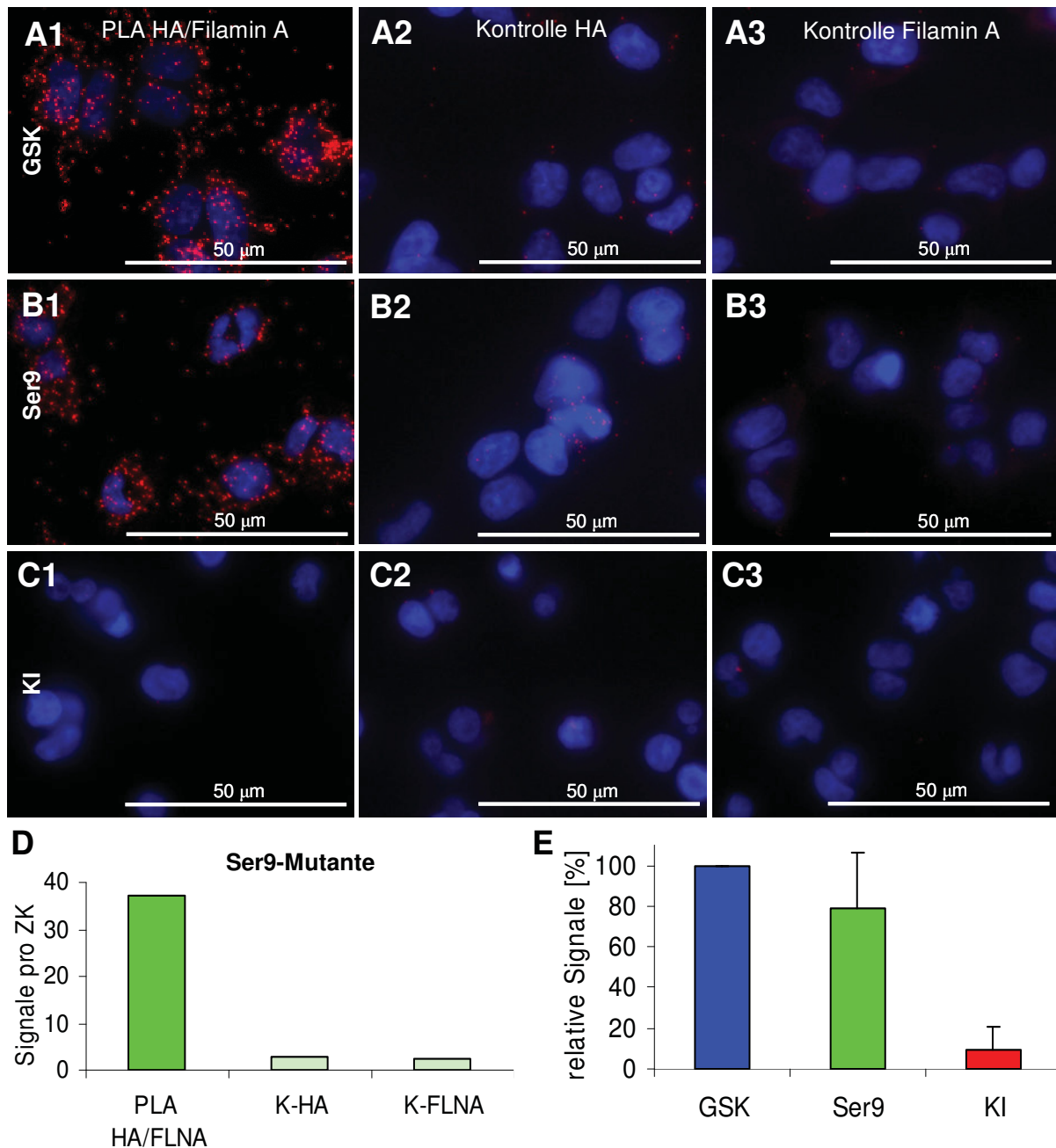


Abb. 3.22: PLA-HA/Filamin A-Ergebnisse von den rekombinanten HEK293T Zellen. Exemplarische Mikroskopaufnahmen der PLAs der GSK3 β -TAP (A), Ser9- (B) und KI-HEK293T Zellen (C) sind aufgeführt. In 1 ist jeweils die PLA-Probe mit den beiden primären Antikörpern α -HA/ α -Filamin A, in 2 die Kontrolle α -HA und in 3 die Kontrolle α -Filamin A zu sehen. **D** zeigt eine beispielhafte Signal-Auszählung der PLAs für die Ser9-Mutante und **E** eine Zusammenfassung der quantitativen Auswertung von zwei unabhängig durchgeführten PLAs. Die Signalstärke aus GSK3 β -TAP transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. ZK: Zellkern, FLNA: Filamin A, K: Kontrolle (n = 2).

In Abb. 3.23 sind nur die Mikroskopaufnahmen der PLAs der rekombinanten HL-1 Zelllinien aufgeführt. Diese zeigen für alle getaggtten GSK3 β -Formen keine Signale. Daraus lässt sich

schlussfolgern, dass die GSK3 β -TAP in den HL-1 Zellen nicht mit Filamin A interagiert oder die gewählten Antikörper in diesem Zelltyp möglicherweise nicht gut binden. Alternativ könnte aber auch die Expression von Filamin A in den HL-1 Kardiomyozyten geringer als in den HEK293T Zellen sein.

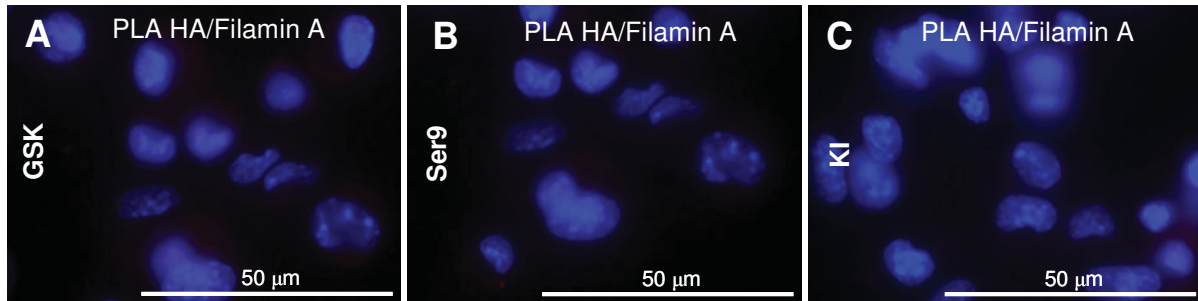


Abb. 3.23: PLA-HA/Filamin A-Ergebnisse von den rekombinanten HL-1 Zellen. Es ist jeweils exemplarisch eine Mikroskopaufnahme der durchgeführten PLAs mit beiden primären Antikörpern α -HA und α -Filamin A von GSK3 β -TAP- (A), Ser9- (B) und KI-HL-1 Zellen (C) dargestellt.

Um dies zu untersuchen, wurde die Filamin A-Expression in wildtypischen HEK293T und HL-1 Zellen im WB verglichen. Abb. 3.24 zeigt, dass im Gegensatz zu den HEK293T Zellen in den HL-1 Kardiomyozyten keine Expression des Filamin A (roter Kanal) nachweisbar war, was die fehlenden PLA-Signale in diesem Zelltyp erklärt. Die GSK3 β -Proteinniveaus (grüner Kanal) waren in beiden Zelltypen gleich stark.

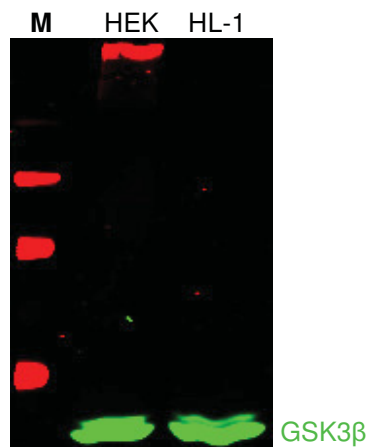


Abb. 3.24: WB-Analyse der Mengenverhältnisse von GSK3 β zu Filamin A in WT-HEK293T und HL-1 Zellen. Der WB wurde mit den Antikörpern gegen GSK3 β (grün) und Filamin A (rot) durchgeführt. HEK: HEK293T, M: Proteingrößenstandard.

Um zu überprüfen, ob der GSK3 β -Filamin A-Interaktion auch für die endogene GSK3 β unabhängig von dem TAP-Tag nachweisbar ist, wurden wildtypische HEK293T Zellen untersucht. Für die Analyse wurden Antikörper gegen GSK3 β (Kaninchen) und Filamin A (FLNA, Maus) verwendet. In Abb. 3.25 sind die GSK3 β /Filamin A-PLA-Ergebnisse der HEK293T Zellen (A1-A4) dargestellt. Es sind exemplarisch Mikroskopaufnahmen der PLAs (A1: primäre Antikörper α -GSK3 β und α -FLNA) und der Kontrollexperimente (α -GSK3 β :

A2; α -FLNA: **A3**) gezeigt. In **A4** ist die entsprechende Quantifizierung für den PLA-Versuch aufgeführt.

Die Abb. 3.25 **A1** zeigt viele Signale im Vergleich zu den Kontrollen **A2** und **A3**, in denen nur wenige Signale zu erkennen sind. Dieses zeigt sich auch in der quantitativen Auszählung, wo für die PLA-Probe 22, für die Kontrolle-GSK3 β 1 und für die Kontrolle-FLNA 3 Signale pro ZK ausgezählt (**A4**). Da der PLA-Wert deutlich über dem Hintergrund liegt, belegt dieses Experiment eine Interaktion zwischen der WT-GSK3 β und Filamin A in HEK293T Zellen.

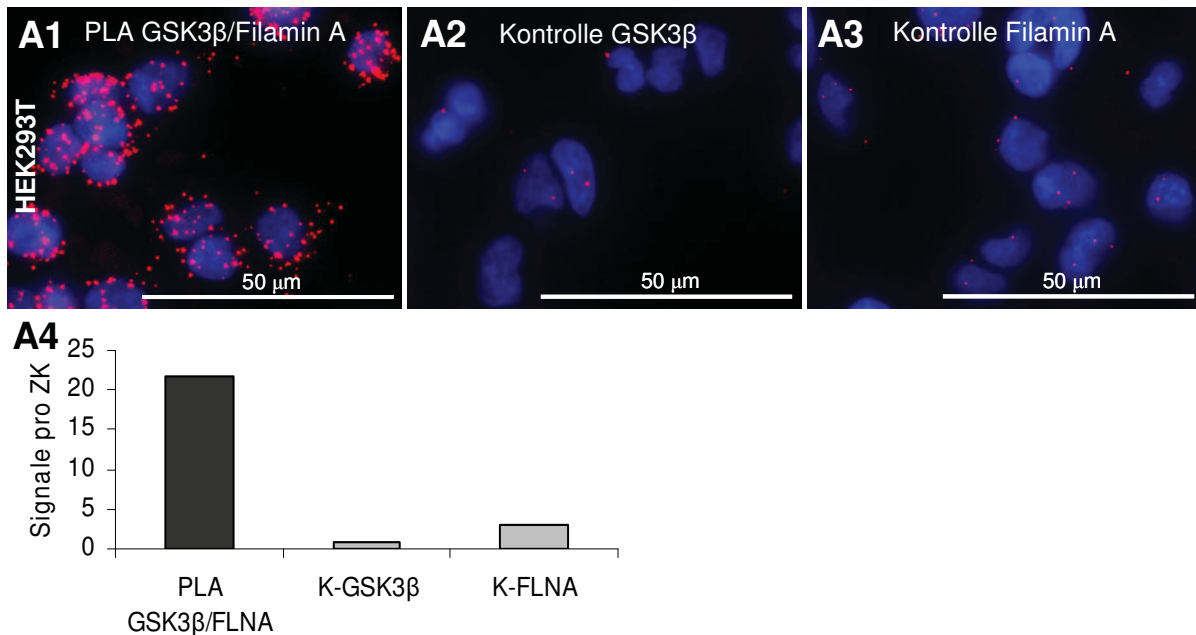


Abb. 3.25: PLA-GSK3 β /Filamin A Ergebnisse von den HEK293T Zellen. A1-A3 zeigen beispielhaft Mikroskopaufnahmen. In A4 ist die Auswertung des durchgeführten PLAs dargestellt. ZK: Zellkern, K: Kontrolle, FLNA: Filamin A.

3.3.2 Verifizierung des GSK3 β /ACC1-Komplexes

Die TAP/MS-Analysen zeigten einen Komplex zwischen ACC1 und GSK3 β -TAP, der unabhängig von der GSK3 β -TAP-Aktivität sowohl in HEK293T als auch in HL-1 Zellen identifiziert wurde. Dieser Komplex sollte mittels PLA in den rekombinanten HEK293T und HL-1 Zelllinien (GSK3 β -TAP-, GSK3 β -Ser9-TAP-, GSK3 β -KI-TAP-Zellen) verifiziert werden. Für diesen Versuch wurden Antikörper gegen den TAP-Tag (α -HA, Maus) und gegen ACC1 (Kaninchen) eingesetzt. Die PLA-Ergebnisse von transfizierten HEK293T sind in Abb. 3.26 und von transfizierten HL-1 Zellen in Abb. 3.27 aufgeführt. Es wurden jeweils exemplarische Mikroskopaufnahmen von der PLAs (**A1**, **B1**, **C1**: primäre Antikörper: α -HA und α -ACC1) und den Kontroll-PLAs (**A2**, **B2**, **C3**: α -HA; **A3**, **B3**, **C3**: α -ACC1) von jeder getaggen GSK3 β -Zelllinie abgebildet.

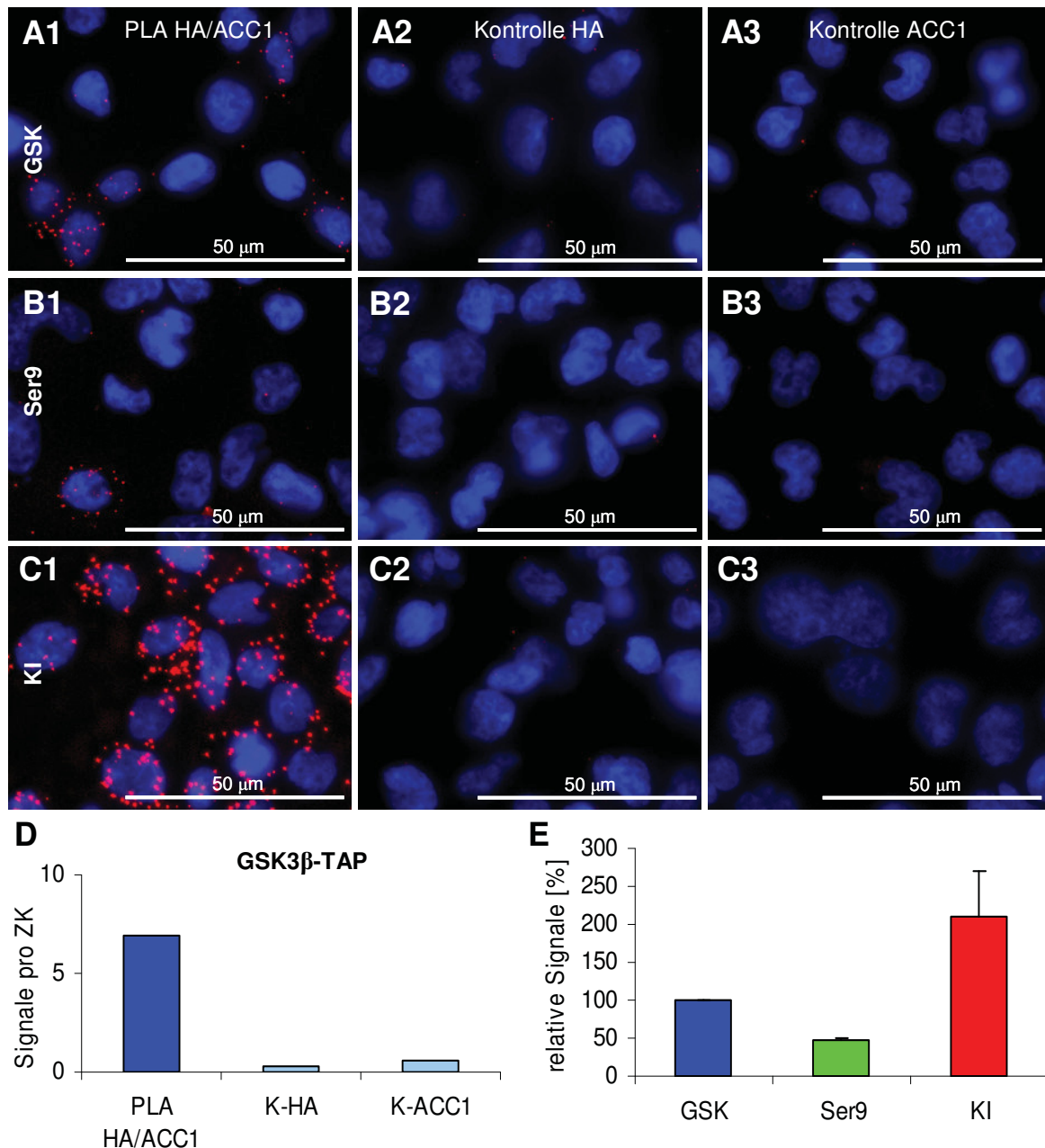


Abb. 3.26: PLA-HA/ACC1-Ergebnisse von den rekombinanten HEK293T Zellen. Von den GSK3 β -TAP (A), Ser9- (B) und KI-HEK293T Zellen (C) sind jeweils exemplarisch Mikroskopaufnahmen der PLAs dargestellt. In 1 ist jeweils die PLA-Probe mit den beiden primären Antikörpern α -HA/ α -ACC1, in 2 die Kontrolle α -HA und in 3 die Kontrolle α -ACC1 zu sehen. In D ist eine beispielhafte Signal-Auszählung eines Einzel-experiments für GSK3 β -TAP Zellen abgebildet und in E ist die quantitative Zusammenfassung von zwei unabhängig durchgeführten PLA-Experimenten aufgeführt. ZK: Zellkern, K: Kontrolle (n = 2).

In der PLA-Probe der GSK3 β -TAP-HEK293T Zellen in Abb. 3.26 A1 sind viele Signale zu sehen. Die entsprechende HA- (A2) wie auch die ACC1-Kontrolle (A3) weist sehr wenige Signale auf, nämlich weniger als 1 Signal pro ZK im Vergleich zur PLA-Probe die 7 Signale pro ZK (D). Für die Kontrollversuche der Ser9- und KI-Mutante wurden ähnlich geringe Signale beobachtet (vgl. B2, B3, C2, C3). In der PLA-Probe der Ser9-Mutante (B1) wurden weniger Signale als in PLA-GSK3 β -TAP (A1) festgestellt (E). Im Gegensatz zu den aktiven GSK3 β -TAP-Formen steht der PLA der inaktiven KI-Mutante (C1), denn hier wurden sehr

viele Signale nachgewiesen. Dieser Befund wird durch die quantitative Auswertung von zwei Experimenten belegt (E). Bei der Ser9-Mutante ist das relative Signal um 50 % im Vergleich zu der wildtypischen GSK3 β reduziert. Hingegen ist das Signal der KI-Mutante um mehr als 120 % gestiegen. Somit scheint die Ser9-Mutante nur halb so stark und die KI-Mutante doppelt so stark wie die getaggte WT-GSK3 β mit der ACC1 zu interagieren.

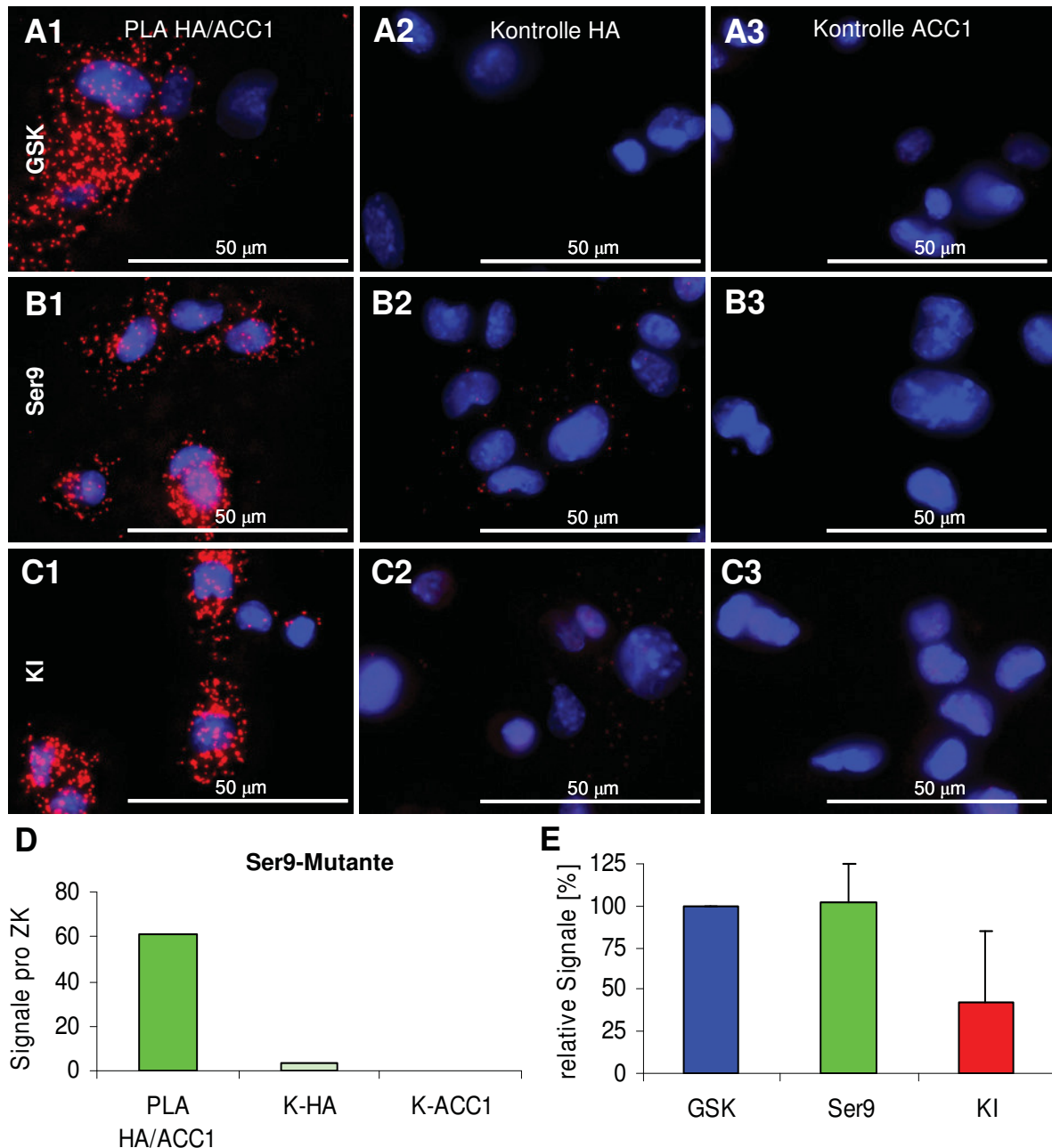


Abb. 3.27: PLA-HA/ACC1-Ergebnisse von den rekombinanten HL-1 Zellen. Es sind von jedem PLA der GSK3 β -TAP (A), Ser9- (B) und KI-HL-1 Zellen (C) jeweils beispielhaft eine Mikroskopaufnahme abgebildet. Die PLA-Probe mit den beiden primären Antikörpern α -HA/ α -ACC1 ist jeweils in 1, die Kontrolle α -HA in 2 und die Kontrolle α -ACC1 in 3 dargestellt. Eine beispielhafte Signal-Auszählung von den PLAs der Ser9-TAP Zellen ist in D zu sehen. E zeigt die quantitative Auswertung von zwei unabhängig durchgeführten PLA-Durchgängen aller rekombinanten Zelllinien. ZK: Zellkern, K: Kontrolle (n = 2).

Die PLA-Mikroskopaufnahmen in Abb. 3.27 zeigen, dass sowohl das GSK3 β -TAP (**A1**) als auch die Ser9-Mutante (**B1**) bzw. die KI-Mutante (**C1**) in HL-1 Zellen mit der ACC1 interagieren. Wie die exemplarisch dargestellte, quantitative Auswertung für die Interaktion der Ser9-Mutante mit ACC1 belegt (**D**), liegen die spezifischen Signale weit über dem jeweiligen Hintergrund (vgl. **A2, A3, B2, B3, C2, C3**). Die relative Signalstärke für die einzelnen GSK3 β -TAP-Formen zeigt ein Verhältnis von 1:1:0,5 für GSK3 β -TAP: Ser9-Mutante: KI-Mutante. Daraus ließe sich vermuten, dass die KI-Mutante in den HL-1 Zellen weniger stark mit der ACC1 interagiert.

Um eine unspezifische Interaktion zwischen dem TAP-Tag und der ACC1 auszuschließen, sollte die Frage beantwortet werden, ob die ACC1 auch mit der endogenen GSK3 β in den HEK293T und HL-1 Zellen einen Komplex bildet. Dazu wurden die wildtypischen HEK293T und HL-1 Zellen mit den Antikörpern gegen GSK3 β (Maus) und gegen ACC1 (Kaninchen) im PLA untersucht. In Abb. 3.28 sind die Ergebnisse der HEK293T in **A1-A5** und der HL-1 Zellen in **B1-B5** aufgeführt. Von den PLA-Proben (**A1, B1**: primäre Antikörper α -GSK3 β und α -ACC1) und den Kontrollen (α -GSK3 β : **A2, B2**; α -ACC1: **A3, B3**) sind jeweils exemplarisch Mikroskopaufnahmen gezeigt. Die Auszählungen von zwei PLA-Durchgängen sind zu jedem Zelltyp in **4** und **5** dargestellt.

Die PLA-Mikroskopaufnahme der HEK293T Zellen in **A1** zeigt im Vergleich zu der GSK3 β - (**A2**) und der ACC1-Kontrolle (**A3**) deutlich mehr Signale. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der Auszählung von zwei PLA-Experimenten (**A4** und **A5**) wider. Für die PLAs wurden 6 und 2,5 Signale pro ZK und für die Kontroll-PLAs weniger als 1 Signal pro ZK ermittelt. Somit ist die unspezifische Bindung der Antikörper sehr gering und es wurde erneut eine Interaktion zwischen GSK3 β und ACC1 nachgewiesen.

Bei den PLA-Mikroskopaufnahmen der HL-1 Zellen (**B1**) sind mehr Signale als in den HEK293T Zellen zu sehen. Die beiden Kontrollen (**B2** und **B3**) zeigen ebenfalls, wie die der HEK293T Zellen, kaum Hintergrund. Die Quantifizierung von zwei PLAs (**B4** und **B5**) bestätigt den vorherigen Befund, denn für die PLAs wurden 30 und 12 Signale pro ZK und für die Kontrollen weniger als 1 Signal pro ZK ausgezählt. So wurde der GSK3 β /ACC1-Komplex ebenfalls in den HL-1 verifiziert. Da die PLAs der HL-1 sehr viel höhere Signalzahlen als die der HEK293T Zellen zeigen, ist anzunehmen, dass der Komplex in den Kardiomyozyten stärker gebildet wird.

Die stärkere Komplexbildung zwischen GSK3 β und ACC1 in HL-1 Zellen könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Expressionsverhältnis von ACC1 zu GSK3 β in den Kardiomyozyten zugunsten einer erhöhten Komplexbildung vorliegt. Um dies zu untersuchen,

wurde eine WB-Analyse der Proteinextrakte der HEK293T und HL-1 Zellen mit Antikörpern gegen GSK3 β (grün) und gegen ACC1 (grün) durchgeführt (siehe Abb. 3.29).

