

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Axel Gödecke

**Identifizierung von α -Enolase und
Elongationsfaktor 2 als neue AKT2-
Bindungspartner**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Katharina Bottermann
(2013)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr rer.nat. Axel Gödecke

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer.nat. Wilhelm Stahl

Für meinen Großvater

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikationen:

Bottermann, K., Reinartz, M., Barsoum, M., Kötter, S., and Gödecke, A. (2013).
Systematic Analysis Reveals Elongation Factor 2 and α -Enolase as Novel Interaction Partners of AKT2. PLoS ONE 8, e66045.

Tagungsabstracts:

Identification of Protein Interactions of AKT2 via TAP and mass spectrometry.

Katharina Bottermann, Marian Naguib, Michael Reinartz, Anna-Maria Simon, Axel Gödecke

Vortrag

88. Jahrestreffen der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Gießen 2009

AKT-dependent signalling involves low affinity protein interactions.

Katharina Bottermann, Michael Reinartz, Sabine Hamer, Nina Blasberg, Andreas Hiester, Axel Gödecke

Poster

91. Jahrestreffen der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Dresden 2012

Elongation Factor 2 and Enolase 1 are new AKT2-interacting proteins.

Katharina Bottermann, Michael Reinartz, Sebastian Kötter, Axel Gödecke

Poster

92. Jahrestreffen der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Heidelberg 2013

AKT2-signaling involves transient protein interactions.

Katharina Bottermann, Michael Reinartz, Axel Gödecke

Poster

Experimental Biology, Boston 2013

Zusammenfassung

Die Proteinkinase AKT reguliert eine Vielzahl von zellulären Enzymen, Proteinen und Kinasen im Bereich von Zellwachstum, Apoptose und Zellüberleben sowie Zellmetabolismus. Dabei erfüllen die drei Isoformen von AKT, AKT1, AKT2 und AKT3, trotz einer hohen Sequenzhomologie sehr spezifische Aufgaben. Zur Identifizierung neuer Funktionen der AKT2-Isoform wurden in dieser Arbeit die Protein-Proteininteraktionen von AKT2 mittels Tandem Affinitätsaufreinigung (TAP) und quantitativer Massenspektrometrie systematisch analysiert.

AKT2 wurde sowohl am C- als auch am N-terminalen Ende mit einem 8 kDa großen Triple-Tag aus HA, Flag und StrepII-Tag versehen und stabil über lentivirale Infektion in HEK293T-Zellen exprimiert. Aus diesen Zellen wurde AKT2 mit seinen assoziierten Proteinen unter nativen Bedingungen in zwei Schritten aufgereinigt. Als koeluierte Proteine wurden HSP90, Cdc 37, HSP70, GRP78, Tubulin, GAPDH, α -Enolase und Elongationsfaktor 2 gefunden. Quantitative Massenspektrometrie mit stabil isotopisch markierten Zellen (SILAC) zeigte, dass AKT2 nur mit HSP90 und Cdc 37 in einem stabilen Komplex vorlag. Mit den anderen Interaktionspartnern wie GRP78 oder Tubulin war AKT2 hingegen nur lose assoziiert. Die bei der TAP entdeckten möglichen Interaktionspartner GAPDH, α -Enolase und Elongationsfaktor 2 konnten mittels der in situ-Methode *Proximity Ligation Assay* als AKT2-Interaktionspartner verifiziert werden. Weitere funktionelle Analysen der Interaktion von AKT2 und α -Enolase zeigten, dass AKT keinen Einfluss auf die Kinasefunktion von α -Enolase hat. Die Untersuchung der AKT2/EF2-Interaktion in Rattenkardiomyozyten zeigte, dass die AKT2/EF2-Interaktion bei Hemmung des PI3-Kinasesignalwegs verstärkt wurde und bei Stimulation von AKT mit Angiotensin II, IGF-1 bzw. Insulin zerfällt. Dieser neu entdeckte Zusammenhang deutet darauf hin, dass AKT2 EF2 direkt regulieren könnte. Neben der beschriebenen indirekten Aktivierung von EF2 durch AKT könnte dies ein neuer, direkter Regulationsmechanismus sein, über den AKT2 die Translation kontrolliert.

Abkürzungsverzeichnis

Å	- Ångström
AKT2NTag	- N-terminal getaggttes AKT2
AKT2CTag	- C-terminal getaggttes AKT2
AS	- Aminosäure
bzw.	- beziehungsweise
ca.	- circa
cDNA	- komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d	- Tag
E.coli	- Escherichia coli
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure
GTP	- Guanidintriphosphat
h	- Stunde
HA	- Hämagglutinin
kDa	- Kilo Dalton
µg	- µgramm
min	- Minute
ml	- Milliliter
mTor	- <i>mammalian target of rapamycin</i>
MS	- Massenspektrometrie
NADH	- Nicotinamidadeninukleotidhydrid
TAP	- <i>Tandem Affinity Purification</i>
TBS/T	- <i>Tris buffered saline/Tween</i>
Tg	- <i>transgen</i>
pg	- picogramm
PLA	- <i>proximity ligation assay</i>
SILAC	- <i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
siRNA	- <i>small interfering RNA</i>
SDS-PAGE	- Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
WBA	- Western Blot Analyse
WT	- Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	AKT – Proteinkinase B	2
1.1.1	Struktur und Regulation.....	2
1.1.2	Funktionen in der Zelle.....	5
1.1.3	Isoformen von AKT.....	7
1.2	Proteininteraktionen	9
1.3	Fragestellung.....	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Geräte.....	12
2.2	Antikörper.....	13
2.2.1	Primäre Antikörper	13
2.2.2	Sekundäre Antikörper	13
2.3	Chemikalien	14
2.4	Enzyme und Hormone	14
2.5	Kits.....	14
2.6	Gele	15
2.7	Größenstandard.....	15
2.8	Puffer	15
2.9	Oligonukleotide.....	16
2.10	Vektoren.....	16
2.11	Zell- und Bakterienkultur.....	18
2.11.1	Medien	18
2.11.2	Kultivierung von HEK293T-Zellen	18
2.11.3	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293T-Zellen	19
2.11.4	Lentivirale Infektion	19
2.11.5	Präparation und Kultivierung embryonaler (E18) Rattenkardiomyozyten	20
2.12	Arbeit mit DNA	20
2.12.1	Extraktion und Fällung	20
2.12.2	Restriktionsendonukleasenanalyse.....	21
2.12.3	Auffüllung von überhängenden Enden, Dephosphorylierung.....	21

2.12.4	Ligation.....	21
2.12.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	21
2.12.6	Elektrophoretische Auftrennung der DNA und Isolation aus dem Agarosegel	22
2.12.7	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	22
2.12.8	Transformation und Kultivierung kompetenter E.coli-Zellen.....	22
2.12.9	Präparation von DNA aus E.coli-Zellen	23
2.12.10	Sequenzierung.....	23
2.13	Arbeit mit Proteinen	23
2.13.1	Proteinisolierung aus kultivierten Zellen	23
2.13.2	Bestimmung des Proteingehalts von Zellextrakten.....	23
2.13.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-PAGE	
	(Polyacrylamidgelelektrophorese)	24
2.13.4	Western Blot Analyse und Immunodetektion	24
2.14	Stimulation und Inhibition des AKT-Signalwegs.....	24
2.15	Tandem Affinitätsaufreinigung - TAP	25
2.16	Aufarbeitung von Proteinen zur massenspektrometrischen Analyse.....	26
2.16.1	Gelfärbungen	26
2.16.2	In-Gel-Verdau mit Trypsin	26
2.16.3	In-Lösungs-Verdau mit Trypsin	27
2.16.4	Entsalzung.....	28
2.17	Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie	28
2.18	SILAC – <i>stable isotope labeling in cell culture</i>.....	29
2.19	<i>Proximity Ligation Assay</i>	30
2.20	α-Enolase-Aktivitätsassay.....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Transiente Expression von AKT2Tag	32
3.1.1	AKT2CTag-Expressionsvektor	33
3.1.2	AKT2NTag-Expressionsvektor	33
3.1.3	Nachweis der transienten Expression durch Western Blot Analyse	35
3.1.4	Funktionale Untersuchung der rekombinanten Proteine bei transienter Expression	36
3.2	Transiente Überexpression von AKT2 ohne Tag	37
3.3	Stabile Expression von AKT2Tag.....	38
3.3.1	Puromycin-Resistenz AKT2CTag	38
3.3.2	Puromycin-Resistenz AKT2NTag.....	39

3.3.3	Nachweis der stabilen Expression der rekombinanten Proteine mittels Western Blot Analyse	40
3.3.4	Funktionale Untersuchung der rekombinanten Proteine bei stabiler Expression.....	41
3.4	Suche nach AKT2-Bindungspartnern mittels Tandem Affinitätsaufreinigung	43
3.4.1	Vergleich von AKT2CTag und AKT2NTag bei der Tandem Affinitätsaufreinigung.....	44
3.4.2	Identifizierung von AKT2NTag-Bindungspartnern	45
3.4.3	Vergleich der interagierenden Proteine bei unterschiedlicher Aktivität von AKT2	47
3.4.4	Untersuchung der unspezifischen Bindungen mittels SILAC	51
3.5	Verifizierung von AKT2-Bindungspartnern mittels <i>Proximity Ligation Assay</i>	54
3.6	Einfluss von AKT-Stimulation auf die EF2/AKT2-Interaktion in E18 Rattenkardiomyozyten.....	57
3.7	Messung der α-Enolase-Aktivität in Abhängigkeit der AKT-Aktivität	58
4	Diskussion	61
4.1	Proteininteraktionspartner von AKT2.....	62
4.1.1	Chaperone.....	62
4.1.2	Weitere AKT2-Bindungspartner	64
4.2	Methodische Analyse von Proteininteraktionen mittels Tandem Affinitätsaufreinigung.....	67
4.3	Schlussfolgerung	70
5	Literaturverzeichnis	71
6	Danksagung	79

1 Einleitung

Die Zellen eines vielzelligen Organismus müssen in der Lage sein, sich den ständig wechselnden Bedingungen in ihrer Umgebung anzupassen. Um auf Änderungen adäquat reagieren zu können, ist es essentiell, dass sie miteinander kommunizieren. Dazu stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Zum Beispiel können Zellen in Zellverbänden über Synapsen, Nexus oder durch parakrine Sekretion verbunden sein. Zum anderen können aber auch anatomisch weit voneinander entfernte Zellen über endokrine Sekretion miteinander in Verbindung stehen. In allen Fällen werden zur Signalübermittlung extrazelluläre Signalmoleküle wie Hormone, Zytokine oder Transmitter genutzt. Diese werden z.B. von den endokrinen Drüsen wie Pankreas, Schilddrüse oder Hypophyse, aber auch von Nerven- oder Blutzellen sezerniert. Auf diesem Weg wird die koordinierte Steuerung von Stoffwechselprozessen und somit die Körperhomöostase sichergestellt.

Die Wirkung der Signalmoleküle wird durch Rezeptoren vermittelt, die entweder an der Zelloberfläche in der Plasmamembran verankert sind, oder im Zytoplasma der Zelle liegen. Intrazelluläre Rezeptoren sind oft Transkriptionsfaktoren, die durch ihre lipophilen Liganden aktiviert werden und dann auf DNA-Ebene wirksam werden. Unter den Rezeptoren, die in der Zellmembran liegen, finden sich z.B. ligandenaktivierte Ionenkanäle, heptahelikale Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen bzw. Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen. Bei diesen Membranrezeptoren entfaltet sich die Wirkung der Liganden zunächst auf der Proteinebene. Durch Bindung des Liganden an den Rezeptor wird eine Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt, wobei sekundäre Botenstoffe wie Calcium (Ca^{2+}), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositol-3-Phosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) eine große Rolle spielen. Diese sekundären Botenstoffe wirken als biologische Verstärker, das heißt, ein Hormonmolekül setzt viele sekundäre Botenstoffe frei, welche wiederum viele Proteine in ihrer Aktivität modifizieren. Zu den am häufigsten modifizierten Proteinen zählen Proteinkinasen, denn die Phosphorylierung von Proteinen ist eine einfache und schnelle Möglichkeit das extrazelluläre Signal in der Zelle in veränderte Stoffwechselprozesse umzusetzen.

Eine grobe Einteilung von Proteinkinasen erfolgt in Serin/Threonin-Kinasen oder Tyrosin-Kinasen, je nachdem, ob die Kinase die Hydroxylgruppe in der Seitenkette der Aminosäuren Serin, Threonin oder am aromatischen Ring der Aminosäure Tyrosin phosphoryliert (Krebs and Beavo, 1979). Zur Phosphorylierung nutzen die Kinasen die

Energie aus der Hydrolyse des γ -Phosphats von ATP (Adenosintriphosphat) bzw. GTP (Guanosintriphosphat).

Proteinkinasen lassen sich nach struktureller und funktioneller Ähnlichkeit weiter in Untergruppen einteilen. Unter den Serin/Threonin-Kinasen finden sich z.B. die CaMK (*Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase*)- und die CMGC-Familie (*Cyclin-dependent kinase*, *MAP-Kinase*, *Glycogen synthase kinase 3*, *Cdc-like kinase*) sowie die AGC-Familie (*PKA*, *PKG*, *PKC*), zu welcher AKT/PKB (Proteinkinase B) gehört (Hanks and Hunter, 1995).

1.1 AKT – Proteinkinase B

1.1.1 Struktur und Regulation

AKT ist eine Serin/Threonin-Kinase aus der Gruppe der AGC-Kinasen, welche bevorzugt an Serin/Threonin-Stellen in der Nähe der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin phosphorylieren (Hanks and Hunter, 1995).

AKT hat ein Molekulargewicht von 57 kDa und umfasst 480 Aminosäuren. In Säugern finden sich drei Isoformen von AKT, AKT 1-3. Das Protein besteht aus drei Domänen: der N-terminalen *pleckstrin-homology*-(PH-)Domäne (AS 5-108), einer katalytischen Domäne (259 AS (AKT1) bzw. 258 AS (AKT2)) sowie der C-terminal gelegenen regulatorischen Domäne (AS 410-481/AKT1, 409-480/AKT2) (Abb. 1). Dieser generelle Aufbau ist allen Mitgliedern der AGC-Kinasen-Familie gemein und zeigt sich besonders deutlich in dem in AGC-Kinasen hoch konservierten hydrophoben Abschnitt der regulatorischen Domäne (Fayard et al., 2005). Auch die katalytische Domäne in der Mitte des Proteins weist eine hohe Ähnlichkeit zu anderen AGC-Kinasen auf, besonders konserviert ist hier ein Threonin (308/AKT1, 309/AKT2), welches für die Aktivierung phosphoryliert wird. Eine weitere hoch konservierte Phosphorylierungsstelle, die wichtig für die AKT-Aktivierung ist, ist ein Serinrest (473/AKT1, 474/AKT2) in der hydrophoben Region der C-terminalen regulatorischen Domäne (Hanada et al., 2004, Peterson and Schreiber, 1999). Die PH-Domäne besitzt eine hohe Affinität zu Phosphatidylinositol-3-Phosphat und ermöglicht somit eine Membrantranslokation von AKT im Zuge der Aktivierung (Frech et al., 1997) (Abb. 1).

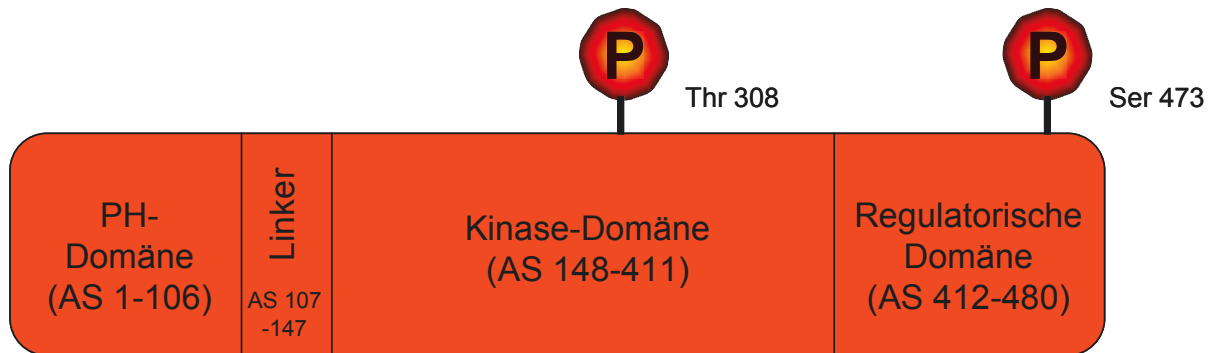


Abb. 1: Struktureller Aufbau von AKT. Die N-terminal gelegene PH-Domäne (*pleckstrin homology*) ist für die Membrantranslokation von AKT im Rahmen der Aktivierung essentiell.

AKT kann über den PI- (Phosphatidylinositol) 3-Kinase-Signalweg zum einen durch Rezeptortyrosinkinasen und zum anderen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Wymann et al., 2003). Die Aktivierung durch Rezeptortyrosinkinasen wird durch Hormone und Wachstumsfaktoren wie Insulin, IGF (*Insulin-like growth factor*), EGF (*Epidermal growth factor*) oder PDGF (*Platelet derived growth factor*) vermittelt (Chan et al., 1999). Nach Binden eines Liganden an den Rezeptor kommt es über eine Autophosphorylierung des Rezeptors und die Rekrutierung von Adaptermolekülen wie IRS (*Insulin-Rezeptor-Substrat*) zur Aktivierung der PI3-Kinase. PI3-Kinasen, die über Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden, gehören der Klasse IA an und bestehen aus einer 110 kDa großen Kinase-Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit, die entweder 85, 55 oder 50 kDa groß sein kann. Aktivierte PI3-Kinasen bilden Phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-trisphosphat (PI(3, 4, 5)P₃) aus Phosphatidylinositol-(3, 4)-bisphosphat (PI(3, 4)P₂), welches dann über die PH-Domäne AKT an die Plasmamembran rekrutiert. Dadurch erfolgt eine Konformationsänderung von AKT, welche es der PDK-1 (*phosphoinositide-dependent-kinase 1*) erlaubt, AKT an Threonin 308 zu phosphorylieren (Matheny and Adamo, 2009). Die Kolokalisation von PDK-1 und AKT an der Plasmamembran ist dabei für die Phosphorylierung essentiell (Anderson et al., 1998). Für die volle Aktivität von AKT ist eine zweite Phosphorylierung an Serin 473 in der regulatorischen Domäne notwendig (Alessi et al., 1996a). Diese Phosphorylierung erfolgt durch verschiedene Faktoren, vornehmlich durch mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) (Sarbasov et al., 2005). Es wird jedoch auch die Beteiligung der DNA-PK (*DNA-abhängige Proteinkinase*) (Bozulic et al., 2008) diskutiert.

Auch durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*GPCR*) kann AKT aktiviert werden. Liganden sind hier z.B. Angiotensin II oder Endothelin I. PI3Kinasen, die durch *GPCR*

aktiviert werden, gehören der Klasse IB an. Sie bestehen aus der katalytischen Untereinheit p110 γ sowie der regulatorischen Domäne p101, die an das G-Protein bindet (Hirsch et al., 2000, Wymann et al., 2003). G-Proteine sind trimere Proteine bestehend aus α -, β - und γ -Untereinheiten, wobei es nach Aktivierung des Rezeptors zur Dissoziation der G α -Untereinheit von den G $\beta\gamma$ -Untereinheiten kommt. G $\beta\gamma$ -Untereinheiten sind in der Lage, die PI3-Kinase direkt zu aktivieren, wohingegen die G α -Untereinheit dies über Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen bewirkt. Nach Aktivierung der PI3-Kinase kommt es dann zur oben erläuterten Signalkaskade (New et al., 2007) (Abb. 2).

Auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskade können Phosphatasen regulierend in die Aktivierung von AKT eingreifen. PI(3, 4, 5)P₃ kann von der Phosphatase PTEN (*protein phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) zu PI(4,5)P₂ dephosphoryliert werden (Stambolic et al., 1998). AKT selbst wird an Serin 473 in der hydrophoben Region von PHLPP (*PH-domain leucin-rich repeat proteinphosphatase*) und an Threonin 308 in der Kinasedomäne von PP2A (*protein phosphatase 2A*) dephosphoryliert und damit inaktiviert (Gao et al., 2005, Millward et al., 1999).

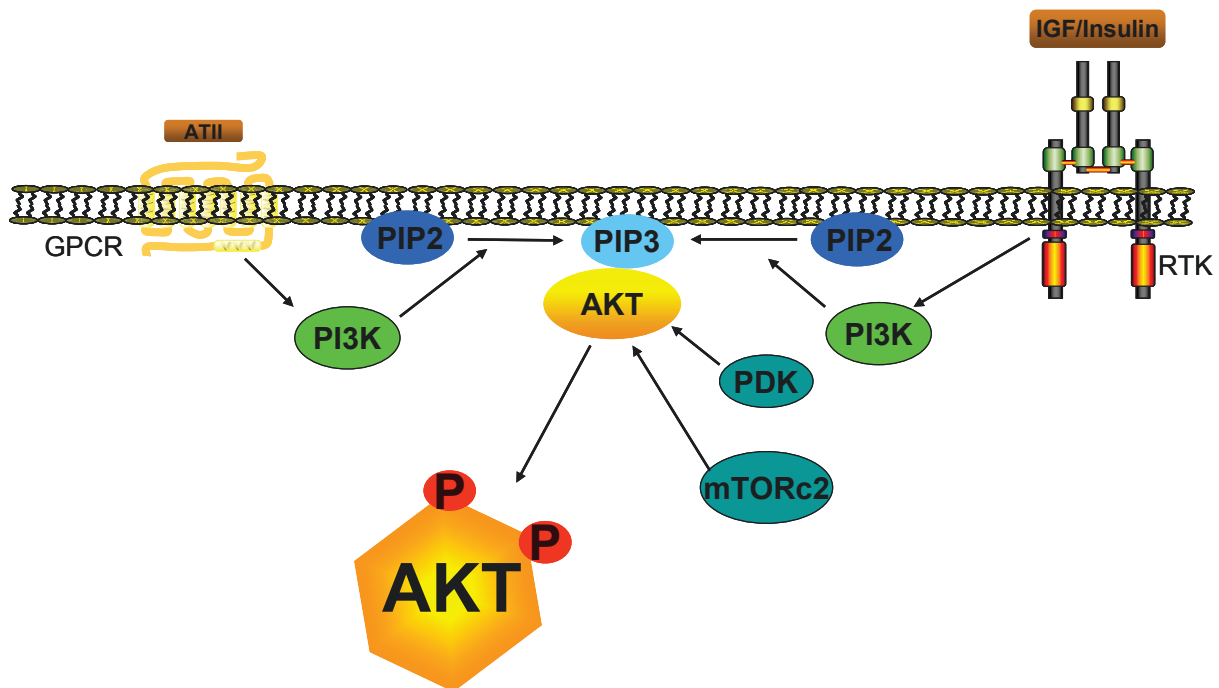


Abb. 2: Aktivierung von AKT über den PI3-Kinase-Signalweg.

Abkürzungen: GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor, RTK: Rezeptortyrosinkinase, weitere Abkürzungen: s. Text

1.1.2 Funktionen in der Zelle

Die Hauptaufgaben von AKT in der Zelle sind die Regulation von Wachstum, Apoptose und Metabolismus, welche von AKT über eine Vielzahl von nachgeschalteten Proteinen moduliert werden. Dabei wird AKT auf den Ebenen der Gen-Transkription, der mRNA-Translation und auch direkt auf Proteinebene aktiv. Es wird von über 100 AKT-Substraten berichtet, von denen die meisten eine bevorzugte Erkennungssequenz haben, an der die Kinase aktiv wird (Manning and Cantley, 2007). Sie lautet R-X-R-X-X-S/T, wobei X beliebige Aminosäuren sein können. Diese Sequenz wird gefolgt von einem hydrophoben Rest (Alessi et al., 1996b). Im Folgenden werden einige wichtige Substrate, über die AKT Metabolismus, Zellzyklus, Wachstum und Apoptose moduliert, erläutert.

Im Rahmen des insulinabhängigen Substratmetabolismus spielt AKT zum Beispiel eine wichtige Rolle bei der Steigerung der Glukoseaufnahme über Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4). Besonders AKT2 scheint hier mit GLUT4-Vesikeln assoziiert zu sein und den Einbau von GLUT4 in die Zellmembran zu fördern (Kohn et al., 1996, Calera et al., 1998). Vermittelt wird dies unter anderem durch das AKT-Substrat AS160, welches durch AKT phosphoryliert wird. Durch diese Phosphorylierung wird die GAP (*GTPase-activating protein*)-Aktivität von AS160, die im aktiven Zustand das kleine G-Protein Rab in seiner GDP-Form hält, unterbunden. Der Einbau der GLUT4 Transporter und hier vor allem das Andocken der Vesikel an die Plasmamembran wird vermittelt durch GTP-gebundenes Rab, welches eine Art Bindeglied zwischen zwei Membranen darstellt. Somit moduliert AKT insulinabhängig die Glukoseaufnahme (Sano et al., 2003, Bai et al., 2007, Jahn et al., 2003). Ein weiteres wichtiges Substrat von AKT ist GSK3 α/β (*Glykogen synthase kinase*). GSK wird von AKT nach Aktivierung durch Insulin an Serin 21 (GSK3 α) oder Serin 9 (GSK3 β) phosphoryliert und damit inaktiviert. GSK3 selber ist im nicht-phosphorylierten Zustand konstitutiv aktiv und inaktiviert durch Phosphorylierung die Glykogensynthase. Damit unterbindet sie den Glykogenaufbau. Somit fördert Insulin als anaboles Hormon über AKT- und GSK-abhängige Hemmung die Glykogensynthese (Summers et al., 1999). Weiterhin greift AKT über GSK in den Fettstoffwechsel der Zelle ein. In aktivem Status inhibiert GSK die ATP-Citrat-Lyase, welche den Abbau von Citrat zu Acetyl-Coenzym A und Oxalacetat katalysiert. Somit ermöglicht AKT durch Hemmung von GSK diese Katalyse (Potapova et al., 2000).

Eine Modulation des Zellwachstums vermittelt AKT über den mTOR Komplex 1 (*mTORC1*), welcher über Aktivierung der p70 S6-Kinase die Proteinsynthese steuert. AKT

reguliert mTORC1 indirekt über die Inaktivierung von TSC2 (*tuberous sclerosis complex* 2) durch Phosphorylierung (Inoki et al., 2002). Im inaktiven Zustand kann TSC2, im Komplex mit TSC1, das kleine G-Protein *Rheb* nicht hemmen. Rheb ist aber ein starker mTOR-Aktivator (Gao et al., 2002, Inoki et al., 2003a). Ein weiteres AKT-Substrat, welches den mTOR-Komplex1 reguliert, ist PRAS40 (*proline rich AKT Substrate of 40 kDa*). Im aktiven Zustand bindet PRAS40 an mTORC1 und inhibiert so den Komplex. Wird PRAS 40 durch AKT an Threonin 246 phosphoryliert (Kovacina et al., 2003) kommt es zur Bindung des 14-3-3-Proteins an PRAS40 gefolgt von einer Destabilisierung des PRAS40/mTOR-Komplexes (Vander Haar et al., 2007).

In den Zellzyklus kann AKT zum einen direkt über die Inhibitoren p21/cip1 und p27/kip1 eingreifen oder indirekt über GSK3 und Cyklin D. AKT phosphoryliert p21/cip1 (*CDK-interacting protein 1*) am Threonin 145 und p27/kip1 (*Kinase Inhibitor Protein 1*) am Threonin 157 und verhindert damit eine Kerntranslokation (Zhou et al., 2001, Shin et al., 2002, Liang et al., 2002). Alles in allem führt diese Ausschaltung der Inhibitoren zu einer verstärkten Aktivität von Cyklin/CDK (*Cyclin dependent kinase*), welche in der Zelle den Zellzyklus regulieren. Eine Stabilisierung von Cyklin/CDK erreicht AKT auch über Inaktivierung von GSK3 β , da aktive GSK3 β Cyklin D phosphoryliert und es dem proteasomalem Abbau zuführt (Diehl et al., 1998).

Seinen regulierenden Einfluss auf die Apoptose übt AKT überwiegend durch Phosphorylierung und damit Inaktivierung proapoptotischer Proteine wie Bad (*Bcl-2/Bcl-X antagonist*), ASK1 (*apoptosis-signal regulating kinase 1*) oder humane Caspase 9 aus. Aber auch durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie FoxO (*Forkhead Box O*) wirkt AKT antiapoptotisch. Bad gehört zur Familie der Bcl-2-Proteine, die die Apoptose über den mitochondrialen Apoptoseweg aktivieren. AKT phosphoryliert Bad an Serin 136 (Datta et al., 1997) und destabilisiert dadurch den proapoptotischen BAD/Bcl-2/Bcl-XL-Komplex (Datta et al., 2000). ASK1 ist eine MKKK (*mitogene activated protein kinase kinase kinase*) welche über Stressproteine wie JNK (*c-jun-N-terminal kinase*) und p38 MAPK (*mitogene activated protein kinase*) den SAPK (*stress activated protein kinase*)-Apoptoseweg aktiviert und durch AKT an Serin 83 phosphoryliert und damit inaktiviert wird (Kim et al., 2001). Caspase 9 ist ebenfalls ein proapoptotisches Protein. Pro-caspase 9 wird durch AKT an Serin 196 phosphoryliert, was die volle enzymatische Aktivierung durch Cytochrom c verhindert (Cardone et al., 1998). Die FoxO-Transkriptionsfaktoren kontrollieren die Expression proapoptotischer Proteine. FoxO1, 2,

3a und 4 werden durch AKT phosphoryliert und durch Translokation inaktiviert, da sie nach Phosphorylierung aus dem Zellkern in das Zytoplasma transloziert werden und somit die Expression FOXO-abhängiger Gene unterbunden wird (Biggs et al., 1999, Wolfrum et al., 2003, Brunet et al., 1999).