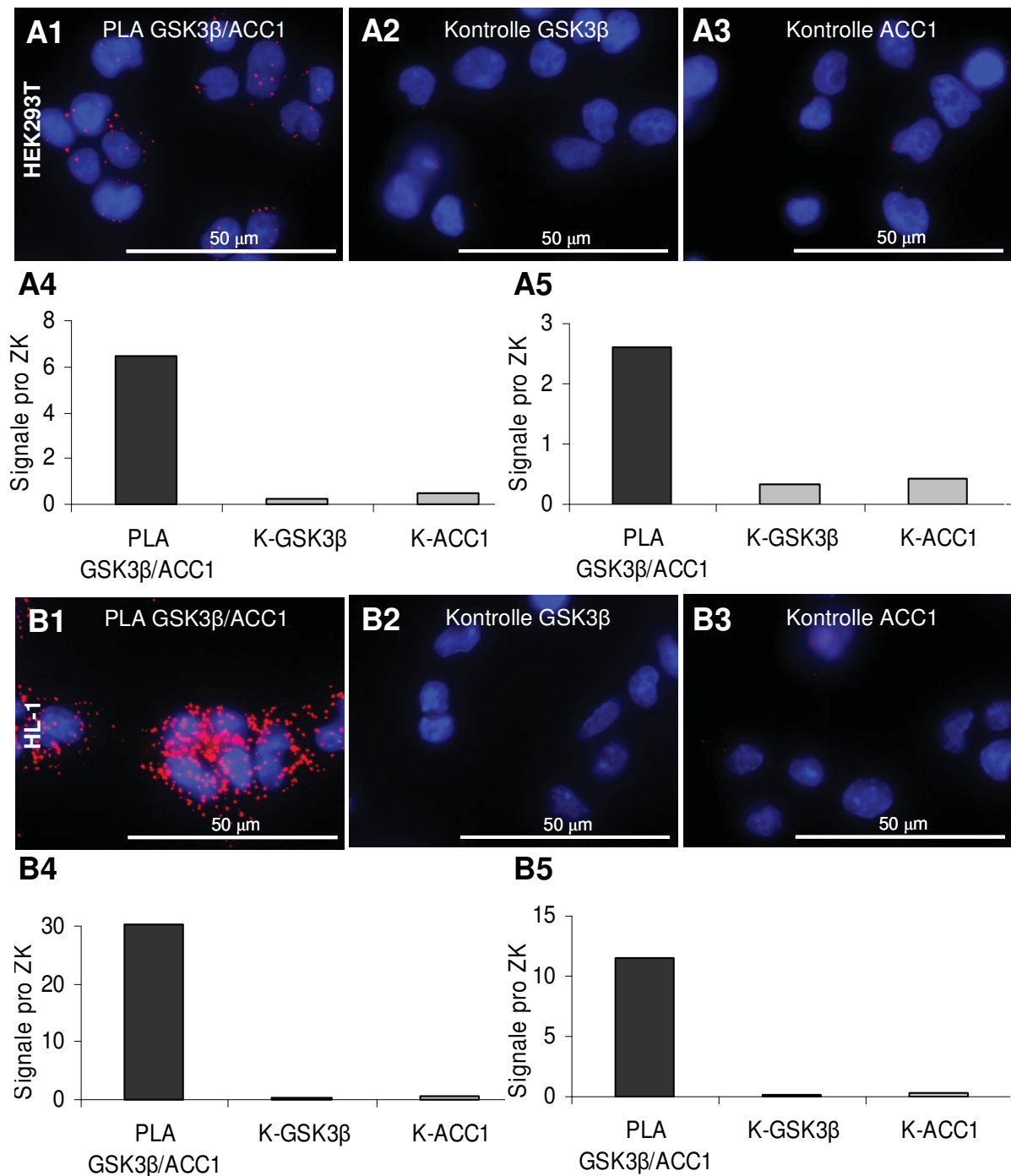


Abb. 3.28: PLA-GSK3 β /ACC1 Ergebnisse von den HEK293T (A1-A5) und HL-1 Zellen (B1-B5). In A1-A3 und B1-B3 sind exemplarisch Mikroskopaufnahmen abgebildet. Die Quantifizierung von zwei PLAs ist jeweils in 4 und 5 zu sehen. ZK: Zellkern, K: Kontrolle.

Während die ACC1 in den HEK293T und in den HL-1 Zellen etwa gleich stark exprimiert wurde, ist in den HL-1 Zellen eine etwas stärkere Expression der GSK3 β zu sehen. Dies zeigt die Quantifizierung der Signalintensitäten unter dem WB in Abb. 3.29. Diese etwas höhere GSK3 β -Proteinmenge könnte die verstärkte Komplexbildung in den HL-1 Zellen

unterstützen. Es können jedoch auch unterschiedliche Stoffwechselbedingungen für die verstärkte Interaktion in HL-1 Zellen verantwortlich sein.

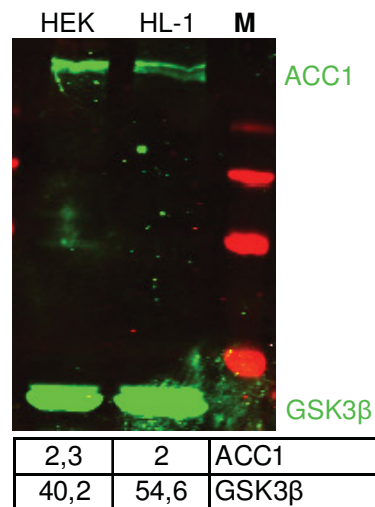


Abb. 3.29: Bestimmung des Mengenverhältnisses von GSK3β zu ACC1 in WT-HEK293T und HL-1 Zellen mittels WB-Analyse. Die WB-Analyse erfolgte mit den Antikörpern gegen GSK3β (grün) und ACC1 (grün). Unterhalb des WBs sind die Quantifizierungen der ACC1- und GSK3β-Signalintensitäten aufgeführt. HEK: HEK293T, M: Proteingrößenstandard.

3.3.3 Verifizierung des GSK3β/PRMT5-Komplexes

Die Ergebnisse der TAP/MS-Analysen zeigten, dass die PRMT5 mit der getaggtten aktiven und inaktiven GSK3β der HEK293T gleichermaßen koeluierte. Auch in HL-1 Zellen wurde sie mit den aktiven GSK3β-Formen lokalisiert (vgl. Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3). Der GSK3β-PRMT5-Komplex sollte mit PLAs zunächst in den rekombinanten HEK293T und HL-1 Zelllinien überprüft werden. Für diese Verifizierung wurden Antikörper gegen den TAP-Tag (α -HA, Maus) und gegen PRMT5 (Kaninchen) verwendet. In Abb. 3.30 sind von den rekombinanten Zelllinien jeweils exemplarisch Mikroskopaufnahmen der PLAs mit beiden primären Antikörpern dargestellt.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen zu Filamin A und ACC1 zeigte sich bei keiner der analysierten HEK293T (**A1**, **A2**, **A3**) und HL-1 Zelllinien (**B1**, **B2**, **B3**) ein positives Signal. Vielmehr ließ sich kein Unterschied zwischen den PLA-Proben und den Kontrollen (nicht gezeigt) ausmachen.

Ein gleiches Ergebnis wurde für die Analyse der endogenen GSK3β mit α -GSK3β-Antikörper und PRMT5 in HEK293T und HL-1 Zellen erhalten. Auch hier wurden im PLA keine positiven Signale ermittelt (Abb. 3.31).

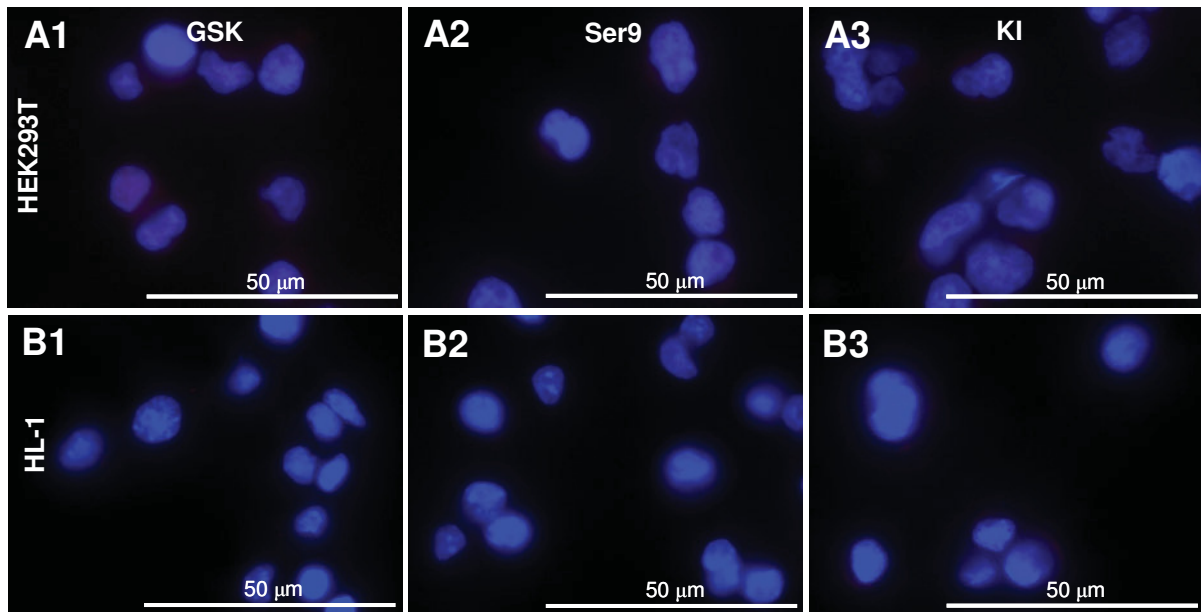


Abb. 3.30: PLA-HA/PRMT5-Ergebnisse von den rekombinanten HEK293T (A) und HL-1 Zellen (B). Von den untersuchten GSK3 β -TAP (1), Ser9- (2) und KI-HEK293T Zellen (3) sind jeweils exemplarisch Mikroskopaufnahmen der PLAs (α -HA (Maus) / α -PRMT5 (Kaninchen)) dargestellt. Die PLA-Kontrollen mit jeweils einem Antikörper sind nicht abgebildet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass weder die Kombination von α -GSK3 β - mit α -PRMT5-Antikörper noch von α -HA- mit α -PRMT5-Antikörper positive Ergebnisse erbrachten. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die GSK3 β -PRMT5-Interaktion im PLA nicht verifiziert werden konnte, könnte sein, dass die Bindungsstelle für den PRMT5-Antikörper von der Interaktion mit GSK3 β blockiert wird.

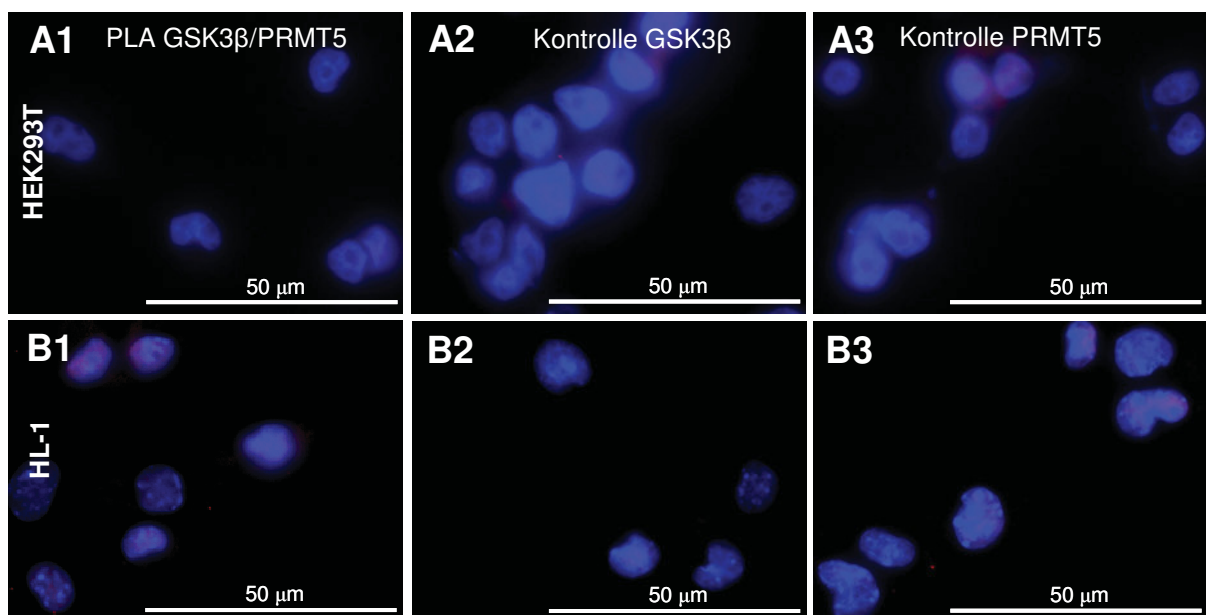


Abb. 3.31: PLA-GSK3 β /PRMT5-Ergebnisse von den HEK293T (A1-A4) und HL-1 Zellen (B1-B4). A1-A3 und B1-B3 zeigen exemplarisch Mikroskopaufnahmen. In 1 ist jeweils die PLA-Probe, in 2 die Kontrolle HA und in 3 die Kontrolle PRMT5 zu sehen.

3.3.4 Verifizierung des GSK3 β /PKA I α -Komplexes

Die Ergebnisse der TAP/MS-Analysen zeigten reproduzierbar eine Interaktion der aktiven getaggen GSK3 β -Formen (GSK3 β -TAP und Ser9-Mutante) mit den beiden Untereinheiten (regulatorische UE Typ I α (RI α) und katalytische UE α (cata)) der PKA I α in HEK293T Zellen sowie der PKA RI α in HL-1 Kardiomyozyten. Die Bandenintensitäten der koeluierten PKA I α -Proteine war dabei im Vergleich zu den anderen Interaktionspartnern besonders stark (vgl. Abb. 3.19), so dass die PKA I α -GSK3 β -TAP-Interaktion näher untersucht wurde.

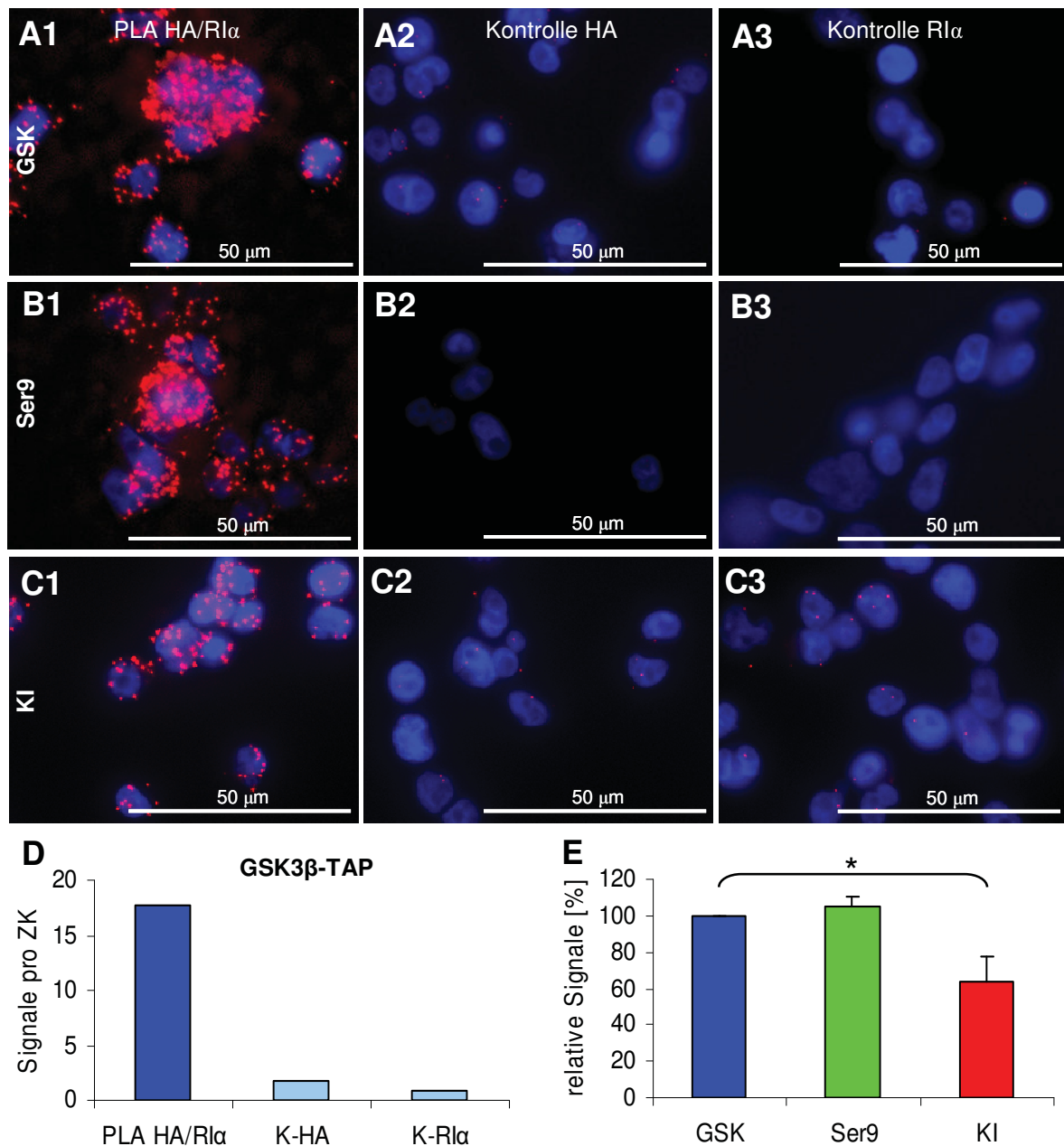


Abb. 3.32: PLA-HA/PKA RI α -Ergebnisse von den transgenen HEK293T Zellen. Von den GSK3 β -TAP- (A1-A3), Ser9- (B1-B3) und KI-HEK293T Zellen (C1-C3) sind exemplarisch Mikroskopaufnahmen der PLAs dargestellt. **1** zeigt jeweils die PLA-Probe mit beiden primären Antikörpern α -HA und α -PKA RI α , **2** die Kontrolle HA und **3** die Kontrolle PKA RI α . In **D** ist eine exemplarische Signal-Auszählung von den PLAs der GSK3 β -TAP Zellen und in **E** die quantitative Auswertung aufgeführt. ZK: Zellkern, K: Kontrolle (n = 3, außer Ser9 n = 2).

Die Verifizierung der Komplexbildung erfolgte mittels PLA an den einzelnen rekombinanten Zelllinien. Hierzu wurden die Antikörper-Kombinationen α -HA (Kaninchen) / α -PKA RI α (Maus) verwendet, um die Interaktion von GSK3 β -TAP mit PKA RI α nachzuweisen. Eine Analyse der Interaktion von GSK3 β -TAP mit cata wurde hier nicht durchgeführt, da der α -PKA cata-Antikörper in den GSK3 β -TAP HEK293T Zellen bereits einen hohen Hintergrund zeigte (nicht abgebildet).

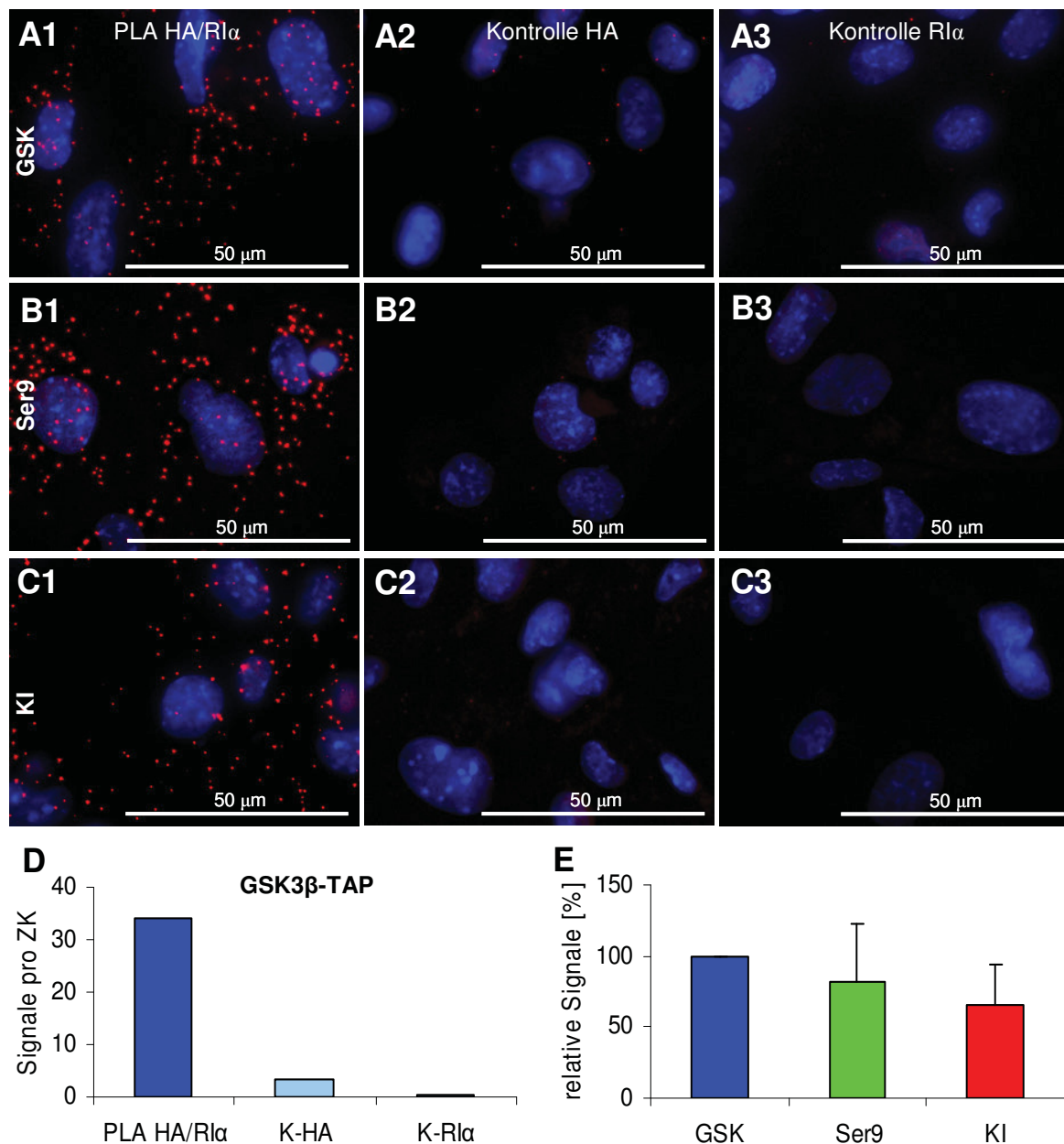


Abb. 3.33: PLA-HA/PKA RI α -Ergebnisse von den transgenen HL-1 Zellen. A1-A3 zeigen beispielhaft Mikroskopaufnahmen von den GSK3 β -TAP-, B1-B3 von den Ser9- und C1-C3 von den KI-HL-1 Zellen. Dabei ist in 1 jeweils die PLA-Probe HA/PKA RI α , in 2 die Kontrolle HA und in 3 die Kontrolle PKA RI α abgebildet. Eine exemplarische Auszählung von den transgenen GSK3 β -TAP Zellen ist in D zu sehen und in E ist die quantitative Auswertung dargestellt. ZK: Zellkern, K: Kontrolle (n = 2).

Exemplarische PLA-Ergebnisse sind in Abb. 3.32 für HEK293T und in Abb. 3.33 für HL-1 Zellen aufgeführt. In **A** sind jeweils die Ergebnisse der getaggtten WT-GSK3 β , in **B** der Ser9-Mutante und in **C** der KI-Mutante dargestellt (PLA-Reaktion α -HA/ α -PKA RI α : **A1, B1, C1**; Kontrollreaktion α -HA: **A2, B2, C2**; Kontrollreaktion α -PKA RI α : **A3, B3, C3**).

Wie in den mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 3.32 klar zu sehen ist, führte der PLA zum Nachweis der Interaktion von den GSK3 β -TAP-Varianten mit der PKA RI α , da die Signale (**A1, B1, C1**) weit über denen der Kontrollen (**A2, A3, B2, B3, C2, C3**) liegen. Dies bestätigt auch die quantitative Auswertung der GSK3 β -TAP HEK293T Zellen (**D**). Wenn die relativen Signalstärken verglichen werden (**E**), zeigt die inaktive KI-Mutante einen geringeren Wert für die Interaktion als die aktiven Formen (GSK3 β -TAP und Ser9-Mutante). Dieses Ergebnis bestätigt den Befund aus den TAP/MS-Experimenten, bei denen die PKA RI α nur mit den aktiven GSK3 β -TAP-Formen aufgereinigt wurde (vgl. Tabelle 3.2).

Gleiche Untersuchungen wurden für die verschiedenen HL-1 Zelllinien durchgeführt (Abb. 3.33). Auch hier ließ sich eine Interaktion der GSK3 β -TAP-Formen mit der PKA RI α nachweisen (**A1, B1, C1**), da die Signale der PLA-Reaktionen weit über den Hintergrundsignalen (**A2, A3, B2, B3, C2, C3**) lagen (vgl. auch exemplarische Signal-Auszählung in **D**). Die Auswertung von zwei PLA-Experimenten in HL-1 Zellen zeigt, dass bei der KI- um 35 % und bei der Ser9-Mutante um 20 % weniger Signale detektiert wurden als bei der GSK3 β -TAP (**E**). Demzufolge lässt sich sagen, dass die getaggte WT-GSK3 β am stärksten, die Ser9-Mutante geringer und die KI-Mutante am geringsten mit RI α interagiert. Somit scheint die Interaktion von RI α mit GSK3 β etwas weniger stark ausgeprägt zu sein, wenn GSK3 β inaktiv ist.

In weiteren Untersuchungen wurde bestätigt, dass auch die endogene GSK3 β mit der PKA RI α interagiert. Dieser Nachweis gelang sowohl für die PKA RI α als auch für die PKA cata in HEK293T (PKA RI α : Abb. 3.34 **A1-A5**; PKA cata: Abb. 3.34 **B1-B5**) und in HL-1 Zellen (PKA RI α : Abb. 3.35 **A1-A5**; PKA cata: Abb. 3.35 **B1-B5**). Sowohl die mikroskopischen Aufnahmen als auch die quantitativen Analysen zeigen, dass die Kontrollreaktionen einen geringen Hintergrund aufweisen, da die Werte unter denen der PLA-Reaktionen liegen (Abb. 3.34 / Abb. 3.35 jeweils **A4, A5, B4, B5**).

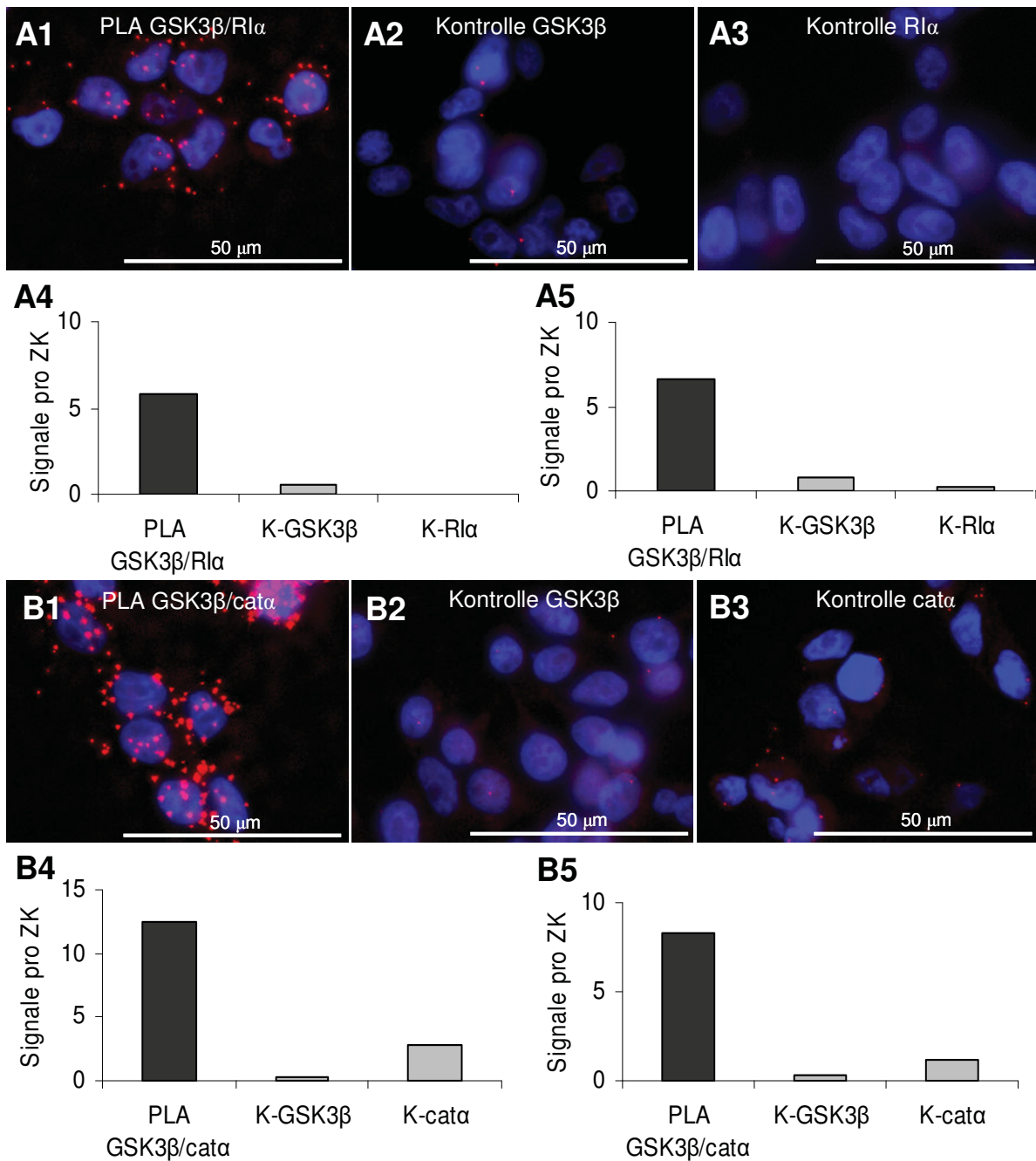


Abb. 3.34: PLA-GSK3β/PKA RIα (A1-A5) und PLA-GSK3β/PKA cata Ergebnisse (B1-B5) von HEK293T Wildtypzellen. Die Analysen erfolgten mit den Antikörper-Kombinationen α -GSK3 β (Kaninchen) / α -PKA RI α (Maus) und α -GSK3 β (Maus) / α -PKA cata (Kaninchen). In **A1-A3** und **B1-B3** sind jeweils exemplarisch Mikroskopaufnahmen dargestellt, wobei **1** die PLA-Reaktionen zeigen und in **2** bzw. **3** die Kontrollreaktionen abgebildet sind. **A4-A5** und **B4-B5** sind jeweils zwei unabhängig durchgeführte PLA-Auszählungen aufgeführt. ZK: Zellkern, K: Kontrolle.