Während AKT also im Allgemeinen eher anabole Funktionen im Rahmen von Glykogen-, Protein- und Fettsäuresynthese sowie Förderung von Wachstum und Proliferation bei gleichzeitiger Inhibition von apoptotischen Signalwegen wahrnimmt, stellt die AMP-abhängige Kinase (AMPK) eine Art Gegenspieler zu AKT dar, da sie vermehrt katabole Prozesse wie Glykolyse zur ATP-Gewinnung fördert (Marsin et al., 2000) und anabole Prozesse wie Protein- und Fettsynthese hemmt (Horman et al., 2003, Inoki et al., 2003b, Jørgensen et al., 2004). Die AMPK fungiert als „Energiesensor“ in der Zelle und wird bei einer Erhöhung des AMP/ATP-Verhältnis durch allosterische Aktivierung durch AMP und somit vermehrte Phosphorylierung an Threonin 173 aktiv (Hawley et al., 1995, Hawley et al., 1996). AKT ist auch in der Lage, diesen Gegenspieler zu regulieren, indem es AMPK an Serin 485/Serin 491 phosphoryliert und damit die aktivierende Phosphorylierung an Threonin 173 verhindert (Kovacic et al., 2003, Horman et al., 2006).

1.1.3 Isoformen von AKT

Es gibt drei AKT-Isoformen: AKT1, AKT2 und AKT3. Sie unterscheiden sich in Vorkommen und Proteinmenge, in ihren spezifischen Funktionen sowie, in geringem Maße, in ihrer Sequenz.

Trotz der hohen Sequenzhomologie wurden spezifische Funktionen der einzelnen Isoformen nachgewiesen. Diese wurden insbesondere auch durch funktionelle Charakterisierung isoformspezifischer Knockoutmäuse untersucht. Der Knockout von AKT1 führte bei den Tieren zu einem stark verminderten Körperwachstum (Cho et al., 2001a, Yang et al., 2003). AKT2-Knockoutmäuse entwickelten hingegen einen diabetischen Phänotyp und eine Lipoatrophie (Cho et al., 2001b, Garofalo et al., 2003). Ein Knockout von AKT3 führte bei Mäusen zu einem relativ normalen Körperwachstum, aber zu einer stark verringerten Hirnmasse (Tschopp et al., 2005). Bei doppeltem Knockout zweier Isoformen, z.B. AKT1 und AKT2, kam es zu starken Störungen des Wachstums und die Mäuse starben postnatal, bzw. pränatal bei kombiniertem Knockout von AKT1 und AKT3 (Peng et al., 2003, Yang et al., 2004). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass AKT1 vor allem für das Wachstum von Körper und Organen, AKT2 für

den Substratmetabolismus und AKT3 für die neuronale Entwicklung zuständig zu sein scheint.

Auch bei Analyse der isoformspezifischen Funktionen durch siRNA-Experimente *in vitro* konnten spezifische Funktionen festgestellt werden. Für den Metabolismus konnte z.B. in 3T3-L1 Adipozyten gezeigt werden, dass die insulinabhängige Translokation des GLUT4 vor allem durch AKT2 vermittelt wird (Jiang et al., 2003, Katome et al., 2003). In Kardiomyozyten konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Proteinspiegel der GLUT1 und GLUT4-Transporter direkt mit dem AKT2- aber nicht mit dem AKT1-Proteinspiegel korreliert. Weiterhin ist AKT2 in Kardiomyozyten die bevorzugt phosphorylierte Isoform, obwohl AKT1 ein höheres Expressionsniveau aufweist (Raupach, 2010).

Trotz dieser unterschiedlichen Funktionen der AKT-Isoformen in der Zelle sind sie sich in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich. Besonders bei AKT1 und AKT2 findet sich eine starke Sequenzhomologie von ca. 80% (Matheny and Adamo, 2009). Bei den einzelnen Domänen zeigen sich für die Kinase-Domäne und die PH-Domäne hohe Homologien von 87% und 75%, die C-terminale regulatorischen Domäne zeigt eine Homologie von ca. 66% und die Linker-Region weist mit einer 17% Homologie die größten Unterschiede zwischen den Isoformen auf (Kumar and Madison, 2005). Auch die beiden für die Aktivierung entscheidenden Phosphorylierungsstellen sind unter den Isoformen konserviert. In AKT1 sind es Serin 473 und Threonin 308, in AKT2 Serin 474 und Threonin 308 und in AKT3 Serin 472 und Threonin 305 (Alessi et al., 1996a). Es zeigt sich also, dass die verschiedenen AKT-Isoformen hohe Sequenzhomologien und gleichartige Aktivierungsmechanismen aufweisen.

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für diese Diskrepanz zwischen spezifischen Funktionen auf der einen, und einer hohen Sequenzhomologie auf der anderen Seite.

Zum einen könnten diese Unterschiede auf Variationen in Expressionsmuster und Expressionsniveau beruhen und sich somit auf DNA- und RNA-Ebene abspielen. Untersuchungen auf diesem Gebiet zeigen, dass sich AKT1 und AKT2 in fast allen Organen des Körpers finden, wobei das Expressionsniveau in den verschiedenen Geweben unterschiedlich ist. AKT1 wird in fast allen Organen exprimiert, vor allem in Gehirn, Thymus, Hodengewebe, Herz, Lunge, Pankreas, Milz und Fettgewebe (Yang et al., 2003). AKT2 ist die dominierende Isoform in insulinabhängigen Geweben wie Pankreas, Leber und Skelettmuskulatur (Cho et al., 2001b), aber auch im Herz (Yang et al., 2005). AKT3

zeigt in den meisten Geweben ein geringes Expressionsniveau und ist vor allem im Gehirn zu finden (Tschopp et al., 2005).

Zum anderen könnten sich die isoformspezifischen Funktionen aber auch auf Proteinebene manifestieren. Denkbar wären Unterschiede in der Aktivierung, der Substratphosphorylierung oder im Vorkommen der Isoformen in bestimmten subzellulären Kompartimenten. Zur Analyse dieser proteinvermittelten Regulationsmechanismen ist die Untersuchung AKT-isoformspezifischer Proteininteraktionen essentiell.

1.2 Proteininteraktionen

Die Bildung von Proteinkomplexen und die Interaktion von Proteinen untereinander sind entscheidend für eine Vielzahl biologischer Prozesse. Ein bekanntes Beispiel für hochaffine Interaktionen ist die Antigen-Antikörperbindung. Aber auch im Rahmen von Signaltransduktion sind Protein-Protein-Interaktionen entscheidend. Durch Verbindungen der Proteine untereinander bildet sich ein zelluläres Netzwerk aus, welches die Komplexität eines Organismus organisiert. Somit ist es nicht verwunderlich, dass die Komplexität eines Organismus mit der Anzahl von Protein-Protein-Interaktionen korreliert. Die Anzahl an Interaktionen im humanen Organismus wird auf 650.000 geschätzt (Stumpf et al., 2008). Die Gesamtheit aller Proteininteraktionen wird auch als Interaktom bezeichnet. Es gibt verschiedene Arten von Interaktionen und Bindungen. Die Proteine können in festen Komplexen vorliegen oder nur kurzzeitig mit anderen Proteinen interagieren. Die Art der Interaktion wird durch unterschiedliche Bindungsstellen in Proteinen vermittelt. Bindungen in großen, stabilen Proteinkomplexen, die eine hohe Affinität und Stabilität erfordern, kommen durch Interaktionen zweier Domänen zustande. Diese haben meistens eine große Kontaktfläche von ca. 2000 Å² und weisen eine Hydrophobizität auf (Jones and Thornton, 1996). In der Signaltransduktion sind dagegen eher transiente Interaktionen mit geringer Affinität von Bedeutung. Diese dynamischen Interaktionen werden durch Bindung von Domänen an kurze lineare Peptidsequenzen von 3-10 Aminosäuren vermittelt. Die Kontaktfläche solcher Bindungen ist mit 200-500 Å² auch wesentlich kleiner als die von Domäne-Domäne-Interaktionen (Bader et al., 2008, Stein et al., 2009). Einige Beispiele sind die SH2 (*Src-homology 2*)-Domäne die an Sequenzen in der Nähe von phosphoryliertem Tyrosin bindet (Pawson et al., 2002), die SH3 (*Src-homology 3*)-Domäne, die bevorzugt prolinhaltige Peptide bindet (Mayer, 2001) oder die PDZ (*postsynaptic density 95; discs large; zona occludentes*)-Domäne, die C-

terminale Peptide erkennt (Kornau et al., 1995). Wie am Beispiel der SH2-Domäne zu sehen ist, spielen auch posttranslationale Modifikationen eine Rolle für die Spezifität der Bindung.

Die Analyse des Interaktoms stellt eine wesentliche Herausforderung moderner biologischer Forschung dar. Durch die Aufklärung von Interaktionen lässt sich ein vertieftes Verständnis der Signaltransduktion gewinnen. Daher wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden entwickelt, die sowohl ein Screening als auch eine Verifizierung der Interaktionspartner erlauben.

1989 entwickelten Fields und Song das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Fields and Song, 1989). Mit diesem System können mithilfe des Transkriptionsfaktors GAL4, der eine DNA-bindende und eine aktivierende Domäne hat, interagierende Proteine auf einfache Weise und in großer Menge identifiziert werden. Ein Nachteil dieses Ansatzes ist jedoch, dass die Proteine im Zellkern und damit häufig nicht im physiologischen Umfeld miteinander interagieren müssen.

Eine Methode zur nativen Aufreinigung von Proteinen und ihren Interaktionspartnern stellt die Tandem Affinitätsreinigung (TAP) dar. Die TAP wurde 1999 von Rigaut et al. entwickelt und erlaubt ein Screening nach Bindungspartnern eines bestimmten Zielproteins über ein TAP-Tag. Die TAP wurde zunächst in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Im Jahr 2002 führten Gavin et al. eine systematische Analyse des Hefe-Proteoms mithilfe der TAP durch (Gavin et al., 2002). Im weiteren Verlauf wurde die TAP dann auch für Säugerzellen weiterentwickelt (Knuesel et al., 2003, Li et al., 2004, Bürckstümmer et al., 2006). Ein Vorteil der TAP ist, dass durch die zweifache Aufreinigung des Proteins und seiner Bindungspartner viele unspezifisch gebundene Proteine eliminiert werden. Ein Nachteil ergibt sich hingegen aus der Tatsache, dass transiente Bindungspartner eines Proteins nur unzuverlässig erfasst werden (Xu et al., 2010).

Zur Verifizierung der durch das Screening identifizierten Bindungspartner wird häufig die Methode der Co-Immunopräzipitation genutzt, bei welcher der zu beweisende Interaktionspartner das Zielantigen darstellt. Aber auch immunhistochemische Methoden wie der *Proximity Ligation Assay* (PLA) können zum Nachweis von Proteininteraktionen dienen (Söderberg et al., 2006).

1.3 Fragestellung

Die Proteinkinase AKT hat eine zentrale Funktion bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Metabolismus, Apoptose und Proliferation. Da die Interaktion mit anderen Proteinen essentiell zur Signalübermittlung ist und Protein-Protein-Interaktionen einen wichtigen Aspekt bei isoformspezifischer Signaltransduktion darstellen können, sollen in dieser Arbeit systematisch Proteininteraktionen der AKT2-Isoform analysiert werden.

Dazu sollen AKT2-Proteininteraktionen zunächst global mittels der Tandem Affinitätsaufreinigung untersucht und die gefundenen Interaktionen mit quantitativer Massenspektrometrie im Hinblick auf Komplexstabilität weiter analysiert werden. Weiterhin sollen gefundene Proteine mit einer TAP-unabhängigen Methode verifiziert und auf ihre Funktionalität in der AKT2-vermittelten Signaltransduktion untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

- Analysewaagen: PCB Präzisionswaage (Kern), PE 3600 (Mettler-Toledo), Feinanalysewaage BP121S (Sartorius)
- Autoklav (Webeco)
- Eismaschine (Ziegra)
- Gelkammern: Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Bioscience/GE Healthcare), SE 400 Sturdier Vertical Electrophoresis Unit (Hoefer Scientific Instruments)
- Kühl- und Gefrierschränke: -80°C Gefrierschrank UltimaII (Revco/Thermo Fisher), -20°C Gefrierschrank Senator (Privileg), -20°C Gefrierschrank öko (Privileg), -20°C Gefrierschrank comfort (Liebherr), Kühlschrank öko (Privileg), Kühlschrank glass line (Liebherr)
- Magnetrührer: MR3001 (Heidolph), IKA-COMBIMAG-RCH (Klees)
- Massenspektrometer: *LTQ Orbitrap XL* (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt mit einer *Ultimate3000-RT-LC*-Säule (Thermo Fisher/Dionex)
- Mikroskope: Lichtmikroskop ID 03 (Zeiss), Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ 9000 (Keyence)
- Mikrowelle: Micromat (AEG)
- PCR-Maschine: *Mastercycler gradient* (Eppendorf)
- pH-Meter: pH 526 (WTW)
- pH-Elektrode: *Blue line 14 pH* (Schott Instruments), *InLab Micro* (Mettler-Toledo)
- Pipetten: *Pipetman 10-1000µl* (Gilson),
- Plattenphotometer: *Spectra Count* (Packart), *Optima Fluostar* (BMG Labtech)
- Schüttler: *Mini Rocking Platform* (Biometra), Wippschüttler (neoLab), *Thermomixer comfort* (Eppendorf), Drehschüttler *Roto-shake Genie* (Scientific Industries)
- Spektralphotometer: *Nanodrop ND 1000* (peqlab)
- Stromquellen: *Model 500/200 Power Supply* (Biorad), *500 Volt Power Supply* (Buchler Instruments), *Electrophoresis Power Supply: EPS 600* und *EPS 3501 XL* (Amersham Pharmacia biotech/GE Healthcare), *Power 608* (Fisher Scientific),

Power Pack P25 (Biometra), *PS 500XT DC Power Supply* (Hoefer Scientific Instruments)

- Stickstofftank: *Arpege 110* (Air Liquide)
- UV-Tisch: *Mighty Bright* (Hoefer Scientific Instruments), *Universal Hood* (Biorad)
- Vortexer: *Vortex-Genie 2* (Scientific Industries)
- Westernblotting-Zubehör: *Semidry Blot-Kammer* (Biometra), Kühlung *MultitempII* (LKB), *Infrared Imaging System Odyssey* (LI-COR), Nitrozellulosemembran Protran (Whatman), *LICOR Blocking Solution* (LI-COR)
- Wasserbad: *16°C Julabo U3* (Julabo), *37°C GLF 1083* (GFL)
- Wasserreinigung: *Milli-Q plus* (Millipore)
- Zellkultur: Sterilbank *Antair BSK*, Sterilbank *LaminAir* (Heraeus), Brutschränke (Heraeus)
- Zentrifugen: *Centrifuge 5417R*, *5810R* (Eppendorf), *Rotofix 32* (Hettich), Vakuumzentrifuge, *Savant SPD 131DPA* (Thermo), Minizentrifuge (Roth)

2.2 Antikörper

2.2.1 Primäre Antikörper

- Cell Signaling Technology: AKT-Antibody (9272), AKT Mouse mAb (2966), AKT2 Rabbit mAb (3063), AKT2 Mouse mAB (5239), HA-Tag Mouse mAB (2367), P-AKT (Ser 473) Antibody (9271), P-AKT (Thr 308) Antibody (9275), P-GSK3 β (Ser9) Antibody (9336), eEF2-Antibody (2332), GAPDH Rabbit mAb (2118),
- Abcam: Anti-ENO1 antibody (ab 85086)
- Sigma: Anti-Flag Polyclonal (F7425), Anti-GAPDH antibody Rabbit (G9545)

2.2.2 Sekundäre Antikörper

- Antikörper für LI-COR Odyssey: IRDye 800CW Goat Anti-Mouse IgG, IRDye 800CW Goat Anti-Rabbit IgG, IRDye 680 Goat Anti-Mouse IgG, IRDye 680 Goat Anti-Mouse IgG

2.3 Chemikalien

- Ammoniumhydrogencarbonat (Fluka), APS (Ammoniumpersulfat) (Roth), Biotin (Sigma) Bromphenolblau (Roth), BSA (bovines Serumalbumin) (Merck), DTT (Dithiothreiol) (Sigma), EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (Sigma), Flag-Peptid (BMFZ, Universität Düsseldorf), Iodacetamid (Sigma), Kaliumchlorid (Merck), Kalium-Ferricyanid (Merck), Natriumchlorid (Fluka), Natriumcarbonat (Merck), Natriumhydroxid (Roth), Natriumthiosulfat (Merck), SDS (Sodiumdodecylsulfat) (Roth), Silbernitrat (Riedel-de Haen), Tris (Trishydroxymethylaminomethan) (MP Biomedicals),
- Acetonitril (Fisher), Acrylamid 40% (Roth), Ameisensäure (Fluka), Essigsäure (Merck),
- Formaldehyd (Merck), Methanol (Merck), Salzsäure 25% (Merck), TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin) (Roth)

2.4 Enzyme und Hormone

- Restriktionsendonukleasen: AgeI, BamHI, BsrGI, EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaI, HpaII, KpnI, PstI, PvuII, SbfI, ScaI, SwaI, XbaI, XhoI (NEB)
- Polymerasen: Taq-DNA-Polymerase (NEB), Klenow Fragment (3'->5' exo-) (NEB)
- Ligase: T4-DNA-Ligase (NEB)
- Kinasen: T4-Polynukleotidkinase (NEB)
- Alkalische Phosphatase (Roche)
- Trypsin (Promega)
- IGF-1 (Invitrogen, Miltenyi Biotecs), Insulin (Insuman Rapid, 40 I.E/ml, Sanofi Aventis), Angiotensin II, *human* (Calbiochem), Ly294002 (Cell Signaling, Sigma) CCT128930 (SelleckBio.com)

2.5 Kits

- *NucleoSpin Extract II Kit* (Macherey-Nagel)
- *NucleoBond Xtra Midi Plus Kit* (Macherey-Nagel)
- *BCA-Protein-Assay Kit* (Thermo Scientific)
- *SILAC™ Protein Identification and Quantitation Media Kit* (Invitrogen)
- *Duolink II Fluorescence-Kit* (Olink Bioscience)

- *ENOI Human Activity Assay Kit* (abcam)

2.6 Gele

- Agarosegel: 1-1,5%-Agarose, 0.005-0,01% Ethidiumbromid, 0,5% TAE-Puffer
- SDS-Acrylamidgele: Sammelgel 2,5%: 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 H₂O, Trenngel 10%: 10 ml Acrylamid 40%, 10 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 400 µl SDS 10%, 100 µl APS 10%, 80 µl TEMED, 20 ml H₂O

2.7 Größenstandard

- Lambda-DNA geschnitten mit EcoRI/HindIII in Basenpaaren: 21000 – 5150 – 4950 – 2027 – 1900 – 1584 – 1375 – 947 – 831 – 560
- pBluescript-DNA geschnitten mit HpaII in Basenpaaren: 710 - 489 – 404 – 325 – 242 – 190 – 157 – 147 - 110 – 67 – 57 – 34 - 26
- *PageRule Prestained Protein Ladder* in kDa: 170 – 130 – 100 – 70 – 55 – 40 – 35 – 25 – 15 - 10

2.8 Puffer

- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄*2H₂O, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4
- Halb-Trocken-Puffer: 190 mM Glycin, 25 mM Tris (pH 8,5), 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Ethanol
- Laemmli-Probenpuffer (4fach): 250 mM Tris-Cl, 8% SDS, 50 mM DTT, 20% Glycerol, 0,1 mg/ml Bromphenolblau
- Lysispuffer: 10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,1% IGEPAL, pH 7,4
- SDS-PAGE-Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin (pH 8,3), 0,1% (w/v) SDS
- Strep-Wash-Puffer: 100 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
- TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA
- TBS: 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris-Cl, pH 7,4
- TBST: TBS, 0,1% Tween
- TE: 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA
- Fixativ: 4%Paraformaldehyd, 0,1 M Natriumphosphat

2.9 Oligonukleotide

Tab. 1: Oligonukleotide (Invitrogen)

Oligonukleotid Nummer, Name	Sequenz 5'→3'
Nr.759, <i>AKT2 ATG</i>	ATGAATGAGGTATCTGTCATCAAAGA
Nr.760, <i>AKT2 minus STOP</i>	TTTCCTGCAGGCTCTCGGATGCTGGCTGAGTAGG
Nr.781, <i>NTag for</i>	ATGGGCGGGTACCCATACGACGTGCCCGAC
Nr.782, <i>NTag rev</i>	AACCCCCTTATCGTCATCGTCTTTATAG
Nr.784, <i>AKT2 plus STOP</i>	TCACTCTCGGATGCTGGCTGAGTAG

2.10 Vektoren

Die Grundstruktur aller in dieser Arbeit genutzten Vektoren beruht auf dem Vektor pGJ3-C-CAG (Abb. 3). In diesem Vektor steht das jeweils integrierte Gen unter der Kontrolle des CAGGS-Promotors (*CMV enhancer fused with chicken β -actin promotor, GAGGS*). Der Promotor besteht aus dem Cytomegalovirus-Enhancer und dem β -Aktin Promotor aus dem Huhn (Niwa et al., 1991). Des Weiteren befinden sich die Gene gag, und RRE (*REV (regulator of virion expression)-responsive-element*) auf dem Vektor, welche, unter Kontrolle des CMV (*Cytomegalievirus*)-Promotors, für die effektive Produktion lenitviraler Partikeln erforderlich sind.

Zur Selektion plasmidtragender Bakterien dient das Ampicillinresistenzgen unter der Kontrolle des β -Lactamase-Promotors (bla). In eukaryotischen Zellen kann Zeocin zur Selektion genutzt werden, wobei das Resistenzgen unter Kontrolle des EM7-Promotors steht. pUC-ori und F1-ori sind Replikationsursprünge, die die Replikation in E.coli (pUC-ori), bzw. die Herstellung einzelsträngiger Kopien und die Verpackung in filamentöse Phagen (F1-ori) ermöglichen.

Weiterhin genutzt wurde der Vektor IRAVp968G0444D von *Source Bioscience*, welcher als Matrize für die Amplifikation der AKT2-cDNA per Polymerasekettenreaktion diente. Zur Isolation eines Puromycinresistenzgens mit Phosphoglyceratkinase-Promotor, welches zur Selektion lenitviral infizierter Zellen diente, wurde der Vektor pSicoPuro (Ventura et al., 2004), bezogen von *addgene* (Addgene Plasmid 11586), eingesetzt (Abb. 4). Die graphische Darstellung aller in dieser Arbeit gezeigten Plasmide erfolgte mit dem Programm *Geneious v5.4* (Drummond et al., 2011).

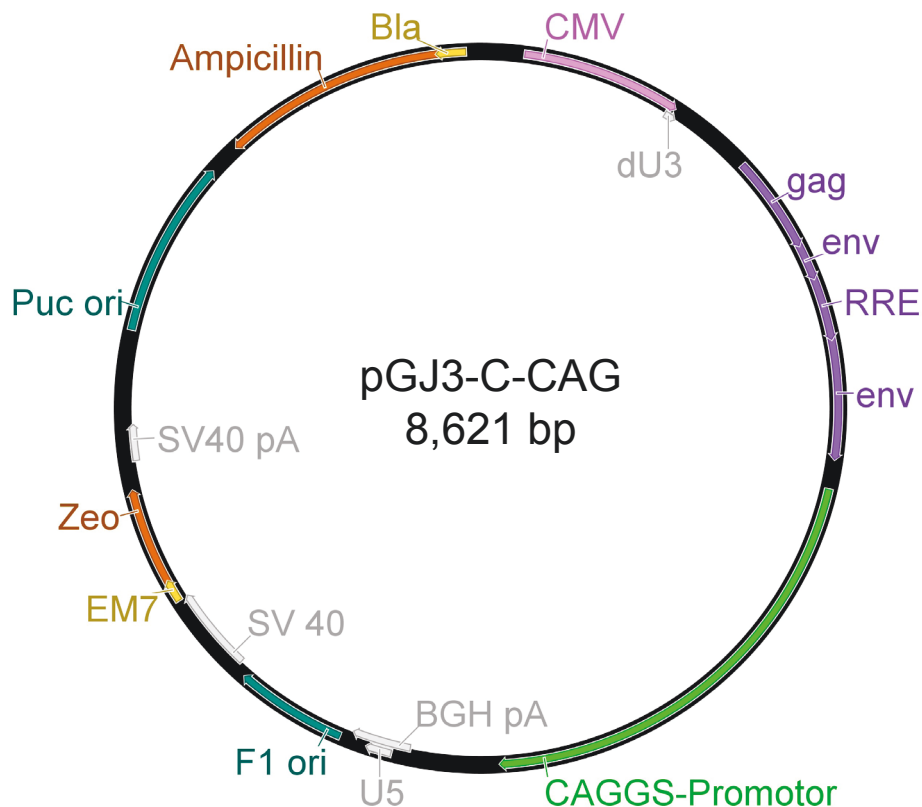


Abb. 3: Lentiviraler Vektor zur Expression eines stabil exprimierten, rekombinanten AKT2. Alle im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigten Vektoren basieren auf diesem Vektor.

BGH pA: Polyadenylierungssignal des bovine growth hormone; SV40 (Simian virus 40), SV40pA (SV40 Polyadenylierungssignal: SV40 Enhancer zur Verstärkung der Expression der viralen Gene (Kelly and Wildeman, 1991)

Der Aufbau des Vektors und alle weiteren Abkürzungen sind im Text erläutert.

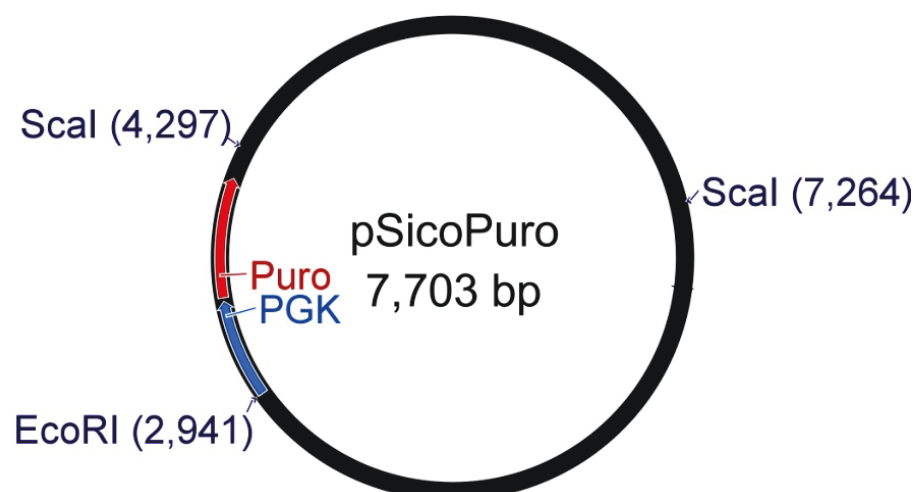


Abb. 4: pSicoPuro (addgene)

Vektor mit Puromycinresistenzgen und PGK-Promotor-Kontrolle, dessen Expression für die Selektion vektortragender Zellen nach lentiviraler Infektion benötigt wurde.

2.11 Zell- und Bakterienkultur

- Zellen: *Human Embryonic Kidney* HEK293T-Zellen (ECACC/HPA), embryonale (E18) Rattenkardiomyozyten (Präpariert und zur Verfügung gestellt von Dr. Sebastian Kötter, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.)
- Bakterien: kompetente *E.coli*-Zellen XL-1 Blue (Stratagene)

2.11.1 Medien

- HEK-Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium D-MEM (Invitrogen), 10% fötales bovines Serum FBS Superior (Biochrom AG), 0,1 mM MEM Non Essential Amino Acids (Invitrogen), 2 mM GlutaMAXX-I Supplement (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin-Streptomycin, liquid (Invitrogen)
- HEK-Einfriermedium: 8 ml HEK-Medium, 1 ml FBS Superior, 1 ml DMSO
- Kardiomyozytenmedium: Dulbecco's Modified Eagle Medium D-MEM, 20% FBS, 0,1 mM non-essential amino acids, 100 U/ml Pen/Strep, 50 μ M β -Mercaptoethanol
- Bakterienmedium Luria-Bertani-(LB)-Medium: 10 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Bacto-Yeast Extract, 170 mM NaCl, 50 μ g/ml Ampicillin, pH 7,5. Durch Zusatz von 15 g/l Agar kann man einen Agar-Nährboden auf Petrischalen gießen und die Bakterien dort kultivieren.
- Sonstiges: 0,05% Trypsin EDTA (Invitrogen), S-EDTA (0,7 mM EDTA, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2), Puromycin (Sigma), Verdaupuffer für Kardiomyozytenisolation (137 mM NaCl, 11 mM D-Glukose, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 417 μ M NaH₂PO₄·H₂O, 56 μ M Phenolrot, 1 mg/ml Kollagenase Typ II, 3 mg/ml Trypsin).