Die PLA-Ergebnisse belegen eine Komplexbildung von WT-GSK3 β mit PKA RI α bzw. WT-GSK3 β mit PKA cata in den HEK293T und HL-1 Zellen.

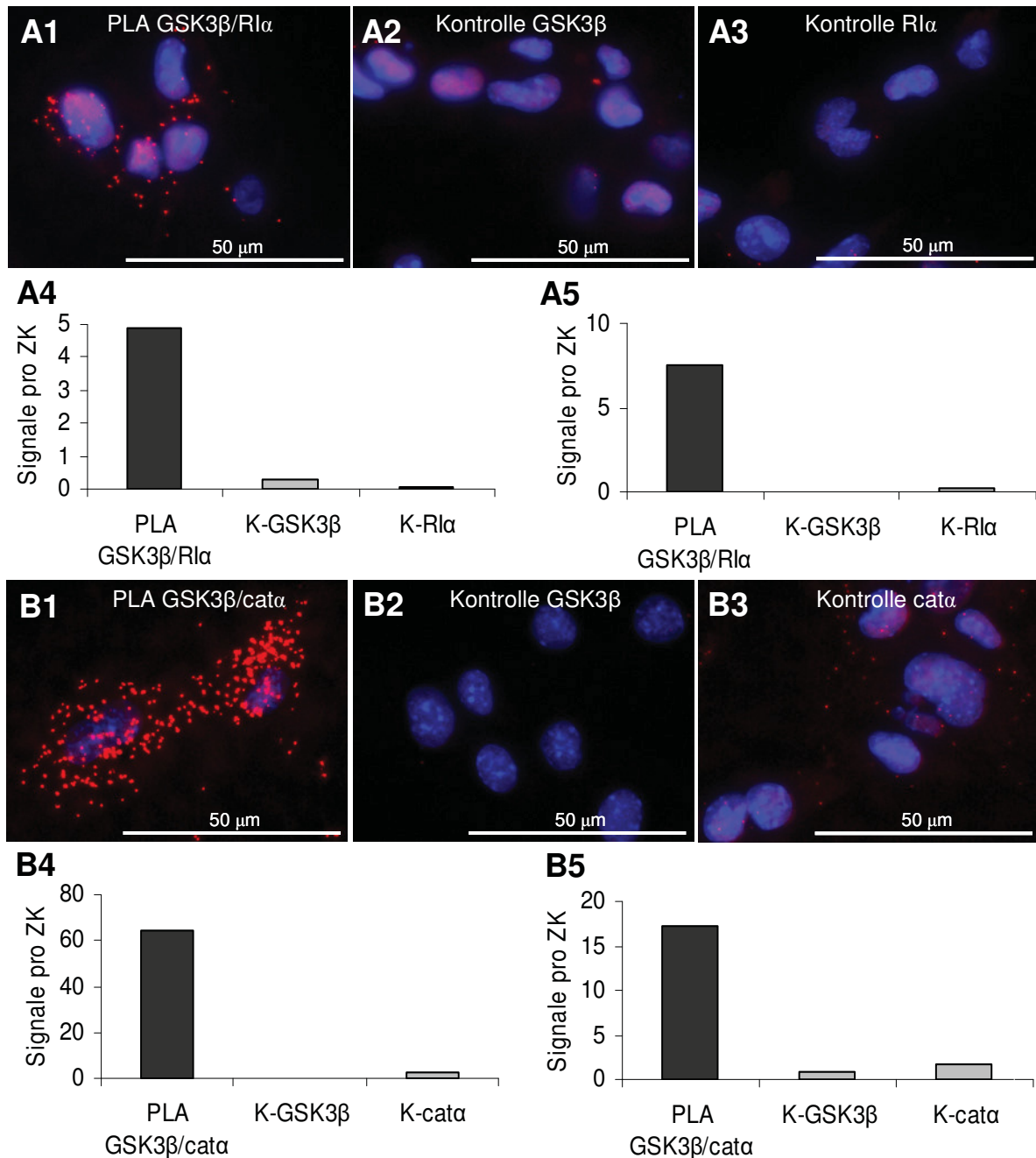


Abb. 3.35: PLA-GSK3β/PKA R1α (A1-A5) und PLA-GSK3β/PKA catα Ergebnisse (B1-B5) von HL-1 Wildtypzellen. Die Experimente erfolgten mit den Antikörper-Kombinationen α -GSK3β (Kaninchen) / α -PKA R1α (Maus) und α -GSK3β (Maus) / α -PKA catα (Kaninchen). **A1-A3** und **B1-B3** zeigen exemplarisch Mikroskopaufnahmen. Hierbei sind in **1** die PLA-Reaktionen und in **2** bzw. **3** die entsprechenden Kontrollreaktionen zu sehen. In **A4-A5** und **B4-B5** sind die Auswertungen von zwei unabhängig durchgeführten PLA-Analysen dargestellt. ZK: Zellkern, K: Kontrolle.

3.3.5 Auswahl eines potenziellen GSK3β-Interaktionspartner für funktionelle Untersuchungen

Die PLA-Ergebnisse zeigten, dass drei von vier untersuchten möglichen GSK3β-Interaktionspartnern, die zuvor mit der TAP/MS-Methode ermittelt worden waren, verifiziert werden konnten (siehe Zusammenfassung der TAP/MS- und PLA-Ergebnisse in Tabelle 3.4).

Für Filamin A (FLNA) wurde die Interaktion in HEK293T Zellen bestätigt, während in HL-1 Zellen keine Interaktion gezeigt werden konnte. Da FLNA in HL-1 Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, ist auch dieses Ergebnis nicht im Widerspruch zu den TAP/MS-Ergebnissen, sondern belegt vielmehr die Spezifität des PLAs. In den HEK293T Zellen schien die GSK3 β -TAP/FLNA-Interaktion durch die GSK3 β -TAP-Aktivität reguliert zu werden, denn bei der inaktiven KI-Mutante waren nur sehr wenige PLA-Signale detektierbar.

Die ACC1 konnte mit den PLAs in beiden Zelltypen und auch unter endogenen Bedingungen als GSK3 β -Interaktionspartner verifiziert werden. Die ACC1 interagiert in den HEK293T Zellen am stärksten mit der inaktiven GSK3 β und in den HL-1 mit den aktiven GSK3 β -Formen. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den TAP/MS-Ergebnissen, wo die ACC1 in HEK293T Zellen nur mit der GSK3 β -TAP und in den HL-1 Zellen mit allen GSK3 β -Formen isoliert wurde. Somit lässt sich hier keine eindeutige Tendenz der Komplexbildung in Abhängigkeit der GSK3 β -Aktivität bestimmen.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der TAP/MS- und PLA-Ergebnisse. Für die TAP/MS-Ergebnisse wurde nur aufgelistet, ob die möglichen GSK3 β -Interaktionspartner detektiert (+) oder nicht gefunden (-) wurden. Bei den PLA-Ergebnissen wurde die relativen Signalintensitäten (++ viele Signale, + wenig Signale, - keine Signale) zwischen den Zelllinien berücksichtigt. trans.: transient exprimierende Zellen, GSK: GSK3 β -TAP Zellen, Ser9: GSK3 β - Ser9-TAP Zellen, GSK3 β -KI-TAP Zellen, n.d.: nicht durchgeführtes Experiment.

	HEK293T Zellen								HL-1 Zellen								
	trans.	stabil							WT	stabil							WT
	GSK	GSK		Ser9		KI		GSK		Ser9		KI					
	TAP/MS	TAP/MS	PLA	TAP/MS	PLA	TAP/MS	PLA	PLA	TAP/MS	PLA	TAP/MS	PLA	TAP/MS	PLA	PLA		
FLNA	+	-	++	-	++	-	+	+	-	-	-	-	-	-	n.d.		
ACC1	+	+	+	-	+	-	++	+	+	++	+	++	+	+	+		
PRMT5	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-		
PKA RIα	+	+	++	+	++	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+		
PKA cata	+	+	n.d.	+	n.d.	-	n.d.	+	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	+		

PRMT5 wurde sowohl in den rekombinanten HEK293T als auch in den HL-1 Zellen nicht als GSK3 β -Interaktionspartner bestätigt. Die Komplexbildung der endogenen GSK3 β mit der PRMT5 konnte ebenfalls in beiden Zelllinien nicht verifiziert werden.

Die beiden Untereinheiten der PKAI α konnten wiederum als GSK3 β -Interaktionspartner in wildtypischen HEK293T und HL-1 Zellen bestätigt werden. Des Weiteren untermauerten die PLA-Ergebnisse, insbesondere in den HEK293T Zellen, die Beobachtung aus den TAP/MS-Analysen, dass der Komplex aus PKAI α und GSK3 β -TAP von der GSK3 β -Aktivität abhängig zu sein scheint. Dieser interessante Befund der Komplexbildung in Abhängigkeit der GSK3 β -Aktivität sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

3.4 Funktionelle Analyse des GSK3 β -PKA $I\alpha$ -Komplexes

3.4.1 TAP/MS-Analyse zur Identifizierung des GSK3 β -interagierenden Proteins (GSKIP)

In der Literatur wurde gezeigt, dass die Typ II Isoform der regulatorischen PKA Untereinheit über ein kurzes Adapterprotein GSKIP (GSK3 β interagierendes Protein) einen Komplex mit der GSK3 β ausbilden kann (Hundsruker et al., 2010). Um zu prüfen, ob GSKIP (17 kDa) mit der GSK3 β -TAP-Variante interagiert, wurde eine TAP/MS-Analyse von den stabil GSK3 β -TAP exprimierenden HEK293T Zellen durchgeführt. Als Kontrolle wurden WT-HEK293T Zellen eingesetzt.

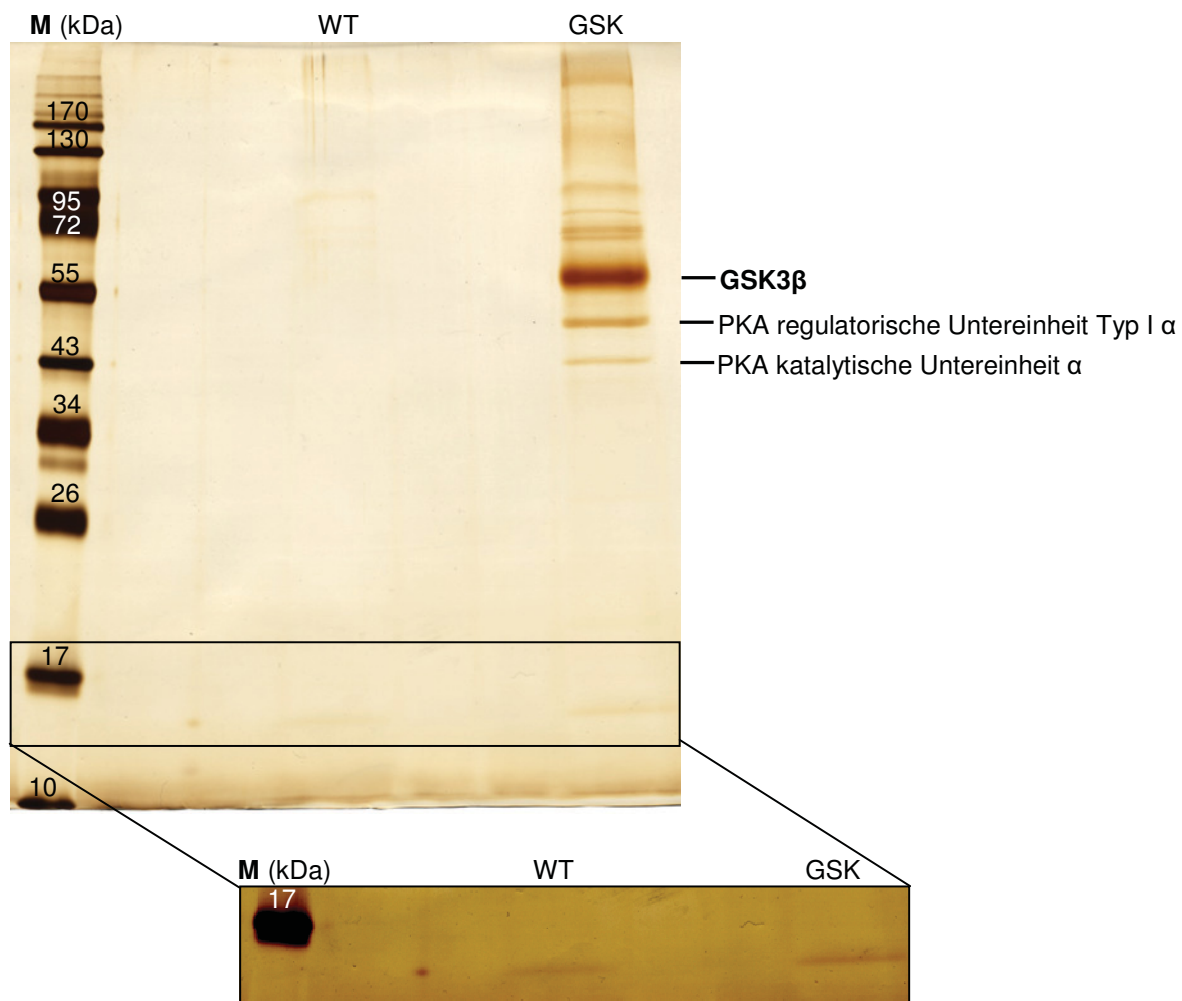


Abb. 3.36: Exemplarisches Silbergel einer TAP-Analyse zur Identifizierung des GSKIPs. Für das StrepTactin-Eluat der GSK3 β -TAP HEK293T Zellen wurden die bekannten Banden von GSK3 β und den beiden UE für PKA $I\alpha$ beschriftet. Unterhalb des Silbergels ist ein Teilausschnitt auf der Höhe der 17 kDa-Größenstandard-Bande mit einem stärkeren Kontrast dargestellt. M: Proteingrößenstandard, WT: Wildtyp-Eluat, GSK: GSK3 β -TAP-Eluat.

Für eine erfolgreiche Identifizierung des kleinen GSKIP wurden für diese Analyse jeweils die doppelten Proteinmengen im Vergleich zum Standard TAP-Protokoll (20x 15-er

Zellkulturplatten; ca. 200 mg Gesamtproteinextrakt) eingesetzt. Für eine gute Auftrennung im niedermolekularen Bereich wurden die StrepTactin-Eluate auf einem hochprozentigen SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetrennt und isolierte Proteine mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

Die Abb. 3.36 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Trotz der verdoppelten Proteinmenge sind bei den Kontrollzellen (WT) kaum Banden sichtbar, so dass es auch unter diesen Bedingungen nicht zu einer Anreicherung von unspezifisch gebundenen Proteinen kam. Im Gegensatz dazu wurden aus den GSK3 β -TAP HEK293T Zellen wie erwartet eine Vielzahl von Proteinen mit der TAP isoliert (GSK). Die bekannten Banden der angereicherten GSK3 β -TAP und der beiden PKA I α UE (regulatorische UE Typ I α und katalytische UE α) wurden auch hier gefunden. Im niedermolekularen Bereich auf der Höhe von 17 kDa, wo GSKIP erwartet würde, wurde kein Signal detektiert, das in der Intensität zu den isolierten PKA-Banden passen würde. Lediglich kurz unterhalb der 17 kDa Region wurde ein schwaches Signal detektiert, das aber auch in der WT-Kontrolle sichtbar war. Obwohl weder Größe noch Intensität noch die Präsenz in der WT-Kontrolle auf GSKIP hindeuten, wurden beide Regionen aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die hierbei gefundenen Peptide enthielten keine GSKIP-Sequenzen und konnten keinem spezifischen Protein zugeordnet werden. Daher ergaben die Analysen keinen Hinweis darauf, dass GSKIP an der Ausbildung des GSK3 β -TAP/PKA I α -Komplexes beteiligt ist.

3.4.2 StrepTactin-Präzipitation (SP) des GSK3 β -TAP/PKA I α -Komplexes

In weiteren Analysen wurde genauer der Frage nachgegangen, inwieweit die Komplexbildung von GSK3 β und PKA I α durch die Aktivität der jeweiligen Proteinkinase moduliert wird. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Beobachtung aus den TAP/MS-Analysen, wo sich die Interaktion der GSK3 β mit der PKA I α zwischen der aktiven GSK3 β -TAP-Formen und der inaktiven KI-Mutante unterschied, näher untersucht. Um diesen Befund quantitativ genauer zu erfassen, wurden die drei getaggten GSK3 β -TAP-Formen der HEK293T Zellen durch Bindung an die StrepTactin-Sepharose (SP) präzipitiert und im WB analysiert. Für die WB-Analysen wurden spezifische Antikörper gegen den TAP-Tag (α -HA, grün), die PKA RI α (grün) Untereinheit und die PKA cat α (rot) Untereinheit eingesetzt.

In Abb. 3.37 ist die WB-Analyse der Präzipitate aus allen rekombinanten HEK293T Zellen und den wildtypischen Kontrollzellen (WT) dargestellt. Um die Effizienz der Aufreinigung zu kontrollieren, wurden jeweils vom Proteinextrakt (P), vom Präzipitatüberstand (Ü) und von

der Waschfraktion (W) vergleichbare Teilmengen und die gesamte Menge des StrepTactin-Präzipitates (SP) aufgetragen.

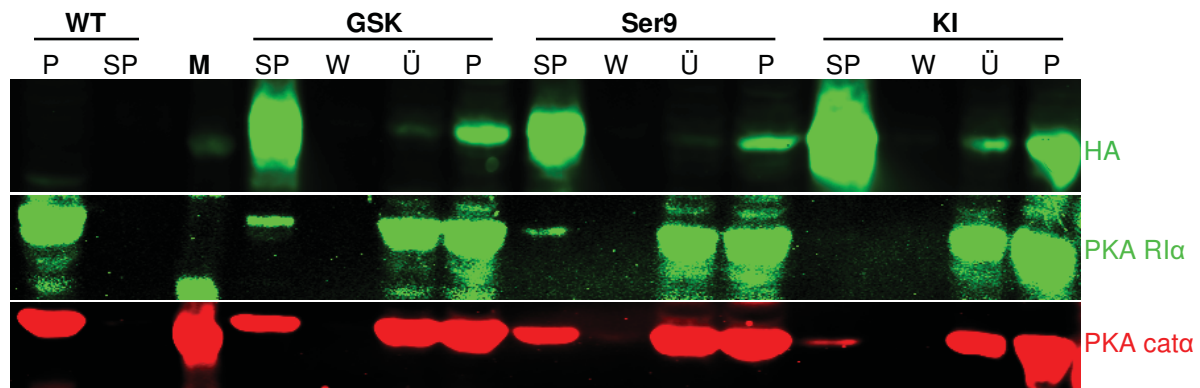


Abb. 3.37: StrepTactin-Präzipitation der rekombinanten GSK3 β -TAP-HEK293T Zellen zur Analyse des GSK3 β -PKA I α -Komplexes. Von den Proteinextrakten (P), Präzipitatüberständen (Ü) und Waschfraktionen (W) wurden vergleichbare Mengen und von dem StrepTactin-Präzipitat (SP) die gesamte Probe für die WB-Analyse aufgetragen. Die WB-Analyse wurde mit dem Antikörper gegen den TAP-Tag (α -HA, grün), die PKA RI α (grün) und die PKA cata (rot) durchgeführt. M: Proteingrößenstandard, WT: Wildtypzellen, GSK: GSK3 β -TAP.

Der WB zeigt im grünen Kanal (α -HA) wie erwartet kein Signal für die WT-Kontrolle. Im Gegensatz dazu ist in den GSK3 β -TAP Zellen (GSK) im Proteinextrakt (P) ein starkes und im Überstand (Ü) ein schwächeres Signal zu sehen. Somit erfolgte fast eine vollständige Bindung des Fusionsproteins an die StrepTactin-Sepharose. Da in der Waschfraktion (W) kein Signal erkennbar ist, kann von einem minimalen Proteinverlust ausgegangen werden. Das sehr starke Signal im Präzipitat (SP) zeigt, dass eine sehr große Menge des GSK3 β -TAP-Proteins aufgereinigt wurde. Die Ser9- und die KI-Mutante verhielten sich bei der StrepTactin-Präzipitationen wie die nicht mutierte GSK3 β -TAP. Folglich wurden diese Fusionsproteine ebenfalls ohne großen Verlust bei der Aufreinigung aus dem Zellextrakt isoliert. Der Vergleich zwischen den SP-Signalen zeigt, dass unterschiedliche absolute Mengen der Fusionproteine isoliert wurden. Von dem KI-Protein wurde die größte, von dem GSK3 β -TAP-Protein etwas weniger und von dem Ser9-Protein die geringste Menge präzipitiert (KI-Mutante > GSK3 β -TAP > Ser9-Mutante).

Es wurde nun untersucht, in welchem Ausmaß die Untereinheiten der PKA I α mit den präzipitierten GSK3 β -TAP-Proteinen kopräzipitiert wurden. Bei der WT-Kontrolle ist im grünen Kanal (α -PKA RI α) und im roten Kanal (α -PKA cata) jeweils ein Signal im Ausgangsextrakt (P), aber kein Signal im SP zu finden. Demzufolge wurden die beiden Untereinheiten der PKA nicht durch unspezifische Bindung an das Säulenmaterial isoliert. Im Gegensatz dazu wurden in den Präzipitaten der GSK3 β -TAP und der Ser9-Mutante sowohl die PKA RI als auch die PKA cata detektiert (vgl. GSK-SP; Ser9-SP). Werden die Signalintensitäten jedoch mit den Signalen im Überstand nach der Präzipitation (Ü)

verglichen, so wird deutlich, dass nur ein geringer Anteil der gesamten PKAI α an die GSK3 β -TAP- und die Ser9-Proteine gebunden war. Für die KI-Mutante ergibt sich jedoch ein anderes Bild. Hier ist für die PKA RI kein Signal nachweisbar, während für die PKA cat α ein schwaches, aber deutliches Signal detektiert wurde (vgl. KI-SP).

Dieser beschriebene Befund wurde bei einer Wiederholung dieser Analyse noch einmal bestätigt. Somit bestätigen diese Experimente die Vermutung, dass der GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplex stärker ausgeprägt ist, sobald GSK3 β in der aktiven Form (GSK3 β -TAP und Ser9-Mutante) vorliegt.

3.4.3 Analyse des GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplexes nach GSK3 β Stimulation/Inhibition

Bei den Untersuchungen der KI-Mutante (TAP/MS- und PLA-Analysen, StrepTactin-Präzipitation) konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die abgeschwächte Interaktion mit der PKAI α durch eine strukturelle Veränderung der GSK3 β infolge der eingeführten Mutation ausgelöst wurde. Daher sollte in weiteren Experimenten die Aktivität der GSK3 β -TAP moduliert werden. In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass LY294002 (PI3-Kinase Inhibitor) zu einer verminderten (ca. 80 %-Reduktion) und Insulin zu einer gesteigerten GSK3 β -Phosphorylierung am Ser9 (ca. 35 %-Zunahme) führt (vgl. Kapitel 3.2.2). Möglicherweise könnten diese Unterschiede in der GSK3 β -Phosphorylierung ausreichen, um den Komplex mit PKAI α zu beeinflussen. Um dieses zu untersuchen wurden die GSK3 β -TAP-HEK293T Zellen mit LY294002 (100 μ M für 1 h) bzw. Insulin (432 nM für 10 min) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Präzipitation der GSK3 β -Fusionsproteine durch Bindung an StrepTactin-Sepharose (SP). Die SP-Proben wurden mit Antikörpern gegen den TAP-Tag (α -HA, rot), die PKA RI α UE (grün) und gegen die PKA cat α UE (rot) im WB analysiert (Abb. 3.38).

Die WB-Analyse in Abb. 3.38 **A** steht exemplarisch für insgesamt drei unabhängige Experimente, die mit LY294002 bzw. Insulin behandelten GSK3 β -TAP Zellen durchgeführt wurden. Der WB zeigt, dass in etwa gleiche Mengen der rekombinanten GSK3 β -Proteine unter den verschiedenen Bedingungen isoliert wurden (vgl. HA-Signale, rot). Bei den LY294002 behandelten Zellen wurden im Vergleich zu den mit Insulin behandelten Zellen verstärkte Signale für beide PKAI α -Untereinheiten detektiert. Dieses spiegelt sich auch in der quantitativen Auswertung aller Versuche wider (Abb. 3.38 **B**). Somit zeigte sich bei den LY294002 behandelten Zellen eine Signalsteigerung um ca. 40 % für RI α und um 75 % für

cata. Bei den Insulin behandelten Zellen wurde eine Signalreduktion um ca. 50 % für RI α und 25 % für cata gemessen. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die weniger phosphorylierte und somit aktivere GSK3 β -TAP (LY294002) verstärkt bzw. die stärker phosphorylierte und inaktivere GSK3 β -TAP (Insulin) weniger stark mit PKAI α interagiert. Dieses Experiment unterstützt wiederum die These, dass der GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplex von der GSK3 β -TAP-Aktivität abhängig ist, denn GSK3 β -TAP-Inaktivierung führt zu einer Auflösung und GSK3 β -TAP-Aktivierung zu einer Verstärkung des GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplexes.

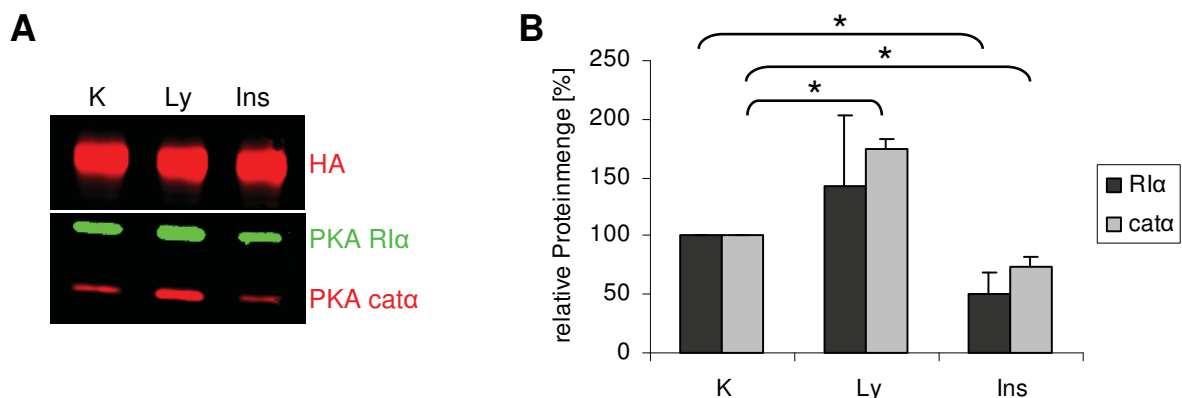


Abb. 3.38: WB-Analyse des GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplexes nach GSK3 β Stimulation mit LY294002 (Ly) und Inhibition mit Insulin (Ins). A) Exemplarische WB-Analyse der GSK3 β -TAP-HEK293T Zellen nach GSK3 β -Stimulation/Inhibition. Hierfür wurden die rekombinanten GSK3 β -TAP-Proteine zunächst mit einer StrepTactin-Präzipitation isoliert und anschließend mit einem WB mit Antikörpern gegen HA (rot), PKA RI α (grün) und PKA cata (rot) analysiert. B) Quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen. Hierzu wurde sowohl die regulatorische (RI α) als auch die katalytische (cata) UE auf die isolierte GSK3 β -TAP-Proteinmenge bezogen (RI α /HA, cata/HA). Die jeweiligen Werte der Kontrollzellen wurden auf 100 % gesetzt und dienen dann als Bezugswert für die Normierung der LY294002- und Insulin-Werte. K: Serumzugskontrolle, Ly: mit LY294002 (100 μ M für 1 h) behandelte Zellen, Ins: mit Insulin (432 nM für 10 min) behandelte Zellen (n = 3, p < 0,05).

3.4.4 Einfluss von Lithiumchlorid (LiCl) inhibierter GSK3 β -TAP auf den GSK3 β -TAP/PKAI α -Komplex

In diesem Experiment sollte analysiert werden, inwieweit die PKAI α -Bindung zu GSK3 β -TAP durch einen weiteren GSK3 β -Inhibitor gehemmt werden kann. Lithiumchlorid (LiCl) gilt als starker GSK3 β -Inhibitor. Verschiedene Mechanismen wurden für seine Hemmwirkung diskutiert. So besitzt LiCl eine kompetitive Wirkung auf Magnesiumionen (Mg²⁺), die essentiell für die Aktivität der GSK3 β bei der Phosphorylierung vieler ihrer Substrate sind. Durch eine Hemmung von Phosphatasen, die für eine Dephosphorylierung von GSK3 β wichtig sind, sorgt LiCl für eine vermehrte GSK3 β -Phosphorylierung. Außerdem soll über eine LiCl-vermittelte Aktivierung von GSK3 β -phosphorylierender Kinasen (PKC α , AKT) GSK3 β verstärkt phosphoryliert und somit inaktiviert werden. Um den Einfluss von

LiCl auf den Komplex von GSK3 β -TAP und der PKA I α zu untersuchen, wurden die GSK3 β -TAP- und Ser9-HEK293T Zellen mit LiCl (20 mM) ÜN inkubiert. Für die Kontrollbedingungen wurde anstelle von LiCl NaCl (20 mM) dem Medium zugesetzt. Nach einer StrepTactin-Präzipitation wurden WB-Analysen der aufgereinigten GSK3 β -TAP- und Ser9-Proteine durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgten mit Antikörpern gegen den TAP-Tag (α -HA, grün), PKA RI α UE (grün) und PKA cata UE (rot; Abb. 3.39).

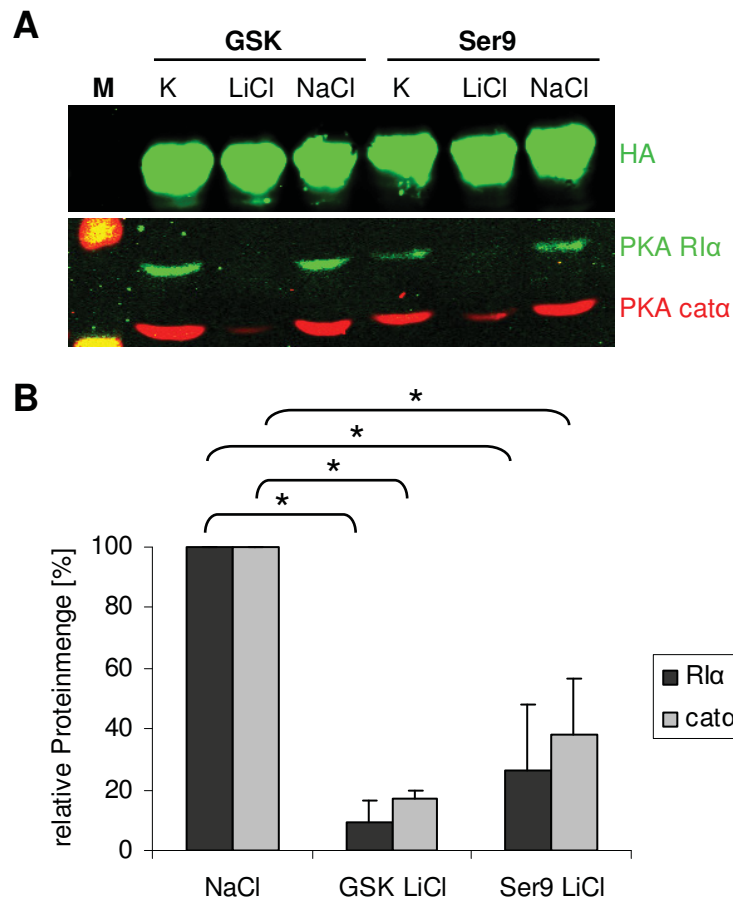


Abb. 3.39: WB-Analyse des GSK-PKA I α -Komplexes nach GSK3 β Inhibition mit LiCl. **A)** Exemplarische WB-Analyse der StrepTactin-Präzipitate von LiCl- oder NaCl-behandelten (20mM) GSK3 β -TAP- und Ser9-HEK293T Zellen. Der WB wurde mit Antikörpern gegen HA (grün), PKA RI α (grün) und PKA cata umgesetzt. **B)** Quantitative Auswertung von drei unabhängigen WB-Analysen. Für die Berechnung der relativen PKA-Proteinmenge wurde wie im Kapitel 3.4.3 Abb. 3.38 beschrieben verfahren. Hierbei wurden die LiCl-Werte auf die entsprechende NaCl-Kontrolle normiert. K: unbehandelte Zellen, GSK: GSK3 β -TAP (n = 3, p < 0,05).

In Abb. 3.39 **A** ist exemplarisch eine WB-Analyse des oben erklärten Experiments dargestellt. Im grünen Kanal für α -HA ist zu sehen, dass etwa gleiche Mengen der Fusionsproteine nach den unterschiedlichen Behandlungen präzipitiert wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die LiCl-behandelten Zellen (GSK und Ser9) kein RI α -Signal (grün) und ein stark reduziertes cata-Signal (rot) im Vergleich zur NaCl-Kontrolle zeigen. Dieses wurde durch die quantitative Auswertung dreier unabhängiger Experimente bestätigt (Abb. 3.39 **B**). Die LiCl-Behandlung führte in beiden Zelltypen auch zu einer signifikanten Reduktion der PKA I α -

Bindung. So wurde das RI α -Signal in den GSK3 β -TAP um 90 % und in den Ser9-Mutanten um 75 % vermindert. Das cata-Signal wurde in den GSK3 β -TAP um 80 % und in den Ser9-Zellen um 60 % reduziert. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass durch die LiCl-Inhibition der GSK3 β die PKAI α -Komplexbildung zu GSK3 β sehr stark eingeschränkt wurde.

Die inhibitorische Wirkung von LiCl sollte ebenfalls auf die Komplexbildung zwischen PKAI α und der endogenen GSK3 β in HEK293T Zellen und HL-1 Kardiomyozyten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die beiden Zelllinien mit LiCl (20 mM) und mit NaCl (20 mM) behandelt und anschließend die Interaktion mit PLA analysiert. Die PLAs wurden mit den Antikörpern gegen GSK3 β (Maus) und PKA cata (Kaninchen) durchgeführt.

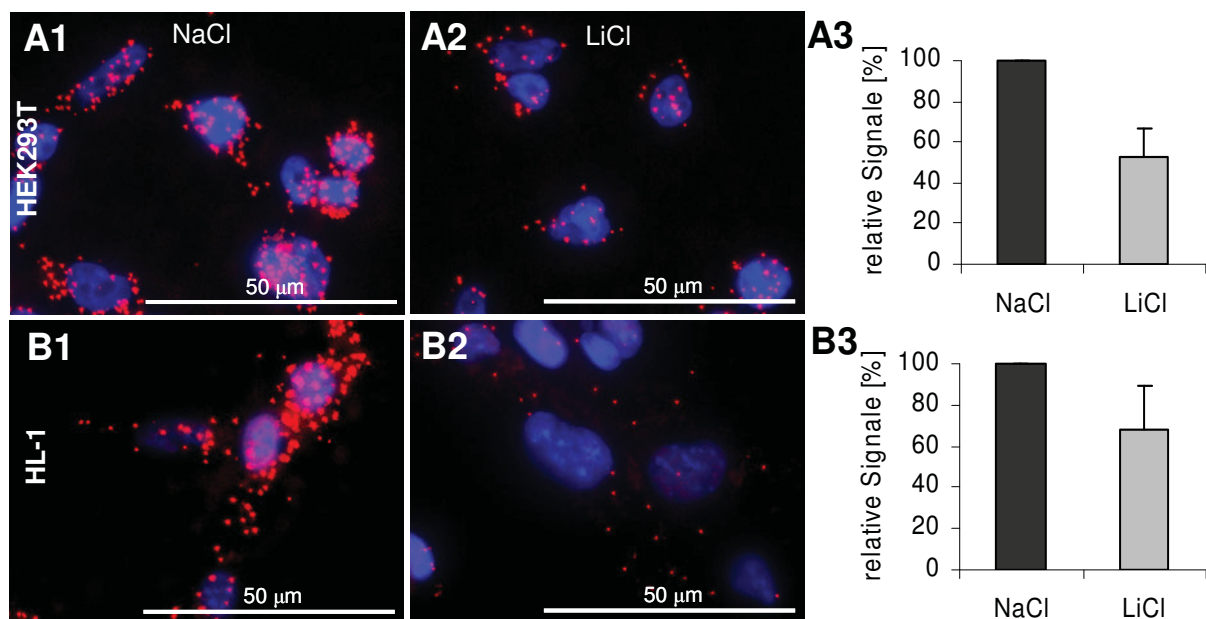


Abb. 3.40: PLA-GSK3 β /PKA cata-Ergebnisse von HEK293T (A1-A3) und HL-1 Zellen (B1-B3) nach LiCl-Behandlung. Die PLAs wurden mit Antikörpern gegen GSK3 β (Maus) und PKA cata (Kaninchen) durchgeführt. In 1-2 sind exemplarisch Mikroskopaufnahmen abgebildet, wovon 1 die NaCl (20 mM) -Kontrolle und 2 die LiCl (20 mM) -inkubierten Zellen zeigt. In 3 sind die entsprechenden quantitativen Auswertungen von jeweils zwei PLAs dargestellt (n = 2).

In Abb. 3.40 sind die Ergebnisse der PLAs von den HEK293T (A1-A3) und von den HL-1 Zellen (B1-B3) zu sehen. In den Mikroskopaufnahmen der LiCl-behandelten HEK293T Zellen sind weniger Signale als in der NaCl-Kontrolle zu sehen (vgl. A2 vs. A1). Somit reduziert LiCl im Vergleich zur NaCl-Kontrolle die Assoziation von GSK3 β mit der PKA cata in den HEK293T Zellen. Die quantitative Auswertung von zwei Versuchen zeigt eine Reduktion der Interaktion um ca. 50 % (A3). Ein ähnliches Ergebnis wurde für die HL-1 Zellen erhalten. Auch hier sind in exemplarischen Mikroskopaufnahmen der LiCl-behandelten Zellen (B1) weniger Signale als in der NaCl-Kontrolle (B2) zu erkennen. Die Quantifizierung von zwei PLA-Experimenten zeigt eine 30 %-ige-Reduktion der Interaktion.

Der PLA zeigt also ebenfalls eine reduzierte GSK3 β /PKA $I\alpha$ -Interaktion bei GSK3 β -Hemmung. Im Vergleich zu den biochemischen Analysen war der Effekt aber nicht so stark ausgeprägt.

3.4.5 Untersuchung des GSK3 β -TAP/PKA $I\alpha$ -Komplexes nach PKA $I\alpha$ Stimulation/Inhibition

Da sich zeigte, dass die Ausbildung des GSK3 β -TAP/PKA $I\alpha$ -Komplexes mit der Aktivität der GSK3 β variiert, stellte sich die Frage, ob dieser Komplex auch von der PKA $I\alpha$ -Aktivität abhängig ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Zellen mit dem cAMP-Analogen 8-Br-cAMP stimuliert. PKA liegt als Tetramer vor, das aus zwei regulatorischen Untereinheiten und zwei katalytischen Untereinheiten besteht. 8-Br-cAMP aktiviert die PKA, indem es an die regulatorischen Untereinheiten bindet und deren Dissoziation von den zwei katalytischen Untereinheiten aus dem Tetramer veranlasst. Dadurch sind die katalytischen Zentren nicht mehr blockiert und PKA kann seine Substrate phosphorylieren. Die Hemmung der PKA erfolgte mit H89, das an die ATP-bindende Domäne der katalytischen Untereinheit bindet. Für diese Analyse wurden entweder isolierte GSK3 β -TAP/PKA $I\alpha$ -Komplexe direkt oder die Zellen mit 8-Br-cAMP bzw. H89 behandelt. Nach der Behandlung der Zellen erfolgte auch hier eine StrepTactin-Präzipitation (SP) um den Komplex aufzureinigen. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. In Abb. 3.41 **A** sind die WB-Ergebnisse der behandelten Komplexe und in **B** der behandelten Zellen dargestellt.

In Abb. 3.41 **A** ist exemplarisch eine WB-Analyse der stimulierten/inhibierten Komplexe aufgeführt. Im roten Kanal (α -HA) ist zu sehen, dass jeweils etwa die gleichen Mengen des GSK3 β -TAP-Proteins, des Ser9-Proteins und des KI-Proteins unter den verschiedenen Bedingungen isoliert wurden. Unter Kontrollbedingungen zeigt sich wie zuvor, dass für GSK3 β -TAP und Ser9 exprimierende Zellen sowohl die PKA RI α als auch die PKA cat α Untereinheit kopräzipitiert wurde. Für die KI-Mutante wurden wieder sehr schwache Signale für beide PKA $I\alpha$ -Untereinheiten detektiert.

Bei GSK3 β -TAP führte die H89-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle zu einer leichten Signalschwächung beider PKA $I\alpha$ -Untereinheiten. Eine 8-Br-cAMP-Inkubation hingegen bewirkte vor allem eine starke Reduktion der cat α -Untereinheit. Bei der Ser9-Mutante ist eine ähnliche Signalverteilung für beide PKA $I\alpha$ -Untereinheiten nach PKA-Stimulation bzw. -Inhibition zu sehen. So zeigen sich hier nach H89-Behandlung verminderte Signale für die beiden PKA $I\alpha$ -UE und nach 8-Br-cAMP-Inkubation eine Signal-Schwächung von RI α und

kein Signal für $\text{cata}\alpha$. Bei der KI-Mutante führte weder H89 noch 8-Br-cAMP zu einer aussagekräftigen Veränderung der Signale der PKA $\text{RI}\alpha$ -Untereinheiten. Ausgehend von der erheblich geringeren Signalintensität für die $\text{RI}\alpha$ und $\text{cata}\alpha$ kommt es für beide Untereinheiten zu einem völligen Verschwinden der Signale.

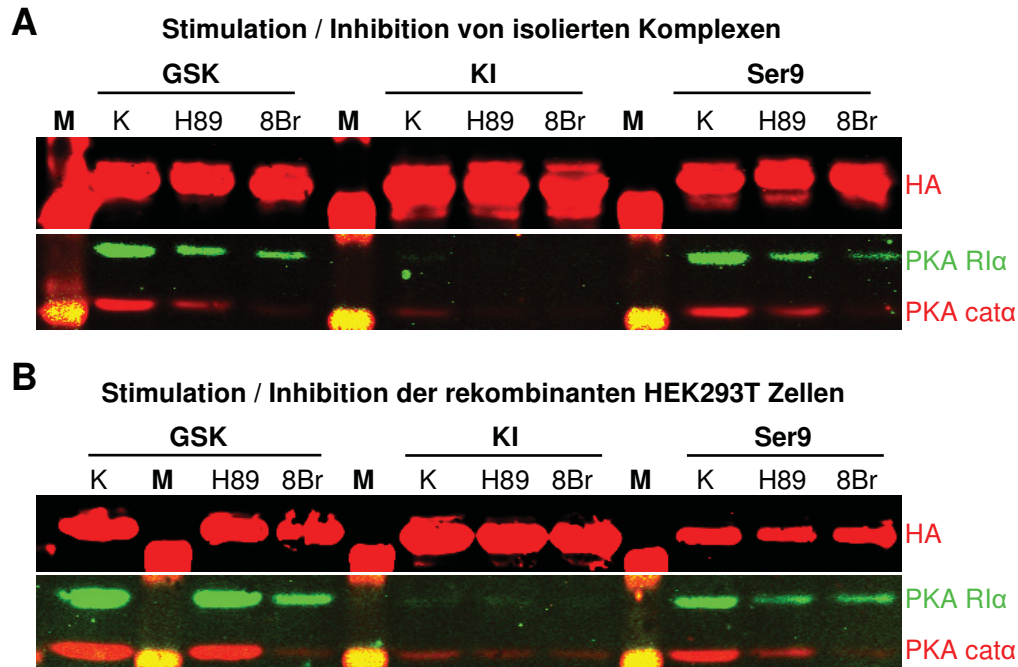


Abb. 3.41: GSK3 β -TAP/PKA $\text{I}\alpha$ -Komplexbildung nach PKA $\text{I}\alpha$ Stimulation mit 8-Br-cAMP oder PKA $\text{I}\alpha$ Inhibition mit H89. Exemplarische WB-Analysen von den behandelten isolierten Komplexen (A) oder den inkubierten Zellen (B). Mit dem WB wurden die StrepTactin-Präzipitate mit Antikörpern gegen HA (rot), PKA $\text{RI}\alpha$ (grün) und PKA $\text{cata}\alpha$ analysiert. M: Proteingrößenstandard, K: Serumentzugskontrolle, H89: mit H89 behandelte Probe, 8Br: mit 8-Br-cAMP behandelte Probe.

Bei der Behandlung der Zellen mit H89 bzw. 8-Br-cAMP und anschließender StrepTactin-Präzipitation der Fusionsproteine mit den assoziierten Proteinen wurde ein entsprechendes Ergebnis erhalten (siehe Abb. 3.41 B). Für jede Zelllinie wurden jeweils gleiche Proteinmengen bei allen drei Bedingungen (Kontrolle, H89- und 8-Br-cAMP-Behandlung) präzipitiert (vgl. HA-Signale (rot) der einzelnen Fusionsproteine). Für die KI-Mutante sind unter allen Bedingungen aufgrund der schwachen Interaktion von PKA $\text{I}\alpha$ mit der inaktiven Mutante nur schwache Signale für beide PKA $\text{I}\alpha$ -UE zu sehen, obwohl im Vergleich zu GSK3 β -TAP ähnliche Proteinmengen isoliert wurden (vgl. HA-Signale). Bei GSK3 β -TAP sind keine wesentlichen Unterschiede der $\text{RI}\alpha$ - und $\text{cata}\alpha$ -Signale zwischen den H89 behandelten Zellen und der Kontrolle zu erkennen. Hingegen zeigten sich eine $\text{RI}\alpha$ - und eine starke $\text{cata}\alpha$ -Signal-Reduktion bei den 8-Br-cAMP-inkubierten Zellen. In der Ser9-Mutante führte eine PKA-Stimulation ebenfalls zu einer besonders ausgeprägten Reduktion des $\text{cata}\alpha$ -Signals.

Beide Experimente konnten in unabhängigen Versuchsansätzen bestätigt werden. Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass sowohl am isolierten Komplex als auch in intakten Zellen die Stimulation der PKA zu einer fast vollständigen Dissoziation der $\text{cat}\alpha$ -Untereinheit führte während die $\text{RI}\alpha$ -Untereinheit teilweise mit der GSK3 β -TAP bzw. Ser9-Mutante assoziiert blieb. Bei der Hemmung der PKA verblieben beide PKA $\text{I}\alpha$ -Untereinheiten weitgehend mit der GSK3 β -TAP bzw. Ser9-Mutante verbunden.

3.4.6 Analyse des GSK3 β und GSK3 β -TAP Phosphorylierungsniveaus nach PKA-Stimulation/Inhibition

Da PKA einen stabilen Komplex mit GSK3 β bildet, stellte sich die Frage, ob sich das GSK3 β -Phosphorylierungsniveau und somit ihre Aktivität durch PKA-Stimulation bzw. Inhibition beeinflussen lässt. Deshalb wurden die Zellextrakte von GSK3 β -TAP HEK293T Zellen nach Behandlung mit H89 bzw. 8-Br-cAMP im WB auf Ser9-Phosphorylierung der GSK3 β bzw. GSK3 β -TAP analysiert. Hierzu wurden Antikörper gegen GSK3 β (rot) und gegen die Ser9-Phosphorylierung (PGSK3 β , grün) verwendet (Abb. 3.42).

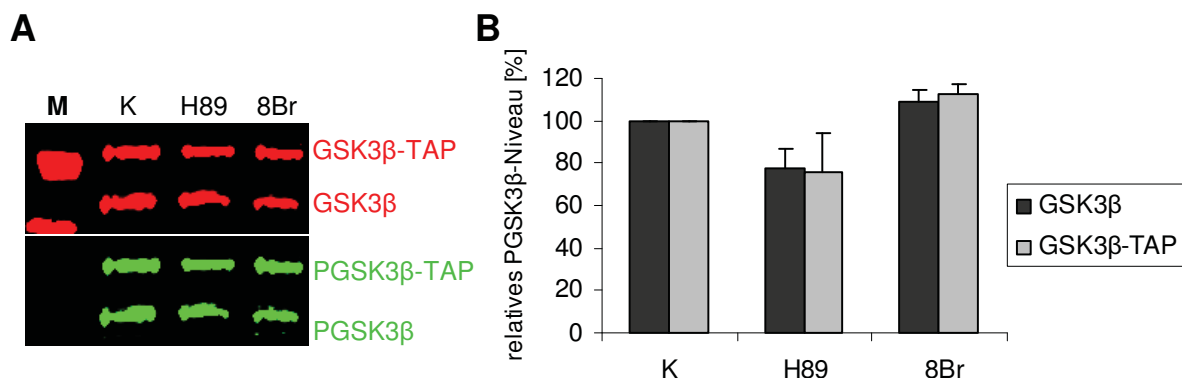


Abb. 3.42: Bestimmung des relativen PGSK3 β - und PGSK3 β -TAP-Niveaus nach PKA Stimulation/Inhibition. A) Exemplarische WB-Analyse der GSK3 β -TAP-HEK293T Zellen nach PKA Stimulation mit 8-Br-cAMP (8Br) und nach Inhibition mit H89. Es wurden jeweils die Präzipitate aufgetragen und der WB mit Antikörpern gegen GSK3 β und PGSK3 β umgesetzt. B) Quantitative Auswertung von zwei unabhängigen WB-Analysen. Hierbei wurde das PGSK3 β -Niveau durch den Quotienten von PGSK3 β -/GSK3 β -Intensität (PGSK3 β -TAP-Niveau: PGSK3 β -TAP/GSK3 β -TAP) bestimmt und diese Werte wurden wiederum auf die Kontrolle (K) normiert. M: Proteingrößenstandard, K: Serumentzugskontrolle (n = 2).

In Abb. 3.42 A ist exemplarisch eine WB-Analyse der untersuchten GSK3 β -TAP-Proteinextrakte nach PKA-Stimulation und -Inhibition dargestellt. Im roten Kanal ist jeweils ein Signal für die rekombinante (GSK3 β -TAP) und für die endogene GSK3 β ersichtlich. Die ähnlichen Signalintensitäten zwischen den verschiedenen Bedingungen weisen auf etwa gleiche analysierte Proteinmengen hin. Bei den H89- und 8-Br-cAMP-behandelten Zellen zeigen sich im grünen Kanal des WBs keine starken Veränderungen des PGSK3 β und

PGSK3 β -TAP-Signals im Vergleich zur Kontrolle (K). Die quantitative Auswertung von zwei unabhängigen Experimenten (Abb. 3.42 B) bestätigt diese Beobachtung. H89 verringert die Phosphorylierung von GSK3 β und GSK3 β -TAP um ~20% und 8-Br-cAMP steigert diese um ~10%. Die Veränderungen sind allerdings nicht signifikant.

Die geringen Effekte auf die GSK3 β -Phosphorylierung nach PKA Stimulation/Inhibition könnten auf die hohe basale GSK3 β -Phosphorylierung zurückzuführen sein. Deshalb sollte zur besseren Beurteilung der PKA Stimulation/Inhibition die basale GSK3 β -Phosphorylierung, die durch den PI3K/AKT-Signalweg vermittelt wird, durch eine LY294002- (PI3-Kinase Inhibitor) Behandlung reduziert werden. Hierzu wurden die GSK3 β -TAP HEK293T Zellen mit LY294002 und 8-Br-cAMP bzw. mit LY294002 und H89 inkubiert. Anschließend erfolgte eine WB-Analyse der Proteinextrakte mit Antikörpern gegen GSK3 β (rot) und gegen die Ser9-Phosphorylierung von GSK3 β (grün; Abb. 3.43).

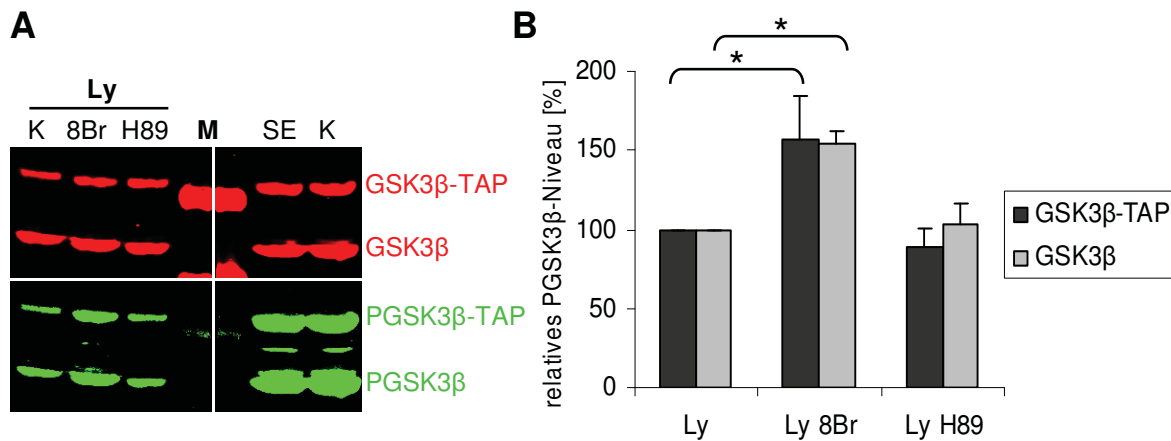


Abb. 3.43: Bestimmung des relativen PGSK3 β - und PGSK3 β -TAP-Niveaus nach LY294002- (Ly) Behandlung und PKA Stimulation/Inhibition. A) Exemplarische WB-Analyse der GSK3 β -TAP-HEK293T Zellen nach LY294002-Behandlung und zusätzlicher PKA Stimulation mit 8-Br-cAMP (8Br) und Inhibition mit H89. Für die WB-Analyse wurden jeweils die Präzipitate mit Antikörpern gegen GSK3 β und PGSK3 β untersucht. B) Quantitative Auswertung von zwei biologischen Replikaten mit zwei und drei technischen Replikaten. Hierbei wurde das PGSK3 β -Niveau durch den Quotienten der PGSK3 β -/GSK3 β -Signalintensität (PGSK3 β -TAP-Niveau: PGSK3 β -TAP/GSK3 β -TAP) bestimmt und anschließend erfolgte eine Normierung von LY294002/8-Br-cAMP und LY294002/H89 auf die LY294002-Kontrolle (Ly-K) normiert. M: Proteingrößenstandard, SE: Serumentzugskontrolle, K: unbehandelte Zellen. (n = 2, mit 2 und 3 technischen Replikaten, p<0,05)

Abb. 3.43 A zeigt exemplarisch eine WB-Analyse der LY294002-, LY294002 / 8-Br-cAMP-, LY294002 / H89-behandelten Zellen und der Kontrollzellen (SE: Serumentzugskontrolle, K: unbehandelte Zellen). Der PI3-Kinase Inhibitor LY294002 reduzierte im Vergleich zu den Kontrollen (SE, K) das Ausmaß der Ser9-Phosphorylierung von GSK3 β -TAP und GSK3 β (grüner Kanal). Im Vergleich zu Zellen, die nur mit LY294002 behandelt wurden, führte die Stimulation mit 8-Br-cAMP zu einem Anstieg des Signals für PGSK3 β . Dieser Effekt wurde sowohl für das endogene als auch für das getaggte GSK3 β -Protein beobachtet. Hemmung der PKA mit H89 hingegen führte zu keiner Signalveränderung.

Die Normierung der PGSK3 β -Signale (grün) auf die eingesetzten GSK3 β -Proteinmengen (rot) ergab, dass 8-Br-cAMP den Phosphorylierungsgrad von GSK3 β unter diesen Bedingungen um 50 % steigerte (siehe Abb. 3.43 **B**). Für GSK3 β -TAP wurde ebenfalls eine 50 %-Steigerung der Phosphorylierung erreicht. Generell kann die PKA also GSK3 β und GSK3 β -TAP phosphorylieren, doch scheint die Modulation über den PI3K/AKT-Signalweg in HEK293T Zellen den größeren Effekt zu haben.

3.4.7 Aktivitätsassays von PKA α und GSK3 β

Es stellte sich nun die Frage, ob die Interaktion von GSK3 β und PKA α die Enzymaktivität der Kinasen beeinflusst. Da die PKA-Stimulationsexperimente mit 8-Br-cAMP zeigten, dass die GSK3 β -Phosphorylierung gesteigert wurde, lässt sich vermuten, dass dadurch ihre Aktivität vermindert wurde. Bei diesem Experiment wurden jedoch alle Isoformen der Proteinkinase A in der Zelle aktiviert, es konnte daher nicht bestimmt werden, ob speziell die PKA α einen Einfluss auf die GSK3 β -Phosphorylierung hat. Aus diesem Grund sollte die GSK3 β -Enzymaktivität in Gegenwart der PKA α *in vitro* untersucht werden. Hierzu wurden PKA α und GSK3 β mit einem Substratpeptid, welches die GSK3 β -Phosphorylierungsstelle der Glykogensynthase umfasst, unter Zugabe von [γ -³³P] ATP inkubiert. Erst nach einer 15 minütigen-Inkubation der Enzyme wurde die PKA α durch cAMP-Zugabe aktiviert, damit die Proteinkinasen genügend Zeit für eine Ausbildung eines Komplexes haben. Als Kontrolle wurde entsprechend H₂O verwendet. Nach Inkubationszeiten von 0, 10, 15, 20, 25 und 30 min wurde jeweils ein Teil der Probe entnommen und auf ein P81-Filter gegeben, der alle Proteine bindet. Nachdem das überschüssige radioaktive ATP durch Waschen entfernt wurde, erfolgte eine Messung des Einbaus an radioaktivem Phosphat. Für die Bestimmung der basalen GSK3 β -Enzymaktivität wurde die GSK3 β mit ihrem Substratpeptid (GS) ohne Zugabe von PKA α inkubiert. Um mögliche cAMP-Einflüsse auf die GSK3 β -Aktivität auszuschließen, erfolgte zusätzlich eine GSK3 β -Aktivitätsmessung unter cAMP-Zugabe. Somit ergaben sich vier verschiedene Versuchsansätze, die in Tabelle 3.5 zusammengefasst sind.