2.11.2 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Die humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*, HEK293T) wurden bei 37°C und 5% CO₂ in supplementiertem D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) kultiviert. Die Pflege der Zellen bestand in regelmäßigem Mediumwechsel, sowie der Teilung der Zellen bei 100% Konfluenz der Platte. Dieses „Splitten“ erfolgte durch Waschen der Zellen mit S-EDTA, um eventuell abgestorbene Zellen zu entfernen, und dem Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale mit Trypsin-EDTA. Die abgelösten

Zellen wurden in ca. 5-10 ml frischem Medium für 5-10 min abzentrifugiert, um dann in frischem Medium im Verhältnis 1:4-1:5 auf neue Zellkulturschalen verteilt zu werden.

2.11.3 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293T-Zellen

Die transiente Transfektion der HEK293T-Zellen erfolgte mit Lipofektamin 2000 (Invitrogen). Hierbei bildet das kationische Lipid DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid) mit der DNA Lipid-DNA-Komplexe, welche mit der Zellmembran verschmelzen können (Felgner et al., 1987).

Für die Transfektion einer zu 90% konfluenten 10 cm-Zellkulturschale wurden 15-20 µg DNA und 45 µl Lipofektamin jeweils getrennt für 5 min bei 37°C in 1,5 ml Opti-MEM (Invitrogen) inkubiert. Diese Ansätze wurden vereint und nach einer weiteren, 30-60-minütigen Inkubation bei 37°C zu den HEK293T-Zellen gegeben. Die Analyse der Zellen erfolgte 48 h nach Transfektion.

2.11.4 Lentivirale Infektion

Um rekombinante Gene stabil in das Genom einer Zelle zu integrieren und somit eine stabile Expression des gewünschten Gens zu erreichen, wurden modifizierte Lentiviren genutzt.

Zur Herstellung von Lentiviren werden verschiedenen Gene gebraucht, die aus Sicherheitsgründen auf drei verschiedene Vektoren verteilt sind. Dies sind ein Helferplasmid, ein Verpackungsplasmid sowie der Expressionsvektor mit dem Zielgen und einem Antibiotikaresistenzgen. Das Helferplasmid enthält die Informationen für die Virusproteine gag (Kapsidproteine), pol (Virion-assoziierte Enzyme Protease, reverse Transkriptase und Integrase), rev und tat (Expressionsregulatoren). Auf dem Verpackungsplasmid pCZ-VSV-G befindet sich das Glykoprotein G des vesikulären Stomatitis-Virus, welches zum Eintritt und zur Knospung der Viren benötigt wird (Mochizuki et al., 1998 Pietschmann et al., 1999). Der Expressionsvektor enthält zusätzlich zum Gen *AKT2* und einem Puromycinresistenzgen ein psi-Verpackungssignal sowie die Signale für die reverse Transkription und Integration.

Zur Durchführung der Infektion wurde eine 10 cm Zellkulturschale HEK293T-Zellen mit jeweils 5 µg der Plasmide in 1,5 ml Opti-MEM und 45 µl Lipofektamin in 1,5 ml Opti-MEM inkubiert. Ca. 18 h nach der Infektion wurde das Medium zum ersten Mal gewechselt. Ca. 2 d nach der Infektion wurde der Überstand mit den Viruspartikeln abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter filtriert, um ihn dann für die Infektion der

gewünschten Zellen einzusetzen. Dazu wurde der Virusüberstand 1:1 mit frischem Medium verdünnt und für 2 d mit den Zellen inkubiert. Anschließend erfolgte für ca. eine Woche eine Selektion mit 3 µg Puromycin/ml Medium. Die Selektion wurde durchgeführt, bis eine identisch behandelte, wildtypische Kontrolle keine überlebenden Zellen mehr aufwies.

2.11.5 Präparation und Kultivierung embryonaler (E18) Rattenkardiomyozyten

Die Präparation und Pflege der Zellen wurde freundlicherweise durchgeführt von Dr. Sebastian Kötter, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Haltung der Tiere erfolgte in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Organentnahmenummer O/29/2011. Für die Präparation wurden trächtige Wistarratten genutzt. Diese wurden zunächst mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Die Embryonen wurden an Tag 18 entnommen und dekapitiert. Nach Entnahme der Herzen wurden die Kardiomyozyten durch enzymatische und mechanische Zerkleinerung für 30 Minuten bei 37°C vereinzelt. Die Suspension wurde filtriert (100µm Porengröße) und mit 10 ml Medium versetzt, um die enzymatische Reaktion abzustoppen. Nach fünf Minuten Zentrifugation bei 800 rpm wurden die Zellen mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Loch auf 6-Loch Platten ausgesäht. Die Kultivierung erfolgte bei 5% CO₂ und 37°C. Zur Unterdrückung von Fibroblastenwachstum wurden die Zellen einen Tag nach der Präparation mit 10 µg/ml Mitomycin behandelt.

2.12 Arbeit mit DNA

Alle hier aufgeführten Methoden wurden nach den Protokollen von Sambrook and Russell durchgeführt (Sambrook, 2001).

2.12.1 Extraktion und Fällung

Die Extraktion von DNA, z.B. aus einem Restriktionsansatz, erfolgte durch Zugabe gleicher Volumenanteile Phenol-Chloroform und Chloroform, wobei sich die DNA nach Zentrifugation in der wässrigen Phase anreicherte. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe eines doppelten Volumenanteils 99% Ethanol und 10% 3 M Natriumacetat und Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 14000 rpm. Zur Entfernung von Salzen erfolgte im Anschluss ein Waschschriff mit 70% Ethanol. Die gefällte und gereinigte DNA konnte dann im gewünschten Puffer gelöst werden.

2.12.2 Restriktionsendonukleasenanalyse

Die Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde nach Angaben der Hersteller (NEB und Gibco) durchgeführt. Pro μg DNA wurde jeweils eine Unit Enzym eingesetzt. Des Weiteren enthielt ein Restriktionsansatz den jeweiligen Puffer sowie, wenn nötig, BSA. Nach der Restriktion wurden die Enzyme gegebenenfalls durch Extraktion mit Phenol-Chloroform aus dem Ansatz entfernt.

2.12.3 Auffüllung von überhängenden Enden, Dephosphorylierung

Bei Restriktion mit versetzt schneidenden Enzymen wurden überhängende 5'-Enden mit einer 5'-3'-Kleenow Polymerase aufgefüllt.

Um eine Religation der Vektorteile zu verhindern und die Ausbeute an Plasmiden mit Fragmentinsertion zu steigern, wurde die DNA mit einer Phosphatase (CIP = *calf intestinal phosphatase*) behandelt, welche zu einer Dephosphorylierung am 5'-Ende führt. Die CIP-Behandlung erfolgte nach 1-2 h Restriktion, mit 2 U CIP für 30-60 min bei 37°C im Restriktionsansatz. Im Anschluss wurde der Ansatz für 15 min bei 67°C zur Inaktivierung der CIP inkubiert.

2.12.4 Ligation

Für Ligationen wurde die T4-Ligase (NEB) genutzt. Ein Ligationsansatz, bestehend aus 100-150 ng Plasmid und Fragment in drei- bis fünffach molarem Überschuss, wurde für 3-4 h bei 16°C mit der T4-Ligase inkubiert.

Bei dem Einsatz von PCR-Fragmenten musste eine 5'-Phosphatgruppe vorhanden sein, welche durch Inkubation des Fragments mit einer T4-Polynukleotidkinase (NEB) und ATP angehängt werden konnte.

2.12.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Spectrophotometer Nanodrop ND-1000 (peqlab) mit der zugehörigen Software ND 1000 3.2.1 genutzt. Sowohl die E260 (Extinktion bei 260 nm) zur Konzentrationsbestimmung als auch der Quotient E260/E280 zur Reinheitsbeurteilung der Probe wurden von der Software automatisch ermittelt.

2.12.6 Elektrophoretische Auftrennung der DNA und Isolation aus dem Agarosegel

Die Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte auf 1-1,5% Agarosegelen, welchen 0,005-0,01% Ethidiumbromid sowie TAE-Puffer zugesetzt wurden. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer bei einer Spannung von 50-150 V.

Die in dieser Arbeit zu sehenden Abbildungen von Agarosegelen wurden mit dem ChemiDoc XRS-System (BioRad) aufgenommen und mit dem Computerprogramm QuantityOne 4.5.2. (BioRad) bearbeitet. Als Größenmarker für Fragmente ab einer Größe von 500 bp diente Lambda-DNA, welche zuvor mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII behandelt wurde. Für kleinere Fragmente unter 700 bp wurde ein mit HpaII geschnittener pBluescript-Vektor genutzt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden für eine Klonierung aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem *NucleoSpin Extract II Kit* nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert.

2.12.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Amplifikation der AKT2-cDNA und des NTags genutzt. Die jeweils eingesetzten Matrizen und Oligonukleotide sind in Kapitel 2.9, Tab. 1 gelistet.

Der PCR-Thermocycler wurde wie folgt programmiert: Denaturierung bei 94°C für 15 sec, Oligonukleotidanlagerung bei 55°C für 45 sec mit einem Gradienten von 50-60°C, Arbeitstemperatur der *Pfx*-Polymerase bei 68°C für 2 min. Ab Schritt zwei wurden 30 Wiederholungen durchgeführt.

2.12.8 Transformation und Kultivierung kompetenter E.coli-Zellen

Zur Transformation von kompetente XL-1 Blue-Zellen mit Plasmid-DNA wurden zunächst 10 µl eines Ligationsansatzes (ca. 500-1000 ng DNA) auf kompetente Zellen gegeben und für 30 min bei 4°C vorinkubiert. Dann erfolgte ein kurzer Hitzeschock (90 s, 42°C) zur Steigerung der Transformationsrate. Danach wurden die Zellen in 250 µl LB-Medium aufgenommen und für ca. 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte die Ausplattierung auf einer LB-Amp-Platte (Agaroseplatte aus LB-Medium, welches mit Ampicillin versetzt wurde) und Inkubation über Nacht bei 37°C. Am nächsten Morgen wurden von dieser Platte dann einzelne Kolonien isoliert und in ca. 2-3 ml LB-Amp-Medium kultiviert, sodass daraus die DNA der E.coli-Zellen präpariert werden konnte.

2.12.9 Präparation von DNA aus E.coli-Zellen

Die Präparation der DNA aus E.coli-Zellen erfolgte mit dem *NucleoBond Xtra Midi Plus Kit* nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Angaben des Herstellers. Extraktion und Fällung der DNA erfolgte wie in Kapitel 2.12.1 beschrieben.

2.12.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch das biologisch-medizinische Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die erhaltenen Sequenzen wurden mithilfe des Programms *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) von www.ncbi.nlm.nih.gov analysiert.

2.13 Arbeit mit Proteinen

2.13.1 Proteinisolierung aus kultivierten Zellen

Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Lysispuffer (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,1% IGEPAL, pH 7,4) für ca. 5 min auf Eis. Dem Lysispuffer zugesetzt wurden Proteinase-Inhibitor-Mix (Sigma) sowie bei Bedarf Phosphataseinhibitor. Bei Gebrauch von mehr als 10 ml Puffer wurden die *complete-mini-* bzw. *PhosStop*-Tabletten (Roche) verwendet. Der Einsatz erfolgte nach Herstellerangaben. Im Anschluss an die Lyse wurden die Zellen mit einem Zellkulturschaber von der Platte abgenommen. Die Zellsuspension wurde je nach Volumen 5-30 min bei 4°C zentrifugiert um Kerne und andere Zellbestandteile abzutrennen.

2.13.2 Bestimmung des Proteingehalts von Zellextrakten

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem *BCA-Protein-Assay Kit*. Eine aufsteigende Reihe an BSA-Konzentrationen (25-2000 µg/ml) in Lysispuffer diente als Standard. 25 µl Probenvolumen wurden mit 200 µl Reagenzlösung für 30 min bei 37°C inkubiert. Auf einer 96-well-Mikrotiterplatte wurde im Elisa-Reader SpectraCount (Packard) mit dem Computerprogramm PlateReader V3.0 die Absorption bei 577 nm gemessen. Die entsprechenden Proteinkonzentrationen konnten mithilfe der Eichgerade ermittelt werden.

2.13.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)

Vor Auftrennung der Proteine im SDS-Gel (Laemmli, 1970) wurden sie zur Denaturierung und Erreichen einer negativen Ladung in Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C gekocht.

Ein SDS-Polyacrylamidgel besteht aus einem 2,5% Sammelgel zur Konzentrierung der Proteine, sodass diese in einer scharfen Bande in das 10 – 12% Trenngel übertreten, wo sie nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in Hoefer-Elektrophoresekammern in SDS-PAGE-Laufpuffer bei 50-200 V. Als Größenstandard diente der *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas) (10-170 kDa).

2.13.4 Western Blot Analyse und Immunodetektion

Die über Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nach dem „Semi-dry“-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer dauerte ca. 1 h bei 200-300 mA, wobei die Stromstärke sich nach der Größe der Membran richtete (Größe der Membran in $\text{cm}^2 \cdot 2 = \text{benötigte Stromstärke in mA}$). Nach dem Transfer wurde die Membran für ca. 1 h in 5% Milchpulver in TBS oder LICOR Odyssey Lösung 1:1 in TBS behandelt um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern.

Der primäre Antikörper wurde je nach Herstellerangabe in 5% Milchpulver oder 5% BSA in TBST entweder bei 4°C über Nacht oder für 1 h bei RT inkubiert. Nach Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Als sekundäre Antikörper wurden mit roten und grünen Fluoreszenzfarbstoffen markierte α -Maus oder α -Kaninchen-Antikörper, ebenfalls nach Herstellerangaben in der Verdünnung 1:15000 in LICOR Odyssey-Lösung, eingesetzt. Es folgten fünf 10-minütige Waschschrte mit TBST und PBS. Die Detektion des fluoreszierenden sekundären Antiköpers erfolgte mit dem LI-COR Odyssey-Gerät und dem Programm Odyssey 2.1 und V3.0.

2.14 Stimulation und Inhibition des AKT-Signalwegs

Zur Untersuchung der Aktivität von AKT wurden Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen kultiviert.

Um HEK293T-Zellen zu „hungern“, wurden sie in serumfreiem Medium kultiviert. Für eine Inhibition bzw. Stimulation des PI3-Kinase-Signalwegs wurden 25 μmol PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002 für 1 h bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$ IGF-1 oder 1,75 μg Insulin/ml für 10 min eingesetzt.

E18 Rattenkardiomyozyten wurden zum „hungern“ über Nacht in 1% FBS supplementiertem Medium kultiviert und mit 50 μM Ly294002 behandelt. Zur Aktivierung von AKT über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde mit 100 nM Angiotensin II für 30 min stimuliert.

2.15 Tandem Affinitätsaufreinigung - TAP

Bei der Aufreinigung von Proteinen nach dem TAP-Protokoll (Rigaut et al., 1999) können getaggte Proteine mit ihren Bindungspartnern in zwei Schritten aus Zellextrakten aufgereinigt werden.

Es wurde ein modifiziertes Protokoll nach Naguib verwendet (Naguib, 2009). Voraussetzung war die Expression eines mit einem Flag-Tag und einem StrepII-Tag versehenen AKT2 in HEK293T-Zellen. Die Zellen wurden zunächst, wie in Kapitel 2.13.1 beschrieben, mit Lysispuffer lysiert. Zur Kontrolle wurde eine gleiche Anzahl wildtypischer HEK293T-Zellen dem gleichen Protokoll unterzogen. Im ersten Aufreinigungsschritt wurden Agarosekügelchen, welche mit α -Flag-Tag-Antikörper beschichtet waren (Flag-Beads) (*Anti-Flag M2 Affinity Gel*, Sigma-Aldrich) zur Aufreinigung über das Flag-Tag genutzt. 200 μl der Beads wurden zunächst in Lysispuffer gewaschen, um sie dann für 1 h bei 4°C und 400 rpm auf dem Schüttler mit dem Zellextrakt zu inkubieren. Danach wurde das Gemisch auf eine Einmalsäule (*Micro Bio-Spin, Chromatography Columns*, BioRad) gegeben und die abgesetzten Beads mit 2 ml TBS (150 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris-Cl, pH 7,4) in 0,5 ml-Schritten gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution des gebundenen Proteins mit 1 ml Triple-Flag Elutions-Puffer (300 μg 3xFlag-Peptid/ml TBS). Dieses Eluat wurde im nächsten Aufreinigungsschritt über eine neue Einmalsäule mit Strep-Tactin-Beads (*Strep-Tactin Sepharose*, IBA Technologies) gebunden. Die Säule wurde zunächst mit 2 ml Strep-Wasch-Puffer (100 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) equilibriert und 200 μl Strep-Tactin-Beads in ca. 1 ml Puffer auf die Säule gegeben. In einem ersten Schritt wurde das Flag-Eluat über das StrepII-Tag an die Strep-Tactin-Matrix gebunden. Im Anschluss folgte ein Waschschriff mit 2 ml Strep-Wash-Puffer in 0,5 ml-Schritten. Die Elution der Proteine erfolgte mit 2,5 mM Biotin (Sigma-Aldrich) in Strep-Wasch-Puffer. Sowohl Flag- als auch Strep-Tactin-Beads wurden im Anschluss an die Elution in 1 ml TBS bzw. Strep-Wasch-Puffer aufgenommen. Auch von den anderen Aufreinigungsschritten wurden die Fraktionen gesammelt, sodass sich am Ende der TAP

neun Fraktionen ergaben: Zellextrakt, Durchfluss I, Wasch Flag, Flag Eluat, Flag *Beads*, Durchfluss II, Wasch Strep, Strep Eluat, Strep *Beads*. Jede dieser Fraktionen wurde mittels Western Blot Analyse auf das rekombinante AKT2 untersucht, um eventuelle Proteinverluste während der Aufreinigung zu erkennen.

Zur Konzentrierung der Proteine wurde mit *StrataClean Beads* (Stratagene) inkubiert oder über *Centrifugal Filter Units, 10K Membrane* (Millipore) zentrifugiert, um sie dann durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auftrennen zu können.

Insgesamt wurden bei Durchführung der TAP und der Herstellung der benötigten Puffer streng auf den Gebrauch von Handschuhen und die Verwendung von Reinstwasser geachtet, um Kontaminationen zu vermeiden.

2.16 Aufarbeitung von Proteinen zur massenspektrometrischen Analyse

2.16.1 Gelfärbungen

Die in dieser Arbeit abgebildeten Proteingele wurden mit Silbernitrat gefärbt.

Die Silberfärbung erfolgte nach einem leicht abgewandelten Protokoll nach Shevchenko et al. Benötigt wurden Fixierer I (50% Methanol, 5% Essigsäure) und II (50% Methanol), Thiosulfatreagenz (0,02% Natriumthiosulfat), Silbernitratreagenz (0,2% Silbernitrat, 0,02% Formaldehyd), Entwickler (3% Natriumcarbonat, 0,05% Formaldehyd, 0,05% Natriumthiosulfat) und Stop-Reagenz (5% Essigsäure). Fixierer I wurde zu Beginn für 20 min auf dem Schüttler inkubiert, gefolgt von Fixierer II zweimal jeweils 10 min. Vor Inkubation mit Thiosulfatreagenz für 1 min musste zunächst 10 min mit H₂O gewaschen werden. Dem Thiosulfatreagenz folgten drei kurze Waschschrte mit H₂O, bevor das Gel für 20 min mit dem fünffachen Gelvolumen an Silbernitratreagenz inkubiert wurde. Wieder folgten drei kurze Waschschrte, um dann das Gel zu entwickeln. Dieser Schritt wurde unter Beobachtung durchgeführt, damit bei zunehmender Färbung des Gels die Reaktion mit 5% Essigsäure abgestoppt werden konnte. Zwischen Entwickler und Stopp-Reagenz wurde dreimal kurz mit Wasser gewaschen.

2.16.2 In-Gel-Verdau mit Trypsin

Um die im Gel erkennbaren Proteinbanden mittels Massenspektrometrie zu analysieren, wurden die Gelbanden nach einem Protokoll von Shevchenko et al. aufgearbeitet. Dazu wurde das Gel zunächst dreimal für jeweils 10 min mit H₂O gewaschen. Danach wurden die entsprechenden Gelbanden aus dem Gel ausgeschnitten und in ca. 1 mm² große Stücke

zerkleinert. Nach dem Trocknen in der Vakuumzentrifuge für 45 min bis 1 h bei 55-60°C erfolgte das Waschen und Entfärben der Proben für 15 min bei Raumtemperatur in 40 µl einer 1:1-Lösung aus 30 mM Kaliumferricyanid/100 mM Natriumthiosulfat. Anschließend wurden sie viermal mit 80 µl einer 100 mM Ammoniumbicarbonatlösung gewaschen und dann für 45 min bei 55°C in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Im nächsten Schritt erfolgte die Reduktion und Alkylierung der Proteine bei 56°C für 15 min in 40 µl 10 mM DTT/100 mM Ammoniumbicarbonat. Nach Abkühlen wurde der Überstand verworfen und die Proben für 30 min im Dunkeln mit 55 mM Iodacetamid/100 mM Ammoniumbicarbonat versetzt. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur mit 40 µl Ammoniumbicarbonat wurden 40 µl Acetonitril hinzugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gelstücke erneut in der Vakuumzentrifuge bei 55°C getrocknet. Für den tryptischen Verdau der Proteine im Gel wurden 20 µg Trypsin in 1600 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat und 5 mM Calciumchlorid gelöst. Mit dieser Lösung wurden die Gelstücke für 45 min bei 4°C rehydratisiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Gelstücke ausreichend mit 50 mM Ammoniumbicarbonat und 5 mM Calciumchlorid überschichtet und für 16 h bei 37°C inkubiert.

Nach der Verdauung erfolgte die Extraktion der Peptide in mehreren Schritten mit 50% Acetonitril und 5% Ameisensäure. Um die Effektivität zu erhöhen, wurden die Proben nach jedem Extraktionsschritt für jeweils 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Das Extrakt wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.16.3 In-Lösungs-Verdau mit Trypsin

Alternativ zur Verdauung der Proteine im Gel wurde das konzentrierte Strep-Eluat ohne vorherige Fraktionierung im SDS-Gel analysiert.

Dazu wurde das Strep-Eluat nach der TAP wie in Kapitel 2.15 beschrieben konzentriert und in 8 M Harnstoff und 10 mM DTT für 1 h bei 30°C reduziert. Danach folgte eine Acetylierung mit 40 mM Iodacetamid für eine Stunde bei 30°C. Die Lösung wurde 1:10 mit 150 mM Ammoniumbicarbonat verdünnt und das Gemisch konzentriert. Das Konzentrat wurde mit 2,5 µg Trypsin in 50 mM Ammoniumbicarbonat/5 mM Calciumchlorid versetzt und für 16 h bei 37°C inkubiert.

2.16.4 Entsalzung

Nach dem Trypsinverdau wurden die Proben über eine C18 Filterspitze ZipTip (Millipore) entsalzt. Der Filter wurde zunächst mit 100% Acetonitril (ACN) konditioniert und dann dreimal mit 100 µl 4% ACN/0,1% Ameisensäure (FA) äquilibriert. Die Probe wurde mit 4% ACN und 0,1% FA versetzt und dann durch sechsmaliges Auf- und Abpipettieren auf den Filter geladen. Es folgte ein Waschschrift mit fünfmal 100 µl 4% ACN/0,1% FA und dann die Elution zunächst mit 60% ACN/0,1% FA und dann mit 99,9% ACN/0,1% FA. Das Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.17 Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie

Die durch Trypsin gespaltenen Proteine wurden mittels einer automatisierten nano-LC-MS/MS analysiert (UltiMate 3000 LC System, Dionex; LTQ-Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific). Für die automatisierte Steuerung des UltiMate 3000 LC Systems wurde die Chromeleon-Software (Version 6.80, SP2c) genutzt. Das Massenspektrometer wurde mit der Software XCalibur 2.0.7 gesteuert.

Bei aus dem Gel extrahierten Peptiden wurde die Probe zunächst auf eine mit C18-Umkehrphasenmaterial (Reprosil-Pur C18 AQ, 3 µm, Dr. Maisch) gefüllte Fused-Silica Vorsäule (100 µm x 2 cm) aufgetragen und entsalzt. Die Auftrennung und Elution der Peptidprobe erfolgte über eine 15-18 cm lange Fused-Silica Trennsäule (Innendurchmesser 75 µm) mit anschließender Elektrosprayionisation über einen SilicaTip Emitter (New Objectiv) direkt in das Massenspektrometer. Dazu wurde folgender Lösungsmittelgradient mit einer Flussrate von 230 nl/min eingesetzt: linearer Gradient von 4-60% Puffer B1 (84% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) über 60 min, 99% Puffer B1 über 5 min. Im Anschluss erfolgte die Äquilibrierung der Säule mit Puffer A (4% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure).

Für In-Lösung verdaute Proteine wurde zunächst eine SCX (*strong cation - exchange*)-Fraktionierung durchgeführt, um die Probenkomplexität im Vorfeld der massenspektrometrischen Analyse zu reduzieren. Hierzu wurde die Mikrofraktionierungsoption des WPS 3000 PL Probensammlers genutzt. Die Peptide wurden über eine 1 mm x 15 cm Polysulfoethyl-Aspartamid-Säule (Dionex) mittels eines 30 min Gradienten von 0-60% Puffer B2 (5 mM NaH₂PO₄, 15% Acetonitril, 500 mM NaCl, pH 2,7) bei einer Flussrate von 50 µl/min getrennt. Die Fraktionen wurden jeweils

über eine Minute gesammelt und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Im Anschluss erfolgte die weitere Analyse über nano-LC-MS wie oben beschrieben.

Die Elektrosprayionisierung (positiver Modus) der Peptide erfolgte mit einer Spannung von 2 kV. Die Temperatur der Transferkapillare betrug 140°C. Für die automatisierte datenabhängige MS-Analyse wurde die *dynamic-exclusion*-Funktion der Xcalibur-Software genutzt. Nach jedem MS-Scan (Masse/Ladungsverhältnis m/z 300-2000, Ionenfüllwert 1000000 Ionen, Auflösung $r = 60000$ bei $m/z = 400$) folgten MS/MS-Scans der 10 intensivsten Ionen. Parameter der MS/MS-Scans: normalisierte Kollisionsenergie der kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) von 35 U, einmalige Wiederholung in 20 s bei maximaler Massenabweichung von 10 ppm. Zur Identifizierung der Proteine wurden die MS/MS-Spektren mithilfe der *Uniprot human Taxonomie 9609*-Datenbank (83695 Einträge) über den *SEQUEST*-Algorithmus mit der Bioworks-Software (Thermo-Fisher Scientific) analysiert. Die eingestellten Parameter und Filter sind in Tab. 2 gelistet.

Tab. 2 Parameter zu Analyse der MS/MS-Scans

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</i> vs. <i>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

2.18 SILAC – *stable isotope labeling in cell culture*

Die Markierung des Proteoms einer Zelllinie mit einer isotoopen-markierten Aminosäure wurde eingesetzt, um mithilfe der Massenspektrometrie eine relative Quantifizierung der Proteine zweier unterschiedlich markierter Zelllinien durchführen zu können (Ong et al., 2002). Dazu wurden HEK293T-Zellen in der Zellkultur in [$U\text{-}^{13}\text{C}_6$]-L-Lysin- und [$U\text{-}^{13}\text{C}_6$]-L-Arginin-markiertem Medium kultiviert, um das Proteom der Zelle durch den Einbau der $^{13}\text{C}_6$ -markierten Aminosäuren zu kennzeichnen. Der Einbau des $^{13}\text{C}_6$ -Lysins und $^{13}\text{C}_6$ -Arginins führte bei Verwendung der Protease Trypsin zu Peptiden, die bei gleicher

Sequenz einen Massenunterschied von 6 Da aufwiesen. Dazu wurden verschiedene Zelllinien parallel in markiertem und unmarkiertem Medium kultiviert, wobei nach etwa fünf Zellteilungen von einem vollständigen Einbau der markierten Aminosäuren in das Proteom der Zelle ausgegangen werden konnte. Die Extrakte von markierten und unmarkierten Zellen wurden je nach Fragestellung vor oder nach der Aufreinigung nach dem TAP-Protokoll 1:1 gemischt. Das Verhältnis von markierten zu unmarkierten Proteinen wurde zur relativen Quantifizierung genutzt. Verglichen wurden zum Beispiel die bei der Proteinaufreinigung gewonnenen Interaktionspartner von AKT mit einer wildtypischen Kontrolle.

Zur Markierung der Proteine wurde das *SILAC™ Protein Identification and Quantitation Media Kit* genutzt. Die Herstellung des Mediums und die Kultivierung der Zellen erfolgten nach Herstellerangaben.

Für die in Tab. 6 angegebenen SILAC-Ratios der Proteine wurden zunächst die Ratios der nicht-redundanten Peptide gemittelt und diese wiederum für eine gesamte Proteinratio gemittelt und $\pm$ Standardabweichung angegeben.