Tabelle 3.5: Bedingungen für die Messung der GSK3 β -Enzymaktivität in Abhängigkeit von PKA α .
GS: Glykogensynthase-Substratpeptid.

GSK3 β	PKA α	GS	cAMP	Messung von:
x	-	x	-	1) GSK3 β -Aktivität
x	-	x	x	2) cAMP Einfluss auf die GSK3 β -Aktivität
x	x	x	-	3) Einfluss von PKA α auf die GSK3 β -Aktivität
x	x	x	x	4) Einfluss stimulierter PKA α auf die GSK3 β -Aktivität

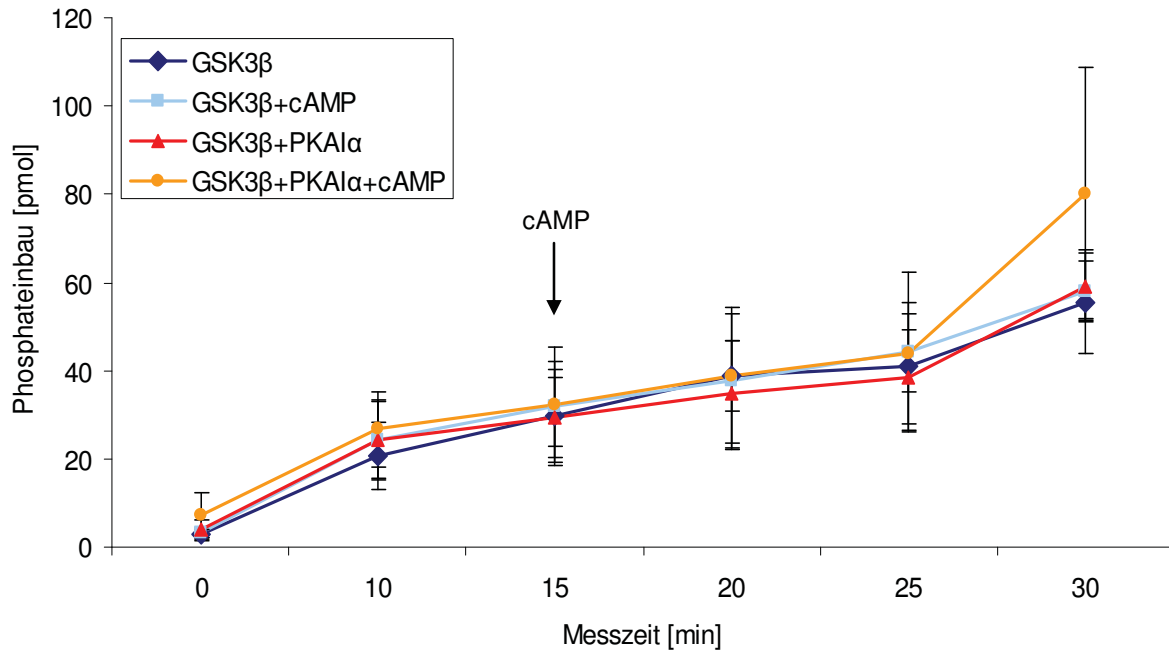


Abb. 3.44: Messung der GSK3 β -Enzymaktivität in Abhängigkeit von PKA1 α . Für diese Versuche wurden die beiden Proteinkinasen mit dem Glykogensynthese-Peptid und mit [γ - 33 P] ATP inkubiert. Ein Teil der Probe wurde nach Inkubationszeiten von 0, 10, 15, 20, 25 und 30 min im Szintilationszähler gemessen. Aus der umgesetzten radioaktiven Phosphatmenge ließ sich der gesamte Phosphateinbau in der Probe in pmol berechnen. Von jeweils sechs unabhängigen Messungen wurden die ermittelten Mittelwerte in pmol entsprechend den Messzeiten aufgetragen. Nach 15 min wurde durch Zugabe von cAMP (Pfeil) die PKA1 α aktiviert (orange). Als Kontrolle wurde entsprechend nach 15 min H $_2$ O zu den Proteinkinasen gegeben (rot). Für die Bestimmung der basalen GSK3 β -Aktivität, wurde diese ohne PKA1 α aber entsprechend mit cAMP (hellblau) bzw. H $_2$ O (dunkelblau) mit der Glykogensynthese inkubiert (n = 6).

In einem Vorversuch wurde eine PKA1 α -vermittelte Phosphorylierung der GS ausgeschlossen (nicht gezeigt).

In Abb. 3.44 sind die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze dargestellt. Hierbei wurde anhand der radioaktiven Messung die umgesetzte Phosphatmenge in pmol bestimmt und der Mittelwert von sechs unabhängig durchgeführten Messungen gegen die Messzeit aufgetragen. Der Kurvenverlauf für die basale GSK3 β -Enzymaktivitätsmessung (dunkelblau) zeigt einen langsamen Anstieg von ca. 3 pmol (0 min) auf ca. 60 pmol umgesetzter Phosphatmenge (30 min). Für die anderen Bedingungen 2) GSK3 β + cAMP (hellblau), 3) GSK3 β + PKA1 α (rot) und 4) GSK3 β + PKA1 α + cAMP (orange) sind annähernd gleiche Kurvenverläufe zu sehen. Somit wurde in allen Versuchsansätzen zu jedem Messzeitpunkt die gleiche Menge an Phosphat umgesetzt. Hier zeigte sich nur bei der 60 min Messung von GSK3 β + PKA1 α + cAMP eine stärkere Aktivitätszunahme auf 80 pmol (orange). Die gleichen Kurvenverläufe der basalen GSK3 β -Enzymaktivitätsmessung (dunkelblau) und der GSK3 β -Enzymaktivitätsmessung unter Zugabe von cAMP (hellblau) weisen daraufhin, dass cAMP keinen Einfluss auf die basale GSK3 β -Kinaseaktivität hat. Des Weiteren wird die Kinaseaktivität auch nicht durch die Inkubation mit PKA1 α verändert (vgl. dunkelblau vs.

rot). Ausschließlich bei der Zugabe von PKA α und cAMP zu GSK3 β ist eine leichte Aktivitätssteigerung nach 30 min zu sehen (vgl. dunkelblau vs. orange). Hier zeigte allerdings die große Standardabweichung, dass zu diesem Messpunkt eine hohe Schwankung der Messergebnisse für die GSK3 β + PKA α + cAMP-Proben vorlag, so dass die Relevanz dieses Anstieges fraglich bleibt. Dieser Versuch spricht insgesamt dafür, dass die PKA α keinen Einfluss auf die GSK3 β -Enzymaktivität hat.

Da GSK3 β möglicherweise die PKA α phosphoryliert und auf diese Weise ihre Enzymaktivität verändert, sollte im umgekehrten Ansatz der GSK3 β -Einfluss auf die PKA α -Aktivität analysiert werden. Für diese Fragestellung wurden die beiden Proteinkinasen unter [γ - ^{33}P] ATP-Zugabe miteinander inkubiert und die PKA α -Enzymaktivität gemessen. Als PKA-Substrat wurde das Peptid Kempetid eingesetzt, welches eine PKA-Phosphorylierungsstelle besitzt. Auch hier wurde die PKA α erst nach 15 min durch cAMP-Zugabe aktiviert, als Kontrolle wurde entsprechend H $_2$ O zum Ansatz gegeben. Nach Inkubationszeiten von 0, 15, 20, 30, 40, 60 min wurde ein Teil der Probe entnommen und der Einbau des radioaktiven Phosphats ermittelt. Die Messung der basalen PKA α -Enzymaktivität wurde ohne die GSK3 β -Inkubation aber mit cAMP- bzw. H $_2$ O-Zugabe durchgeführt. Folglich wurden für diese Frage vier Versuchsansätze durchgeführt (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Bedingungen für die Messung der PKA α -Enzymaktivität in Abhängigkeit von GSK3 β .
Kemp.: Kempetid.

PKA α	GSK3 β	Kemp.	cAMP	Messung von:
x	-	x	-	1) PKA α -Aktivität
x	-	x	x	2) cAMP Einfluss auf die PKA α -Aktivität
x	x	x	-	3) Einfluss von GSK3 β auf die PKA α -Aktivität
x	x	x	x	4) Einfluss von GSK3 β auf die stimulierte PKA α -Aktivität

Mittels eines Vorversuches wurde ausgeschlossen, dass die GSK3 β die Kempptide phosphoryliert (nicht gezeigt).

In Abb. 3.45 sind jeweils die Mittelwerte von sechs Messungen in Abhängigkeit von der Zeit für die einzelnen Versuchsansätze dargestellt. Die dunkelblaue Kurve für die basale PKA α -Enzymaktivität steigt von 5 pmol (0 min) auf 50 pmol umgesetzter Phosphatmenge (15 min). Anschließend findet ein langsamer Anstieg auf ca. 100 pmol Phosphateinbau statt (60 min). Stimulation der PKA α mit cAMP (hellblau) steigerte die umgesetzte Phosphatmenge auf ca. 180 pmol nach 60 min (hellblaue Kurve). Die Kombination von PKA α , GSK3 β und cAMP (orange) zeigte die höchste PKA α -Aktivität von 225 pmol nach 60 min. Folglich führte eine GSK3 β -Zugabe zu einem Anstieg um ca. 45 pmol (vgl. hellblaue vs. orange Kurve). Die statistische Analyse (2-Weg-ANOVA-Test) ergab, dass die einzelnen Kurvenverläufe

zueinander verschieden waren ($p < 0,05$). Mit den Ergebnissen wurde zweimal gezeigt, dass durch die GSK3 β -Zugabe der Phosphateinbau um 30 pmol (vgl. dunkelblaue vs. rote Kurve) und um 45 pmol (vgl. hellblaue vs. orange Kurve) gesteigert wurde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die GSK3 β die PKA α -Aktivität erhöht hat.

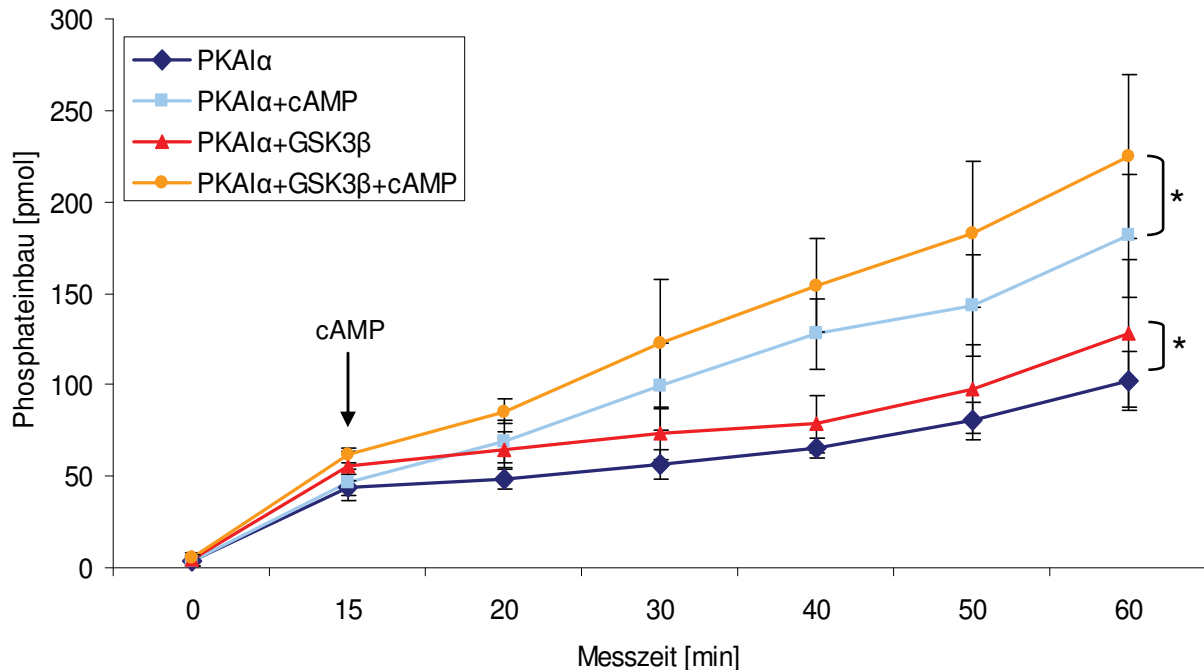


Abb. 3.45: Messung der PKA α -Enzymaktivität in Abhängigkeit von GSK3 β . PKA α und GSK3 β wurden mit Kemptide und mit [γ - 33 P] ATP inkubiert. Nach 0, 15, 20, 30, 40, 50 und 60 min wurde von einem Teil der Probe die eingebaute Radioaktivität ermittelt und die umgesetzte Phosphatmenge in pmol berechnet. Es sind die Mittelwerte von jeweils sechs unabhängigen Messungen aufgetragen. Nach 15 min wurde durch die cAMP-Zugabe (Pfeil) die PKA α -Aktivität induziert (orange). Als Kontrolle wurde nach 15 min H $_2$ O (rot) hinzugegeben. Die basale PKA α -Aktivität wurde ohne die GSK3 β -Anwesenheit, aber unter Zugabe von cAMP (hellblau) bzw. H $_2$ O (dunkelblau) bestimmt ($n = 6$; 2-Weg-ANOVA-Test, $p < 0,05$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PKA α -Aktivität durch GSK3 β leicht gesteigert wurde, aber die GSK3 β -Aktivität durch PKA α nicht verändert wurde.

3.4.8 Auswirkungen einer GSK3 β -Hemmung auf das PKA-Substrat VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein)

Gambaryan et al., 2010 hatten gezeigt, dass PKA auch cAMP-unabhängig aktiviert werden kann, indem die katalytische Untereinheit aus einem Komplex mit NF κ B/I κ B entlassen wird. Da LiCl eine Dissoziation des GSK3 β /PKA α -Komplexes bewirkt, wurde überprüft, ob der GSK3-Inhibitor LiCl eine gesteigerte PKA-Aktivität induzierte. Als Maß für die PKA-Aktivität wurde das PKA-Substrat VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein) genutzt, denn wenn PKA aktiv ist, phosphoryliert sie VASP am Ser157. Um die Auswirkungen der GSK3 β -Hemmung auf die VASP-Phosphorylierung zu untersuchen,

wurden die wildtypischen HEK293T und GSK3 β -TAP HEK293T Zellen für 1, 2, 3 und 4 h mit LiCl (20 mM) behandelt. Für LiCl wurde bereits gezeigt, dass die GSK3 β -Hemmung zu einer verringerten Komplexbildung zwischen GSK3 β und PKA $I\alpha$ führt (siehe 3.4.4). Um die entsprechenden Kontrollen zu erhalten, wurden Zellen mit der entsprechenden NaCl-Konzentration für 1 oder 4 h inkubiert. Als positive Kontrolle dienten 8-Br-cAMP (8Br; PKA-Aktivator, 30 min) behandelte WT-Zellen. Nach den jeweiligen Inkubationen wurden die präparierten Zellextrakte mit einem Antikörper gegen VASP im WB analysiert (Abb. 3.46). VASP besitzt in der dephosphorylierten Form eine Größe von 46 kDa, bei einer Phosphorylierung läuft das phosphorylierte VASP bei 50 kDa.

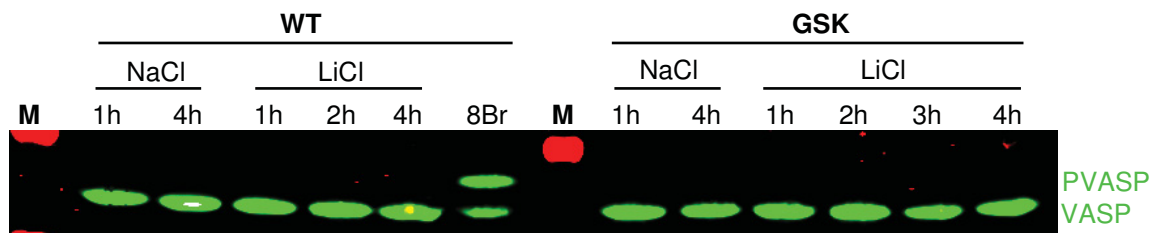


Abb. 3.46: WB zur Untersuchung des Einflusses einer GSK3 β -Inhibierung mit LiCl auf die PKA-Aktivität. Die PKA-Aktivität wurde hierbei anhand der Phosphorylierung des PKA Substrates VASP bestimmt. Für die Dissoziation des GSK3 β /PKA $I\alpha$ -Komplexes wurden die Wildtyp (WT) und die GSK3 β -TAP HEK293T Zellen (GSK) mit LiCl (20 mM) für unterschiedliche Zeiten (1-4 h) inkubiert. Als Kontrollexperiment wurden die Zellen mit NaCl (20 mM, für 1 oder 4 h) behandelt. Zum Erhalt einer positiven Kontrolle wurden die WT-Zellen mit 8-Br-cAMP (8Br) inkubiert. Die WB-Analyse wurde mit einem Antikörper gegen VASP durchgeführt. Bei einer VASP-Phosphorylierung (PVASP) wird die Proteingröße von 46 kDa auf 50 kDa gesteigert. M: Proteingrößenstandard.

Im WB in Abb. 3.46 ist zu sehen, dass sowohl die NaCl als auch die LiCl behandelten Zellen ein Signal für die dephosphorylierte VASP Form zeigen. Im Gegensatz dazu zeigte die positive Kontrolle (8Br) zwei Signale, ein Signal für VASP und eines für das phosphorylierte VASP (PVASP). Da bei diesem Experiment die positive Kontrolle durch ein Signal auf der Höhe des PVASP eine Phosphorylierung von VASP anzeigte, ließ sich eine PKA-Aktivierung über eine 8-Br-cAMP-Behandlung über VASP-Phosphorylierung nachweisen. Eine GSK3 β -Hemmung mit LiCl, welche zu einer Freisetzung von PKA $I\alpha$ führt, hatte wie die Inkubation mit NaCl, keine Auswirkungen auf die VASP-Phosphorylierung. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Dissoziation des GSK3 β /PKA $I\alpha$ -Komplexes nicht zu einer cAMP-unabhängigen Aktivierung der PKA $I\alpha$ führte.

4 Diskussion

Das menschliche Genom enthält nur ca. 30.000 Gene, die ihrerseits zur Bildung von etwa 500.000 verschiedenen Proteinen führen. Diese Steigerung der Komplexität wird durch alternatives Splicing, proteolytische Spaltung sowie posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Nitrosierung, Hydroxylierung, Acetylierung, u.a. erreicht. Die Interaktion von Proteinen und ihre Organisation in Proteinkomplexen stellt eine weitere Ebene dar, die das Funktionsspektrum des Proteoms erheblich steigert. Es wird geschätzt, dass etwa 80 % der Proteine in Proteinkomplexen agieren und nicht als Einzelproteine vorliegen (Berggård et al., 2007). Somit trägt die Erforschung von Proteinkomplexen dazu bei, die spezifische subzelluläre Organisation und Funktion von Proteinen besser zu verstehen.

Die Glykogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3 β) ist an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Funktionen wie Stoffwechsel, Wachstum und Differenzierung beteiligt. Ihre Aktivität wird durch Phosphorylierung an Ser9 gehemmt, Phosphorylierung an Tyr216 hingegen steigert ihre Aktivität. Ihre katalytische Aktivität für spezifische Substrate wird durch eine Substrat-Präphosphorylierung beeinflusst, die von anderen Kinasen (z.B. Casein Kinase 2) ausgeführt wird. Eine weitere Ebene der Regulation erfolgt durch die Ausbildung spezifischer Proteinkomplexe, wodurch GSK3 β mit ihren Substraten assoziiert ist (z.B. im Wnt-Signalweg oder bei der Axonsprossung). Die Bildung von Proteinkomplexen könnte GSK3 β eine Zeit- und Ortsspezifität der Signaltransduktion ermöglichen und zu ihrer Signaldiversität beitragen. In der Literatur sind bisher nur wenige Beispiele für eine Einbindung der GSK3 β in Proteinkomplexe beschrieben, und es wurde bislang keine systematische Analyse der GSK3 β -assoziierten Interaktionspartner durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war es daher, mittels eines Proteomics Ansatzes GSK3 β -assoziierte Proteine aus Säugerzellen (HEK293T Zellen, HL-1 Kardiomyozyten) zu isolieren und zu identifizieren. Durch Kombination der Tandem-Affinitätsreinigung und massenspektrometrischer Analyse (TAP/MS) wurden so bekannte und neue Interaktionspartner der GSK3 β identifiziert, die neue Einblicke in die GSK3 β abhängige Signaltransduktion und Regulation ermöglichten.

Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Mit der TAP/MS-Methode konnten sowohl in transient transfizierten HEK293T Zellen, als auch in stabil infizierten HEK293T und HL-1 Zellen, neue GSK3 β -Interaktionspartner identifiziert werden.

- Drei der vier neuen Interaktionspartner (Filamin A, Acetyl-CoA Carboxylase-1 (ACC1) und Proteinkinase A I α) konnten mit dem *Proximity Ligation Assay* (PLA) als GSK3 β -Interaktionspartner validiert werden. Die Interaktion wurde nicht nur für das rekombinante, sondern ebenfalls für das endogen exprimierte GSK3 β -Protein nachgewiesen. Der GSK3 β -Komplex mit Protein Arginin N-Methyltransferase 5 (PRMT5) hingegen konnte weder in den HEK293T Zellen noch in den HL-1 Kardiomyozyten mit dem PLA validiert werden.
- GSK3 β bildet in beiden Zelllinien einen sehr prominenten Komplex mit der Proteinkinase A Typ I α (PKAI α : regulatorische Untereinheit (UE) Typ I α und katalytische UE α). Hierbei scheint die PKAI α bevorzugt mit der aktiven Form von GSK3 β interagieren. Das GSK3 β interagierende Protein (GSKIP), das die Interaktion der GSK3 β mit der PKA Typ II vermittelt, konnte nicht im Komplex nachgewiesen werden.
- Die detaillierte Analyse des GSK3 β /PKAI α -Komplexes in HEK293T Zellen zeigte, dass die Interaktion von GSK3 β mit PKAI α abhängig von der katalytischen Aktivität der GSK3 β ist. So führte eine Aktivierung der GSK3 β durch Hemmung des inhibitorischen PI3K/AKT-Weges (PI3K-Inhibitor LY294002) zu einer gesteigerten Interaktion. Im Gegensatz dazu verminderte die Hemmung der GSK3 β (über Insulin \rightarrow PI3K/AKT-Signalweg bzw. LiCl) die Komplexbildung. Ebenso zeigte eine inaktive GSK3 β -Mutante fast keine Interaktion mit der PKAI α .
- Die Interaktion von PKAI α und GSK3 β wurde durch eine PKA-Hemmung (PKA-Inhibitor H89) nicht wesentlich beeinflusst. Jedoch hatte eine PKA-Aktivierung (8-Brom-cAMP) zur Folge, dass die katalytische Untereinheit fast vollständig dissoziierte, während die regulatorische Untereinheit teilweise am GSK3 β /PKAI α -Komplex assoziiert blieb.
- Eine PKA-Hemmung bzw. -Aktivierung führte zu einer Verminderung bzw. Steigerung der GSK3 β -Phosphorylierung.
- Im *in vitro* Experiment scheint PKAI α nicht die GSK3 β -Aktivität zu beeinträchtigen, jedoch bewirkt GSK3 β eine PKAI α -Aktivitätssteigerung.

4.1 Identifizierung von GSK3 β -assoziierten Proteinen

Die Tandem-Affinitätsreinigung und massenspektrometrische (TAP/MS) Identifizierung von Proteinkomplexen hat insbesondere in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wegweisende

Erkenntnisse hinsichtlich der Organisation der Proteine in übergeordneten Proteinkomplexen geführt (Rigaut et al., 1999). Um eine systematische Analyse der GSK3 β -assoziierten Proteinkomplexe durchzuführen, wurde die TAP/MS-Methode auf die Proteinkinase GSK3 β übertragen. Es zeigte sich, dass eine Fusion der GSK3 β mit einem HA/StrepII/Flag-Tag (TAP-Tag) zur Identifizierung einer Vielzahl assoziierter Proteine führte. Als Bestätigung für den gewählten experimentellen Ansatz kann gewertet werden, dass mit Axin-1, β -Catenin und *Adenomatous polyposis coli protein* (APC) bereits bekannte GSK3 β -Interaktionspartner aus dem Wnt-Signalweg identifiziert wurden. Es wurden darüber hinaus zahlreiche neue GSK3 β -Interaktionspartner wie z.B. Filamin A, ACC-1 oder PKA $I\alpha$ detektiert.

Da die TAP die Expression eines getaggen Proteins erfordert, ist bei diesem Ansatz immer zu bedenken, dass eine massive Überexpression Einfluss auf die Art der Bindungspartner haben kann und somit falsch positive Proteine identifiziert werden können. Um dieses Risiko zu minimieren, wurde daher die initial durchgeführte transiente Expression (Lipofektion) auf stabil transfizierte Zellen mit einem niedrigeren Expressionsniveau umgestellt. Diese Methode erlaubte darüber hinaus die Kardiomyozyten-Zelllinie HL-1 mit in die Untersuchungen einzubeziehen, da diese durch Lipofektion nahezu untransfizierbar ist. Dies war von besonderem Interesse, da GSK3 β im Herzen eine wichtige Rolle spielt. In der Tat wurde durch den lentiviralen Ansatz erreicht, dass das Expressionsniveau der getaggen GSK3 β in derselben Größenordnung lag wie das der endogen exprimierten GSK3 β . Ferner unterlag das GSK3 β -TAP-Protein derselben Regulation durch Phosphorylierung wie die endogen exprimierte GSK3 β .

Damit stand ein System zur Verfügung, das die erfolgreiche Reinigung von GSK3 β -assoziierten Proteinen erlaubte. Die TAP/MS-Analyse führte auch bei den stabil transfizierten HEK293 und HL-1 Zellen zur Identifizierung interagierender Proteine. Neben den Chaperonen Glukose-regulierendes Protein 78, Hitzeschockprotein 90 (alpha und beta) oder Hitzeschock-verwandtes 71 kDa Protein, wurden wiederholt z.B. ACC1, Annexin A2, PKA regulatorische UE Typ I α , PRMT5 oder Tubulin alpha-1A gefunden. Da die TAP an einer gleichen Proteinmenge nicht-transfizierter Kontrollzellen keine vergleichbaren Banden aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass die identifizierten Proteine als Interaktionspartner von GSK3 β isoliert worden waren. Ein Vergleich der eluierten Proteine aus HEK293T-Zellen und den HL-1 Zellen ergab eine weitreichende Übereinstimmung der identifizierten Proteine, was die Authentizität der Interaktionspartner unterstreicht.

Die Signaltransduktion erfordert die regulierte Interaktion von Proteinen untereinander. Daher stellte sich die Frage, ob die identifizierten Proteine konstitutiv mit der GSK3 β interagierten,

oder ob sich eine Variation der Komplexbildung in Abhängigkeit der GSK3 β -Aktivität beobachten ließ. Die Untersuchungen zur GSK3 β -abhängigen Komplexbildung wurden zunächst nur an Zellen durchgeführt, die subkonfluent in DMEM-Medium mit 10 % FCS gewachsen waren. Unter diesen Bedingungen liegt GSK3 β teilweise in inaktiver (Ser9 phosphoryliert) bzw. aktiver (Ser9 dephosphoryliert) Form vor. Damit ließ sich nicht entscheiden, mit welcher der GSK3 β -Formen die identifizierten Proteine interagierten. Um zu untersuchen inwiefern GSK3 β im aktiven Zustand andere Interaktionspartner bindet als in der inaktiven Form, wurden Stimulations- und Inhibitionsanalysen durchgeführt. So führen Insulin oder IGF-1 durch Stimulation des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/AKT-Signalweges zur Inaktivierung der GSK3 β (Cross et al., 1995; Park et al., 1999). Die so ausgelöste Hemmung der GSK3 β bewirkt eine Entthemmung der Glykogensynthase und führt somit zur vermehrten Synthese von Glykogen (siehe Einleitung Kapitel 1.2). Daher wurde überprüft, inwieweit die Modulation des PI3K/AKT-Signalweges zur vollständigen Hemmung bzw. Entthemmung der GSK3 β führte. Jedoch zeigte sich in diesen Experimenten mit Insulin oder IGF-1 als „GSK3 β -Inhibitoren“ nur eine schwache Steigerung der GSK3 β -Ser9-Phosphorylierung und mit LY294002 (PI3-Kinase Inhibitor) als „GSK3 β -Stimulator“ keine vollständige GSK3 β -Ser9-Desphosphorylierung. Diese Ergebnisse belegten, dass unter den basalen Bedingungen AKT nur zu einem geringen Teil zum Gesamtphosphorylierungsniveau der GSK3 β beitrug. So wird die GSK3 β -Ser9-Phosphorylierung z.B. auch durch die MAPK/MAPKAP-1- oder PLC/PKC Signalwege gesteigert (Saito et al., 1994; Fang et al., 2002; siehe auch Einleitung Kapitel 1.2 Abb. 1.4).