Die Primärdaten der massenspektrometrischen Analysen der SILAC-TAPs wurden auf der Online-Plattform PRIDE (*PRoteomics IDentifications Database*) (<http://www.ebi.ac.uk/pride/>) veröffentlicht (Vizcaino et al., 2012). Kennnummer: PXD000197, DOI 10.6019/PXD000197. (PRIDE Zugangsnummern MBP-TAP I: 29063-29102, MBP-TAP II: 29103-29151, MAP-TAP I: 29152-29201, MAP-TAP II: 29202-29251)

2.19 Proximity Ligation Assay

Zur Identifizierung von Proteininteraktionen *in situ* wurde das *Duolink II Fluorescence-Kit* genutzt. Hierbei können interagierende Proteine immunhistochemisch mit dem Prinzip der *rolling-circle* Amplifikation nachgewiesen werden. Die Zellen wurden auf mit 0,2% Fibronektin oder 0,1% Gelatine beschichteten Objektträgern ausgesät und für vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in entsprechendem Medium inkubiert. Vor Beginn der Fixation wurden die Zellen zunächst kurz mit PBS gewaschen. Die Fixation erfolgte für 10 min mit 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren kurzen Waschschrift in PBS wurden die Zellen für 10 min mit 0,2% Saponin in PBS permeabilisiert. Danach erfolgte das PLA-Protokoll nach Angaben des Herstellers (Söderberg et al., 2008). Für die Auswertung wurden die Proben mit einem 60x Objektiv mikroskopiert. Bei fünf bis zehn

Bildausschnitten wurden jeweils die Punkte pro Zellkern ausgezählt. In denen in Kapitel 3.5-3.6 dargestellten Statistiken wurden die Anzahl der Punkte pro Zellkern der PLA-Proben mit der jeweiligen Anzahl der Punkte pro Zellkern der Kontrollen verglichen. Dabei wurde die jeweilige Punktzahl der PLA-Probe auf 100% gesetzt und die der Kontrollen prozentual darauf bezogen. Für das Kontrollexperiment wurde das jeweilige Protokoll mit nur einem primären Antikörper durchgeführt. Folgende primäre Antikörper wurden genutzt: AKT2-Maus, GAPDH-Kaninchen, EF2-Kaninchen und ENO1-Kaninchen in den Verdünnungen 1:100 bis 1:500.

2.20 α -Enolase-Aktivitätsassay

Um einen möglichen Einfluss von AKT auf die Aktivität der α -Enolase zu untersuchen, wurde diese mittels des *ENO1 Human Activity Assay Kit* gemessen. Hier wird zunächst die α -Enolase aus einem Zellextrakt über spezifische Antikörper aufgereinigt. Das isolierte Enzym wird mit seinem Substrat 2-D-Phosphoglycerat (*2DPG*) und den Enzymen Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase versetzt. Dadurch kann folgende Reaktion ablaufen: α -Enolase katalysiert 2DPG zu Phosphoenolpyruvat, diese wird von der Pyruvatkinase zu Pyruvat umgesetzt. In der anschließenden Reaktion des Pyruvats zu Lactat verbraucht die Lactatdehydrogenase NADH. Die NADH-Extinktion wurde bei 25°C im Photometer *Optima Fluostar* (BMG Labtech) bei 340nm gemessen. Die Steigung der Extinktion in mOD/min ist dann das Maß für die Enolase-Aktivität. Für die Durchführung des Assays wurden HEK293T Wildtyp-Zellextrakte in einer Proteinkonzentration von 10 μ g/ml eingesetzt. Zuvor wurden die Zellen 30 min mit dem spezifischen AKT-Inhibitor *CCT 128930* (10 μ M) (SelleckBio.com) (Yap et al., 2011) behandelt oder 10 Minuten mit Insulin stimuliert. Die spezifische Aktivität der Enolase wurde als Änderung der Menge 2DPG in pmol/min/ μ g Protein dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Transiente Expression von AKT2Tag

Um Proteininteraktionspartner von AKT2 identifizieren zu können, war es erforderlich, AKT2 als Fusionsprotein mit einem Doppeltag zu exprimieren. Das verwendete Tag (8kDa) besteht aus einem Flag-Tag, einem HA (*Hämagglutinin*)-Tag und einem StrepII-Tag. Dabei erlauben Flag- und StrepII-Tag eine Elution der Proteine unter nativen Bedingungen. Um die optimale Position für die Fusion des Tags mit der AKT2-Sequenz zu finden, wurden zwei Konstrukte entwickelt, die die Expression des Tags am C-terminalen bzw. am N-terminalen Ende von AKT2 erlauben. Ziel war es, eventuelle Funktionsbeeinträchtigungen der AKT2 durch das Tag zu minimieren.

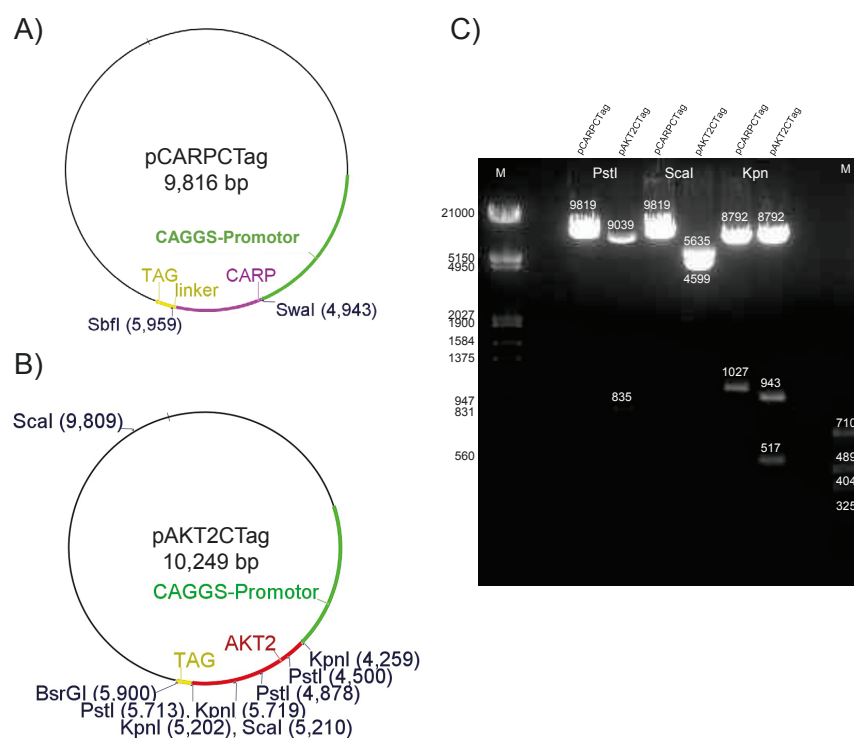


Abb. 5: Klonierung eines Vektors zur Expression von *AKT2* mit C-terminalem Tag.

A) Der Vektor pCARPCTag. Dieser Vektor wurde als Grundlage für die Fusion der AKT2-Sequenz mit dem TAP-Tag genutzt. Die Grundstruktur des Vektors wurde in Kapitel 2.10 eingehend erläutert. Sie gilt für alle gezeigten Vektoren dieser Arbeit und wurde im weiteren Verlauf nicht mehr eingezeichnet. Eingezeichnet sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Swa* I und *Sbf* I, die genutzt wurden, um die CARP-Sequenz aus dem Vektor zu entfernen.

B) Der Vektor pAKT2CTag. Das Gen *AKT2* mit dem C-terminalem Tag unterliegt der Kontrolle des CAGGS-Promotors. Gekennzeichnet wurden die Schnittstellen der Enzyme *Kpn*I, *Pst*I und *Scal* die zur Restriktionsanalyse verwandt wurden. Ebenso gekennzeichnet ist die Schnittstelle von *Bsr*GI, welche zur Klonierung des stabilen Expressionsvektors genutzt wurde.

C) Diagnostische Restriktionsanalyse der Vektoren pCARPCTag und pAKT2CTag mit *Pst*I, *Scal* und *Kpn*I. Die Fragmentgrößen sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

3.1.1 AKT2CTag-Expressionsvektor

Als Grundlage zur Klonierung des AKT2CTag Expressionsvektors diente der Vektor pCARPCTag (Abb. 5A) (Naguib, 2009). Die Grundstruktur dieses Vektors wurde im Kapitel 2.10 ausführlich beschrieben. Der Vektor wurde durch Restriktion mit *SwaI* und *SbfI* geschnitten und dadurch die CARP-cDNA deletiert. Die Restriktionsschnittstellen wurden zur Integration der AKT2-cDNA der Maus in den Vektor genutzt. Die cDNA wurde mit den Oligonukleotiden 759/760 (Tab.1, Kapitel 2.9) aus dem Vektor IRAVp968G0444D über PCR amplifiziert.

Die diagnostische Restriktionsanalyse des Vektors pAKT2CTAG (Abb. 5B) erfolgte mit den Restriktionsenzymen *KpnI*, *PstI* und *ScaI*. Die Enzyme haben jeweils eine (*ScaI*, *KpnI*) bzw. zwei (*PstI*) Schnittstellen in der AKT2-cDNA und keine Schnittstelle in der CARP-cDNA, sodass in der Analyse ein bzw. zwei Fragmente zusätzlich zu sehen sind. Bei der Analyse mit *PstI* entstanden drei Banden, bei 9039, 835 und 378 bp, wobei die kleinste Bande in dieser Abbildung nicht zu erkennen ist (Abb. 5C).

3.1.2 AKT2NTag-Expressionsvektor

Um die Expression von *AKT2* mit einem N-terminal gelegenen Tag zu ermöglichen, musste zunächst ein Vektor erzeugt werden, der die N-terminale Fusion von *AKT2* mit dem TAP-Tag erlaubte. Dazu wurde die TAP-Tag-Sequenz mittels PCR amplifiziert. Als Matrize diente der Vektor pAKT2CTag (Abb. 5B). Die verwendeten Oligonukleotide (Tab.1, Kapitel 2.9) enthielten zum einen im 3' Primer ein Startcodon (ATG) (Oligonukleotidnummer 781), ferner wurde das auf das CTag folgende Stopcodon deletiert (Oligonukleotidnummer 782). Dieses PCR-Produkt wurde in den Vektor pCAG (Abb. 6A), welcher durch Restriktion mit *HpaI* linearisiert wurde, integriert. Für die Fusion dieses N-terminalen Tags (Abb. 6B) mit der AKT2-Sequenz wurde zunächst die AKT2-Sequenz aus dem Vektor pAKT2CTag mit den Oligonukleotiden 759/784 (Tab.1, Kapitel 2.9) amplifiziert. Durch den 5' Primer 784 (Tab.1, Kapitel 2.9) wurde am C-terminalen Ende von AKT2 ein Stopcodon eingeführt (Abb. 6C). Der Vektor pCAGNTag (Abb. 6B) wurde nun, zur Integration dieses Amplifikats, erneut durch *HpaI*-Restriktion geöffnet.

Die Restriktionsanalysen der Vektoren pCAGNTag und pAKT2NTag (Abb. 6D-E) erfolgten mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *BamHI/HpaI* bei pCAGNTag sowie *PvuII* bei pAKT2NTag. Die Analyse der Vektoren pCAG und pCAGNTag mit *XbaI* erlaubte die Aussage über eine

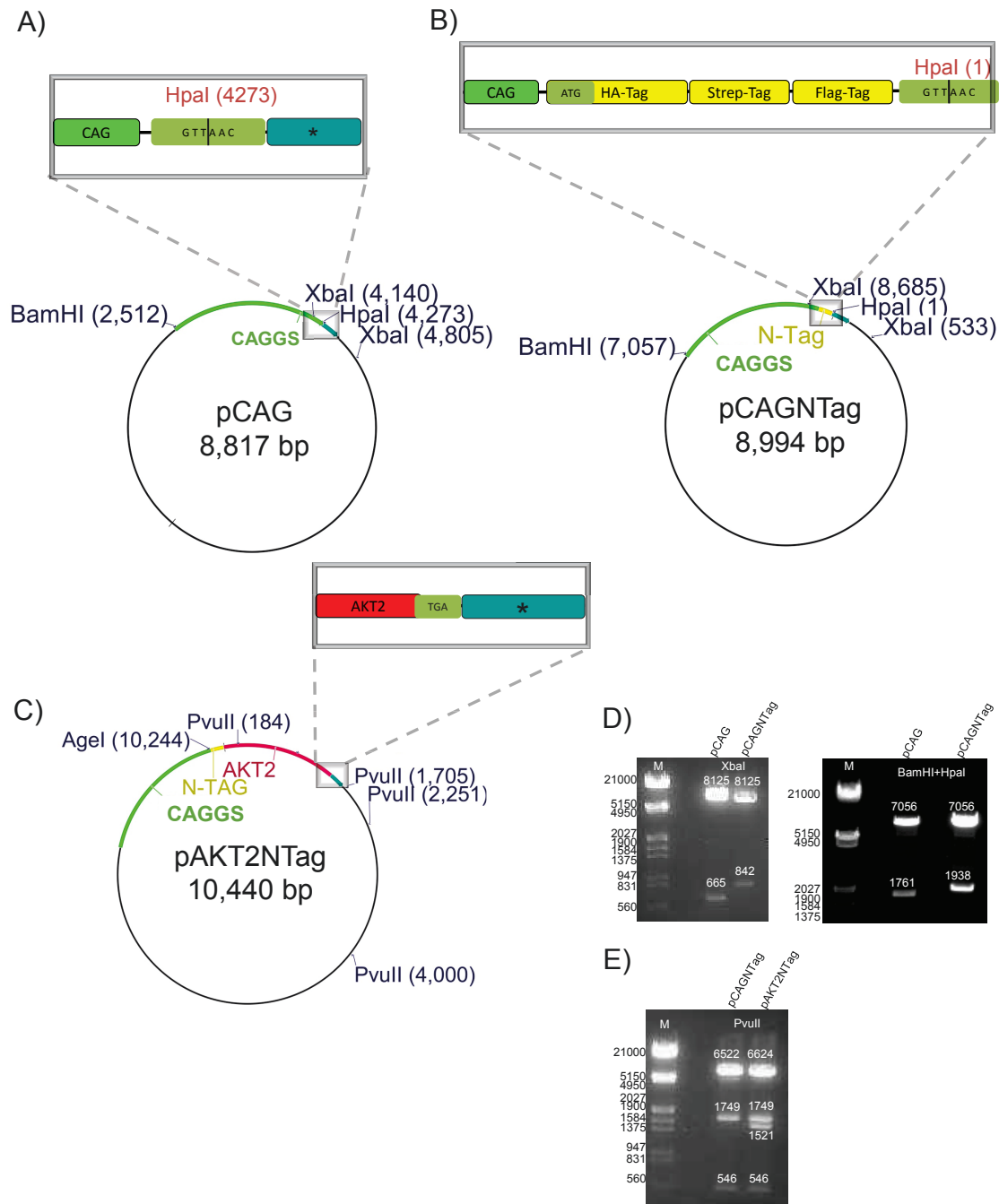


Abb. 6 Klonierung des Vektors zur Expression von *AKT2NTag*.

A) Der Vektor pCAG enthält die in Kapitel 2.10 erläuterte Grundstruktur (nicht eingezeichnet) mit dem CAGGS-Promotor. Eingezeichnet wurden die Schnittstelle von HpaI, welche zur Linearisierung genutzt wurde, und die Schnittstellen von XbaI und BamHI, welche bei der Restriktionsanalyse eingesetzt wurden.

B) Der Vektor pCAGNTag. In diesem Vektor liegt das TAP-Tag direkt hinter dem CAGGS-Promotor. Die Integration des AKT2 PCR-Fragments konnte nach Restriktion des Vektors mit HpaI erfolgen, sodass es zur N-terminalen Fusion der AKT2-Sequenz mit dem TAP-Tag kam. Eingezeichnet sind die Schnittstellen der Enzyme HpaI, sowie XbaI und BamHI, welche in der Restriktionsanalyse verwandt wurden.

C) Vektor pAKT2NTag. Unter der Kontrolle des CAGGS-Promotors wird AKT2 mit dem N-terminalen Tag exprimiert. Eingezeichnet sind hier die Schnittstellen des Enzyms PvuII, welches in der Restriktionsanalyse eingesetzt wurde. * Durch das C-terminal eingeführte Stopcodon in der AKT2-Sequenz wird die noch im Vektor vorhandene C-terminale Tag-Sequenz nicht exprimiert.

D) Diagnostische Restriktionsanalyse der Vektoren pCAG und pCAGNTag mit XbaI und BamHI/HpaI.

E) Analyse der Vektoren pCAGNTag und pAKT2NTag mit PvuII.

erfolgreiche Fragmentintegration, da sich das 665 bp große Fragment durch Integration der NTag-Sequenz auf 842 bp vergrößerte. Durch die Analyse mit BamHI/HpaI konnte man eine Aussage über die korrekte Orientierung des Fragments treffen, da sich bei falscher Orientierung die HpaI-Schnittstelle nicht regenerierte (Abb. 6D). Das Enzym PvuII hat eine Schnittstelle in der AKT2-cDNA, sodass bei dem Vektor pAKT2NTag im Vergleich zu pCAGNTag ein Fragment zusätzlich zu sehen war (Abb. 6E).

3.1.3 Nachweis der transienten Expression durch Western Blot Analyse

Um das rekombinante Protein nachzuweisen, wurden die neu klonierten Vektoren AKT2CTag und AKT2NTag mittels Lipofektamin transient in HEK293T-Zellen transfiziert.

Abb. 7A zeigt den Nachweis von rekombinantem AKT2CTag mit einem α -pan-AKT-Antikörper. Sowohl in Proteinextrakten transfizierter (CTag) als auch wildtypischer (WT) Zellen konnte das endogene AKT als Bande bei ca. 60 kDa detektiert werden. In den transient transfizierten HEK293T AKT2CTag-Zellen (CTag) zeigte sich eine zusätzliche Bande bei ca. 70 kDa, welche das getaggte AKT2 (tg AKT) darstellt. Ein vergleichbares Bild zeigt sich für AKT2NTag in Abb. 7B.

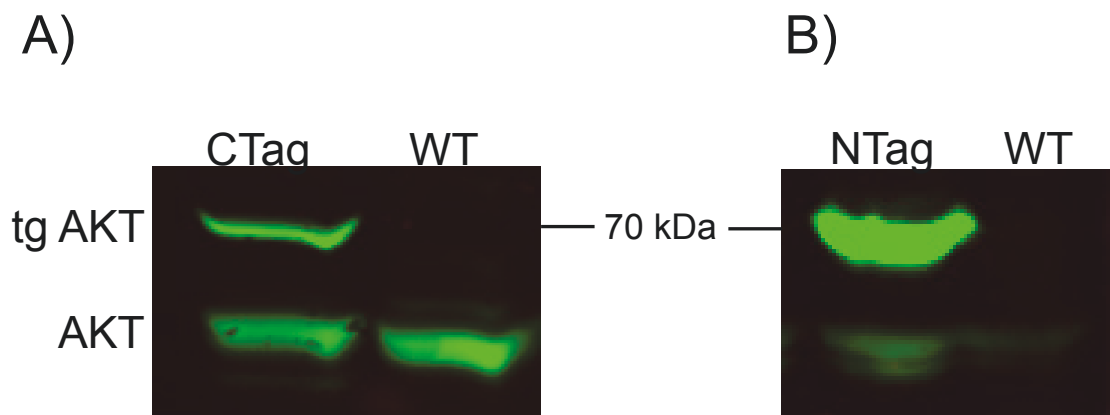


Abb. 7: Expressionkontrolle der rekombinanten AKT2-Proteine.

A) In dieser WBA wurde die Expression des rekombinanten C-terminal getaggten AKT2 in HEK293T-Zellen nachgewiesen. Verglichen wurden HEK293T Wildtyp-Zellen (WT) mit AKT2CTag transient transfizierten HEK293T-Zellen (CTag). Zum Nachweis des Proteins wurde ein α -AKT-Antikörper verwendet, der sowohl das endogene AKT (bei ca. 60 kDa) als auch das rekombinante AKT2CTag (bei ca. 70 kDa) detektiert.

B) Nachweis der erfolgreichen Expression von AKT2NTag in transient transfizierten HEK293T-Zellen. Die Zellextrakte wurden nach dem gleichen Protokoll wie in Abb. 7A analysiert.

3.1.4 Funktionale Untersuchung der rekombinanten Proteine bei transienter Expression

AKT2 ist eine Proteinkinase, die nach Stimulation mit IGF-1 oder Insulin durch Phosphorylierung aktiviert wird, während sie im inaktiven Zustand dephosphoryliert ist.

Um zu überprüfen, ob das getaggte AKT aktiviert und inaktiviert werden konnte, wurde in transient transfizierten HEK293T-Zellen zunächst das Phosphorylierungsniveau von AKT durch Serumentzug über Nacht auf ein Basalniveau reduziert. Dann erfolgte entweder eine Stimulation des IGF-Rezeptors durch IGF-1 oder eine Hemmung der PI3-Kinase durch Ly294002. Der Phosphorylierungsgrad an Serin 473 wurde dabei als Maß für die Aktivierung bzw. Hemmung von AKT2 genutzt und mittels eines phosphospezifischen Antikörpers untersucht.

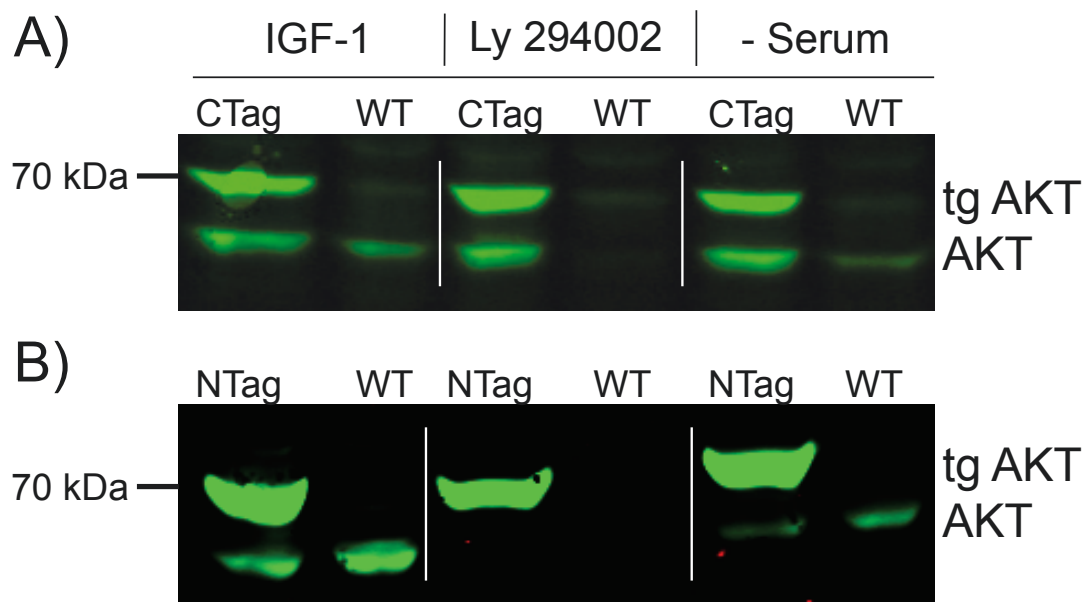


Abb. 8: Nachweis zur physiologischen Aktivität von getaggttem AKT2.

A) Western Blot Analyse von wildtypischen und transient transfizierten HEK293T AKT2CTag-Zellen. Die Zellen wurden jeweils mit IGF-1 oder Ly294002 behandelt, nachdem sie über Nacht in Serum-freiem Medium (-Serum) kultiviert wurden. Es wurde ein α -Phospho-AKT-Serin473-Antikörper (α -P-AKT-Ser473-AK) verwandt.

B) WBA von HEK293T WT- und AKT2NTag-Zellen. Die Versuchsbedingungen sind identisch zur Analyse von AKT2CTag-Zellen in Abb. 8A.

Abb. 8A zeigt den Nachweis der Phosphorylierung von AKT an Serin 473 in HEK293T Wildtyp- (WT) und AKT2CTag-Zellen. In WT-Zellen führte Serumentzug (-Serum) zu einer basalen AKT-Phosphorylierung (schwach grünes Signal bei 60 kDa), welche durch Inhibition der PI3-Kinase mit Ly294002 weiter reduziert werden konnte. Die Stimulation

mit IGF-1 hingegen führte zu einer Steigerung der AKT-Phosphorylierung an Serin 473. Im Gegensatz zu dieser regulierten Phosphorylierung von AKT in Wildtyp-Zellen zeigten endogene und getaggte AKT-Proteine in transient transfizierten Zellen eine konstant hohe Phosphorylierung (starke grüne Signale bei 60 und 70 kDa). Eine Reduktion durch Ly294002 bzw. Steigerung durch IGF-1 war nicht erkennbar.

Abb. 8B zeigt eine WBA nach identischer Versuchsanordnung mit HEK293T AKT2NTag-Zellen und kommt zu einem vergleichbaren Ergebnis.

Es findet sich also bei transienter Expression von C- und N-terminal getaggtten AKT2-Proteinen eine fehlende Regulierbarkeit der Phosphorylierung. Somit konnte die physiologische Funktion der getaggtten Proteine im Sinne von Phosphorylierung und Dephosphorylierung auf äußere Stimuli nicht nachgewiesen werden.

3.2 Transiente Überexpression von AKT2 ohne Tag

Es gibt zwei mögliche Ursachen für die mangelnde Stimulierbarkeit des rekombinanten Proteins nach transienter Transfektion. Zum einen könnte das Tag eine Funktionsbeeinträchtigung des Proteins hervorrufen. Allerdings ist das Tag mit 8 kDa im Vergleich zum Protein AKT2 recht klein. Außerdem zeigte sich sowohl bei C-terminaler als auch bei N-terminaler Position des Tags ein ähnlicher Effekt. Zum anderen könnte die starke Überexpression getaggtter Varianten von AKT2 nach transienter Transfektion Ursache für die fehlende Regulation sein.

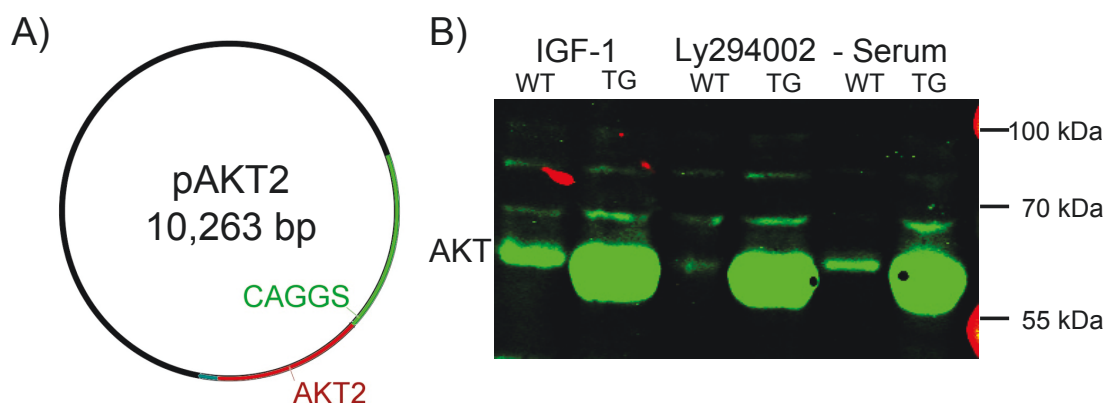


Abb. 9: Überexpression von AKT2.

A) Der Vektor pAKT2. Vektor zur Überexpression von AKT2 enthält die AKT2-cDNA ohne Tag unter Kontrolle des CAGGS-Promotors. Die AKT2-Sequenz enthält durch die PCR-Amplifikation ein Stop-Codon.

B) Die WBA zeigt Extrakte aus HEK293T Wildtyp-Zellen und transient mit dem AKT2 Überexpressionsvektor transfizierten HEK293T-Zellen. Zur Analyse wurde der α -P-AKT-Ser473-Antikörper genutzt.

Um dies zu prüfen, wurde ein AKT2-Überexpressionsvektor ohne Tag kloniert. Hierzu wurde der Vektor pCAG (Abb. 6A) durch Restriktion mit HpaI linearisiert. In diese Schnittstelle wurde eine AKT2-Sequenz integriert, die mittels PCR aus dem Vektor pAKT2CTag amplifiziert worden war. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden 759/784 (Tab. 1). Das 3' Oligonukleotid enthält ein Stopcodon, welches das fehlende Stopcodon der AKT2-Sequenz ergänzt. Dieser Vektor pAKT2 (Abb. 9A) wurde nun transient in HEK293T-Zellen transfiziert und die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, analysiert. Die Western Blot Analyse in Abb. 9B zeigt wie zuvor, dass das endogene AKT in Wildtyp-Zellen bei Serumentzug ein niedriges Phosphorylierungsniveau aufweist. Im Gegensatz dazu zeigte das überexprimierte AKT (TG) ein konstant hohes Phosphorylierungsniveau, welches durch Ly294002 oder IGF-1 nicht veränderlich war.

Diese Ergebnisse legten die Schlussfolgerung nahe, dass die mangelnde Stimulierbarkeit des rekombinanten Proteins nicht aus einer Funktionsbeeinträchtigung durch das Tag, sondern vielmehr aus der starken Überexpression nach transients Transfektion resultierte.

3.3 Stabile Expression von AKT2Tag

Aufgrund der fehlenden Regulierbarkeit des transient transfizierten Proteins bei starker Überexpression wurden stabile Zelllinien etabliert, bei denen ein moderates Expressionsniveau durch Integration des Transgens in das Wirtszellgenom erreicht werden sollte.

3.3.1 Puromycin-Resistenz AKT2CTag

Zur Etablierung von stabil *AKT2CTag* exprimierenden Zellen wurde in den Vektor pAKT2CTag ein Puromycin-Resistenzgen eingeführt. Das Puromycin-Resistenzgen steht unter Kontrolle des PGK-Promotors (Phosphoglyceratkinase-Promotor) und erlaubt nach lentiviraler Infektion und Integration der DNA eine Selektion der stabil infizierten Zellen mit Puromycin. Der Promotor und das Resistenzgen stammen aus dem Vektor pSico Puro (s. Kapitel 2.10) (Abb. 10A) und wurden nach Restriktion mit ScaI und EcoRI aus dem Vektor isoliert. Dann wurde der Vektor pAKT2CTag (Abb. 5A) durch Restriktion mit BsrGI linearisiert und das Resistenzgen integriert. Abb. 10B zeigt das Endprodukt, den Vektor pAKT2CTag Puro. Abb. 10C zeigt die diagnostische Restriktionsanalyse des Endprodukts pAKT2CTag Puro mit EcoRV und XhoI. pAKT2CTag hat keine EcoRV-Schnittstelle, sodass ein Fragment von ca. 10 kb entstand. Bei pAKT2CTag Puro liegt die

3 | Ergebnisse

EcoRV-Schnittstelle am Ende des integrierten Fragments, sodass durch diese Restriktionsanalyse sowohl die erfolgreiche Integration als auch die korrekte Orientierung des Fragments überprüft werden konnte.

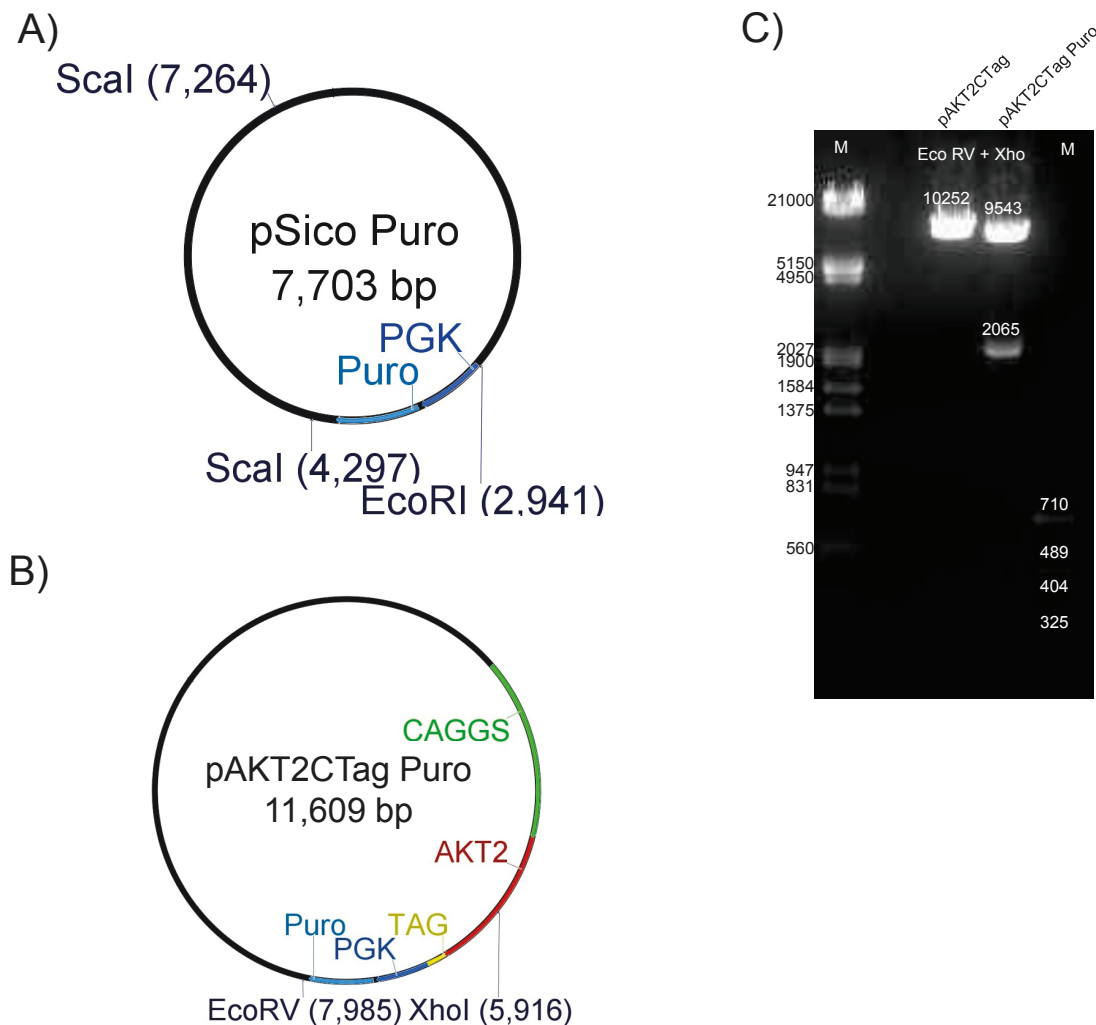


Abb. 10: Klonierung eines Puromycinresistenzgens in den Vektor AKT2CTag.

A) Der Vektor pSico Puro stammt von der Firma „addgene“. Durch Restriktion mit ScaI und EcoRI wurde das Fragment isoliert, das den PGK-Promotor und das Puromycinresistenzgen trägt.

B) Der Vektor pAKT2CTag Puro zur stabilen Infektion von HEK293T-Zellen. Das *AKT2CTag* wird vom CAGGS-Promotor kontrolliert und das Puromycin-Resistenzgen unter Kontrolle des PGK-Promotors gestellt. Eingezeichnet sind die Schnittstellen von EcoRV und XhoI, welche für die diagnostische Restriktionsanalyse genutzt wurden.

C) Diagnostische Restriktionsanalyse der Vektoren pAKT2CTag und pAKT2CTag Puro mit den Enzymen EcoRV und XhoI.

3.3.2 Puromycin-Resistenz AKT2NTag

Der Vektor pAKT2NTag wurde ebenfalls mit einer Puromycinresistenz versehen, um stabil AKT2NTag exprimierende Zellen zu generieren. Dazu wurde der Vektor pAKT2NTag (Abb. 6C) mit BsrGI und SbfI geschnitten, wodurch die noch verbliebene,

jedoch nicht exprimierte Tag-Sequenz am C-terminalen Ende entfernt wurde. In das Vektorrückgrat wurde dann das Puromycinresistenzgen mit Promotor integriert, deren Herkunft in Kapitel 3.3.1 beschrieben wurde. Die Korrektheit des Endprodukts pAKT2NTag Puro wurde durch Restriktionsanalyse mit AgeI überprüft. Durch die zusätzliche AgeI-Schnittstelle im PGK-Promotor entstand ein zweites, kleineres Fragment von 1823 bp, wodurch man sowohl die erfolgreiche Integration, als auch die korrekte Orientierung des Fragments erkennen konnte (Abb. 11).

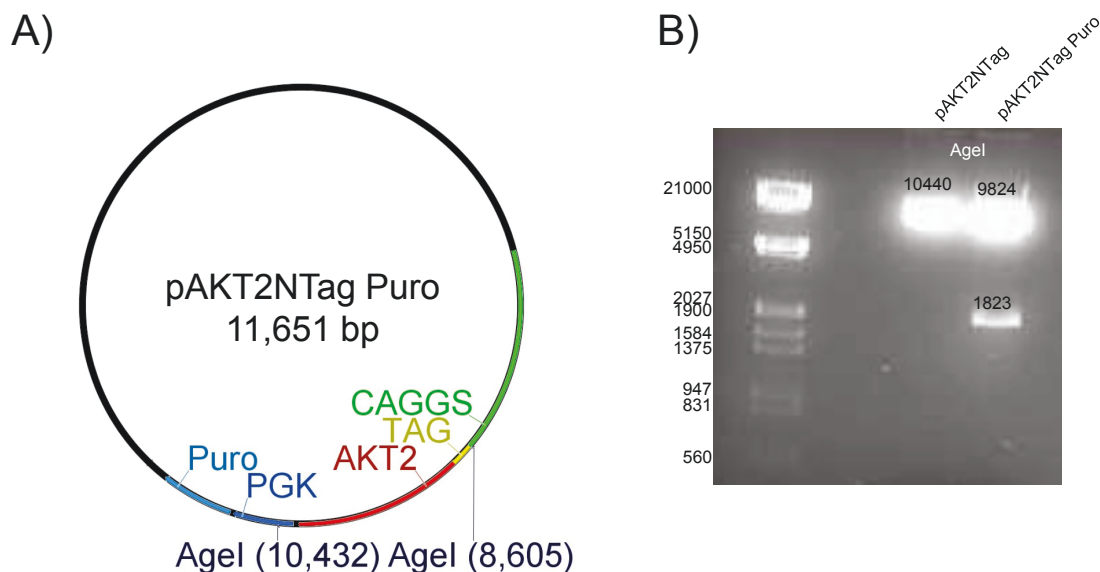


Abb. 11: Klonierung eines AKT2NTag-Vektors mit Puromycinresistenz.

A) Konstrukt zur stabilen Expression von *AKT2NTag*. Es enthält das Puromycinresistenzgen unter der Kontrolle des PGK-Promotors. Eingezeichnet wurde die Schnittstelle des Restriktionsenzym *AgeI*, welches für die diagnostische Restriktionsanalyse verwandt wurde.

B) Restriktionsanalyse der Vektoren pAKT2NTag und pAKT2NTag Puro mit *AgeI*.

3.3.3 Nachweis der stabilen Expression der rekombinanten Proteine mittels Western Blot Analyse

In den stabil infizierten HEK293T-Zellen wurden die rekombinanten Proteine mittels Western Blot Analyse untersucht (Abb. 12). Es wurden ein α -pan-AKT-Antikörper (grün) (Abb. 12A), ein α -AKT2-Antikörper (grün) (Abb. 12B) und ein α -HA-Tag-Antikörper (rot) (Abb. 12A+B) verwendet, um zum einen die Expression des rekombinanten Proteins im Vergleich zum Gesamt-AKT-Gehalt der Zellen und zum anderen die Expression im Vergleich zum AKT2-Gehalt der Zellen zu ermitteln. Abb. 12A zeigt, dass die Expression von AKT2CTag und AKT2NTag niedriger (NTag) bzw. etwa gleich hoch war, im Vergleich zur gesamten endogenen AKT Menge (α -pan-AKT-AK, grün). Analysen mit dem α -HA-Tag-Antikörper (rot), der nur das rekombinante Protein erkennt, zeigten, dass bei AKT2CTag, jedoch nicht bei AKT2NTag, eine verkürzte Formvariante auftrat, die

vermutlich durch proteolytische Spaltung entstanden war. Abb. 12B zeigt die Analyse unter gleichen Bedingungen mit dem α -AKT2-Antikörper. Dieser Antikörper detektierte bei 70kDa das rekombinante AKT2 als grünes Signal. Das Expressionsniveau lag jedoch im Vergleich zum endogenen AKT2 (grünes Signal bei ca. 60 kDa) deutlich höher. Bei der ebenfalls erfolgten Analyse mit dem α -HA-Antikörper (rotes Signal) zeigte sich wieder ein Abbauprodukt des getaggten AKT2 in der AKT2CTag-Zelllinie (CTag) als Signal bei ca. 57 kDa.

Weiterhin fiel auf, dass das C-terminal getaggte AKT2 (CTag) größer zu sein schien als das N-terminal getaggte AKT2 (NTag). Dies könnte auf ein unterschiedliches Laufverhalten der beiden getaggten Proteine im SDS-Gel zurückzuführen sein.

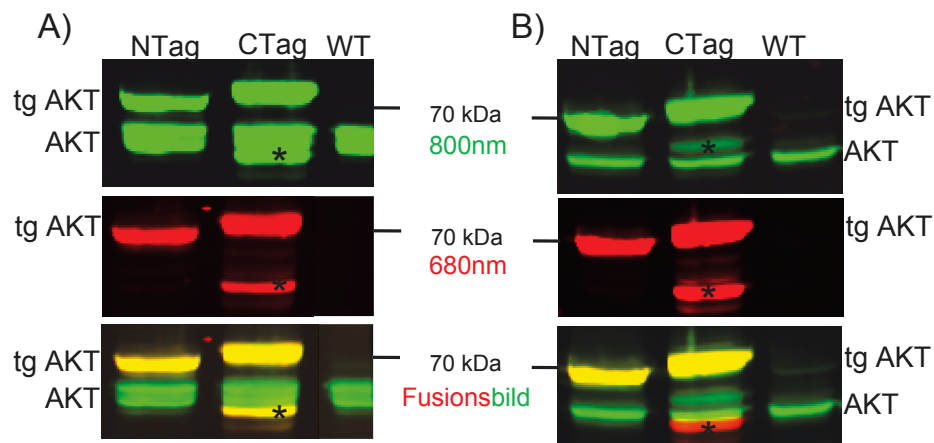


Abb. 12: Expressionsnachweis von stabil exprimiertem AKT2CTag und -NTag.

A) Nachweis der Expression von AKT2CTag und AKT2NTag in stabil infizierten HEK293T-Zellen im Vergleich zu HEK293T Wildtyp-Zellen mit einem α -pan-AKT-Antikörper (grün) und einem α -HA-Antikörper (rot). *Abbauprodukt von AKT2CTag.

B) Die gleichen Proben wie in A), diesmal jedoch mit einem α -AKT2-Antikörper (grün) und einem α -HA-Antikörper (rot) analysiert.

3.3.4 Funktionale Untersuchung der rekombinanten Proteine bei stabiler Expression

In den neu etablierten, *AKT2Tag* stabil exprimierenden HEK293T-Zellen wurde nun die Regulation der rekombinanten Proteine untersucht, um herauszufinden, ob bei niedriger liegendem Expressionsniveau von AKT2CTag und AKT2NTag eine authentische Regulation der Phosphorylierung erfolgte. Dazu wurden HEK293T AKT2CTag- und NTag-Zellen, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, zunächst unter Serumentzug kultiviert und dann mit Ly294002 oder IGF-1 behandelt.

Abb. 13A zeigt, dass in HEK293T AKT2CTag Zellen nach Inkubation in serumfreiem Medium (-Serum) ein basales Phosphorylierungsniveau nachweisbar war (α -P-AKT-

Ser473-Antikörper). Entsprechend dem niedrigeren Expressionsniveau war das Phosphorylierungssignal für das rekombinante Protein (Signal bei 70 kDa) schwächer als das endogener AKT-Kinasen (Signal bei 60 kDa). Ly294002 führte zu einer nahezu vollständigen Dephosphorylierung von endogenem wie rekombinantem AKT. Im Gegensatz dazu ergab eine Stimulation mit IGF-1 eine gesteigerte Phosphorylierung von endogenem und rekombinantem Protein. Die jeweils als Kontrolle gleichsinnig behandelten HEK293T Wildtypzellen zeigten ein gleiches Phosphorylierungsmuster von AKT.

Auffällig ist hier, dass bei AKT2CTag-Zellen, im Gegensatz zu AKT2NTag-Zellen, das Signal des rekombinanten AKT2 durch Hungern über Nacht fast komplett unterdrückt werden konnte. Bei endogenem AKT war dies jedoch nicht der Fall. Dies bedingte sich aus dem unterschiedlichen Expressionsniveau von AKT2CTag und -NTag.

Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass bei stabiler Expression von *AKT2Tag* die Regulation des Proteins in Form von Phosphorylierung und Dephosphorylierung erhalten blieb. Um in weiteren Experimenten die Funktion von AKT2CTag und -NTag zu untersuchen, wurde analysiert, ob deren Expression die Phosphorylierung des Substrats GSK3 β beeinflusst. GSK3 β wird von AKT an Serin 9 phosphoryliert und damit inaktiviert. (Abb. 13B). Die Expression der rekombinanten Proteine führte allenfalls zu einer gering verstärkten Phosphorylierung der GSK3 β .

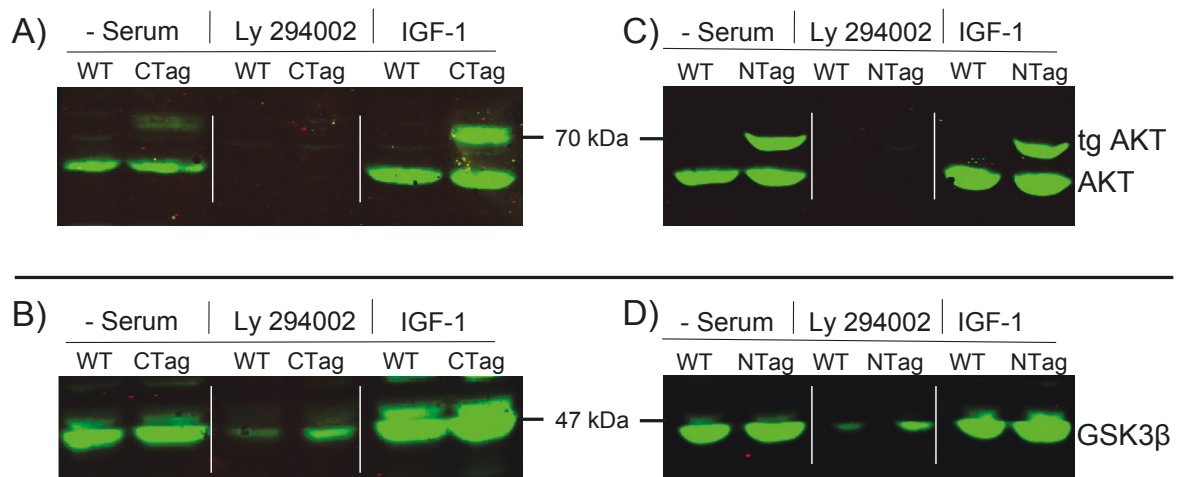


Abb. 13: Funktionsanalyse von stabil exprimiertem AKT2CTag und NTag.

A) WBA von HEK293T WT-Zellen und AKT2CTag-Zellen mit einem α -P-AKT-Ser473-Antikörper. Die Zellen wurden zunächst in der Zellkultur über Nacht in serumfreiem Medium gehungert, am nächsten Morgen wurde ein Teil der Zellen mit Ly294002 behandelt und ein Teil mit IGF-1 stimuliert.

B) WBA von HEK293T AKT2CTag-Zellen und HEK293T WT-Zellen mit einem α -P-GSK3 β -Antikörper.

C) WBA nach gleichen Bedingungen wie in A mit AKT2NTag-Zellen.

D) WBA nach gleichen Bedingungen wie in B mit AKT2NTag-Zellen.

3.4 Suche nach AKT2-Bindungspartnern mittels Tandem Affinitätsaufreinigung

Die zuvor etablierten, stabil *AKT2Tag* exprimierenden Zelllinien wurden nun genutzt, um rekombinantes AKT2 mit seinen Bindungspartnern mittels Tandem Affinitätsaufreinigung (TAP) aus der Zelle aufzureinigen.

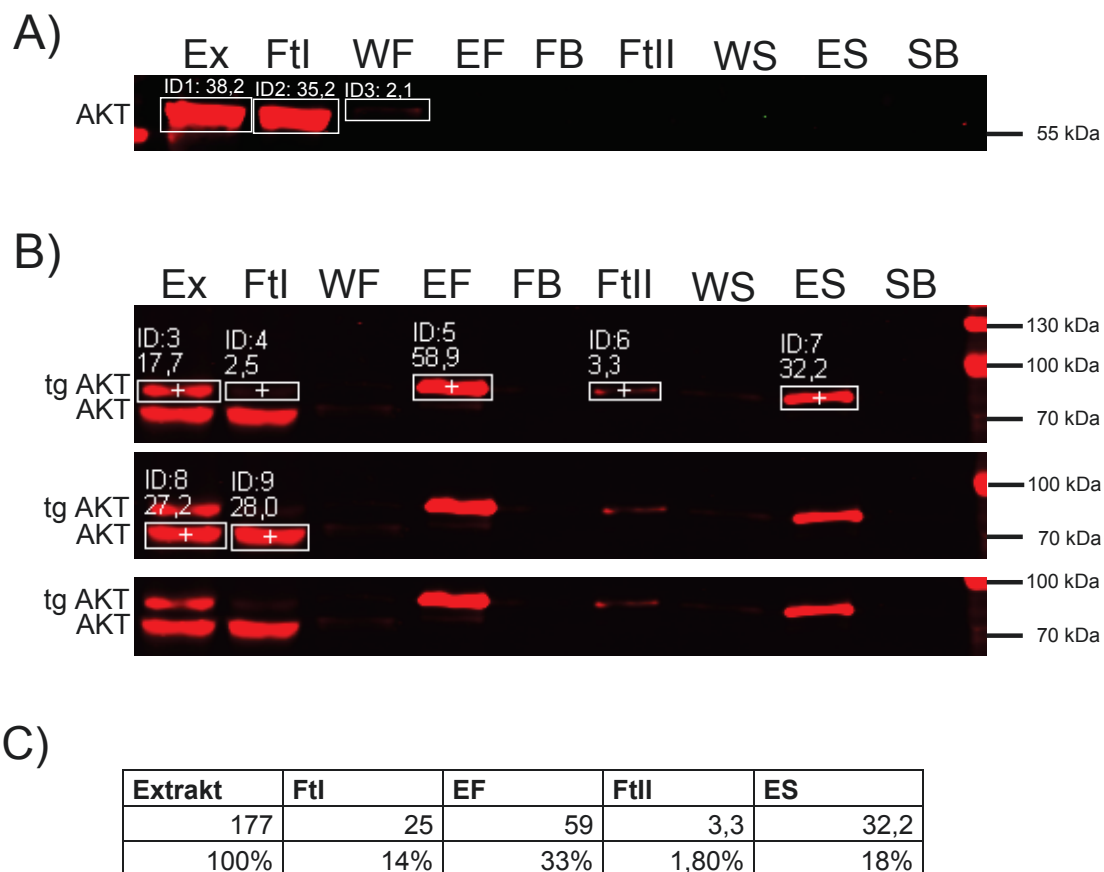


Abb. 14: Western Blot Analyse der Fraktionen einer TAP.

A) Endogenes AKT in den Fraktionen einer Aufreinigung von Wildtypextrakt. Die Intensitäten der Banden wurden mit angegeben.

B) Endogenes und rekombinantes AKT in den Fraktionen einer Aufreinigung von AKT2Tag-Zellextrakt. In den beiden oberen Abbildungen sind die Intensitäten der Banden angegeben. Aufgrund technischer Gegebenheiten wurden bei den Fraktionen Extrakt (Ex) und Durchfluß (Ftl) ein Zehntel der Menge im Vergleich zu den anderen Fraktionen aufgetragen.

C) Effizienz einer TAP-Aufreinigung. Durch Messungen der Intensität der Signale in der Western Blot Analyse wurde die ungefähre Proteinausbeute einer TAP berechnet.

Abb. 14 zeigt exemplarisch für alle TAPs Western Blot Analysen, bei denen das AKT2-Protein in den einzelnen Fraktionen der Aufreinigung mit einem α -pan-AKT-Antikörper nachgewiesen wurde. Abb. 14A zeigt die Fraktionen nach Aufreinigung der WT-Extrakte. Das endogene AKT-Protein findet sich nur in den Fraktionen Extrakt (Ex) und Durchfluß I (Ftl), sowie zu einem geringen Anteil in der Waschfraktion (WF). Eine Anreicherung in

den Flag- und Strep-Eluaten (EF, ES) zeigt sich hingegen nicht. In Abb. 14B detektiert der α -pan-AKT-Antikörper im Zellextrakt der AKT2Tag-Zellen (Ex) eine Doppelbande, welche endogenes AKT und rekombinantes AKT2Tag darstellen. In der Ftl-Fraktion zeigt sich fast nur noch endogenes AKT, welches nicht an die Flag-Beads gebunden hat. Das AKT2Tag-Protein wurde daher nahezu vollständig an die α -Flag-Sepharose gebunden. Weiterhin sieht man eine Anreicherung von AKT2Tag in den Fraktionen Flag- und Strep-Eluat (EF, ES). Die Intensität der Banden wurde gemessen, wobei zu beachten ist, dass die Fraktionen Ex und Ftl aus technischen Gründen nur zu einem Zehntel im Verhältnis zu den anderen Fraktionen aufgetragen wurden. Somit errechnet sich aus den Intensitäten von Ex, EF und ES ein Verhältnis von 1 : 1/3 : 1/2 (Abb. 14C). Im Strep-Eluat befindet sich also 1/5 bis 1/6 der Ausgangsmenge des AKT2Tag-Proteins.

3.4.1 Vergleich von AKT2CTag und AKT2NTag bei der Tandem Affinitätsaufreinigung

Da sowohl C-terminal als auch N-terminal getaggt AKT2 zur Tandem Affinitätsaufreinigung zur Verfügung standen, wurde die Effizienz beider Konstrukte bei der Aufreinigung miteinander verglichen. Hierzu wurde die Reinigung aus Proteinextrakt von stabil AKT2NTag, bzw. CTag exprimierenden Zellen und von HEK293T Wildtyp-Zellen als Negativ-Kontrolle verglichen. Die bei der Aufreinigung gewonnen Eluate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung analysiert.

Abb. 15 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung, bei dem jeweils Eluate von TAPs mit AKT2CTag-, AKT2NTag- und HEK293T WT-Zellen aufgetragen wurden. Die Gelspur links (WT) zeigt die Eluate der wildtypischen Zellen. Erwartungsgemäß ließen sich hier keine Proteine anfärben. Die Eluate von AKT2CTag (mittlere Spur) und AKT2NTag (rechte Spur) zeigen als prominenteste Bande bei ca. 70 kDa das getaggte AKT2. Bei AKT2CTag findet sich ca. 10 kDa darunter eine weitere prominente Bande, welche mittels MS-Analyse als Abbauprodukt von AKT2CTag identifiziert wurde und auch schon in der Western Blot Analyse detektiert werden konnte (Abb. 12). Neben dem getaggtten Protein finden sich in beiden Proben weitere koeluierte Proteine. Dabei stellte sich das Bandenmuster zwischen AKT2NTag und -CTag als heterogen dar. Die TAP mit AKT2CTag-Zellen wurde wiederholt durchgeführt (n=5), wobei sich jedes Mal mindestens eine prominente AKT2Tag-Abbaubande finden ließ. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf die Aufreinigungen nur noch mit AKT2NTag exprimierenden Zellen

3 | Ergebnisse

durchgeführt. Die bei den TAPs mit AKT2NTag gefundenen Proteine sind unter TAP Nr. *I* und *II* in Tab. 3 aufgeführt.

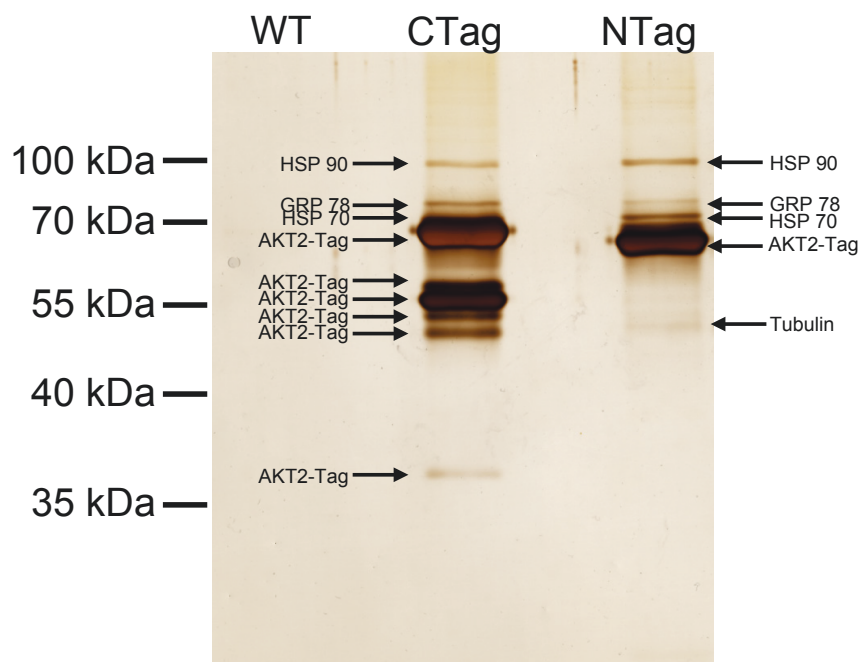


Abb. 15: TAP zum Vergleich der rekombinanten AKT2-Proteine. Direkter Vergleich von AKT2CTag und AKT2NTag in einer TAP. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Zellen dem gleichen Aufreinigungsprotokoll unterzogen. n=2

3.4.2 Identifizierung von AKT2NTag-Bindungspartnern

Auf Basis der oben erläuterten Ergebnisse wurden weitere Aufreinigungen mit der AKT2NTag-Zelllinie durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Gelelektrophorese und Silberfärbung der Gele, sowie massenspektrometrischer Analyse der koeluierten Proteine.