Um definitiv aktive bzw. inaktive GSK3 β hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens zu analysieren, wurde eine Ser9-Mutante (Ser9 \rightarrow Ala9; konstitutiv aktiv) und eine inaktive Mutante (KI) generiert. Weitreichende Analysen zur Struktur von Proteinkinasen haben gezeigt, dass die ATP-Bindungsstelle hochkonservierte Sequenzmotive trägt (GxGxxG -16 x-K (x: beliebige Aminosäure). Das konservierte Lysin (K) scheint dabei direkt an dem Transfer des Phosphatrestes auf das Substrat beteiligt zu sein. Tatsächlich wurde in verschiedenen Analysen gezeigt, dass eine Mutation des konservierten Lysins in der ATP-Bindungsstelle zur Inaktivierung der katalytischen Aktivität von Kinasen führte (Hanks et al., 1988). Da die GSK3 β an der entsprechenden Position zwei Lysine K(85)K(86) aufweist, wurden beide Lysine durch Alanine ersetzt (K85, K86 \rightarrow A85, A86) und auf diese Weise eine inaktive GSK3 β -Mutante erzeugt (KI-Mutante). Die Analyse der erhaltenen Mutanten ergab, dass die Ser9-Mutante nicht phosphorylierbar war und eine hohe katalytische Aktivität *in vitro* besaß,

während die KI-Mutante an Ser9 phosphoryliert wurde, *in vitro* aber, wie erwartet, keinerlei katalytische Aktivität aufwies.

Die Analyse der Proteininteraktionen der GSK3 β -Mutanten in HEK293T und in HL-1 Zellen ergab ein konsistentes Bild. Dabei ließ sich feststellen, dass die Muster der gebundenen Proteine in den Zellen, die die GSK3 β -TAP Variante bzw. die Ser9-Mutante exprimierten, sehr ähnlich waren. Ein wesentlicher qualitativer Unterschied betraf vor allem die KI-Mutante.

4.2 Interaktion von GSK3 β mit Hitzeschockproteinen (HSP)

Mit großer Reproduzierbarkeit wurden Hitzeschockproteine (z.B.: Hitzeschockprotein 90 (HSP90) alpha und beta, Hitzeschock-verwandtes 70 kDa Protein-2, Hitzeschock-verwandtes 71 kDa Protein, Glukose-regulierendes Protein 78) als Interaktionspartner von GSK3 β -TAP sowohl bei transienter als auch stabiler Expression koeluiert. Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass das GSK3 β -TAP-Protein zu einem großen Teil fehlgefaltet vorliegen könnte. Allerdings ist die Assoziation nicht nur bei der transienten Expression des GSK3 β -TAP-Proteins zu finden, die durch eine massive Überexpression gekennzeichnet ist. Vielmehr lässt sich die Interaktion auch in den auf niedrigem Niveau stabil exprimierenden Zelllinien nachweisen. Die Interaktion von Proteinen mit HSP findet jedoch nicht nur bei einer Fehlfaltung der Proteine statt. Es ist vielmehr bekannt, dass insbesondere die Proteine der HSP90 Familie eine regulatorische Funktion aufweisen (Pratt, 1998; McClellan et al., 2007). So führt die Interaktion von HSP90 mit nukleären Hormonrezeptoren (z.B. Progesteronrezeptor) zu ihrer zytoplasmatischen Sequestrierung, die nach Bindung des Liganden aufgehoben wird und eine Kerntranslokation der Rezeptoren ermöglicht (Haverinen et al., 2001; Tao and Zheng, 2011). Ebenso ist HSP90 an der Regulation der Aktivität beispielsweise der endothelialen NO Synthase (Pritchard et al., 2001) sowie der Proteinkinase AKT beteiligt (Sato et al., 2000). Die Interaktion von GSK3 β mit HSPs könnte daher auch im Dienste ihrer Regulation bzw. Signalweiterleitung stehen.

4.3 Interaktion von GSK3 β mit weiteren Proteinen

In den TAP/MS-Analysen der stabil exprimierenden HEK293T- und HL-1 Zellen wurden weitere Proteine, die bereits bei den transienten Transfektionen gefunden worden waren, wieder detektiert. Zu diesen Proteinen zählten die ACC1 und PKA1 α . Als ein weiterer neuer und noch unbekannter GSK3 β -Interaktionspartner wurde die PRMT5 sowohl in HL1 als auch

in HEK293T Zellen nachgewiesen. Diese drei Proteine (PRMT5, ACC1, PKAI α) und Filamin A, das in den transient transfizierten HEK293T Zellen identifiziert wurde, wurden für eine Verifizierung der GSK3 β -Interaktion ausgewählt. Dies erfolgte mittels *Proximity Ligation Assay* (PLA). Diese Methode sollte einerseits als ergänzendes Verfahren zur Verifizierung der TAP Ergebnisse herangezogen werden, andererseits erlaubte der PLA zu überprüfen, ob die für das getaggte Protein nachgewiesene Interaktion auch mit der endogen exprimierten GSK3 β (nicht getaggt) nachweisbar war. Die Erhebung dieser Daten war besonders wichtig, um eine artifizielle Interaktion der potenziellen Bindungspartner mit dem getaggtten Protein auszuschließen.

4.3.1 GSK3 β /Filamin A-Komplex

Für Filamin A wurde eine Interaktion mit der rekombinanten und der endogenen GSK3 β in HEK293T Zellen nachgewiesen. In HL-1 Kardiomyozyten wurde keine Komplexbildung zwischen GSK3 β und Filamin A gezeigt, da dieser Zelltyp entsprechend der Western Analyse Filamin A nicht oder nur in sehr geringem Maße bildet. Für die rekombinanten HEK293T Zellen zeigte sich, dass Filamin A vornehmlich an die aktiven Formen von GSK3 β (Ser9-Mutante und GSK3 β -TAP), nicht aber an die KI-Mutante bindet. Diese Interaktion scheint somit durch die GSK3 β -Aktivität reguliert zu werden.

Filamin A ist ein großes zytoplasmatisches Protein, welches aus zwei Untereinheiten von je 280 kDa besteht. Es gehört zu den Aktin-bindenden Proteinen und sorgt für eine Quervernetzung der Aktinfilamente, wodurch das dreidimensionale Aktin-Netzwerk stabilisiert wird. Filamin ist aber nicht nur als Aktin-bindendes Protein bekannt, sondern es wurden mittlerweile über 90 weitere Filamin-Interaktionspartner identifiziert. Zu den verschiedenen intrazellulären Proteinen zählen Kanäle, Rezeptoren, Signalmoleküle, sowie Transkriptionsfaktoren (Nakamura et al., 2011). Filamin A interagiert sowohl mit F-Aktin als auch mit Integrinen und stellt somit eine Verbindung zwischen Matrix und Zytoskelett her (Kiema et al., 2006). Dieser Verbindung scheint bei der Signalübermittlung mechanischer Stimuli eine wesentliche Rolle zu spielen. Über diese Verbindung ist Filamin A auch an der Steuerung der Zelladhäsion und -migration beteiligt (Zhou et al., 2010).

In dieser Arbeit wurde nun erstmalig gezeigt, dass auch die GSK3 β zu den Filamin A bindenden Proteinen zählt. Die genaue Funktion dieser Interaktion wurde nicht weiter untersucht. Ein Ansatzpunkt könnte jedoch in der Beobachtung liegen, dass sowohl Filamin A als auch GSK3 β die Dynamik der Filopodienbildung und somit im weiteren Verlauf die Aussprossung von Axon und Dendriten modulieren (Letourneau and Shattuck, 1989; Lambert

de Rouvroit and Goffinet, 2001; Owen and Gordon-Weeks, 2003). Ferner zeigte sich, dass Filamin A in Blutplättchen die Interaktion zwischen dem Glykoprotein Ia und dem Aktin-Zytoskelett herstellt und damit die Plättchenadhäsion vermittelt. Ein Defekt dieser Interaktion führt zu einer verringerten Plättchenadhäsion und damit zu vermehrten Blutungen. Interessanterweise wirkt GSK3 β als negativer Regulator der Plättchenaggregation (Li et al., 2008).

Aufgrund der hier nachgewiesenen Interaktion von GSK3 β und Filamin A eröffnet sich für weitere Untersuchungen die interessante Frage, inwieweit GSK3 β die Axonsprossung und/oder die Plättchenfunktion direkt durch Modulation des Filamins steuert.

4.3.2 GSK3 β /PRMT5-Komplex

Die Arginin N-Methyltransferase PRMT5 katalysiert die Methylierung von Arginin-Seitenresten, so dass ω -N-Monomethylarginin- oder symmetrisches Dimethylarginin gebildet werden. Durch diese posttranslationale Modifikation reguliert PRMT5 die Genexpression (z.B. ribosomale RNA), indem sie beispielsweise Histone modifiziert (Majumder et al., 2010; Tee et al., 2010). Daneben spielt die PRMT5-vermittelte Methylierung z.B. auch eine essentielle Rolle bei der zytoplasmatischen Assemblierung und Biogenese der Kernribonukleoproteine (snRNPs, *small nuclear ribonucleoprotein*; Gonsalvez et al., 2007).

Der weitreichende Einfluss der PRMT5 auf die Genexpression eröffnete die Möglichkeit, dass die Interaktion der GSK3 β mit der PRMT5 ein wichtiges regulatorisches Prinzip darstellen könnte. Daher wurde die Interaktion beider Proteine auch mittels PLA näher untersucht. Sowohl in HEK293T als auch in HL-1 Zellen wurden keine Signale im PLA detektiert, so dass die mit den TAP/MS-Analysen ermittelte Interaktion aufgrund dieses Negativ-Befundes nicht bestätigt werden konnte und es sich somit bei der PRMT5 um ein falsch positives Ergebnis handeln könnte. In der Literatur wurde PRMT5 bereits als ein falsch-positiver Interaktionskandidat beschrieben, der bei der Reinigung über Flag-Agarose unspezifisch an die Matrix bindet (Nishioka and Reinberg, 2003; Chen and Gingras, 2007). Allerdings wurde in dieser Arbeit im Gegensatz zur einfachen Reinigung die Tandem-Affinitätsreinigung durchgeführt. Eine unspezifische Kontamination der Eluate mit PRMT5 würde eine zweifache unspezifische Adhäsion und daran anschließende Elution einmal mit dem Flag Peptid zum anderen aber auch mit Biotin erfordern. Außerdem wurde die PRMT5 nicht in den Eluaten der Kontrollzellen gefunden. Ebenso wurde die PRMT5 nicht bei der TAP des kardialen Ankyrin Proteins (CARP) in unserem Labor identifiziert (Naguib, 2009), so dass eine Kontamination eher unwahrscheinlich ist. Ein Grund für das negative PLA Ergebnis für den GSK3 β /PRMT5-

Komplex könnte bei den verwendeten Antikörpern liegen. Da der PLA nur bei einem hinreichend kurzen Abstand (< 40 nm, Herstellerangabe) der beiden verwendeten Antikörper ein Signal liefert, hängt der Ausgang dieses Experiments von der Anordnung der Epitope auf den Proteinen ab. Ferner dürfen die Epitope nicht durch die Komplexbildung der Proteine blockiert sein. Das bedeutet, dass auch bei negativen PLA-Ergebnissen eine Komplexbildung von GSK3 β und PRMT5 *in vivo* durchaus möglich ist. In dieser Arbeit wurden jedoch keine weiteren Untersuchungen zum GSK3 β /PRMT5-Komplex durchgeführt.

4.3.3 GSK3 β /ACC1-Komplex

Im Gegensatz zur PRMT5 waren die Daten zur Interaktion von GSK3 β mit der ACC1 eindeutig. Die PLA-Ergebnisse für den GSK3 β /ACC-1-Komplex bestätigen eine direkte Interaktion in HEK293T und in HL-1 Zellen. Die Interaktion von ACC1 und GSK3 β wurde auch in nicht transfizierten Zellen bestätigt, so dass eine unphysiologische Interaktion von ACC1 und GSK3 β durch die Expression der getaggen GSK3 β ausgeschlossen wurde.

Die Abhängigkeit der Interaktion von der GSK3 β -Aktivität war hierbei nicht eindeutig, da die ACC1 in den HEK293T verstärkt mit der inaktiven GSK3 β und in den HL-1 Zellen vermehrt mit den aktiven GSK3 β -Formen interagiert. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den TAP/MS-Ergebnissen, denn in den HEK293T Zellen wurde die ACC1 nur mit der GSK3 β -TAP und in den HL-1 Zellen mit allen GSK3 β -Formen isoliert. Unterschiedliche Ergebnisse zwischen der TAP/MS- und PLA-Analyse können damit erklärt werden, dass bei der TAP/MS-Untersuchung durch die Zwei-Schritt-Aufreinigung nur feste Komplexe isoliert und detektiert werden. Schwache Interaktionen könnten hierbei jedoch destabilisiert werden. Bei der PLA-Analyse werden hingegen auch schwache Interaktionen, durch die vorangegangene Formaldehyd-Behandlung in der Zelle fixiert und anschließend mit dem PLA sichtbar gemacht. Ob die ACC1 möglicherweise unterschiedlich in verschiedenen Zelltypen reguliert wird, müsste mit weiteren Untersuchungen, wie sie für den GSK3 β /PKA α -Komplex durchgeführt wurden, analysiert werden.

Die ACC ist als GSK3 β -Substrat bereits bekannt (Hughes et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine direkte Komplexbildung der beiden Proteine gezeigt. Die ACC spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Fettsäurebiosynthese, wo sie die irreversible biotinabhängige Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA katalysiert. Bei Energiemangel wird die AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK) aktiviert, die die ACC durch Phosphorylierung inaktiviert (Witters and Kemp, 1992). Die Folge ist eine verringerte Fettsäure-Synthese, so dass das Acetyl-CoA eher der Energiegewinnung zugeführt werden

kann. Im Gegensatz dazu hat ein erhöhter Insulinspiegel eine ACC-Aktivierung zur Folge. Hierbei wird angenommen, dass eine Insulin vermittelte AMPK-Inaktivierung stattfindet, die zu einer ACC-Aktivierung führt (Witters and Kemp, 1992). Aufbauend auf der hier nachgewiesenen Interaktion von GSK3 β und ACC könnte die Insulin-abhängige Aktivierung aber auch direkt über die gebundenen GSK3 β ablaufen, da Insulin durch Stimulation des PI3-Kinase/AKT-Signalwegs GSK3 β durch eine Ser9-Phosphorylierung hemmt. Auf diesem Wege würde die ACC1 weniger durch GSK3 β gehemmt und die Fettsäure-Synthese würde verstärkt ablaufen.

4.3.4 GSK3 β /PKA $I\alpha$ -Komplex

Von allen identifizierten Protein-Interaktionen mit Ausnahme der HSP war die Interaktion der GSK3 β mit der Proteinkinase A I α am stärksten ausgeprägt. Sowohl die regulatorische RI α als auch die katalytische cata α Untereinheiten wiesen insbesondere bei den HEK293T Zellen in der Silberfärbung starke Signale auf.

Die Komplexbildung von GSK3 β und PKA $I\alpha$ wurde mit dem PLA in HEK293T und in HL-1 Zellen verifiziert. Dabei wurde eine Interaktion der PKA $I\alpha$ mit der endogen und rekombinant exprimierten GSK3 β bestätigt. Für den Komplex aus GSK3 β und PKA $I\alpha$ wurde eine Abhängigkeit der Interaktion von der GSK3 β -Aktivität nachgewiesen. Die TAP/MS-Ergebnisse beider Zelllinien zeigten für die GSK3 β -Mutanten, dass eine Komplexbildung nur dann eintrat, wenn die GSK3 β katalytische Aktivität aufwies. Während sowohl das GSK3 β -TAP-Protein als auch die konstitutiv aktive Mutante (Ser9-Mutante) zur Identifizierung der PKA $I\alpha$ nach TAP führten, war für die KI-Mutante keine Interaktion nachweisbar. Dieser Zusammenhang wurde auch bei der Analyse der Komplexbildung mittels PLA nachgewiesen. Hier zeigte sich, besonders in den HEK293T Zellen, eine reduzierte Interaktion der inaktiven KI-Mutante mit der PKA $I\alpha$. Dieser interessante Befund wurde in weiteren Untersuchungen näher analysiert.

4.4 Funktionelle Bedeutung des GSK3 β /PKA $I\alpha$ -Komplexes

Die Beobachtung, dass vornehmlich die katalytisch aktive GSK3 β mit der PKA $I\alpha$ interagiert, beruhte auf der Analyse von mutierten GSK3 β -Proteinen. Da nicht auszuschließen ist, dass insbesondere die Einführung der Doppelmutation an Position 85,86 die Proteinstruktur der GSK3 β soweit modifiziert hatte, dass eine Interaktion mit der PKA $I\alpha$ verhindert wurde, sollte

in HEK293T Zellen erforscht werden, ob eine hormonell oder pharmakologisch vermittelte Hemmung der GSK3 β ebenfalls zu einem Zerfall der GSK3 β /PKA-Interaktion führen würde. Eine GSK3 β -Inaktivierung, induziert durch die Stimulation des PI3-Kinase/AKT-Signalweges mit Insulin, führte zu einer Reduktion der Komplexbildung zwischen GSK3 β und PKA α . Umgekehrt verstärkte sich die Interaktion zwischen beiden Proteinen, wenn der PI3K/AKT-Signalweg mit LY294002 gehemmt wurde. Da diese Intervention eine Steigerung der GSK3 β Aktivität durch verminderte AKT-abhängige Phosphorylierung bewirkt, wurde bestätigt, dass das Ausmaß der Komplexbildung durch den Aktivitätszustand der GSK3 β beeinflusst wird.

LiCl ist ein bekannter Inhibitor der GSK3 β , welcher sogar therapeutisch zur Behandlung von so genannten bipolaren affektiven Störungen (manisch-depressive Erkrankungen) eingesetzt wird (Jope, 2011). Es wird davon ausgegangen, dass GSK3 β eine wesentliche Rolle bei diesem Krankheitsgeschehen spielt. So wiesen transgene Mäuse mit Überexpression einer konstitutiv aktiven GSK3 β -Mutante Hyperaktivität und geringere Angst auf und waren weniger anfällig für Depressionen (Ackermann et al., 2010). Trotz des therapeutischen Einsatzes besteht bisher Unklarheit, ob LiCl direkt und/oder indirekt die GSK3 β -Aktivität inhibiert. Eine direkte GSK3 β -Hemmung durch LiCl konnte im *in vitro* Ansatz an isolierter GSK3 β gezeigt werden (Klein and Melton, 1996). Hierbei soll LiCl kompetitiv die Bindung von Mg²⁺-Ionen an GSK3 β hemmen, die für die Entfaltung der Kinaseaktivität essentiell sind. Bei der indirekten Hemmung soll LiCl Phosphatasen hemmen, die GSK3 β dephosphorylieren und folglich aktivieren (Jope, 2003). Andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass LiCl die PKC α aktiviert, welche wiederum die GSK3 β phosphoryliert und somit inaktiviert (Kirshenboim et al., 2004). Ebenfalls wurde eine indirekte Aktivierung der AKT durch LiCl vermutet, die dann wiederum GSK3 β inhibieren kann (O'Brien et al., 2011). Damit stellte LiCl eine weitere Option dar, um die Komplexbildung von GSK3 β und PKA α zu untersuchen.

Im Vergleich zur Modulation der GSK3 β -Aktivität über den Insulin-Signalweg, zeigte die Hemmung mit LiCl einen sehr viel stärkeren Effekt auf den GSK3 β /PKA α -Komplex. So wurde die Interaktion von PKA α mit GSK3 β sowohl in den GSK3 β -TAP als auch in den GSK3 β -Ser9-TAP transfizierten HEK293T Zellen fast komplett verhindert. Ein ähnliches Ergebnis wurde für LiCl behandelte WT-HEK293T und -HL-1 Zellen im PLA gezeigt. Hier führte die LiCl-Behandlung ebenfalls zu einer Reduktion der GSK3 β /PKA α Komplexbildung. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Aktivität der GSK3 β eine wesentliche

Determinante der Interaktion mit der PKA α ist, denn wie die genetische führte auch die pharmakologische Hemmung der GSK3 β -Aktivität zu einer Dissoziation des GSK3 β /PKA α -Komplexes. Eine schematische Zusammenfassung der neu gewonnenen Erkenntnisse zum GSK3 β /PKA α -Komplex sind in Abb. 4.1 dargestellt.

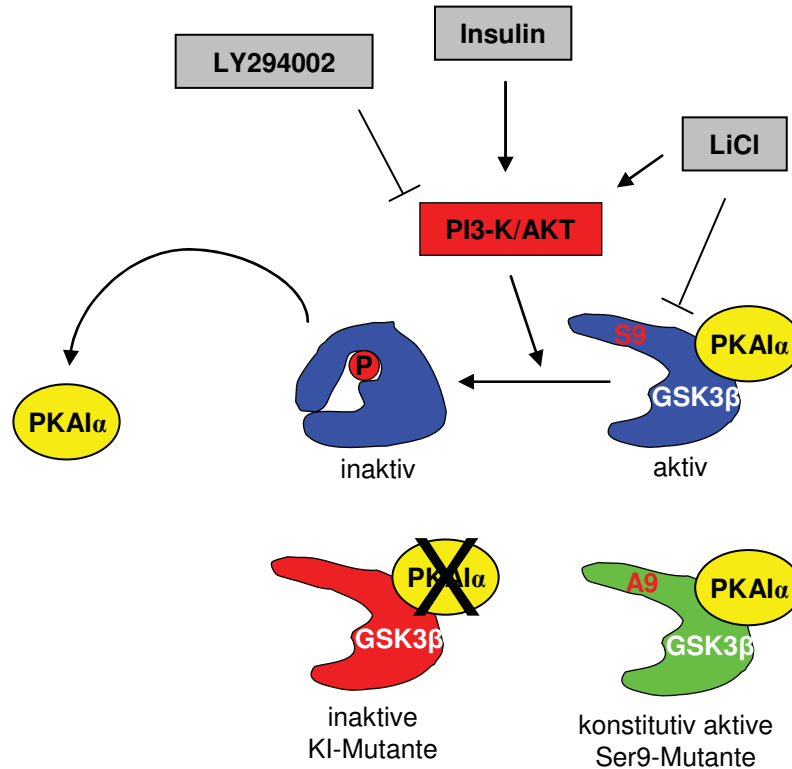


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Regulation des GSK3 β /PKA α -Komplexes. Die Inaktivierung des PI3-Kinase/AKT-Signalweges (Insulin) bzw. die direkte AKT-Aktivierung (LiCl) oder GSK3 β -Hemmung (LiCl) führt zu einer reduzierten Interaktion von PKA α und GSK3 β . Ein ähnliches Bild zeigt sich für die inaktive KI-Mutante, die nur eine sehr geringe Affinität zu PKA α zeigt. Bei einer GSK3 β -Stimulation, die durch Hemmung des PI3-Kinase/AKT-Signalweges mit LY294002 hervorgerufen wird, wird der Komplex zwischen den beiden Proteinkinasen verstärkt. Eine starke Interaktion ist ebenfalls zwischen der aktiven Ser9-Mutante und PKA α zu sehen.

Die hohe Effizienz von LiCl bei Störung der Interaktion der GSK3 β mit der PKA α wirft die Frage auf, wie die Aktivität der GSK3 β und die Komplexbildung mit der PKA α verknüpft sind. Da die LiCl-Behandlung an intakten Zellen durchgeführt wurde, ist nicht vollständig auszuschließen, dass die LiCl-Wirkung über die postulierten indirekten Mechanismen erfolgt sein könnte. Allerdings sprechen folgende Befunde dafür, dass zumindest zu einem großen Teil eine direkte Hemmung der GSK3 β für den beobachteten Effekt verantwortlich war:

- Eine LiCl-Inkubation der isolierten GSK3 β aus HEK293T Zellen führte zu einer GSK3 β -Hemmung (persönliche Mitteilung von Martin Gerlach, ehemaliger Doktorand, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie). Dies belegte eine direkte Hemmung der enzymatischen Aktivität, da unter diesen Bedingungen AKT oder PKC sowie die diskutierten Phosphatasen nicht in dem Testansatz vorhanden waren.

- Die Aktivierung der Insulinkaskade, die über AKT die GSK3 β durch Phosphorylierung hemmt, induzierte eine Reduktion der Komplexbildung von PKA $I\alpha$ und GSK3 β .
- Auch die Interaktion der GSK3 β -Ser9-Mutante mit der PKA $I\alpha$ wurde durch LiCl gehemmt. Da diese Mutante an Ser9 nicht mehr phosphorylierbar ist, ist eine indirekte Beeinflussung der Komplexbildung durch LiCl über andere Kinasen bzw. Phosphatasen in diesem Falle nicht möglich.

Es wurde weiter untersucht, welchen Einfluss die Aktivität der PKA auf den GSK3 β /PKA $I\alpha$ -Komplex hatte. Eine Aktivierung der tetrameren PKA, die aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten besteht, erfolgt normalerweise durch die Bindung von insgesamt vier cAMP-Molekülen an die regulatorischen Untereinheiten. Dabei erfährt PKA eine Konformationsänderung, wodurch die katalytischen Untereinheiten von den regulatorischen Untereinheiten dissoziieren (Zhao et al., 1998). Das membrangängige cAMP-Analogon 8-Br-cAMP kann sowohl in isolierten Zellen als auch am gereinigten Enzym eine Aktivierung der PKA auslösen. Für eine Hemmung der katalytischen Aktivität wurde H89 eingesetzt, welches direkt an die ATP-Bindungsstelle des aktiven Zentrums der katalytischen Untereinheiten bindet.

Eine Hemmung der PKA mit H89 führte zu keiner wesentlichen Beeinflussung der Komplexbildung. Dies galt für die Behandlung isolierter Komplexe wie für die Inkubation der transfizierten GSK3 β -TAP- und Ser9-HEK293T Zellen mit dem Inhibitor. Hingegen induzierte eine PKA-Aktivierung mit 8-Br-cAMP eine Dissoziation des GSK3 β /PKA $I\alpha$ -Komplexes. Sowohl bei Anwendung auf isolierte Komplexe als auch auf GSK3 β -TAP- und Ser9-HEK293T Zellen kam es zu einer Dissoziation der regulatorischen (RI α) und katalytischen (cata α) Untereinheiten. Auffällig war, dass die cAMP induzierte Dissoziation zu einem stärkeren Verlust der cata α und nur in geringerem Maße der RI α führte. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion der GSK3 β mit der PKA $I\alpha$ über eine Interaktion von GSK3 β und der RI α Untereinheit der PKA $I\alpha$ erfolgte.

Welche Rückschlüsse lassen sich nun auf die Interaktion der GSK3 β und der PKA $I\alpha$ ziehen? Mit Ausnahme der Ser9 Mutante liegt die GSK3 β intrazellulär teilweise in der phosphorylierten und teilweise in der dephosphorylierten Form vor. Da eine Interaktion der PKA auch mit der Ser9 Mutante erfolgt, kann man davon ausgehen, dass die Phosphorylierung nicht essentiell für die Interaktion von GSK3 β und PKA ist. Dies wird auch durch die K85,86 Mutante unterstützt: Obwohl diese inaktive GSK3 β effizient an Ser9

phosphoryliert wird, kommt es zu keiner, bzw. einer stark abgeschwächten Bindung. Daher scheint eher die Konformation der GSK3 β eine Rolle zu spielen. Mit der Phosphorylierung an Ser9 kommt es zu einer Autoinhibition der GSK3 β , indem eine intramolekulare Reaktion zur Einlagerung des N-terminalen Peptids in die Substrat-Bindungsstelle führt (Dajani et al., 2001). Wie in der Einleitung (siehe 1.2) ausgeführt, phosphoryliert GSK3 β bevorzugt Substrate, die in der Nähe der GSK3 β -Phosphorylierungsstelle bereits durch andere Kinasen phosphoryliert („priming phosphate“) wurden. Daher wird vermutet, dass das Ser9 phosphorylierte N-terminale Ende als Pseudosubstrat dient und analog zu einem präphosphorylierten Substrat die Funktion eines „priming phosphate“ übernimmt. Dabei soll das phosphorylierte Ser9 mit der positiv geladenen Tasche, die sich aus Arg96, Arg180 und Lys205 zusammensetzt, interagieren (Ter Haar et al., 2001; Doble and Woodgett, 2003). Infolge dieser Umlagerung kommt es zumindest am N-terminalen Ende zu einer Strukturänderung der GSK3 β , die eine Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen und im Falle der Interaktion mit der PKAII die Bindung hemmen könnte. Interessanterweise zeigen neuere Daten, dass Li⁺ Ionen bei der Hemmung der GSK3 β Mg²⁺ Ionen verdrängen können, die für die Bindung von ATP und die Katalyse eine wesentliche Rolle spielen. Eine Verdrängung von Mg²⁺ Ionen, welche mit den β - und γ -Phosphatgruppen des ATP interagiert, führt interessanterweise zu einer Konformationsänderung der GSK3 β unter erheblicher Verschiebung des Arg96 sowie benachbarter Schleifenstrukturen (Sun et al., 2011). Die Mutagenese von K85,86 der ATP-Bindungsstelle zur Erzeugung der katalytisch inaktiven Mutante (KI-Mutante) wird ebenfalls vermutlich direkte Auswirkungen auf die Struktur des aktiven Zentrums der GSK3 β haben. Aus diesen Überlegungen lässt sich vermuten, dass der gemeinsame Mechanismus der Inaktivierung der GSK3 β durch Phosphorylierung, durch Hemmung mit LiCl und durch Mutagenese eine damit verbundene Änderung der Tertiärstruktur im Bereich der ATP-Bindungsstelle sein könnte.