Abb. 16 zeigt SDS-Polyacrylamidgele nach Silberfärbung von TAPs mit AKT2NTag-Zellen. Als prominente Bande bei 70 kDa zeigte sich jeweils AKT2NTag. Es ließen sich weitere koeluierte Proteine anfärben. Wie auch im Vergleich mit Abb. 15 zu sehen ist, weist das Bandenmuster der interagierenden Proteine von TAP zu TAP eine Variabilität auf.

Zur Identifizierung der Proteine wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Häufig konnten dabei Heat Shock Proteine wie HSP90, HSP70 oder GRP78, oder aber auch Tubulin identifiziert werden, welche auch als prominente Banden im Gel zu sehen waren. Bei der Analyse der etwas schwächer angefärbten Bande bestätigte sich der optische Eindruck einer Variabilität der koeluierten Proteine. Die hier identifizierten Proteine konnten nur in einigen TAPs gefunden werden oder wurden teilweise nur einmalig detektiert. Tab. 3 zeigt die bei den ersten vier TAPs identifizierten Proteine

3 | Ergebnisse

Tab. 3: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der TAPs mit AKT2NTag (Gele aus Abb. 15 und Abb. 16). Das Molekulargewicht ist näherungsweise aufgeführt. Es wurde die Anzahl redundanter Peptide angegeben. Einschlusskriterien für aufgeführte Proteine waren mehr als drei unterschiedliche, nicht redundante Peptide. Grau markierte Proteine wurden in diesen vier TAPs jeweils nur einmal gefunden.

AKT2NTag-TAPs I-IV		Peptide (P) & Aminosäuresequenzabdeckung in % (AS SA%)								MW (kDa)
		I		II		III		IV		
Proteine		P	AS SA%	P	AS SA%	P	AS SA%	P	AS SA%	
Heat Shock Protein 90 kDa										
	Heat shock protein HSP90-α	14	9,3	7	5,7	14	14,8	44	19,9	84
	Heat shock protein HSP90-β	7	8,7	2	2,1	6	10,9	32	12,8	83
Cdc 37		x	x	11	23,3	19	26,2	35	25,1	44
Endoplasmin		x	x	x	x	8	5,2	x	x	92
Heat Shock Protein 70 kDa										70
	Heat shock 70 kDa protein 1	x	x	23	26,7	6	14	62	37,8	70
	Heat shock cognate 71 kDa protein	34	28,2	54	30,8	-	-	50	35,3	70
	Heat shock 70 kDa protein 1L	6	6,2	21	5,8	12	5,9	41	16,4	70
	Heat shock-related 70 kDa protein 2	12	8,4	10	7,4	-	-	41	10,5	70
78 kDa glucose regulated protein		31	36,5	x	x	26	39	39	39,1	72
Kinesin like protein		x	x	x	x	99	51,3	x	x	119
Elongationsfaktor 2		x	x	x	x	18	15	x	x	95
Splicing factor U2AF 65 kDa subunit		x	x	x	x	13	21,3	x	x	53
Elongationsfaktor 1α		x	x	12	17,3	30	30,5	4	x	50
Tubulin										
	Tubulin α-1A chain	11	20,6	18	31	36	44,8	15	18	50
	Tubulin β-chain	6	9,9	8	9,9	10	16	14	9,9	50
	Tubulin β-2A chain	10	15,5	17	24,5	22	36,2	16	15,7	50
	Tubulin β-2C chain	8	7,4	8	10,8	8	16,9	14	7,4	50
	Tubulin β-1 chain	9	6,2	12	6,4	17	6,4	21	6,4	50
α-Enolase		x	x	x	x	18	35,7	x	x	47
Creatin Kinase B-Typ		x	x	x	x	10	34,6	x	x	42
Methylosom Protein 50		x	x	x	x	12	38,9	x	x	36
Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase		x	x	8	12,8	10	22,1	x	x	36
60S acidic ribosomal protein		x	x	x	x	21	43,2	x	x	34
Putative heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A		x	x	x	x	27	28,9	x	x	34
40S ribosomal protein		x	x	x	x	14	38,7	x	x	26
Cleavage and polyadenylation specificity factor su 5		x	x	x	x	14	41,4	x	x	26
BTB/POZ domain-containing protein		x	x	x	x	18	35,9	x	x	26
Peroxiredoxin-1		x	x	x	x	7	20,1	x	x	22
60S ribosomal protein		x	x	x	x	14	37,6	x	x	20
Splicing factor, arginine/serine-rich 3		x	x	x	x	10	38,4	x	x	19
ANKRD26-like family C member 1A		x	x	8	4,1	6	4,5	x	x	120
Actin, aortic smooth muscle		x	x	14	19,4	x	x	x	x	41
Ankyrin repeat domain-containing protein 1		x	x	11	17,9	x	x	x	x	36
Triosephosphate isomerase		x	x	5	16,1	x	x	x	x	26
ATP Synthase subunit β, Mitochondrial		x	x	6	15,3	x	x	x	x	56,5
Lactat Dehydrogenase B Kette		x	x	14	25,8	x	x	x	x	36,6
Lactat Dehydrogenase A Kette		x	x	6	11,7	x	x	x	x	36,6
Protein Arginin N-Methyltransferase 5		x	x	x	x	4	4,9	x	x	72
Nucleolin		x	x	x	x	9	6,8	x	x	76
Importin		x	x	x	x	10	8,3	x	x	119

(Gele aus Abb. 15 und Abb. 16), wobei die einmalig gefundenen Proteine grau unterlegt sind. Proteine, die nach Auswertung aller durchgeführter TAPs (n=6) nur jeweils einmal gefunden wurden, wurden als mögliche Bindungspartner nicht weiter berücksichtigt. Tab. 5 zeigt eine Übersicht.

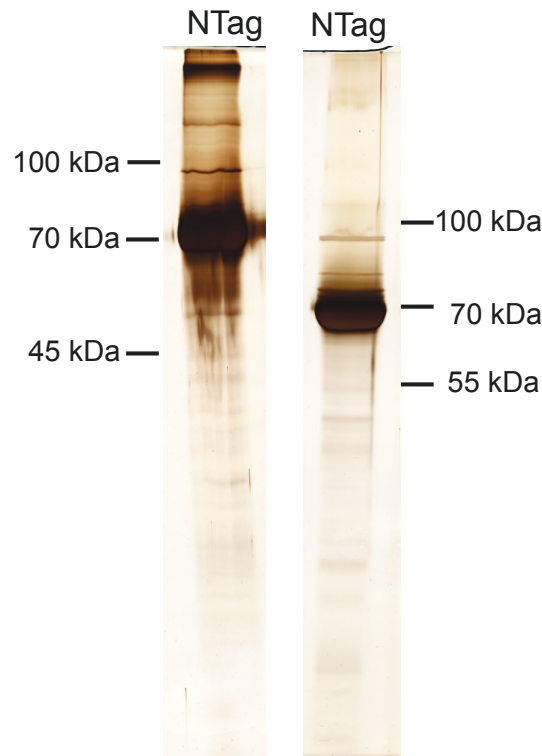


Abb. 16: Beispielhafte Proteingele mit Strep-Eluaten von AKT2NTag-TAPs nach Silberfärbung. Die hier identifizierten Proteine finden sich in Tab. 3 unter TAP Nr. *III* und *IV*.

3.4.3 Vergleich der interagierenden Proteine bei unterschiedlicher Aktivität von AKT2

Um einen möglichen Einfluss des AKT-Phosphorylierungsgrades auf die AKT2-Proteininteraktionen zu untersuchen, wurden die AKT2NTag exprimierenden Zellen vor der Aufreinigung mit Insulin stimuliert oder mit Ly294002 zur Inhibition des PI3Kinase-Signalwegs behandelt. Abb. 17 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung, auf dem die Eluate der TAP nach Inhibition (Ly) und Stimulation (Ins) von AKT2NTag-Zellen sowie das Eluat der Negativkontrolle (WT) aufgetragen wurden. Bei den Proben der AKT2NTag-Zellen zeigt sich eine prominente AKT2NTag-Bande bei 70 kDa sowie eine Vielzahl koelutierter Proteine. Das Bandenmuster zeigt, im Vergleich mit vorangegangenen TAPs, die schon bekannte Variabilität. Bei einem rein optischen Vergleich zwischen

3 | Ergebnisse

Stimulation und Inhibition scheinen die koeluierten Proteine jedoch weitgehend identisch, was sich auch in der massenspektrometrischen Analyse bestätigen ließ (Tab. 4).

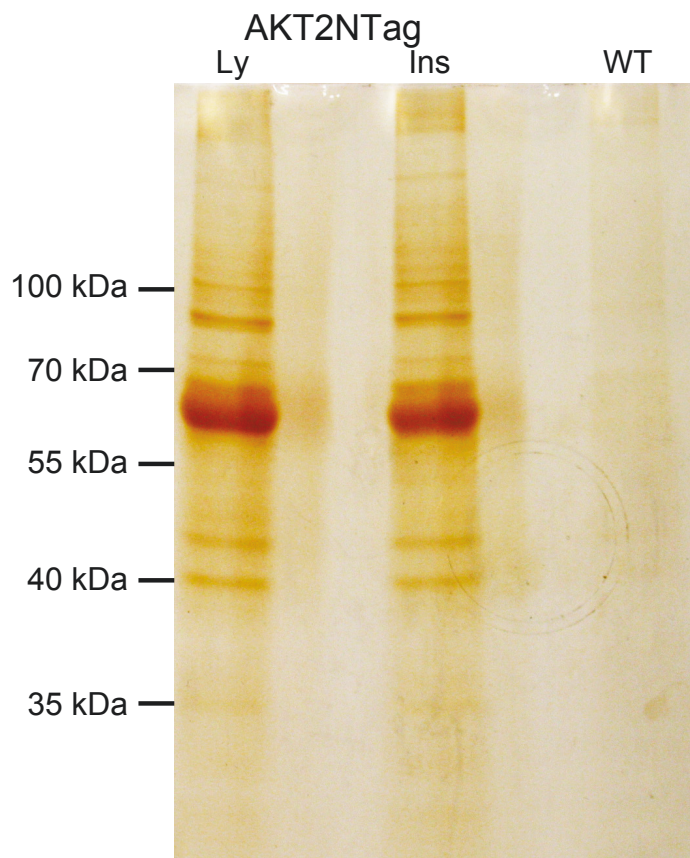


Abb. 17: Silbergel einer TAP mit AKT2NTag nach Behandlung der Zellen mit Insulin (Ins) und Ly294002 (Ly). HEK293T WT-Zellen (WT) wurden demselben Aufreinigungsprotokoll unterworfen. Die hier identifizierten Proteine sind in Tab. 4 gelistet.

Bei der Probe der HEK293T WT-Zellen ließen sich erwartungsgemäß keine Proteine anfärben. Um dennoch eine korrekte Analyse der möglichen, unspezifisch bindenden Proteine vorzunehmen, wurde hier exemplarisch, parallel zu den Banden der AKT2NTag-Eluate, eine massenspektrometrische Analyse des Wildtypeluats vorgenommen. Tab. 4 zeigt die Ergebnisse der massenspektrometrischen Messung. Es zeigt sich, dass ein Großteil der in den AKT2NTag-Proben gefundenen Proteine auch in der WT-Probe detektiert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass trotz der negativen Ergebnisse in der Silberfärbung eine minimale Menge der Proteine auch unspezifisch aus den nicht-transfizierten Zellen in den Gelen nachweisbar ist. Um eine quantitative Aussage darüber treffen zu können, ob es bei der Expression des AKT2NTags zu einer spezifischen Anreicherung von Proteinen kommt, wurden aus den erhaltenen Daten zwei Kriterien genauer analysiert:

3 | Ergebnisse

1. Zahl der identifizierten Peptide (Vergleich WT/AKT2NTag).
2. Peak-Integrale von je drei identifizierten Peptiden.

Bis auf die Acetyl-CoACarboxylase fanden sich deutlich mehr Peptide in den AKT2NTag-Proben als in der wildtypischen Probe, sodass dies auf eine spezifische Interaktion hindeutete (Tab. 4). Da es hier jedoch auch aufgrund der Aufarbeitung der Proben zu Variabilitäten kommen kann, wurden in einem weiteren Schritt für einige Proteine, bei jeweils drei gefundenen Peptiden, die Intensitäten des jeweiligen Peaks im Chromatogramm untersucht. Die Intensität berechnete sich durch Integration der Peakfläche.

Tab. 4: Identifizierte Interaktionspartner aus einer TAP nach Stimulation und Inhibition der Zellen. Die entsprechenden Gelbanden wurden auch aus der Wildtypprobe extrahiert. Die in den 3 Proben gefundenen Peptidanzahlen wurden gelistet, um die mengenmäßige Verteilung zwischen Kontrolle und Proben zu erfassen. x: Protein wurde nicht detektiert.

AKT2Ntag „Stimulation“		Peptide (P) & Aminosäuresequenzabdeckung in % (AS SA%)					MW (kDa)
		WT	Ly		Ins		
		P	P	AS SA %	P	AS SA %	
Heat Shock Protein 90 kDa							
	Heat shock protein HSP90-α	12	33	27,4	40	28,4	84
	Heat shock protein HSP90-β	4	11		23	26,8	83
Cdc 37		-	9	17,7	11	25,7	44
78 kDa glucose regulated protein		22	36	43,3	34	40,2	72
Heat Shock Protein 70 kDa							70
	Heat shock 70 kDa protein 1	18	28	42,6	27	37,1	70
	Heat shock cognate 71 kDa protein	10	32	46,6	44	47,8	70
	Heat shock 70 kDa protein 1L	15	25	24,6	19	18,3	70
	Heat shock-related 70 kDa protein 2	7	8	7,8	9	10,5	70
Stress-70 protein, mitochondrial		17	36	31,5	24	28,4	73
Filamin A		x	40	15,7	14	6,1	280
Filamin B		x	x	x	10	3,7	278
Fatty acid synthase		x	14	7	7	2,9	273
Acetyl CoA-Carboxylase		47	40	19,4	2	0,8	265
Clathrin heavy chain		4	40	30,3	35	22,75	191
Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase		x	6	5,3	10	7,8	170
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A		x	x	x	8	7,1	166
Structural maintenance of chromosomes protein 4		x	x	x	11	8,5	147
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1		x	20	22,9	26	28,7	117
Neutral α-Glucosidase AB		5	25	27,1	34	36,9	106
α-actinin-1		x	16	16,9	24	22,5	102
Elongationsfaktor 2		17	43	46,4	59	51,4	95
Endoplasmin		9	25	32,8	37	38,6	92
Protein Arginin N-Methyltransferase 5		12	13	24,5	11	19,3	72
Protein Disulfide Isomerase A4		11	26	29,8	22	28,2	72
Ezrin		x	20	24,7	17	21,3	69
α-Enolase		32	47	61,3	45	51,1	47
Elongationsfaktor 1α		13	11	26	16	32,2	50
Eukaryotic translation initiation factor 4B		15	12	34	20	16,8	46
Phosphoglycerate Kinase 1		6	20	34	24	34,3	44
Actin, cytoplasmic		x	10	13,3	6	13,3	41
Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase		4	14	49,6	14	51,3	36
L-Lactat Dehydrogenase, B Kette		5	7	17,1	6	19,5	36
Malat Dehydrogenase, Zytoplasmatisch		x	11	39,5	10	41,6	36
Malat Dehydrogenase, Mitochondrial		3	11	31,9	12	43,2	35

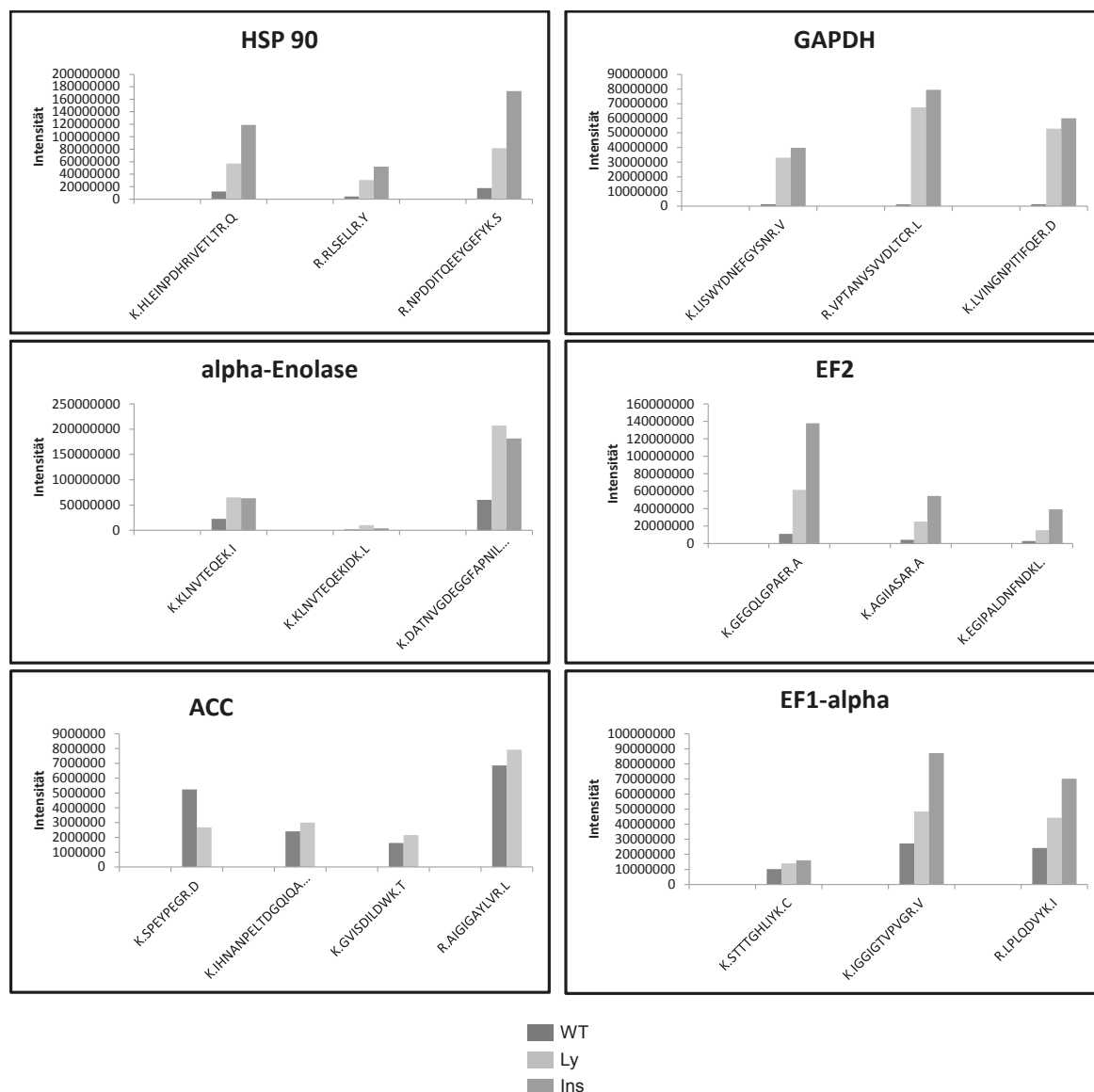


Abb. 18: Vergleich von Peakintensitäten für jeweils drei Peptiden aus den drei unterschiedlichen Proben WT, Ly294002 (Ly) und Insulin (Ins) für die Proteine HSP90, GAPDH, α -Enolase, EF2, ACC und EF1- α .

Abb. 18 zeigt die Peakintensitäten für jeweils drei Peptide von Hitzeschockprotein 90 kDa (HSP90), Elongationsfaktor2 (EF2), Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH), α -Enolase, AcetylCoA-Carboxylase (ACC) und Elongationsfaktor 1 α (EF1 α). Da für die ACC in der mit Insulin behandelten Probe nur zwei Peptide gefunden wurden, wurden hier nur WT und Ly-behandelte Proben analysiert. Für die Peptide von HSP90, EF2, α -Enolase und GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) konnte gezeigt werden, dass die Peakintensitäten der AKT2NTag-Proben 3 bis 80x höher als die der WT-Probe lagen. Bei den Peptiden der ACC hingegen zeigte sich annähernd ein 1:1-Verhältnis. Auch die Peptide von EF1 α zeigten in der AKT2NTag-Probe nur eine zwei- bis dreimal höhere Intensität als die WT-Probe. Daraus konnte man schließen, dass ACC und EF1 α eher

unspezifisch angereicherte Proteine sind, während die anderen untersuchten Proteine HSP90, EF2, α -Enolase und GAPDH als mögliche Interaktionspartner von AKT2 zu sehen sind.

Tab. 5: Überblick über die in sechs TAPs am häufigsten (3-6 mal) gefundenen mit AKT2 koeluierten Proteine.

TAPs n=6	gefunden n=	MW (kDa)
Proteine		
Heat shock protein 90 kDa	6	84
Cdc 37	5	44
Heat shock protein 70 kDa	6	70
78 kDa glucose regulated protein	5	72
Elongationsfaktor 1 α	4	50
Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	4	36
Tubulin	4	50
Elongationsfaktor 2	3	95
α -Enolase	3	47
Endoplasmin	3	92
Protein Arginin N-Methyltransferase 5	3	72

3.4.4 Untersuchung der unspezifischen Bindungen mittels SILAC

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.4.3 zeigen, dass sich die als AKT2-Bindungspartner gefundenen Proteine zwar auch in der Kontrolle finden, jedoch in einer viel geringeren Intensität. Um dennoch mögliche falsch positive Bindungspartner herauszufiltern, wurde zur relativen Quantifizierung der Intensitäten die SILAC-Methode eingesetzt. Dazu wurden HEK293T AKT2NTag-Zellen und HEK293T Wildtyp-Zellen in SILAC-Medium kultiviert, wobei eine der beiden Zelllinien $^{13}\text{C}_6$ -markiertes Lysin und $^{13}\text{C}_6$ -markiertes Arginin erhielt, sodass das Proteom der Zelle anschließend stabil isotopisch markiert war. Somit konnten Peptide, die aus der unmarkierten WT-Probe stammten und $^{12}\text{C}_6$ -markierte Aminosäuren enthielten, von Peptiden aus der $^{13}\text{C}_6$ -markierten AKT2NTag-Probe durch einen Massenunterschied von 6 Dalton unterschieden werden, was eine relative Quantifizierung der Peptide zueinander erlaubte. Für die Affinitätsreinigung wurden gleiche Proteinmengen der AKT2NTag ($^{13}\text{C}_6$)- und WT ($^{12}\text{C}_6$)-Zellen vor der TAP gemischt und die AKT2-assoziierten Proteine mittels TAP isoliert (*Mixing before purification*, MBP). Um unspezifisch angereicherte Proteine von spezifisch stabil bzw. spezifisch transient gebundenen Proteinen unterscheiden zu können, wurden in einem weiteren Ansatz die TAP Eluate von zwei parallel durchgeführten Reinigungen aus AKT2NTag ($^{13}\text{C}_6$)- und WT ($^{12}\text{C}_6$)-Zellen nach der TAP gemischt (*Mixing after*

3 | Ergebnisse

purification, MAP). Stabil an AKT2NTag gebundene Proteine sollten während des gesamten ca. zwei Stunden dauernden Reinigungsprotokolls mit AKT2NTag assoziiert bleiben. Bei der massenspektrometrischen Analyse sollten daher, sowohl nach MAP als auch nach MBP, vermehrt schwere, $^{13}\text{C}_6$ -markierte Peptide als leichte, $^{12}\text{C}_6$ -markierte Peptide detektiert werden. Bei transient an AKT2NTag bindenden Proteinen könnte es während der Reinigung zu einem Austausch von diesen $^{13}\text{C}_6$ -markierten Proteinen mit den entsprechenden unmarkierten Proteinen aus der WT-Probe kommen, sodass nach MBP-TAP eine annäherndes 1:1 Verhältnis von markierten zu unmarkierten Proteinen besteht.

Tab. 6: Liste der gefundenen AKT2-Interaktionspartner nach MBP oder MAP-TAP und In-Lösungsverdau. Die SILAC-Ratios sind jeweils Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von mindestens drei nicht redundanten Peptiden. Die Ratios der redundanten Peptide wurden zuvor ebenfalls gemittelt.

∞ : das entsprechende Peptid der WT-Probe wurde nicht gefunden, daher ist das Verhältnis als ∞ angegeben.

x: das Protein wurde in dieser TAP nicht detektiert.

*: diese Ratios wurden auf Basis von nur zwei nicht-redundanten Peptiden ermittelt.

SILAC-TAPs AKT2NTag:WT		SILAC Ratio NTag:WT				MW (kDa)
		MAPI	MAP II	MBP I	MBP II	
Heat Shock Protein 90 kDa						
	Heat shock protein HSP90- α	69.1 $\pm$ 27.7	∞	∞	∞	84
	Putative heat shock protein HSP90- β -2	80.0 $\pm$ 39.4	∞	75.1 $\pm$ 38.0	21.9 $\pm$ 1.0	44
	Putative heat shock protein HSP90- β -3	98.7 $\pm$ 49.4	72.1 $\pm$ 39.8	62.3 $\pm$ 39.0	33.8 $\pm$ 3.6 *	68
Cdc 37		89.9 $\pm$ 42.3	x	45.4 $\pm$ 14.7	∞ *	44
60 kDa heat shock protein, mitochondrial		16.9 $\pm$ 4.5	33.6 $\pm$ 1.6	7.4 $\pm$ 2.7	2.3 $\pm$ 1.4	61
Heat Shock Protein 70 kDa						
	Heat shock 70 kDa protein 1	40.1 $\pm$ 15.4	∞	3.2 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.6	70
	Heat shock cognate 71 kDa protein	33.3 $\pm$ 12.0	∞	2.6 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.4	70
	Heat shock 70 kDa protein 1L	∞	∞	3.1 $\pm$ 1.5	4.9 $\pm$ 0.7	70
	Heat shock-related 70 kDa protein 2	∞	∞	2.7 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 1.0*	70
78 kDa glucose regulated protein		26.0 $\pm$ 11.6	32.2 $\pm$ 18.2	1.5 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 0.4	73
Stress 70 protein, mitochondrial		x	∞	1.2 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2	50
Tubulin α 1A chain		∞	∞	1.2 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.5	50

Mittels massenspektrometrischer Analyse konnte nun exakt bestimmt werden, aus welcher Probe das jeweilige Peptid stammte, und somit eine Aussage darüber getroffen werden, ob

das Protein spezifisch an AKT gebunden ist oder unspezifisch über die Säulenmatrix mit aufgereinigt wurde.

Tab. 6 zeigt die Intensitätsverhältnisse der bei diesem Verfahren gefundenen Proteine, sowie einen Vergleich dieser Verhältnisse zwischen MBP und MAP. Dabei zeigen die Proteine im oberen Abschnitt (HSP90, Cdc 37) sowohl bei MBP als auch bei MAP eine deutliche Anreicherung der Peptide aus der AKT2NTag-Probe. Sie sind somit stabil an AKT2NTag bindende Proteine. Proteine im unteren Abschnitt zeigen ein deutlich verschobenes Verhältnis nur nach MAP-TAP, aber ein ungefähres 1:1-Verhältnis nach MBP-TAP und sind damit als transiente Interaktionspartner zu charakterisieren. Die Proteine im mittleren Abschnitt (HSP70, HSP60) zeigen bei MAP ebenfalls eine deutliche Anreicherung schwer markierter Peptide, haben jedoch bei der MBP nur ein leicht verschobenes Verhältnis von 1:2 – 1:5 und können dadurch als semistabil an AKT2NTag bindende Proteine angesehen werden. Mittels der MAP/MBP-Experimente konnten auch unspezifisch aufgereinigte Proteine wie Nuceolin, Methylosom Protein 50 und Protein Arginin Methyltransferase 5 identifiziert werden. Abb. 19 zeigt exemplarische MS-Spektren von Peptiden von HSP90 (A) und GRP78 (B) und deren Verhältnis von schwer zu leicht nach MBP und MAP.

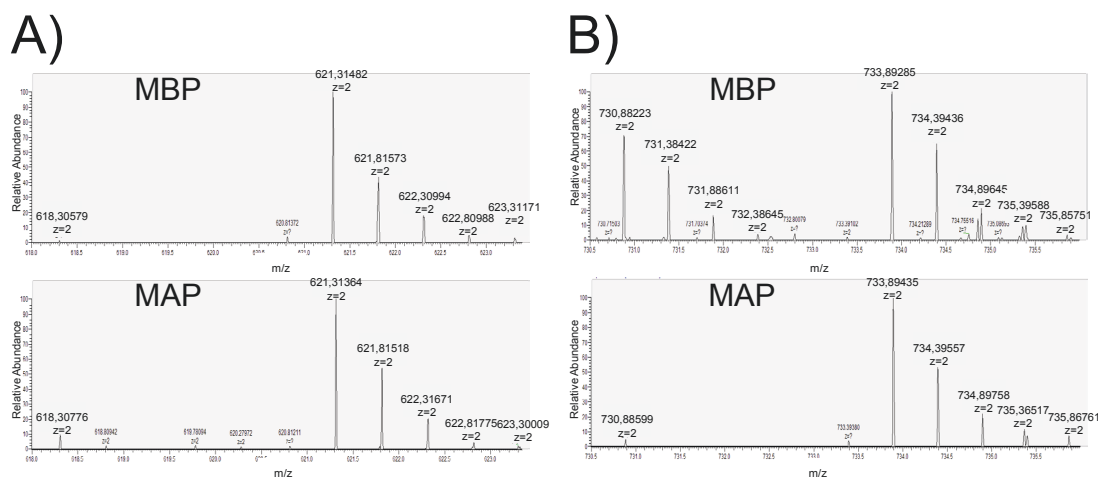


Abb. 19: MS-Spektren von Peptiden von HSP90 und GRP78 nach MBP und MAP.