In der Literatur ist beschrieben, dass Isoformen der Proteinkinase A vielfältige Komplexe mit anderen Proteinen bilden. Dadurch wird unter anderem eine spezifische räumliche Lokalisation der Kinasen in den Zellen erreicht. Es wurde gezeigt, dass die Interaktion der PKA mit anderen Proteinen unter Beteiligung so genannter AKAPs (*A-Kinase Anchor-Proteins*) erfolgte. Die AKAPs stellen dabei gewissermaßen ein multivalentes Gerüst dar, an dessen Oberfläche die PKA und ihre Substrate zusammengebracht werden bzw. eine spezifische subzelluläre Lokalisation der PKA erreicht wird (Edwards and Scott, 2000). Diese Art der Interaktion mit AKAP wurde bisher vor allem für die PKAII (PKA mit regulatorischer

Untereinheit Typ II (RII)) nachgewiesen, wobei die Interaktion über die regulatorischen Untereinheiten (RII) vermittelt wird. Auch GSK3 β wurde bereits in Komplexen mit der PKAII gefunden, die durch zwei verschiedene AKAPs vermittelt wurden: AKAP11 (synonym AKAP220; Tanji et al., 2002) und GSKIP, das GSK3 β -interagierende Protein, welches ebenfalls mit der RII α Untereinheit der PKAII interagiert (Hundsrucker 2010). In dieser Arbeit wurde nun erstmalig gezeigt, dass GSK3 β auch einen Komplex mit der PKAI α ausbildet und dass dies vermutlich über die regulatorische RI α Untereinheit vermittelt wird. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von allen vier bekannten humanen Isoformen der regulatorischen PKA Untereinheiten belegte eindeutig, dass in dieser Arbeit die RI α Untereinheit und nicht die RI β , RII α oder RII β Untereinheit identifiziert wurde (siehe Anhang 9.1). Hierzu stellt sich die Frage, ob in Analogie zur Interaktion der PKAII die Interaktion von GSK3 β mit PKAI α ebenfalls durch ein AKAP vermittelt wird.

Da die PKAI α quantitativ der prominenteste Interaktionspartner von GSK3 β war, wäre für ein AKAP, das an diesem Komplex beteiligt ist, in etwa dieselbe Signalstärke nach der Gelelektrophorese zu erwarten gewesen. Für AKAP11 war dies in den HEK293T Zellen nicht gegeben und in HL-1 Zellen wurde AKAP11 überhaupt nicht gefunden. Darüber hinaus ist die Rolle von AKAP11 als Bindeprotein für RI Untereinheiten umstritten. Während in humanen Hoden hAKAP220 (entspricht AKAP11) eine duale Spezifität für RI und RII Untereinheiten zu besitzen scheint (Reinton et al., 2000), wurde kürzlich in einem proteomischen Ansatz gezeigt, dass AKAP11 in HEK293 Zellen, Lungengewebe und Hoden der Ratte zu den RII-spezifischen AKAP gehört (Aye et al., 2009). Eine Beteiligung von AKAP11 an der Bildung des PKA-Komplexes ist hier vor allem wegen des Fehlens von AKAP11 in den HL-1 TAP Ergebnissen sowie der RII-Spezifität in HEK293 Zellen eher unwahrscheinlich.

GSKIP ist ein kleines Protein, für das bereits eine Interaktion als AKAP mit PKAII und GSK3 β nachgewiesen wurde. Daher wurde in dieser Arbeit spezifisch nach der Anwesenheit von GSKIP in den TAP Eluaten gesucht, um eine mögliche Beteiligung an der Komplexbildung zu überprüfen. Mittels TAP und anschließender MS Analyse ergab sich aber kein Hinweis auf eine Beteiligung von GSKIP an der Ausbildung des hier nachgewiesenen GSK3 β /PKAI α -Komplexes, so dass GSKIP nicht an der Komplexbildung zwischen GSK3 β und der PKAI beteiligt ist. Dieser Befund bestätigt frühere Beobachtungen, nach denen dass GSKIP mit RII, nicht aber mit RI Untereinheiten interagiert (Hundsrucker et al., 2010). Außer dem RII spezifischen AKAP11 wurde in den TAP Analysen kein weiteres „AKAP-ähnliches“ Protein gefunden. Damit bleibt unklar, ob der GSK3 β /PKAI α -Komplex auf einer direkten

Interaktion beruht, oder ob ein anderes Protein beteiligt ist, für das bisher noch keine AKAP Funktion beschrieben wurde.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Bildung des GSK3 β /PKAI α -Komplexes abhängig von der GSK3 β - und der PKAI α -Aktivität ist. Hierzu stellte sich die Frage, ob diese Interaktion auch die Enzymaktivität der Proteinkinasen steuert. In den *in vitro* Experimenten mit kommerziell erhältlichen gereinigten Proteinkinasen (GSK3 β und PKAI α) zeigte sich, dass die GSK3 β -Aktivität durch die Interaktion mit PKAI α nicht beeinflusst wurde. Generell ist davon auszugehen, dass die PKAI α auch eine Phosphorylierung von Ser9 der GSK3 β durchführen kann. Somit wäre eine reduzierte GSK3 β -Aktivität zu erwarten gewesen. Umgekehrt zeigte sich, dass die PKAI α -Aktivität durch GSK3 β -Interaktion leicht gesteigert wurde. Im letzteren Fall war die Steigerung der PKAI α -Aktivität lediglich in den Kurvenverläufen, jedoch nicht für einzelne Zeitpunkte der Messung signifikant. Somit ist hier allenfalls von einer minimalen Beeinflussung der PKAI α durch GSK3 β auszugehen. Überraschend war nur, dass die GSK3 β -Aktivität in dem gewählten Assay nicht durch die PKAI α beeinflusst wurde.

Ein Grund für das unerwartete Ergebnis der *in vitro* Experimente könnte sein, dass der GSK3 β /PKAI α -Komplex unter physiologischen Bedingungen über einen dritten Interaktionspartner vermittelt wird, der im *in vitro* Experiment fehlte. Dieser dritte Interaktionspartner könnte beispielsweise eine lokale Interaktionsplattform darstellen oder zu einer notwendigen Konformationsveränderung führen.

Als mögliche Interaktionsvermittler zwischen GSK3 β und PKAI α können AKAP11 und GSKIP, wie oben beschrieben, vermutlich ausgeschlossen werden. Als „AKAP-ähnliche“ Proteine würden somit in erster Linie Proteine in Frage kommen, die im Rahmen der TAP mit etwa derselben Intensität, wie die PKAI α -Untereinheiten, nachgewiesen wurden. Unter diesem Gesichtspunkt kommen vor allem die Hitzeschockproteine in Frage. Wie bereits oben ausgeführt, spielen HSP nicht nur bei der Unterstützung der Proteinfaltung eine Rolle, vielmehr können sie ebenfalls die Ausbildung von Proteinkomplexen vermitteln. So assembliert z.B. HSP90 einen Komplex aus endothelialer NO Synthase, Calmodulin und der Proteinkinase AKT, wodurch eine Ca²⁺-unabhängige Stimulation der eNOS vermittelt wird (Takahashi and Mendelsohn, 2003). Es bleibt also zu untersuchen, ob die koeluierten HSP-Proteine eine Interaktion von GSK3 β und PKAI α vermitteln können.

Interessanterweise hatten Gambaryan et al., 2010 in Blutplättchen gezeigt, dass die PKA einen Komplex mit NF κ B/I κ B ausbildet. Eine Stimulation der Blutplättchen mit Thrombin

oder Kollagen induzierte dabei die Entlassung der katalytischen PKA Untereinheit aus dem Komplex. Die auf diese Weise aktivierte PKA konnte so nach Stimulation der Blutplättchen das PKA-Substrat VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein) phosphorylieren. Das Besondere an diesem Befund ist, dass es sich um eine cAMP-unabhängige Aktivierung der PKA handelt.

Da LiCl eine Dissoziation des GSK3 β /PKA α -Komplexes induzierte, wurde untersucht, ob diese PKA α -Entlassung, analog zur Stimulation in Blutplättchen, zu einer gesteigerten PKA-Aktivität beiträgt. Als Indikator für die PKA-Aktivität in HEK293T Zellen, wurde die Phosphorylierung des VASPs genutzt (Butt et al., 1994). Im Gegensatz zur Situation in Thrombozyten führte eine PKA-Dissoziation in den HEK293T Zellen zu keiner Steigerung der VASP-Phosphorylierung. Die Dissoziation der PKA α aus dem Komplex mit der GSK3 β ist daher kein Mechanismus einer cAMP-unabhängigen Aktivierung der PKA α .

4.5 Ausblick

Mit dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsansatz wurden erstmalig systematisch GSK3 β -Interaktionspartner in Säugerzellen analysiert. Hierbei wurde zum ersten Mal gezeigt, dass GSK3 β mit vielen unterschiedlichen Proteinen fest in Komplexen organisiert ist. Die Ergebnisse in dieser Arbeit liefern Hinweise auf neue Funktionen von GSK3 β . So interagiert GSK3 β mit Proteinen, die eine essentielle Rolle bei der Regulation der Zelladhäsion, Zellmigration bzw. des Stoffwechsels spielen. Darüber hinaus wurde die PKA α als GSK3 β -Interaktionspartner identifiziert. Für PKA ist interessanterweise auch bekannt, dass sie wie die GSK3 β eine wichtige Rolle im Herzen und insbesondere bei der Entwicklung einer Hypertrophie spielt (Enns et al., 2010). Hierzu wurde in der Maus gezeigt, dass eine konstitutiv aktive GSK3 β (Ser9-Mutante) vor einer Isoproterenol-induzierten Hypertrophie schützt (Webb et al., 2010). Normalerweise wird das Isoproterenol- wie das Adrenalin-Signal über den β -Rezeptor in die Kardiomyozyten transduziert. Die dadurch aktivierte Adenylylcyclase synthetisiert ATP zu cAMP, wodurch wiederum die PKA aktiviert wird. In dem genannten Beispiel wird angenommen, dass die aktive PKA die GSK3 β über Phosphorylierung inaktiviert. Die inhibierte GSK3 β kann deshalb ihre anti-hypertrophe Wirkung nicht ausüben (Antos et al., 2002; siehe Einleitung 1.4). Hingegen konnte die aktivierte PKA die Ser9-Mutante nicht phosphorylieren, wodurch GSK3 β als anti-hypertropher Faktor wirken konnte. Somit könnte der in dieser Arbeit identifizierte

GSK3 β /PKA $I\alpha$ -Komplex auch direkt über den beschriebenen Mechanismus die Hypertrophie im Herzen regulieren.

Die Befunde dieser Arbeit legen nahe, dass die Signaltransduktion von PKA $I\alpha$ und GSK3 β auch im Herzen durch die Bildung stabiler Komplexe in hohem Maße koordiniert abläuft. Eine interessante Option der weiteren Erforschung des GSK3 β /PKA $I\alpha$ -Komplexes wäre die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren, die im Sinne von „Interaktionsbrechern“, spezifisch die Komplexbildung von GSK3 β und PKA $I\alpha$ hemmen. Auf diesem Wege ließe sich die funktionelle Bedeutung der GSK3 β -Interaktion näher analysieren.

5 Zusammenfassung

Glykogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3 β) ist eine Proteinkinase, die eine Vielzahl zellulärer Funktionen reguliert. So spielt sie z.B. eine essentielle Rolle bei der Regulation des Stoffwechsels, des Wachstums und der Differenzierung. Über eine Serin 9-Phosphorylierung (z.B. durch AKT, PKC) wird die konstitutiv aktive GSK3 β inaktiviert, wohingegen ihre Aktivität über eine Tyr216-Phosphorylierung gesteigert wird. In der aktiven Form besitzt GSK3 β eine besondere Präferenz für Substrate, die bereits durch andere Proteinkinasen präphosphoryliert wurden. Weitere Regulationsmechanismen stellen die zelluläre Lokalisation (Zytoplasma, Zellkern, Mitochondrien) und die Bildung von Komplexen (z.B. im Wnt-Signalweg) dar.

Da bisher nur wenige GSK3 β -assoziierte Proteinkomplexe bekannt sind, war es das Ziel dieser Arbeit, GSK3 β -assoziierte Proteine systematisch aus Säugerzellen (HEK293T Zellen und HL-1 Kardiomyozyten) zu isolieren und zu identifizieren. Auf diese Weise sollten neue Erkenntnisse zur GSK3 β -abhängigen Signaltransduktion und Funktion gewonnen werden. Hierzu wurde eine Kombination aus Tandem-Affinitätsreinigung und massenspektrometrischer Analyse (TAP/MS) angewendet, die eine Aufreinigung und Charakterisierung von GSK3 β und ihren Interaktionspartnern unter nativen Bedingungen ermöglichte. Um die Proteininteraktionen in Abhängigkeit von der GSK3 β -Aktivität zu analysieren, wurde eine konstitutiv aktive GSK3 β -Mutante (Serin 9 \rightarrow Alanin 9) und eine inaktive GSK3 β -Mutante (Lysin 85,86 \rightarrow Alanin 85,86) generiert. Mittels der TAP/MS-Analyse wurden neben bekannten (β -Catenin, Axin-1, APC) auch neue GSK3 β -Interaktionspartner identifiziert.

Von vier ausgewählten neuen GSK3 β -Interaktionspartnern wurden drei Proteine (Filamin A (FLNA), Acetyl CoA Carboxylase 1 (ACC1) und Proteinkinase A I α (PKA I α)) mittels *Proximity Ligation Assay* (PLA) verifiziert. Die Interaktionen wurden auch für die wildtypische endogen exprimierte GSK3 β bestätigt. Für Filamin A zeigte sich, dass es in HEK293T Zellen vornehmlich mit der aktiven Form von GSK3 β interagiert. Die ACC1 und PKA I α wurden hingegen in beiden Zelllinien als GSK3 β -Interaktionspartner bestätigt. Mittels der TAP/MS- und der PLA-Methode konnte gezeigt werden, dass die PKA I α bevorzugt mit der aktiven GSK3 β -Form interagiert und diese Komplexbildung somit von der GSK3 β -Aktivität abhängig ist.

Detaillierte Untersuchungen des GSK3 β /PKA I α -Komplexes in HEK293T Zellen zeigten, dass die inaktive GSK3 β -Mutante nur schwach mit der PKA I α assoziiert war. Ein ähnlicher Befund konnte für eine hormonell (Insulin) und pharmakologisch (Lithiumchlorid) vermittelte Hemmung der GSK3 β gezeigt werden, denn diese führten auch zu einer Dissoziation des GSK3 β /PKA I α -Komplexes. Im Gegensatz dazu steigerte eine GSK3 β -Aktivierung (PI3K-Inhibitor LY294002) die Komplexbildung.

Im Unterschied zur GSK3 β -Inhibition konnte durch PKA-Hemmung (PKA-Inhibitor: H89) kein wesentlicher Einfluss auf den Komplex festgestellt werden. Eine PKA-Aktivierung (cAMP-Analogon: 8-Br-cAMP) hatte hingegen zur Folge, dass die katalytische Domäne fast vollständig und die regulatorische Domäne teilweise vom Komplex dissoziierten. Die GSK3 β -Serin 9-Phosphorylierung wurde durch eine PKA-Hemmung bzw. -Aktivierung vermindert bzw. gesteigert.

Schlussfolgerung: TAP/MS-Analyse von GSK3 β -assoziierten Proteinen ist eine effizienter experimenteller Ansatz, der über die Identifizierung neuer Interaktionspartner auf eine enge Verzahnung der GSK3 β mit der Regulation des Metabolismus, des Zytoskeletts und insbesondere der cAMP-abhängige Signaltransduktion hinweist.

6 Summary

The glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) is a protein kinase which is involved in numerous cellular functions ranging from metabolism and growth to differentiation. GSK3 β is constitutively active and can be inhibited by phosphorylation on serine 9 by e.g. AKT or PKC. In contrast to that, a phosphorylation at tyrosin 216 increases the GSK3 β activity. GSK3 β prefers substrates which are pre-phosphorylated by other protein kinases. Additional regulation mechanisms are distinct cellular localisations (cytoplasm, nucleus, mitochondria) or complex formations (e.g. Wnt-pathway) of GSK3 β with other proteins.

Today little is known about GSK3 β associated proteins or complex formation. To investigate GSK3 β -dependent signalling and its regulation in the context of protein interactions, the aim of this study was the systematic analysis of GSK3 β associated proteins in eukaryotic cells (HEK293T and HL-1 cardiomyocytes). A combination of tandem affinity purification and mass spectrometry (TAP/MS) enabled the purification and characterization of GSK3 β and its interacting proteins under native conditions. Beside known interaction partners of GSK3 β (β -Catenin, Axin-1, APC) also new ones were identified with the help of TAP/MS analysis. To analyze whether the protein interactions depend on the catalytic activity of GSK3 β , a constitutively active mutant (serine 9 \rightarrow alanine 9) and an inactive mutant (lysine 85, 86 \rightarrow alanine 85,86) of GSK3 β were generated.

Three out of four new GSK3 β interaction partners (filamin A (FLNA), acetyl CoA carboxylase 1 (ACC1) and protein kinase A I α (PKA I α)) were verified via proximity ligation assay (PLA). The interactions were also confirmed for endogenous GSK3 β in wildtype cells. Thereby it has been discovered, that filamin A and GSK3 β interact only in HEK293T cells and there in particular, when GSK3 β is active. ACC1 and PKA have been confirmed as GSK3 β interacting proteins in both cell lines. In addition, it was shown that the interaction of GSK3 β and PKA I α depends on GSK3 β -activity, as PKA I α interacts preferentially with the active form of GSK3 β . Further analysis of the GSK3 β /PKA I α complex in HEK293T cells revealed a weak interaction of PKA I α with inactive GSK3 β mutants. Similar findings were shown for hormonal (insulin) and pharmacological (lithium chloride) inhibition of GSK3 β as this led also to a dissociation of the GSK3 β /PKA I α complex. In contrast to that, activation of GSK3 β (PI3K inhibitor LY294002) increased the complex formation.

In contrast to the GSK3 β -mediated effects, an inhibition of PKA (H89: PKA inhibitor) had no essential effect on the GSK3 β /PKA I α complex formation. However, a dissociation of almost the complete catalytic domain and a part of the regulatory domain of PKA from the complex, after PKA-activation with 8-Brom cAMP was detectable.

In addition to that, the GSK3 β -serine 9-phosphorylation was decreased or was detectable increased respectively by PKA inhibition or activation.

Conclusion: TAP/MS analysis of GSK3 β associated proteins is a powerful tool for the identification of new interaction partners. These newly discovered protein interactions point to the deep involvement of GSK3 β in regulation of metabolism, cytoskeleton and in particular cAMP dependent signal transduction.

7 Literatur

- Ackermann, T.F., Kempe, D.S., Lang, F., and Lang, U.E. (2010). Hyperactivity and enhanced curiosity of mice expressing PKB/SGK-resistant glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Cell. Physiol. Biochem.* 25, 775–786.
- Ali, A., Hoeflich, K.P., and Woodgett, J.R. (2001). Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem. Rev.* 101, 2527–2540.
- Antos, C.L., McKinsey, T.A., Frey, N., Kutschke, W., McAnally, J., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2002). Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 907–912.
- Armstrong, J.L., Bonavaud, S.M., Toole, B.J., and Yeaman, S.J. (2001). Regulation of glycogen synthesis by amino acids in cultured human muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276, 952–956.
- Aye, T.T., Mohammed, S., Toorn, H.W.P. van den, Veen, T.A.B. van, Heyden, M.A.G. van der, Scholten, A., and Heck, A.J.R. (2009). Selectivity in Enrichment of cAMP-dependent Protein Kinase Regulatory Subunits Type I and Type II and Their Interactors Using Modified cAMP Affinity Resins. *Mol Cell Proteomics* 8, 1016–1028.
- Berggård, T., Linse, S., and James, P. (2007). Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* 7, 2833–2842.
- Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pretorius, L., and McMullen, J.R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* 128, 191–227.
- Bijur, G.N., and Jope, R.S. (2001). Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J. Biol. Chem.* 276, 37436–37442.
- Bijur, G.N., and Jope, R.S. (2003). Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14, 2415–2419.
- Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J., and Walter, U. (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J. Biol. Chem.* 269, 14509–14517.
- Chen, G.L., and Gingras, A.-C. (2007). Affinity-purification mass spectrometry (AP-MS) of serine/threonine phosphatases. *Methods* 42, 298–305.
- Cho, J.-H., and Johnson, G.V.W. (2003). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J. Biol. Chem.* 278, 187–193.
- Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A., and Izzo, N.J. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 2979–2984.
- Cohen, P., Yellowlees, D., Aitken, A., Donella-Deana, A., Hemmings, B.A., and Parker, P.J. (1982). Separation and characterisation of glycogen synthase kinase 3, glycogen synthase kinase 4 and glycogen synthase kinase 5 from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 124, 21–35.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–789.
- Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Young, N., Good, V., Dale, T.C., and Pearl, L.H. (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105, 721–732.

- Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stanek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* *438*, 867–872.
- Devereux, R.B. (2000). Therapeutic options in minimizing left ventricular hypertrophy. *Am. Heart J.* *139*, S9–14.
- Doble, B.W., and Woodgett, J.R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* *116*, 1175–1186.
- Edwards, A.S., and Scott, J.D. (2000). A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 217–221.
- Eldar-Finkelman, H., Argast, G.M., Foord, O., Fischer, E.H., and Krebs, E.G. (1996). Expression and characterization of glycogen synthase kinase-3 mutants and their effect on glycogen synthase activity in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *93*, 10228–10233.
- Embi, N., Rylatt, D.B., and Cohen, P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* *107*, 519–527.
- Engel, T., Hernández, F., Avila, J., and Lucas, J.J. (2006). Full Reversal of Alzheimer's Disease-Like Phenotype in a Mouse Model with Conditional Overexpression of Glycogen Synthase Kinase-3. *J. Neurosci.* *26*, 5083–5090.
- Enns, L.C., Pettan-Brewer, C., and Ladiges, W. (2010). Protein kinase A is a target for aging and the aging heart. *Aging (Albany NY)* *2*, 238–243.
- Fang, X., Yu, S., Tanyi, J.L., Lu, Y., Woodgett, J.R., and Mills, G.B. (2002). Convergence of multiple signaling cascades at glycogen synthase kinase 3: Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a protein kinase C-dependent intracellular pathway. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 2099–2110.
- Fang, X., Yu, S.X., Lu, Y., Bast, R.C., Woodgett, J.R., and Mills, G.B. (2000). Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *97*, 11960–11965.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *84*, 7413–7417.
- Fiol, C.J., Mahrenholz, A.M., Wang, Y., Roeske, R.W., and Roach, P.J. (1987). Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J. Biol. Chem.* *262*, 14042–14048.
- Frame, S., and Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* *359*, 1–16.
- Gambaryan, S., Kobsar, A., Rukoyatkina, N., Herterich, S., Geiger, J., Smolenski, A., Lohmann, S.M., and Walter, U. (2010). Thrombin and Collagen Induce a Feedback Inhibitory Signaling Pathway in Platelets Involving Dissociation of the Catalytic Subunit of Protein Kinase A from an NFκB-IκB Complex. *J. Biol. Chem.* *285*, 18352–18363.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C.R., Meagher, D.A., Imai, B.S., and Mische, S.M. (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* *20*, 601–605.
- Gonsalvez, G.B., Tian, L., Ospina, J.K., Boisvert, F.-M., Lamond, A.I., and Matera, A.G. (2007). Two distinct arginine methyltransferases are required for biogenesis of Sm-class ribonucleoproteins. *J Cell Biol* *178*, 733–740.
- Grimes, C.A., and Jope, R.S. (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog. Neurobiol* *65*, 391–426.

- Ter Haar, E., Coll, J.T., Austen, D.A., Hsiao, H.M., Swenson, L., and Jain, J. (2001). Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat. Struct. Biol.* 8, 593–596.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9, 576–596.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42–52.
- Haq, S., Michael, A., Andreucci, M., Bhattacharya, K., Dotto, P., Walters, B., Woodgett, J., Kilter, H., and Force, T. (2003). Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4610–4615.
- Hardt, S.E., Tomita, H., Katus, H.A., and Sadoshima, J. (2004). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2Bepsilon by glycogen synthase kinase-3beta regulates beta-adrenergic cardiac myocyte hypertrophy. *Circ. Res.* 94, 926–935.
- Haverinen, M., Passinen, S., Syväälä, H., Pasanen, S., Manninen, T., Tuohimaa, P., and Ylikomi, T. (2001). Heat shock protein 90 and the nuclear transport of progesterone receptor. *Cell Stress Chaperones* 6, 256–262.
- Heineke, J., and Molkentin, J.D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 589–600.
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O., and Woodgett, J.R. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406, 86–90.
- Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S.E., Totty, N.F., and Woodgett, J.R. (1993). Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 12, 803–808.
- Hughes, K., Ramakrishna, S., Benjamin, W.B., and Woodgett, J.R. (1992). Identification of multifunctional ATP-citrate lyase kinase as the alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3. *Biochem. J.* 288 (Pt 1), 309–314.
- Hundsrucker, C., Skroblin, P., Christian, F., Zenn, H.-M., Popara, V., Joshi, M., Eichhorst, J., Wiesner, B., Herberg, F.W., Reif, B., et al. (2010). Glycogen synthase kinase 3beta interaction protein functions as an A-kinase anchoring protein. *J. Biol. Chem* 285, 5507–5521.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., and Kikuchi, A. (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J.* 17, 1371–1384.
- Jope, R.S. (2003). Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 441–443.
- Jope, R.S. (2011). Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders. *Front Mol Neurosci* 4, 16.
- Jope, R.S., and Johnson, G.V.W. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29, 95–102.
- Juhaszova, M., Zorov, D.B., Kim, S.-H., Pepe, S., Fu, Q., Fishbein, K.W., Ziman, B.D., Wang, S., Ytrehus, K., Antos, C.L., et al. (2004). Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113, 1535–1549.
- Kerkela, R., Kockeritz, L., Macaulay, K., Zhou, J., Doble, B.W., Beahm, C., Greytak, S., Woulfe, K., Trivedi, C.M., Woodgett, J.R., et al. (2008). Deletion of GSK-3beta in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation. *J. Clin. Invest.* 118, 3609–3618.
- Kerkelä, R., Woulfe, K., and Force, T. (2007). Glycogen synthase kinase-3beta -- actively inhibiting hypertrophy. *Trends Cardiovasc. Med.* 17, 91–96.

- Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P., Oxley, C.L., Baldassarre, M., Wegener, K.L., Campbell, I.D., Ylännä, J., and Calderwood, D.A. (2006). The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol. Cell* *21*, 337–347.
- Kim, L., Liu, J., and Kimmel, A.R. (1999). The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell* *99*, 399–408.
- Kirshenboim, N., Plotkin, B., Shlomo, S.B., Kaidanovich-Beilin, O., and Eldar-Finkelman, H. (2004). Lithium-mediated phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β involves PI3 kinase-dependent activation of protein kinase C- α . *J. Mol. Neurosci* *24*, 237–245.
- Klein, P.S., and Melton, D.A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *93*, 8455–8459.
- Lambert de Rouvroit, C., and Goffinet, A.M. (2001). Neuronal migration. *Mechanisms of Development* *105*, 47–56.
- Lesort, M., Jope, R.S., and Johnson, G.V. (1999). Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3 β and Fyn tyrosine kinase. *J. Neurochem.* *72*, 576–584.
- Letourneau, P.C., and Shattuck, T.A. (1989). Distribution and possible interactions of actin-associated proteins and cell adhesion molecules of nerve growth cones. *Development* *105*, 505–519.
- Leurs, C., Jansen, M., Pollok, K.E., Heinkelein, M., Schmidt, M., Wissler, M., Lindemann, D., Von Kalle, C., Rethwilm, A., Williams, D.A., et al. (2003). Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34 $^{+}$ cord blood cells. *Hum. Gene Ther.* *14*, 509–519.
- Li, D., August, S., and Woulfe, D.S. (2008). GSK3 β is a negative regulator of platelet function and thrombosis. *Blood* *111*, 3522–3530.
- Li, M., Wang, X., Meintzer, M.K., Laessig, T., Birnbaum, M.J., and Heidenreich, K.A. (2000). Cyclic AMP Promotes Neuronal Survival by Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3 β . *Mol. Cell. Biol.* *20*, 9356–9363.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 781–810.
- MacAulay, K., Doble, B.W., Patel, S., Hansotia, T., Sinclair, E.M., Drucker, D.J., Nagy, A., and Woodgett, J.R. (2007). Glycogen synthase kinase 3 α -specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab.* *6*, 329–337.
- Majumder, S., Alinari, L., Roy, S., Miller, T., Datta, J., Sif, S., Baiocchi, R., and Jacob, S.T. (2010). Methylation of histone H3 and H4 by PRMT5 regulates ribosomal RNA gene transcription. *J. Cell. Biochem.* *109*, 553–563.
- Matsuda, T., Zhai, P., Maejima, Y., Hong, C., Gao, S., Tian, B., Goto, K., Takagi, H., Tamamori-Adachi, M., Kitajima, S., et al. (2008). Distinct roles of GSK-3 α and GSK-3 β phosphorylation in the heart under pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 20900–20905.
- McClellan, A.J., Xia, Y., Deutschbauer, A.M., Davis, R.W., Gerstein, M., and Frydman, J. (2007). Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* *131*, 121–135.
- McMullen, J.R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M.C., Kang, P.M., and Izumo, S. (2003). Phosphoinositide 3-kinase(p110 α) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 12355–12360.
- Michael, A., Haq, S., Chen, X., Hsich, E., Cui, L., Walters, B., Shao, Z., Bhattacharya, K., Kilter, H., Huggins, G., et al. (2004). Glycogen Synthase Kinase-3 β Regulates Growth, Calcium Homeostasis, and Diastolic Function in the Heart. *J. Biol. Chem.* *279*, 21383–21393.