A) Schwere und leichte Form des Peptids DAGTIAGLVNMR von HSP90α. Sowohl nach MBP als auch nach MAP zeigen sich deutlich verschobene Verhältnisse zu Gunsten der schweren Form. B) Schwere und leichte Form des Peptids SDIDEIVLVGGSTR von GRP78. Nach MAP-TAP zeigt sich hier ebenfalls ein verschobenes Verhältnis, nach MBP jedoch ein annäherndes 1:1-Verhältnis.

3.5 Verifizierung von AKT2-Bindungspartnern mittels *Proximity Ligation Assay*

Die bisherigen Analysen zeigten, dass AKT2 häufig transiente Bindungen mit seinen Interaktionspartnern eingeht. Stabile Komplexe finden sich vornehmlich mit Chaperonen wie HSP90. Daher war die Verifizierung transientser Interaktionspartner mit einer TAP-unabhängigen Methode von großer Bedeutung. Aufgrund einer eindeutigen Intensitätsverteilung (s. Kpt. 3.4.3) wurden zur weiteren Interaktionsanalyse die Proteine Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, α -Enolase sowie Elongationsfaktor 2 ausgewählt.

Der *Proximity Ligation Assay* (PLA) bietet die Möglichkeit, antikörperbasiert nah beieinander liegende Proteine zu detektieren. Dabei nutzt man primäre Antikörper aus zwei verschiedenen Spezies (z.B. Maus und Kaninchen), welche durch sekundäre Antikörper erkannt werden, die einen DNA-Einzelstrang mit unterschiedlicher Polarität tragen. Liegen diese DNA-Stränge, und damit auch die Proteine, nah beieinander (< 40 nm), können die Antikörper-gebundenen Einzelstränge mit spezifischen Oligonukleotiden hybridisiert und somit verbunden werden. Nur nach Hybridisierung können die beiden Oligonukleotide zu einem Ringmolekül ligiert werden, welches in einem weiteren Schritt als Substrat für die $\Phi 29$ DNA-Polymerase dient und einen Startpunkt für eine *rolling circle* Amplifikation bildet. Die Amplifikate werden mit Fluorophoren-markierten Nukleotiden synthetisiert, sodass die Interaktion durch Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden kann (Abb. 20). Der PLA eignet sich besonders zur Detektion transientser Proteininteraktionen, da die Vorgänge direkt *in situ* beobachtet werden können.

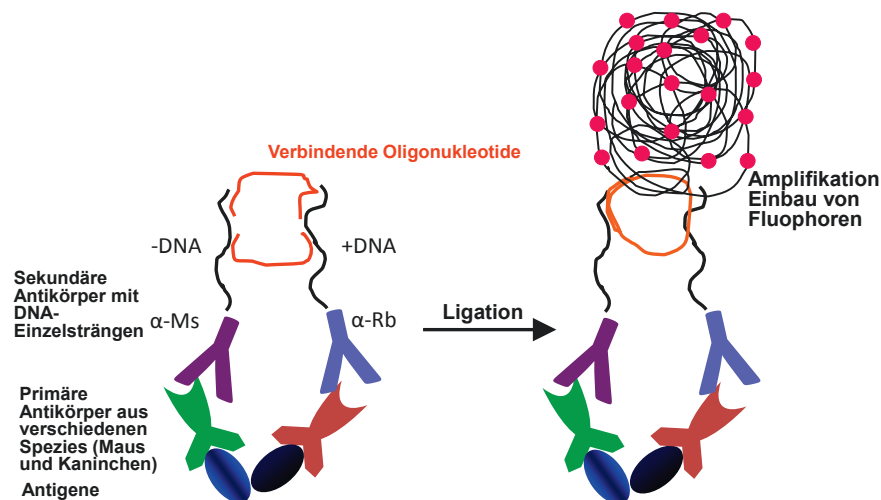


Abb. 20: Schematische Darstellung eines PLA-Ablaufs.
 α -MS: anti-Maus, α -Rb: anti-Kaninchen

3 | Ergebnisse

Der PLA wurde auf HEK293T AKT2NTag-Zellen durchgeführt. Die Abb. 21, Abb. 22 und Abb. 23 zeigen für GAPDH, Elongationsfaktor 2 und α -Enolase jeweils mikroskopische Aufnahmen von der PLA-Probe (A) und den jeweiligen Kontrollen (B, C), sowie eine statistische Auswertung der roten Signale pro Zellkern von zwei unabhängigen PLA-Experimenten (D). Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt und die jeweiligen Interaktionen sind durch rot fluoreszierende Punkte gekennzeichnet. Es zeigt sich für jedes der Proteine, dass die roten Signale/Zellkern in den PLA-Proben die Hintergrundsignale der Kontrollen deutlich übersteigen. Bei Auszählung der Signale bestätigt sich der optische Eindruck der mikroskopischen Aufnahmen, dass in den PLA-Proben deutlich mehr Signale als in den jeweiligen Kontrollen zu detektieren sind. Somit konnte für Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Elongationsfaktor 2 und α -Enolase eindeutig eine Interaktion mit AKT2 nachgewiesen werden.

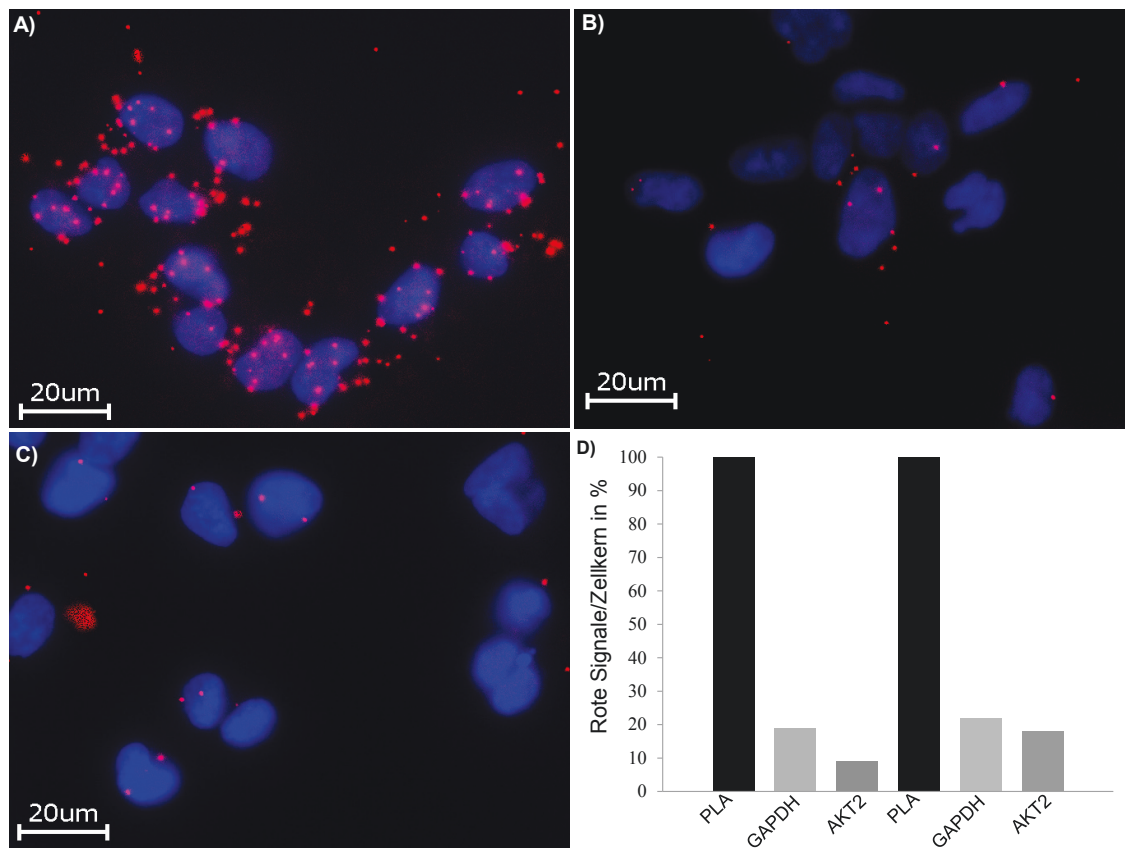


Abb. 21: Mikroskopische Aufnahmen eines PLAs mit AKT2 und GAPDH.

In blau angefärbt sind die Zellkerne zu sehen, die roten Punkte markieren die Interaktion. A) PLA AKT2/GAPDH B) Kontrolle AKT2 C) Kontrolle GAPDH D) Statistische Auswertung der Anzahl der Interaktionen pro Zelle von zwei PLAs. Verglichen wurde jeweils die Punktzahl der Kontrollen mit denen der PLA-Probe. Die Anzahl der Punkte des PLAs wurde jeweils auf 100% gesetzt.

PLA: kompletter Assay, GAPDH, AKT2: Kontrollen mit nur einem primären Antikörper

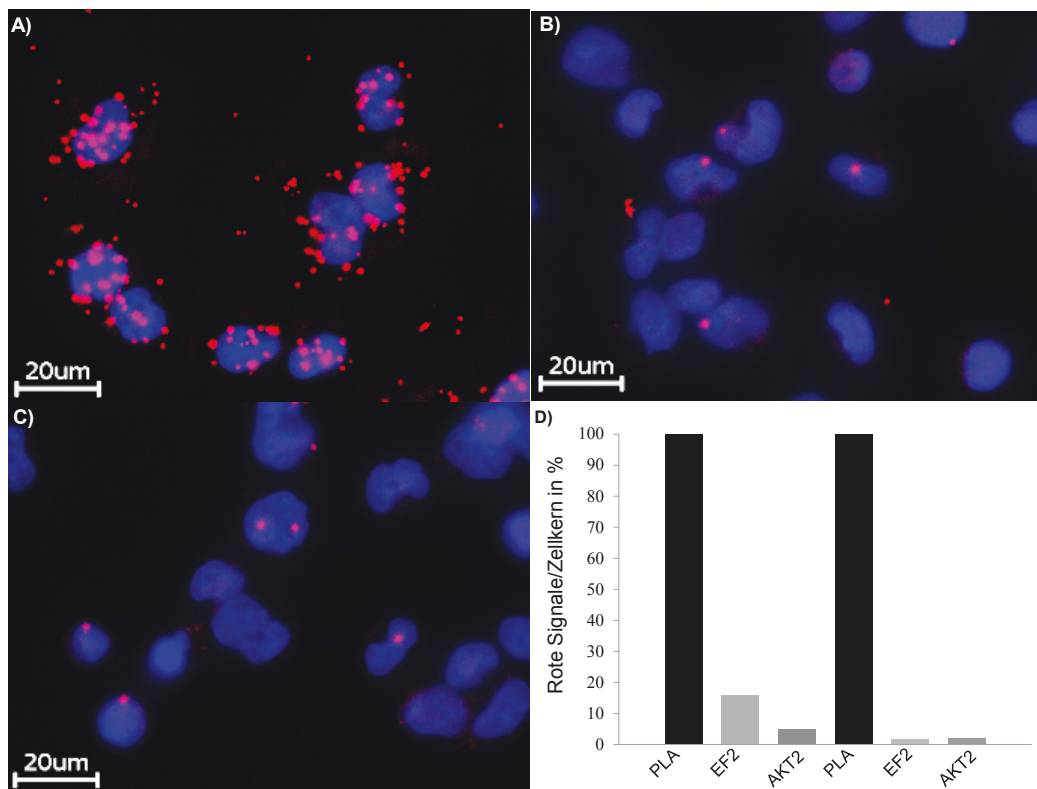


Abb. 22: Mikroskopische Aufnahmen eines PLAs mit AKT2 und EF2. A) PLA AKT2/EF2 B) Kontrolle AKT2 C) Kontrolle EF2 D) Statistische Auswertung der Interaktionen/Zelle von zwei unabhängigen Experimenten. PLA: kompletter Assay, EF2, AKT2: Kontrollen mit nur einem primären Antikörper

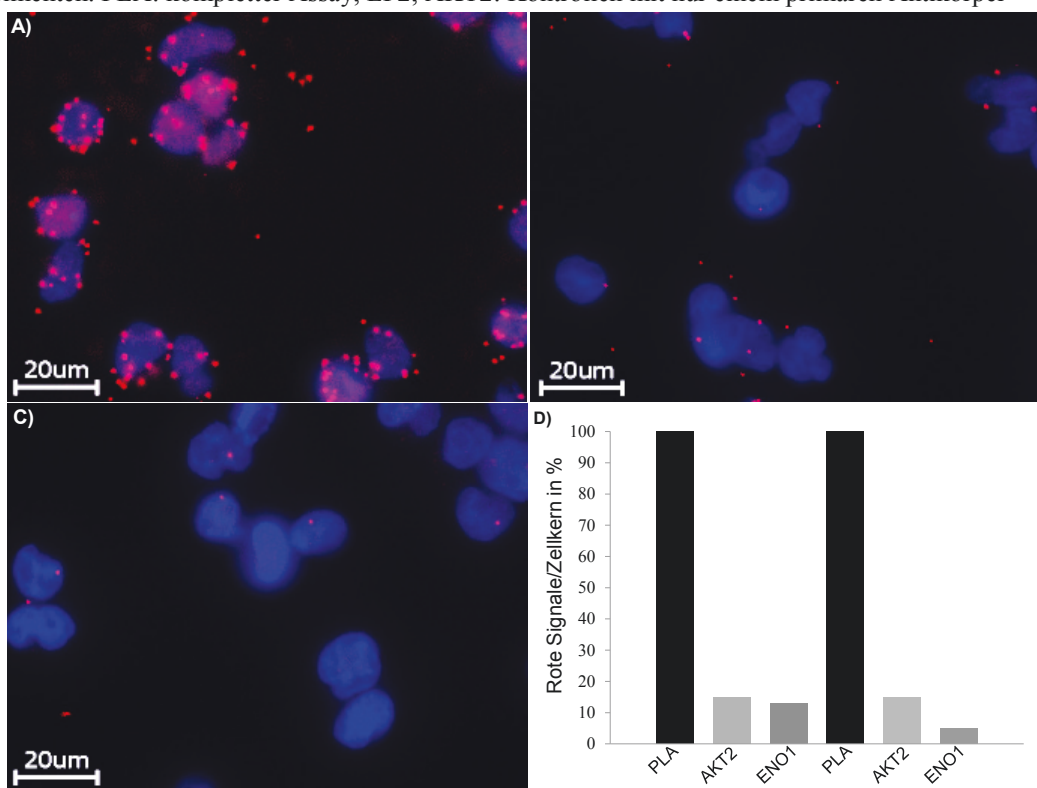


Abb. 23: Mikroskopische Aufnahmen eines PLAs mit AKT2 und α -Enolase. A) PLA AKT2/ENO1 B) Kontrolle AKT2 C) Kontrolle ENO1 D) Statistische Auswertung von zwei PLAs mit AKT2 und α -Enolase. PLA: kompletter Assay, ENO1/AKT2: Kontrollen mit nur einem primären Antikörper

3.6 Einfluss von AKT-Stimulation auf die EF2/AKT2-Interaktion in E18 Rattenkardiomyozyten

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass AKT eine Rolle bei einer Angiotensin II-vermittelten Dephosphorylierung und Aktivierung von EF2 spielt (Everett et al., 2001). Aus diesem Grund wurde der Einfluss einer Angiotensinstimulation auf die AKT2/EF2-Interaktion in embryonalen (E18) Rattenkardiomyozyten untersucht. Die Zellen wurden entweder mit Angiotensin II stimuliert (AKT-Aktivierung über PI3-Kinase γ) oder vor der Stimulation mit Ly294002 behandelt, um den PI3-Kinase-Signalweg zu inhibieren. Danach wurde der PLA wie zuvor beschrieben durchgeführt.

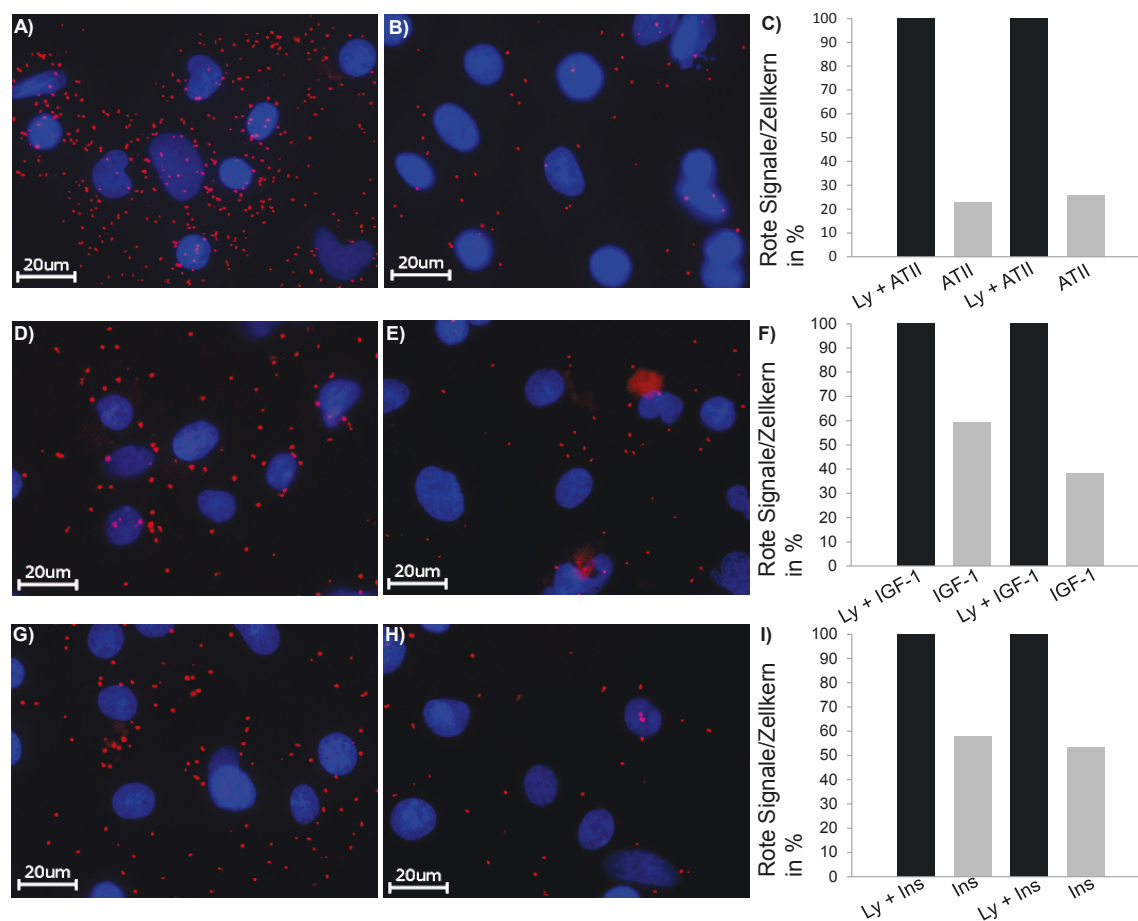


Abb. 24: PLA nach Stimulation mit Angiotensin II (A-C), IGF-1 (D-F) und Insulin (G-I) in E18 Rattenkardiomyozyten (A/D/G): PLA-Probe nach Ly-Behandlung und nachfolgender Stimulation (B/E/H): PLA-Probe nach alleiniger Stimulation (C/F/I): Statistische Auswertung zweier unabhängiger Experimente. Die Punktzahl des PLAs „Ly + Stimulus“ wurde auf 100% gesetzt und die des PLAs nach Stimulation prozentual darauf bezogen.

Zwei unabhängige Experimente zeigten, dass bei vorheriger PI3-Kinase-Hemmung (Ly294402) eine starke Interaktion zwischen AKT2 und EF2 erfolgte (Abb. 24A). Im

Gegensatz dazu bewirkte Angiotensinstimulation eine deutliche Abnahme der Signalanzahl (Abb. 24B), was auf eine Dissoziation der Interaktion durch AKT-Aktivierung schließen lässt. Um den Einfluss weiterer AKT-aktivierender Hormone zu untersuchen, wurde das gleiche Experiment auch mit Insulin- und IGF-1-Stimulation durchgeführt. Abb. 24D-I zeigt, dass sich der oben beschriebene Effekt auch nach Stimulation mit Insulin und IGF-1 einstellt.

3.7 Messung der α -Enolase-Aktivität in Abhängigkeit der AKT-Aktivität

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Interaktion von AKT2 mit α -Enolase die Aktivität der α -Enolase beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde die Aktivität der α -Enolase mit dem *ENO1 Human Activity Assay Kit* (abcam) unter folgenden Bedingungen gemessen:

1. HEK293T WT-Zellen wurden zur Ausschaltung von AKT mit dem ATP-kompetitiven AKT-Inhibitor CCT128930 behandelt.
2. Zur Aktivierung von AKT in den Zellen wurden diese mit Insulin stimuliert.
3. Um auch den Einfluss von Insulin ohne AKT auf die α -Enolase zu erfassen, wurden die Zellen zunächst mit CCT behandelt und dann mit Insulin stimuliert.

Abb. 25 zeigt Western Blot Analysen, mit denen die Effektivität von CCT und Insulin auf AKT nachgewiesen wurde. In Abb. 25A wurde ein P-AKT-Substrate Antikörper genutzt, um die erfolgreiche Hemmung der AKT-Kinasefunktion zu zeigen. Die AKT-Substrate zeigen nach CCT-Inhibition eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung im Vergleich zur insulinstimulierten Probe. Abb. 25B zeigt, dass AKT selber jedoch auch bei CCT-Inhibition stark phosphoryliert ist, was durch die ATP-kompetitive Wirkung von CCT zu erklären ist (Yap et al., 2011). Weiterhin wurden die für den Assay aufgereinigte α -Enolase nach dem Assay mittels Western Blot analysiert und auf eine AKT-Bindung untersucht (Abb. 25C). Neben dem etwas kleineren α -Enolase-Signal bei 50 kDa sieht man auch ein Signal von AKT bei ca. 60 kDa. Dies zeigt, dass auch nach reverser Aufreinigung von α -Enolase AKT an α -Enolase bindet. Zusätzlich sieht man, dass AKT auch bei unterschiedlicher Aktivität mit α -Enolase interagiert.

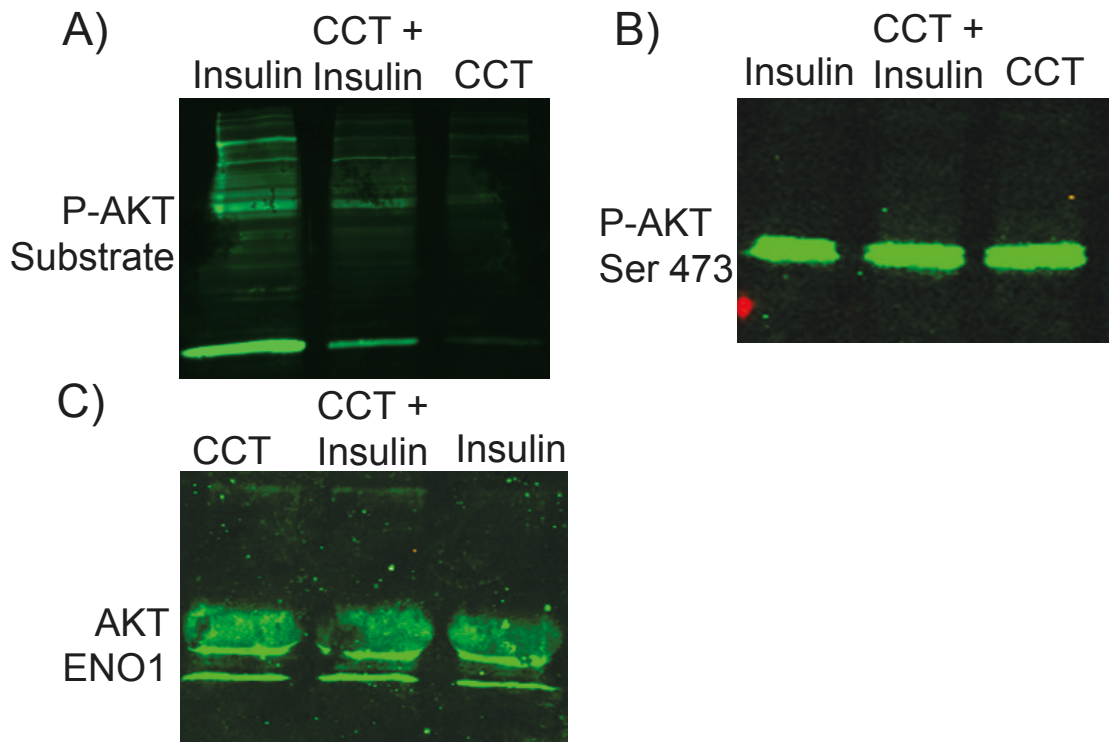


Abb. 25: Western Blot Analysen zum Nachweis der CCT-Wirkung und Koelution von AKT.

A) Zellextrakte nach Behandlung mit CCT, CCT + Insulin und Insulin. Der Western Blot wurde mit dem α -P-AKT-Substrate-Antikörper analysiert. Die insulinstimulierte Probe zeigt eine deutlich stärkere Phosphorylierung der AKT-Substrate als die CCT-behandelten Zellen.

B) Zellextrakte nach Behandlung wie in A) mit einem α -P-AKT-Ser473-Antikörper analysiert. AKT zeigt unter allen drei Bedingungen eine gleich starke Phosphorylierung, da es aufgrund der ATP-kompetitiven Wirkung von CCT weiterhin phosphoryliert werden kann.

C) Für diese Western Blot Analyse wurden die Assay-Proben mit der aufgereinigten α -Enolase nach Messung der Aktivität in Lämmli-Puffer aufgenommen. Die Probe wurde sowohl mit dem α -ENO1-Antikörper (Signal bei 50kDa) als auch mit dem α -pan-AKT-Antikörper (Signal bei 60kDa) analysiert.

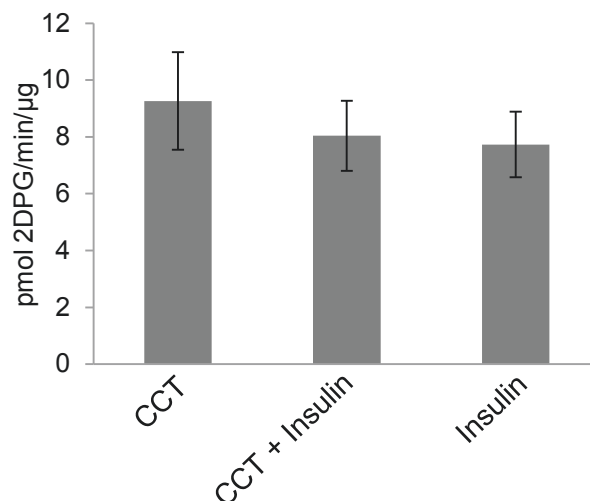


Abb. 26: Änderung der 2DPG-Menge in pmol/min/μg Protein als Maß für α -Enolase-Aktivität. Mittelwerte und Standardabweichungen nach n=7 Messungen für CCT-Behandlung, CCT+Insulinbehandlung und Insulinbehandlung.

3 | Ergebnisse

Abb. 26 zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsmessung der α -Enolase unter den drei oben genannten Bedingungen (n=7 Messungen). Zellen, die mit Insulin stimuliert wurden, zeigten keine Änderung der α -Enolaseaktivität im Vergleich zu denen, die zuvor mit CCT behandelt wurden. α -Enolase aus Zellen, die nur mit CCT behandelt wurden, zeigte eine geringfügig, nicht signifikant höhere Aktivität im Vergleich zu α -Enolase aus Insulin stimulierten Zellen (CCT+Insulin und Insulin). Es zeigte sich also, dass eine Änderung der AKT-Aktivität keinen Einfluss auf die α -Enolaseaktivität hat.

4 Diskussion

Die Proteinkinase AKT und ihre Signaltransduktion ist aufgrund ihrer zentralen Stellung in der Zelle ein wichtiges und interessantes Ziel molekularbiologischer Forschung. AKT moduliert über eine Vielzahl von Substraten zelluläre Prozesse im Rahmen von Metabolismus, Wachstum und Zellzyklus. Sie findet sich in fast allen Zellen des Körpers und ist in viele pathologische Prozesse wie Diabetes mellitus oder Kanzerogenese involviert. Dabei scheinen die drei AKT-Isoformen trotz einer starken Ähnlichkeit im Aufbau sehr spezifische Funktionen wahrzunehmen. Daher ist die Untersuchung der isoformspezifischen Funktionen von AKT ein wichtiger Baustein zum besseren Verständnis der AKT-modulierten Signaltransduktion. Kenntnisse über das Interaktom der AKT-Isoformen sind entscheidend für das Verständnis ihrer Funktionen.