- Mochizuki, H., Schwartz, J.P., Tanaka, K., Brady, R.O., and Reiser, J. (1998). High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J. Virol.* *72*, 8873–8883.
- Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R., and Olson, E.N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* *93*, 215–228.
- Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y., and Fujita, S.C. (2002). Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J. Neurochem.* *81*, 1073–1083.
- Naguib, M. (2009). Protein-Protein-Interaktion des kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins, CARP, mit dem zytoplasmatischen β -Aktin. Doktorarbeit, Institut für Herz-und Kreislaufphysiologie.
- Nakamura, F., Stossel, T.P., and Hartwig, J.H. (2011). The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adh Migr* *5*, 160–169.
- Neal, J.W., and Clipstone, N.A. (2001). Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibits the DNA Binding Activity of NFATc. *J. Biol. Chem.* *276*, 3666–3673.
- Nishioka, K., and Reinberg, D. (2003). Methods and tips for the purification of human histone methyltransferases. *Methods* *31*, 49–58.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* *108*, 193–199.
- O'Brien, W.T., Huang, J., Buccafusca, R., Garskof, J., Valvezan, A.J., Berry, G.T., and Klein, P.S. (2011). Glycogen synthase kinase-3 is essential for β -arrestin-2 complex formation and lithium-sensitive behaviors in mice. *J. Clin. Invest* *121*, 3756–3762.
- Ohori, K., Miura, T., Tanno, M., Miki, T., Sato, T., Ishikawa, S., Horio, Y., and Shimamoto, K. (2008). Ser9 phosphorylation of mitochondrial GSK-3beta is a primary mechanism of cardiomyocyte protection by erythropoietin against oxidant-induced apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *295*, H2079–2086.
- Owen, R., and Gordon-Weeks, P.R. (2003). Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta in sensory neurons in culture alters filopodia dynamics and microtubule distribution in growth cones. *Mol. Cell. Neurosci.* *23*, 626–637.
- Park, B.-C., Kido, Y., and Accili, D. (1999). Differential Signaling of Insulin and IGF-1 Receptors to Glycogen Synthesis in Murine Hepatocytes †. *Biochemistry* *38*, 7517–7523.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (1999). Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J. Virol.* *73*, 2613–2621.
- Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkelä, R., and Ruskoaho, H. (2004). GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc. Res.* *63*, 196–207.
- Pratt, W.B. (1998). The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *217*, 420–434.
- Pritchard, K.A., Ackerman, A.W., Gross, E.R., Stepp, D.W., Shi, Y., Fontana, J.T., Baker, J.E., and Sessa, W.C. (2001). Heat Shock Protein 90 Mediates the Balance of Nitric Oxide and Superoxide Anion from Endothelial Nitric-oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* *276*, 17621–17624.
- Reinton, N., Collas, P., Haugen, T.B., Skålhegg, B.S., Hansson, V., Jahnsen, T., and Taskén, K. (2000). Localization of a Novel Human A-Kinase-Anchoring Protein, hAKAP220, during Spermatogenesis. *Developmental Biology* *223*, 194–204.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* *17*, 1030–1032.

- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272, 1023–1026.
- Ruel, L., Bourouis, M., Heitzler, P., Pantesco, V., and Simpson, P. (1993). Drosophila shaggy kinase and rat glycogen synthase kinase-3 have conserved activities and act downstream of Notch. *Nature* 362, 557–560.
- Saito, Y., Vandenhede, J.R., and Cohen, P. (1994). The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. *Biochem. J.* 303 (Pt 1), 27–31.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (CSHL Press).
- Sato, S., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10832–10837.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J.R. (2000). Multiple Ras-Dependent Phosphorylation Pathways Regulate Myc Protein Stability. *Genes Dev.* 14, 2501–2514.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.-G., et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods* 3, 995–1000.
- Sun, H., Jiang, Y., Yu, Q., Luo, C., and Zou, J. (2011). The effect of Li⁺ on GSK-3 inhibition: molecular dynamics simulation. *J Mol Model* 17, 377–381.
- Sutherland, C., Leighton, I.A., and Cohen, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* 296 (Pt 1), 15–19.
- Takahashi, S., and Mendelsohn, M.E. (2003). Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J. Biol. Chem.* 278, 30821–30827.
- Tanji, C., Yamamoto, H., Yorioka, N., Kohno, N., Kikuchi, K., and Kikuchi, A. (2002). A-kinase anchoring protein AKAP220 binds to glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) and mediates protein kinase A-dependent inhibition of GSK-3beta. *J. Biol. Chem* 277, 36955–36961.
- Tao, Y.J., and Zheng, W. (2011). Chaperones and the maturation of steroid hormone receptor complexes. *Oncotarget* 2, 104–106.
- Tee, W.-W., Pardo, M., Theunissen, T.W., Yu, L., Choudhary, J.S., Hajkova, P., and Surani, M.A. (2010). Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency. *Genes Dev.* 24, 2772–2777.
- Thomas, G.M., Frame, S., Goedert, M., Nathke, I., Polakis, P., and Cohen, P. (1999). A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin. *FEBS Lett.* 458, 247–251.
- Trivedi, N., Marsh, P., Goold, R.G., Wood-Kaczmar, A., and Gordon-Weeks, P.R. (2005). Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *J. Cell. Sci.* 118, 993–1005.
- Tulchin, N., Ornstein, L., and Davis, B.J. (1976). A microgel system for disc electrophoresis. *Anal. Biochem.* 72, 485–490.

- Twomey, C., and McCarthy, J.V. (2006). Presenilin-1 is an unprimed glycogen synthase kinase-3beta substrate. *FEBS Lett.* 580, 4015–4020.
- Wang, Q.M., Fiol, C.J., DePaoli-Roach, A.A., and Roach, P.J. (1994). Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269, 14566–14574.
- Webb, I.G., Nishino, Y., Clark, J.E., Murdoch, C., Walker, S.J., Makowski, M.R., Botnar, R.M., Redwood, S.R., Shah, A.M., and Marber, M.S. (2010). Constitutive glycogen synthase kinase-3alpha/beta activity protects against chronic beta-adrenergic remodelling of the heart. *Cardiovasc. Res.* 87, 494–503.
- Wettschureck, N., Rütten, H., Zywiets, A., Gehring, D., Wilkie, T.M., Chen, J., Chien, K.R., and Offermanns, S. (2001). Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes. *Nat. Med.* 7, 1236–1240.
- Witters, L.A., and Kemp, B.E. (1992). Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 2864–2867.
- Woodgett, J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431–2438.
- Woulfe, K.C., Gao, E., Lal, H., Harris, D., Fan, Q., Vagnozzi, R., DeCaul, M., Shang, X., Patel, S., Woodgett, J.R., et al. (2010). Glycogen synthase kinase-3beta regulates post-myocardial infarction remodeling and stress-induced cardiomyocyte proliferation in vivo. *Circ. Res.* 106, 1635–1645.
- Xiao, G., Mao, S., Baumgarten, G., Serrano, J., Jordan, M.C., Roos, K.P., Fishbein, M.C., and MacLellan, W.R. (2001). Inducible activation of c-Myc in adult myocardium in vivo provokes cardiac myocyte hypertrophy and reactivation of DNA synthesis. *Circ. Res.* 89, 1122–1129.
- Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S., and Kikuchi, A. (1999). Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J. Biol. Chem.* 274, 10681–10684.
- Yao, H.-B., Shaw, P.-C., Wong, C.-C., and Wan, D.C.-C. (2002). Expression of glycogen synthase kinase-3 isoforms in mouse tissues and their transcription in the brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 23, 291–297.
- Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., and He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt coreceptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873–877.
- Zhang, F., Phiel, C.J., Spece, L., Gurvich, N., and Klein, P.S. (2003). Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J. Biol. Chem.* 278, 33067–33077.
- Zhao, J., Hoye, E., Boylan, S., Walsh, D.A., and Trehwella, J. (1998). Quaternary structures of a catalytic subunit-regulatory subunit dimeric complex and the holoenzyme of the cAMP-dependent protein kinase by neutron contrast variation. *J. Biol. Chem.* 273, 30448–30459.
- Zhou, A.-X., Hartwig, J.H., and Akyürek, L.M. (2010). Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol.* 20, 113–123.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
aE	arbiträre Einheiten
ACC1	Acetyl Co A Carboxylase 1
AKAP	<i>A-Kinase Anchor-Proteins</i>
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli Protein</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BGH	pA Polyadenylierungssingnal des <i>bovine growth hormone</i>
bla	β -Lactamase Promotors
bp	Basenpaare
8-Br-cAMP	8 Brom cAMP (cAMP Analog)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Serumalbumin vom Rind
bzw.	beziehungsweise
env	<i>envelope</i> (Hüllprotein)
c	centi-
CAGGS	CAG-Promotor, besteht aus Cytomegalovirus-Enhancer, dem Hühner β -Aktin Promotor und dem Kaninchen β -Globin poly-A Signal
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cat α	katalytische PKA UE alpha
cDNA	<i>complementary</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDK	Zyklin-abhängige Proteinkinase
CK	Casein Kinase
CLK	CDK-ähnliche Proteinkinase
CMGC	Proteinfamilie, verwandt mit CDK, MAPK, GSK und CLK
CMV	Cytomegalovirus
Da	Dalton
dH ₂ O	doppeltdeionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
env	<i>envelope</i> , Hüllprotein
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Rinderserum
FLNA	Filamin A
g	Gramm
gag	Polyprotein
GS	Glykogen Synthase
GSK	Glykogensynthase Kinase
GSKIP	GSK3 β interagierendes Protein
GPRC	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	<i>hour</i> , Stunde

HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HL-1	<i>heart like Zelllinie</i>
HSP	Hitzeschockprotein
H89	Dihydrochlorid (PKA-Inhibitor)
Ins	Insulin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>
k	kilo-
KI	Kinase inaktive GSK3 β -Mutante
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LiCl	Lithiumchlorid
LTR	<i>long terminal repeats</i>
Ly	LY294001 (PI3-Kinase-Inhibitor)
μ	mikro-
m	milli-, Meter
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase
MHC	<i>myosin heavy chain</i> , schwere Kette des Myosin
min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
<i>m/z</i>	Masse/Ladung
n	nano-
OD	optische Dichte
p70S6K	70 kDa ribosomale Proteinkinase S6 1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS (PBST)	<i>Phosphate bufferd saline</i> (mit 0,1 % Tween)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
PGK	Phosphoglyceratkinase
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PP	Protein Phosphatase
PLA	Proximity Ligation Assay
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PRMT5	Protein Arginine N-Methyltransferase 5
RI α	regulatorische PKA UE Typ I alpha
REV	<i>regulator of virion expression</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RRE	REV-responsive Element
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperratur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
SFFV	<i>spleen focus-forming virus</i> (Promotor)
SP	StrepTactin-Präzipitation

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	Tandem-Affinitätsaufreinigung
TBS (TBST)	<i>Tris buffered saline</i> (mit 0,1 % Tween)
TE-Puffer	Tris EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
SV40	Simian Virus 40
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
Zeo	Zeocin
ZK	Zellkern

9 Anhang

9.1 Massenspektrometrische Analyse am Beispiel der regulatorischen PKA Untereinheit Typ I α

In der Abb. 9.1-9.4 sind die Analysen und Auswertungen dargestellt, die nach der massenspektrometrischen Analyse erfolgten. Als Beispiel wurde die regulatorische PKA Untereinheit (UE) Typ I α (RI α) von einer TAP/MS-Analyse der stabilen GSK3 β -TAP HEK293T Zellen (vgl. Tabelle 3.2 TAP 2) herangezogen. In Abb. 9.5 ist ein Aminosäure-Sequenzvergleich der humanen RI α gegen die drei weiteren humanen regulatorischen PKA Untereinheiten (Typ I β , Typ II α , Typ II β) dargestellt.

Scan(s)	Peptide	Reference		Peptide (Hits)	
		Reference	Reference	Ions	Count
sp P10644 KAP0_HUMAN cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit OS=Homo sapiens GN=PRKAR1A				19 (19 0 0 0)	
3912	R.RSENEEFVEVGR.L			27/44	2
3947	K.HNIQALLK.D			13/14	6
4293	R.TDSREDEIS#PPPPNPVVK.G			43/102	5
4323	R.SENEEFVEVGR.L			17/20	2
4340	R.TDSREDEIS#PPPPNPVVK.G			43/102	5
4426	R.EDEISPPPPNPVVK.G			18/26	4
4535	K.DSIVQLC@TAR.P			16/18	6
4636	R.EDEIS#PPPPNPVVK.G			20/39	5
4665	K.NVLFSHLDDNER.S			18/22	3
4794	R.VLGPC@SDILK.R			13/18	2
5187	R.GAISAEVYTEEDAASYVR.K			24/34	3
5240	R.GAISAEVYTEEDAASYVR.K			22/34	3
5257	K.VSILES LDK.W			15/16	2
5676	R.LTVADALEPVQFEDGQK.I			23/32	2
5784	K.VSILES LDKWER.L			22/44	2
6124	R.NIQQYNSFVSLSV.-			16/24	2
7309	K.IVVQGEPEGDEFFIILEGSAAVLQR.R			30/92	2
7338	K.IVVQGEPEGDEFFIILEGSAAVLQR.R			37/92	2
7369	K.IVVQGEPEGDEFFIILEGSAAVLQR.R			35/92	2

Abb. 9.1: Identifizierte Peptide (19) für die regulatorische PKA Untereinheit Typ I α . Zu den einzelnen gefundenen Peptiden ist jeweils die identifizierte Ionenanzahl (Y- und B-Ionenserie) zur erwarteten Ionenanzahl angegeben. Des Weiteren ist für das jeweilige Peptid die Anzahl an zusätzlichen, möglichen Kandidaten (*Count*) in der Datenbank aufgeführt. Mit einem schwarzen Kasten ist das Peptid markiert, für das exemplarisch die möglichen Kandidaten in Abb. 9.3 und die MS/MS-Spektren in Abb. 9.4 dargestellt sind.

1	MESGSTAASEEARSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKE	60
61	EAKQIQNLQKAGTRTDSREDEISPPPPNPVVKGRRRRGAISAEVYTEEDAASYVRKVIK	120
121	DYKTMAALAKAIEKNVLFSHLDDNERSDIFDAMFVSF IAGETVIQQGDEGDNFYVIDQG	180
181	ETDVYVNNNEWATSVGEGGSFGELALIYGTTPRAATVKAKTNVKLWIDRDSYRRILMGSTL	240
241	RKRKMYEEFLSKVSILES LDKWERLTVADALEPVQFEDGQKIVVQGEPEGDEFFIILEGSA	300
301	AVLQRSENEEFVEVGR LGPSDYFGEIALLMNRPRAA TVVARGPLKCVKLD RPRFERVLG	360
361	PCSDILKRNIQQYNSFVSLSV	381

Abb. 9.2: Abdeckung der Aminosäuresequenz für die regulatorische PKA Untereinheit Typ I α . Die grauunterlegten Sequenzabschnitte stellen die identifizierten Peptide aus Abb. 9.1 dar. Die PKA Typ I α regulatorische Untereinheit wurde mit einer 40 %-igen Aminosäuresequenzabdeckung identifiziert.

Reference	Mass	Position
sp P10644 KAP0_HUMAN cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit OS=Homo sapiens	42936.96	252 - 261
tr B2R5T5 B2R5T5_HUMAN Putative uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=PRKAR1A PE=2 SV=1	42936.96	252 - 261
tr Q68DQ4 Q68DQ4_HUMAN Putative uncharacterized protein DKFZp779L0468 OS=Homo sapiens GN=DKFZp77	42902.97	252 - 261

Abb. 9.3: Kandidaten-Proteine, die das identifizierte Peptid K.VSILELSDK.W enthalten.

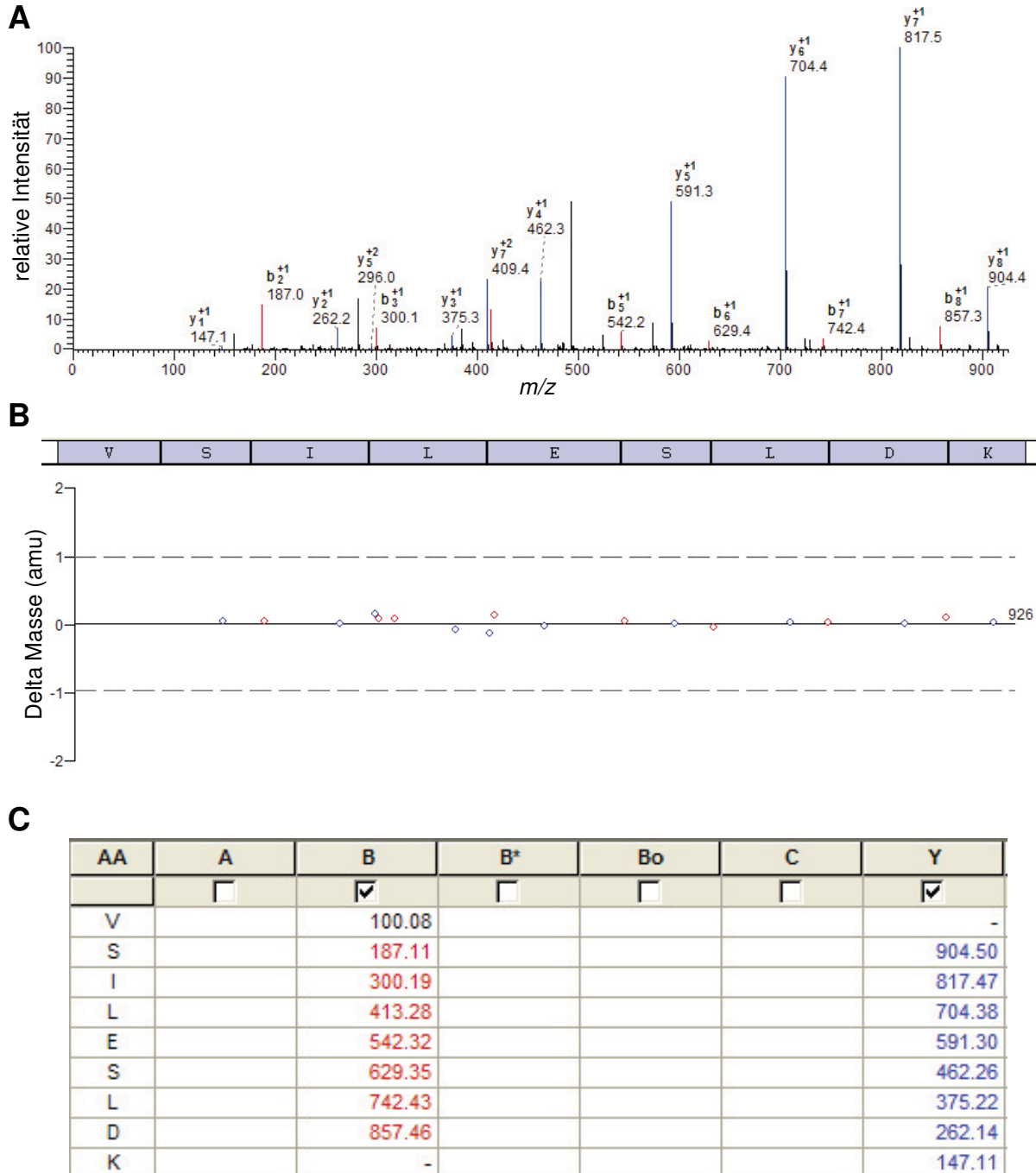


Abb. 9.4: Ionen und MS/MS-Spektrum für K.VSILELSDK.W. In A ist das Fragmentspektrum (MS/MS-Spektrum) des VSILELSDK-Mutterions mit den identifizierten B- (rot) und Y-Ionen (blau) abgebildet. B zeigt die dazugehörige Delta Masse für jedes gefundene Ion. Die Delta Masse gibt die Abweichung von dem zu erwartenden Molekulargewicht der Ionen an. In C sind noch mal alle identifizierten B- und Y-Ionen in Da aufgelistet. In diesem Beispiel wurden fast alle B-Ionen (außer 100.08) bzw. alle Y-Ionen detektiert. amu: atomic mass unit, m/z: Masse/Ladung.

Anhang

RII α	-MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLR---EARAPASVLPAAATPR	56
RII β	-MS-IEIPAGLTELLQGFVTEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENERKGTARFGHEGRTW	58
RI α	MESGSTAASEEARSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTAR----PERPMAFLREYFER	56
RI β	MASPPACPSEEDES�KGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCISK----PERPMKFLREHFEEK	56
	* * *	
RII α	QSLGHPPPEPGPDR---VADAKGDSESEDED-----LEVPVPSRFNRRVSVCAE	103
RII β	GDLGAAAGGGTPSKGVNFAEEPQSDSEDEGEEEAAPADAGAFNAPVINRFTRRASVCAE	118
RI α	LEKEEAKQIQNLQK----AGTRTDSREDEISP-----PPPNPVVKGRRRRGSAISAE	103
RI β	LEKEENRQILARQK----SNSQSDSHDEEVSP-----TPPNPVVKARRRRGGVSAE	103
	* ** ** *	
RII α	TYNPDEEEEDTDPRIHPKTDQRCRLQEACKDILLFKNLDQEQLSQVLDAMFERIVKAD	163
RII β	AYNPDEEEEDDAESRIHPKTDQNRNLQEACKDILLFKNLDPEQMSQVLDAMFEKLVKDG	178
RI α	VYT--EEDAASYVRKVIKPKDYKTMALAKAIEKNVLFSHLDDNERSDIFDAMFVSFVIAI	161
RI β	VYT--EEDAVSYVRKVIKPKDYKMTALAKAISKNVLF AHLDDNERSDIFDAMFPVTHIAG	161
	* ** * ** * * * * *	
RII α	EHVIDQGGDDGNFYVIERGTYDILVTKDNQTRSVGQYDNRGSFGELALMYNTPRAATIVA	223
RII β	EHVIDQGGDDGNFYVIDRGTFDIYVKCDGVGRCVGNVDNRGSFGELALMYNTPRAATITA	238
RI α	ETVIQQGDEGDNFYVIDQGETDVYVN----NEWATSVGEGGSFGELALIYGTTPRAATVKA	217
RI β	ETVIQQGNEGDNFYVVDQGEVDVYVN----GEWVTNISEGGSFGELALIYGTTPRAATVKA	217
	* * * * * * * * * * * * * *	
RII α	TSEGLWGLDRVTFRRIIVKNNAKKRKMFESFIESVPLLSLEVSERMKIVDVIGEKIYK	283
RII β	TSPGALWGLDRVTFRRIIVKNNAKKRKMYESFIESLPFLKSLEFSERLKVVDVIGTKVYN	298
RI α	KTNVKLWGLDRDSYRRILMGSTLKRKMYEEFLSKVSIKESLKDWERLTVADALEPVQFE	277
RI β	KTDLKLWGLDRDSYRRILMGSTLKRKMYEEFLSKVSIKESLEKWERLTVADALEPVQFE	277
	* * * * * * * * * * * * * *	
RII α	DGERIITQGEKADSFYIIESGEVSIILRSRTKSNKDGNGQVEIARCHKGQYFGELALVT	343
RII β	DGEQIIAQGDSADSFFIVESGEVKITMKRKGKSEVEE-NGAVEIARCSRGQYFGELALVT	357
RI α	DGQKIVVQGEPEGDEFFIILEGSAAVLQK---RSENEE---FVEVGR LGPSDYFGEIALLM	331
RI β	DGEKIVVQGEPEGDDFYIITEGTASVLQK---RSPNEE---YVEVGR LGPSDYFGEIALLL	331
	* * * * * * * * * * * * * *	
RII α	NKPRAASAYAVGDVKCLVMDVQAFERLLGPCMDIMKRNI SHYEEQLVKMFGSSVDLGNLG	403
RII β	NKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALFGTNMDIVEPT	417
RI α	NRPRAATVVARGPLKCVKLD RPRFERVLGPCSDILKRNIQQYNSFVSLSV-----	381
RI β	NRPRAATVVARGPLKCVKLD RPRFERVLGPCSEILKRNIQRYSNFISLTV-----	381
	* * * * * * * * * * * * * *	
RII α	Q 404	
RII β	A 418	
RI α	-	
RI β	-	

Abb. 9.5: Aminosäuren-Sequenzvergleich von allen vier humanen Isoformen der regulatorischen PKA Untereinheit. Mit Grau unterlegt sind die identifizierten Peptide aus der vorangegangenen Analyse (vgl. Abb. 9.1). Dieser Vergleich belegt die eindeutige Zuordnung der Peptide zur regulatorischen PKA Untereinheit Typ I α . Verwendete Software: ClustalW <http://www.ebi.ac.uk>, * Aminosäurenübereinstimmung, RII α : PKA regulatorische UE Typ II α , RII β : PKA regulatorische UE Typ II β , RI α : PKA regulatorische UE Typ I α , RI β : PKA regulatorische UE Typ I β .

10 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat an dem spannenden Protein GSK3 β zu arbeiten. Danke Axel, dass ich immer mit meinen Fragen zu dir kommen konnte und du mich stets durch zahlreiche interessante Diskussionen bei der Bearbeitung meines Themas sehr unterstützt hast.

Herrn Prof. Dr. Thomas Klein möchte ich für die Begutachtung und die Teilnahme an meiner Promotionsprüfung danken.

Jetzt möchte ich mich für die super tolle Arbeitsgruppe des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie bedanken. Ihr habt mich besonders in der letzten langen Phase meiner Doktorarbeit sehr unterstützt. Ein großer Dank gilt den besten MTAs Susanne Küster, Barbara Emde und Barbara Patzer. Für zahlreiche theoretische und praktische Hilfen möchte ich mich auch bei Dr. Michael Reinartz, Dr. Torben Söker (der mich auch im Büro ertragen durfte), Dr. Stefanie Gödecke und Dr. Sarah Möllendorf bedanken. Auch möchte ich mich bei Petra Lügert bedanken, die sich meiner Rechtschreibung angenommen hat.

Darüber hinaus habe ich mit einigen Kollegen gute Freundschaften geschlossen, die sich mein Gejammer auch in unserer gemeinsam verbrachten Freizeit anhören durften☺. Ein besonderer Dank geht an:

Katharina Bottermann, die mir als fast Nachbarin, zu zahlreichen schönen und auch sportlichen, aktiven Abenden verholfen hat.

Dr. Annika Raupach, mit der ich meine aufregendste Kongressreise (Kalifornien) erlebt habe und die mir nicht nur bei zahlreichen Hilfestellungen zum Schreiben zur Seite stand, sondern mir auch geholfen hat, auf dem richtigen Weg zu bleiben (sie hat den Dr. ja schon).

Julia Albrecht, mit ihr durfte ich nicht nur meine kreative Ader ausleben.

Nina Blasberg, mit der ich ein gemeinsames Schicksal, das Leben einer Doktorandin, teilte.

Ich möchte mich auch bei der AG Krüger, als Neuzuwachs des Institutes, und bei der AG Schrader für die gute Zusammenarbeit und dem regen Austausch beim Grillen bedanken.

Meiner Familie, insbesondere meinem Vater, möchte ich für die Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit danken. Aber auch für die aufbauenden Worte: „Du schaffst das schon!“

Bei dir, Benedict Lampert, möchte ich mich auch bedanken, dafür dass du immer für mich da warst und auch noch nach dieser anstrengenden Zeit bist.

Nicht zu vergessen sind meine Freunde Nicole Stracke, Dana Reinert, Theresa Polkamp und natürlich die Bio-Mädels (aus ehemals MS), die mir geholfen haben ein Leben neben der Doktorarbeit zu führen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Düsseldorf, den

Unterschrift