In dieser Arbeit wurden daher die Proteininteraktionen der AKT2-Isoform untersucht. Dabei wurde die Screeningmethode der Tandem Affinitätsaufreinigung mit (quantitativer) Massenspektrometrie kombiniert, um Bindungspartner der AKT2-Isoform zu finden und die Art ihrer Bindung näher zu analysieren.

Wesentliche Befunde dieser Arbeit sind:

- AKT2 kann erfolgreich über ein N-terminales Tag mittels Tandem Affinitätsaufreinigung aus der Zelle aufgereinigt werden. Eine C-terminale Modifikation durch ein Tag führt zu vermehrtem Abbau des Proteins in der Zelle.
- Für die physiologische Funktion der Proteinkinase ist eine stabile Expression mit moderaten Proteinspiegeln essentiell.
- Als stabile Interaktionspartner für AKT2 finden sich vor allem Chaperone wie HSP90 und Cdc 37.
- Mit anderen Proteinen geht AKT2 überwiegend transiente Interaktionen ein.
- GAPDH wurde als bekannter AKT2-Interaktionspartner *in situ* verifiziert.
- Als neue Interaktionspartner für AKT2 wurden Elongationsfaktor 2 sowie α -Enolase isoliert und *in situ* verifiziert.
- In embryonalen Rattenkardiomyozyten liegt die Interaktion zwischen AKT2 und EF2 verstärkt bei einer Inhibition des PI3-Kinase Signalwegs vor, wobei sie bei Stimulation der Zellen mit Angiotensin II, IGF-1 und Insulin zerfällt.

4.1 Proteininteraktionspartner von AKT2

4.1.1 Chaperone

Als häufigster und stabil interagierender Interaktionspartner von AKT2 wurde das Heat Shock Protein 90 gefunden. Die Heat Shock Protein 90 Familie ist ein wesentlicher Bestandteil der Chaperon-Maschinerie der Zelle, die für die korrekte Proteinfaltung und den Abbau fehlgefalteter Proteine verantwortlich ist. Aufgrund der zentralen Funktion und der hohen Abundanz von HSP90 ist dieses Chaperon ein häufig bei Proteinaufreinigungen vorkommender Interaktionspartner und wurde auch schon als unspezifische Kontaminante bei Aufreinigungen mit dem Flag-Tag eingeordnet (Chen and Gingras, 2007). Für AKT gibt es jedoch zahlreiche Hinweise, dass HSP90 ein essentieller Interaktionspartner mit spezifischen Funktionen ist. Bereits 2000 konnten Sato und Mitarbeiter zeigen, dass HSP90 spezifisch mit AKT interagiert, wobei die Interaktionsdomäne im C-terminalen Teil von AKT liegt. Funktionell konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion die Zelle vor Apoptose schützt. Dieser erste Hinweis auf vermehrte Stabilität von AKT im Komplex mit HSP90 wurde 2002 durch Basso und Mitarbeiter bestätigt, da sich bei Zerstörung des Komplexes durch HSP90-Inhibitoren die Halbwertszeit von AKT von 36 auf 12 Stunden reduzierte. Des Weiteren scheint die Komplexbildung mit HSP90 AKT vor Dephosphorylierung durch PP2A zu schützen (Sato et al., 2000), so dass die AKT Aktivität durch HSP90 reguliert zu werden scheint. Eine weitere Rolle spielt HSP90, indem es eine Art Bindeprotein zwischen AKT und Substratproteinen darstellt. Diese Gerüst-Funktion konnte sowohl für eNOS (Fontana et al., 2002) als auch ASK1 (Zhang et al., 2005) gezeigt werden. HSP90 ist demnach ein essentieller Interaktionspartner im Hinblick auf AKT-Stabilität und Kinasefunktion. Diese wichtige Funktion zeigt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit dadurch, dass es im Gegensatz zu anderen Proteinen in jeder TAP als Interaktionspartner gefunden wurde. Des Weiteren konnten durch quantitative Massenspektrometrie die stabile Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen nachgewiesen werden.

Als weitere Chaperone wurden auch Proteine der HSP70-Familie als AKT2-Interaktionspartner gefunden. Sie spielen wie HSP90 in der Zelle eine essentielle Rolle im Rahmen von Proteinfaltung und Proteindegradation und sind bei Affinitätsaufreinigungen häufig identifizierte Bindungspartner (Chen and Gingras, 2007). Ähnlich wie bei HSP90 ist jedoch auch hier eine spezifische Interaktion zwischen AKT und HSP70 nicht

auszuschließen, da schon gezeigt wurde, dass HSP70 AKT und andere AGC-Kinasen über das unphosphorylierte Turn-Motiv bindet (Gao and Newton, 2002). Es gibt acht verschiedene Proteine in der Familie der HSP70, von denen einige, wie Hsp70-1 Stress-induziert vorkommen, andere, wie Hsc71 aber auch konstitutiv exprimiert werden. In der TAP wurden beide Formen als AKT2-Bindungspartner gefunden. Es gibt Hinweise darauf, dass die unterschiedlichen HSP70-Proteine AKT auf Proteinebene unterschiedlich regulieren. Koren und Mitarbeiter zeigten 2010 durch si-RNA-Experimente in Brustkrebszellen, dass der AKT-Spiegel durch Hsp70-1 negativ und durch Hsc71 positiv beeinflusst wird. Dies zeigt, dass eine Interaktion zwischen AKT2 und Proteinen der HSP70-Familie, ähnlich wie bei HSP90, die Stabilität von AKT in der Zelle reguliert. Dabei kann man aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen quantitativen Daten der Interaktion, im Vergleich zu HSP90, die Interaktion als semistabil charakterisieren. Funktionell lässt sich die AKT2/HSP70-Interaktion am ehesten in den Themenkomplex Zellüberleben einordnen, da in verschiedenen Zelllinien gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung von AKT bei gestressten Zellen HSP70-abhängig erfolgt (Shiota et al., 2010, Chen et al., 2011). HSP70 reguliert somit die AKT-Spiegel und die Aktivität von AKT in Zellen, die z.B. durch Hypoxie oder andere Faktoren unter Stress stehen, aber auch in Krebszellen, welche AKT für ihr Überleben benötigen.

Ebenfalls ein Mitglied der Familie der HSP70-Proteine ist das endoplasmatische Chaperon GRP78 (Bertolotti et al., 2000, Shen et al., 2002). GRP78 wird hier gesondert diskutiert, da es bei der quantitativen Analyse der Interaktion als transienter Interaktionspartner von AKT2 charakterisiert wurde. In mehreren Arbeiten wurde bisher eine Interaktion zwischen AKT und GRP78 beschrieben (Yung et al., 2011, Barati et al., 2006). Dabei scheint GRP78 sowohl *upstream* als auch *downstream* von AKT zu agieren. Pfaffenbach und Mitarbeiter zeigten 2012, dass die Expression von GRP78 über IGF-1/AKT/mTORC1 reguliert werden kann, wobei der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist. Frühere Arbeiten weisen darauf hin, dass GRP78 die AKT-Aktivität durch Verhinderung der Phosphorylierung an Serin 473 moduliert und somit eher *upstream* von AKT zu finden ist (Yung et al., 2011). Funktionelle Analysen in Lungenkrebszellen zeigen, dass pAKT *downstream* von GRP78 Ursache einer Chemotherapeutikaresistenz ist (Lin et al., 2011). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt sich, dass GRP78 als hoch abundantes Protein der Zelle eine durchaus spezifische Interaktion mit AKT einzugehen scheint.

Wenn man die drei hier diskutierten Chaperone im Hinblick auf die Stabilität ihrer Interaktion mit AKT2 beurteilt, kann man schlussfolgern, dass Chaperone wie HSP90 und HSP70, die wichtig für die Stabilität von AKT sind, stabil oder seminstabil mit AKT interagieren, und solche, die die AKT-Aktivität regulieren (GRP78), eine transiente Interaktion mit AKT eingehen. Insgesamt zeigt sich, dass die hoch abundanten, häufig in der TAP gefundenen Chaperone eine spezifische Funktion im Komplex mit AKT eingehen.

4.1.2 Weitere AKT2-Bindungspartner

Interessanterweise wurden neben den zahlreich gefundenen Chaperonen auch einige andere Proteine als AKT2-Interaktionspartner identifiziert. Dazu zählen die beiden Glykolyse-Enzyme GAPDH und α -Enolase, sowie der Elongationsfaktor 2. α -Enolase und EF2 sind dabei bisher noch nicht bekannte AKT2-Interaktionspartner.

Der eukaryotische Elongationsfaktor 2 ist ein 95 kDa großes zytosolisches Protein, dessen Hauptaufgabe während der Translation darin besteht, die Peptidyl-tRNA im Ribosom von der A- auf die P-Stelle zu transferieren, sodass das Ribosom auf der mRNA in Richtung 3'-Ende wandern kann (Kaul et al., 2011). Durch Phosphorylierung an Threonin 56 durch die EF2-Kinase wird der Elongationsfaktor 2 inhibiert. Dies ist eine einfache Möglichkeit, in energiearmen Situationen kurzfristig Energie zu sparen, da das Ribosom nicht zerfällt, die Proteinbiosynthese aber trotzdem gestoppt wird. Dementsprechend erfolgt eine Aktivierung von EF2 durch vermehrte Dephosphorylierung. Für CHO.T-Zellen (*Chinese hamster ovary*) konnte gezeigt werden, dass diese Dephosphorylierung Insulin- und PI3-Kinase-abhängig erfolgt (Redpath et al., 1996). Auch Angiotensin II-Stimulation führt in Kardiomyozyten zur PI3-Kinase-abhängigen EF2-Dephosphorylierung und damit zur Aktivierung (Everett et al., 2001). Diese Wirkungen werden dabei wahrscheinlich über Inaktivierung der EF2-Kinase durch p70S6-Kinase α oder p90^{RS}-Kinase vermittelt, wobei p70S6-Kinase α durch mTOR, welches von AKT reguliert wird, aktiviert wird (Wang et al., 2001). Eine weitere indirekte regulatorische Wirkung von AKT auf EF2 findet sich über die AMP-Kinase. Diese kann EF2-Kinase aktivieren und damit EF2 inaktivieren. AMP-Kinase steht jedoch unter dem inhibitorischen Einfluss von AKT, sodass AKT indirekt einer Inaktivierung von EF2 und damit der Proteinbiosynthese entgegenwirkt (Horman et al., 2003). In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal auch ein direkter Zusammenhang von AKT2 und EF2 gezeigt werden. EF2 ist ein Interaktionspartner von AKT2, wobei diese

Interaktion vermutlich transienter Natur ist. Zudem konnte eine dynamische Regulation der Interaktion in embryonalen Rattenkardiomyozyten gezeigt werden. Durch Hemmung des PI3-Kinase-Wegs kommt es zu einer vermehrten Interaktion der beiden Proteine im Vergleich zur Stimulation der Zellen mit Angiotensin II, IGF-1 oder Insulin, was einen Zerfall der Interaktion hervorruft (Abb. 27). Die funktionelle Bedeutung der EF2/AKT2-Interaktion ist nicht klar. Es ergibt sich die interessante Option, dass eine direkte (über AKT) und eine indirekte (über EF2-Kinase) Modulation zu einer synergistischen Aktivierung von EF2 führen könnte. Ob AKT EF2 dabei direkt phosphoryliert, ist nicht geklärt. Dieser mögliche Zusammenhang wird derzeit weiter untersucht.

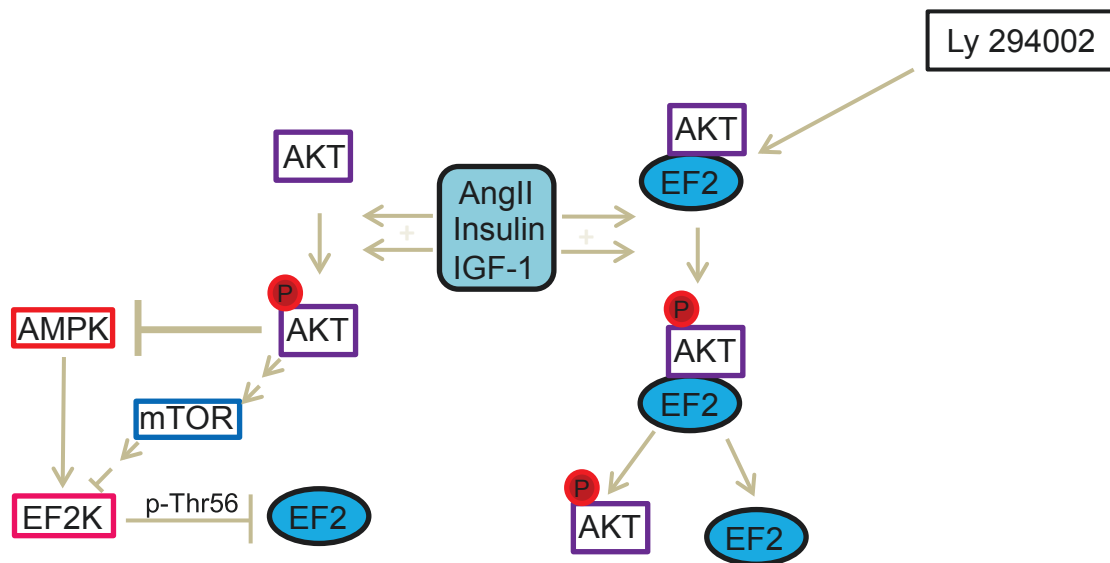


Abb. 27: Die AKT2/EF2-Interaktion. Der zuvor beschriebene indirekte Regulationsmechanismus ist links dargestellt, rechts wurden die neu gewonnenen Erkenntnisse visualisiert.

Als weitere spezifische Interaktionspartner von AKT2 wurden zwei glykolytische Enzyme identifiziert. Das Enzym GAPDH katalysiert die Reaktion von Glyeraldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. α -Enolase wandelt ihr Substrat 2-D-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat um. Eine Interaktion zwischen AKT und GAPDH wurde sowohl in Rattenherzen (Baba et al., 2010) als auch in Ovarialkarzinom-Zellen (Huang et al., 2011) nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun auch *in situ* eine Interaktion von GAPDH mit AKT2 in HEK293T-Zellen. Dabei scheint die funktionelle Relevanz der Interaktion im Bereich des Zellmetabolismus zu liegen (Glykolyse). Sie könnte aber auch einen Schutz vor Apoptose bieten, denn Huang und Mitarbeiter zeigten, dass AKT2 GAPDH an Threonin 237 phosphoryliert und dadurch antiapoptotisch wirkt. Auch Yao und Mitarbeiter zeigten 2012, dass eine AKT-abhängige Phosphorylierung und

Aktivitätserhöhung von GAPDH durch die Hemmung mitochondrial induzierter Apoptose kardioprotektiv wirkt.

Im Gegensatz zu GAPDH ist die hier gezeigte Interaktion zwischen AKT2 und α -Enolase bisher noch nicht bekannt. Eine Verbindung zwischen AKT und α -Enolase zeigt der als Warburg-Effekt bezeichnete spezielle Tumormetabolismus. Hier kommt es in Tumorzellen trotz ausreichendem Sauerstoffangebot vermehrt zu anaerober Glykolyse und damit zur Lactatbildung (Warburg et al., 1927). Viele glykolytische Proteine sind in Tumorzellen heraufreguliert, darunter auch die α -Enolase (Altenberg and Greulich, 2004). Es ist bekannt, dass AKT im Rahmen des Warburg-Effekts direkt und indirekt auf die glykolytischen Enzyme Hexokinase (Gottlob, 2001, Miyamoto et al., 2009) und Phosphofruktokinase (Deprez et al., 1997) wirkt. Die in dieser Arbeit als Proteininteraktionspartner von AKT gefundenen glykolytischen Enzyme GAPDH und α -Enolase könnten weitere Angriffspunkte von AKT im Rahmen von Glykolyse und Tumorüberleben sein. Die Heraufregulation von α -Enolase erfolgt über ein HIF1-sensitives Element im Enolase-Promotor. AKT wiederum fördert über mTORC1 die HIF1 α -Expression (Laughner et al., 2001). Somit gibt es hier eine indirekte Verbindung zwischen AKT und α -Enolase. Die Daten dieser Arbeit zeigen nun auch eine direkte Verbindung zwischen den beiden Proteinen. Die funktionelle Relevanz dieser Interaktion scheint dabei jedoch nicht auf einer regulierenden Funktion von AKT auf α -Enolase zu beruhen, da sich bei Messung der α -Enolase-Aktivität keine Unterschiede durch unterschiedliche AKT-Aktivität ergaben. Vielmehr könnten die genannten Glykolyseenzyme in einer Art Komplex miteinander verbunden sein, in dem AKT eine noch unbekannte strukturelle Funktion hat. Eine solche Komplexbildung von Glykolyseenzymen konnte bisher in verschiedenen Organismen gezeigt werden. Pflanzen (Graham et al., 2007), *E. coli* (Shearer et al., 2005), Säugetier-Erythrozyten (Campanella et al., 2005) und Skelettmuskel (Singh et al., 2004) zeigen ein sogenanntes Metabolon, wobei häufig auch eine Assoziation mit Zytoskelett oder Organellen gefunden wurde. Im Herzen geht man davon aus, dass hier ebenfalls die Glykolyseenzyme in Form von Clustern vorliegen. Neben dieser räumlichen Anordnung, die einen effizienten Ablauf der Enzymaktionen erlaubt, zeigen Modellberechnungen, dass das in der Glykolyse erzeugte ATP vornehmlich für die Aktivität der SERCA genutzt wird, welcher einer der wesentlichen energiezehrenden Prozesse in Kardiomyozyten ist. Im Gegensatz dazu soll das in der Atmungskette gebildete ATP vor allem für die Kontraktion genutzt werden (Stanley et al., 2005). Die Funktion

solcher glykolytischer Metabolone scheint ein Substrat-„channeling“ zur effizienten Substratverwertung innerhalb einer Enzymkette zu sein. Dabei sind die Interaktionen innerhalb des Metabolons häufig transient (Zhang, 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass AKT2 mit GAPDH und α -Enolase transient interagiert, und zumindest auf α -Enolase besteht dabei kein direkter Einfluss auf die Aktivität durch AKT. Daher könnte AKT2 eher eine strukturelle Funktion innerhalb eines glykolytischen Enzymkomplexes haben.

Um auch den Aspekt der isoformspezifischen Funktionen zu berücksichtigen, wurden die beiden neu entdeckten AKT2-Bindungspartner auch auf ihre Interaktion mit AKT1 untersucht. Für EF2 zeigte sich dabei in PLA-Experimenten, dass die Interaktion isoformenunabhängig auch mit AKT1 erfolgt. Ähnliche Analysen mit AKT1 und α -Enolase führten jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis (Bottermann et al., 2013). Auch in systematischen Analysen der AKT1-Interaktionen in transient transfizierten Zellen (Hiester, 2013, *Promotionsverfahren eröffnet*) konnte α -Enolase nicht als Interaktionspartner identifiziert werden, sodass diese beiden Proteine, wenn überhaupt, nur sehr schwach miteinander assoziiert zu sein scheinen.

4.2 Methodische Analyse von Proteininteraktionen mittels Tandem Affinitätsaufreinigung

Die Tandem Affinitätsaufreinigung ist eine Screeningmethode, die eine Analyse des Interaktoms von Zellen unter nativen Bedingungen erlaubt. Denn im Unterschied zu anderen Screenings erfolgt die Aufreinigung direkt aus dem für das Zielprotein typischen Zellkompartiment. Dabei sind vor allem zytosolische Proteine Ziel der Suche, aber mithilfe moderner Probenaufbereitung wie *filter-aided sample preparation* (Wiśniewski et al., 2009), die unter anderem den Einsatz von Harnstoff erlaubt, können auch nukleäre Proteine analysiert werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der TAP ist die Fusion des zu untersuchenden Proteins mit einem TAP-Tag. Puig und Mitarbeiter zeigten, dass ca. 95% der durch TAP untersuchten Proteine C-terminal getaggt wurden (Puig et al., 2001). C-terminale Tags sollen eine bessere Bindung ermöglichen, da sie weniger häufig bei der Proteinfaltung verdeckt werden (Li, 2011). Bei einigen Proteinen kann es jedoch durch Modifikation am C-Terminus zu Funktionsbeeinträchtigungen kommen, sodass eine N-terminale Fusion des TAP-Tags mit dem Protein erforderlich ist. Dies konnte beim

ursprünglichen, 21 kDa großen, ProtA/CBP (*ProteinA*)/(*Calmodulin-binding-protein*)-Tag beobachtet werden. In dieser Arbeit wurde die Proteinkinase AKT2 sowohl am N- als auch am C-Terminus mit einem TAP-Tag versehen, um den Einfluss der Position des Tags auf die physiologische Funktion des Proteins zu untersuchen. Beide rekombinanten Proteine wurden in Western Blot Analysen auf ihre Funktion und in ihrem Verhalten in der Tandem Affinitätsaufreinigung miteinander verglichen. Die Regulation von AKT durch Phosphorylierung war durch das Tag nicht beeinflusst und verhielt sich nach ihren physiologischen Eigenschaften. Sowohl in Western Blot Analysen, als auch nach Tandem Affinitätsaufreinigung zeigte sich jedoch bei C-terminal getaggttem AKT2 ein AKT2Tag-Abbauprodukt. Dies lässt die Vermutung zu, dass es, z.B. durch Fehlfaltung des Proteins, zu einem verstärkten Abbau in der Zelle kommt und es sich somit weniger für eine Aufreinigung physiologischer Proteininteraktionen eignete. Es zeigte sich also, dass auch bei der vergleichsweise geringen Größe des Tags (8kDa im Vergleich zu 21kDa ProtA/CBP-Tag) eine Untersuchung der optimalen Position des Tags erforderlich ist.

Eine weitere Variable der TAP-Methode stellt das Expressionsniveau des rekombinanten Proteins dar. Es ist verständlich, dass eine massive Überexpression des Tag-Proteins nicht die geforderten nativen Bedingungen erfüllt und die Funktion des Proteins eventuell nicht mehr der physiologischen entspricht. In einer Untersuchung der Proteininteraktionen von AKT1 nutzte Hiester die transiente Transfektion (Hiester, 2013). Dabei wurde eine bis zu 30-fache Überexpression von AKT1 erreicht. Dieses Vorgehen beinhaltet das Risiko, dass unter dieser Bedingung eine Fehlregulation oder Fehllokalisation des getaggtten Proteins vorliegt. So wurde trotz der Hemmung des PI3-Kinase-Wegs eine nur unvollständige Dephosphorylierung von AKT1 nachgewiesen. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression nach transienter Transfektion des AKT2Tag-Proteins dazu führte, dass AKT in der Zelle nicht mehr durch Dephosphorylierung zu regulieren war. In der Literatur lassen sich einige Möglichkeiten zur Vermeidung einer starken Überexpression finden (Dunham et al., 2012). Zum einen könnte man bei transienter Transfektion einen schwachen Promotor verwenden. Alternativ dazu wurde in dieser Arbeit ein starker Promotor eingesetzt, die Kopienzahl aber gering gehalten. Dies wurde durch stabile lentivirale Infektion erreicht, bei der die Transgene in das Genom integriert werden. Dieses Vorgehen führte zur erwünschten Reduktion der Proteinspiegel unter Erhalt der physiologischen Funktion des Proteins.

Durch die zwei Aufreinigungsschritte der Tandem Affinitätsaufreinigung sollen möglichst viele unspezifisch gebundene Proteine herausgefiltert werden. Dennoch ist es nicht möglich, die Aufreinigung falsch positiver Proteine völlig zu unterbinden. Eine Möglichkeit diese Proteine zu identifizieren, bietet die Kombination der TAP mit quantitativer Massenspektrometrie. Dabei werden die Proteine einer Zelle so markiert, dass ein Massenunterschied zu unmarkierten Proteinen entsteht, der mithilfe der Massenspektrometrie detektierbar ist. In dieser Arbeit wurde die SILAC-Methode genutzt, bei der die Aminosäuren Lysin und Arginin stabil isotopisch an sechs C-Atomen (^{13}C) markiert werden. Damit unterscheiden sie sich um 6 Dalton von unmarkierten Aminosäuren. Tackett und Mitarbeiter etablierten 2005 eine SILAC-basierte Methode zur Identifizierung zufällig koelutierter Proteine (*I-DIRT=Isotopic Differentiation of Interactions as Random or Targeted*). Dabei wurden unmarkierte Wildtyp-Zellen mit markierten Tag-Zellen vor der Aufreinigung 1:1 gemischt und nur Proteine, die aus den markierten Zellen stammten als spezifisch deklariert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass dieses Protokoll für die AKT2-Interaktionen nur bedingt anwendbar ist. Eine Interpretation der Daten nach I-DIRT würde alle koelutierten Proteine als unspezifisch gebunden klassifizieren, da sich leichte und schwere Proteine gleichmäßig angereichert haben. Eine Limitation der Methode ist demnach, dass nur stabile Proteinkomplexe ausreichend aus den rekombinanten, markierten Zellen angereichert werden können, wobei es bei transienten Interaktionspartnern zu einem Austausch mit nicht markierten Proteinen aus der Wildtyp-Kontrolle während der Aufreinigung kommen kann (Kito et al., 2008). Daher war es für die AKT2-spezifische Interaktionsanalyse wichtig, ein Kontrollexperiment durchzuführen, bei dem die Proben nach der Aufreinigung gemischt wurden (*MAP=Mixing after purification*) (Wang and Huang, 2008). Proteine, die auch bei diesem Experiment eine Anreicherung aus beiden Proben zeigten, konnten somit sicher als falsch positiv klassifiziert werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass man durch den Vergleich mit der I-DIRT-Methode weitere Informationen zur Art der Interaktion erhält. Transiente Interaktionen zeigen nur eine Anreicherung der Tag-Proteine bei MAP, stabile Interaktionen auch bei MBP (*Mixing before purification*, Mischen der Probe vor der Aufreinigung). Für AKT2 ergab sich aus diesen Experimenten die Erkenntnis, dass die meisten der eingegangenen Proteininteraktionen transienter Natur sind.

Ein Problem, das sich hieraus nun ergibt, ist die Tatsache, dass affinitätsbasierte Aufreinigungsmethoden nur bedingt zur Identifizierung transienter Proteininteraktionen

geeignet sind. Stabile Interaktionen überdauern das teilweise lange Aufreinigungsprotokoll, wobei transiente Interaktionen dabei verloren gehen können. Eine Möglichkeit, diese Verluste zu minimieren ist das chemische Quervernetzen der interagierenden Proteine zum Beispiel mit Formaldehyd (Herzberg et al., 2007). Versuche, auch transiente Interaktionspartner von AKT2 durch Formaldehydquervernetzung zu detektieren, waren jedoch in dieser Arbeit nicht zielführend.

Man müsste also speziell für eher transient interagierende Proteine neue Methoden zur Quervernetzung und zur schonenden Aufreinigung von Proteinkomplexen aus der Zelle entwickeln. Mit den heutigen Methoden zur Proteininteraktionsanalyse ist anzunehmen, dass viele Interaktionen nicht detektiert werden können. Mit dem PLA gibt es eine Methode, die *in situ* Proteininteraktionen nachweisen kann und somit besonders zur Verifikation transienter Interaktionen sowie der Regulation von Interaktionen geeignet ist. Als Screeningmethode ist der PLA jedoch nicht einzusetzen, da er als Antikörper-basiertes Verfahren die Kenntnis über eine spezifische Interaktion voraussetzt.

4.3 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden durch die Analyse der AKT2-spezifischen Proteininteraktionen mittels Tandem Affinitätsaufreinigung und *Proximity Ligation Assay* zwei neue Bindungspartner von AKT2 entdeckt. α -Enolase und Elongationsfaktor 2 weisen dabei auf neue AKT-vermittelte Funktionen im Rahmen von Metabolismus und Translationsregulation hin.

Als weiteres Ergebnis dieser Arbeit konnten die meisten AKT2-Proteininteraktionen als transiente Interaktionen charakterisiert werden. Nur der HSP90/Cdc 37-Komplex ist stabil an AKT2 gebunden. In Zusammenhang mit dem schon beschriebenen Phänomen, dass HSP90/Cdc 37 eine Gerüstfunktion für die Interaktion mit den AKT-Substraten eNOS und ASK1 ausübt, könnte der stabile HSP90/Cdc 37/AKT-Komplex eine wichtige Voraussetzung für die Kinase-Substrat-Interaktion sein und damit ein allgemeines Prinzip AKT-vermittelter Signaltransduktion darstellen.

5 Literaturverzeichnis

- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996a). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15, 6541–6551.
- Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., and Cohen, P. (1996b). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 399, 333–338.
- Altenberg, B., and Greulich, K.O. (2004). Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84, 1014–1020.
- Anderson, K.E., Coadwell, J., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol.* 8, 684–691.
- Baba, T., Kobayashi, H., Kawasaki, H., Mineki, R., Naito, H., and Ohmori, D. (2010). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with phosphorylated Akt resulting from increased blood glucose in rat cardiac muscle. *FEBS Lett.* 584, 2796–2800.
- Bader, S., Kühner, S., and Gavin, A.-C. (2008). Interaction networks for systems biology. *FEBS Lett.* 582, 1220–1224.
- Bai, L., Wang, Y., Fan, J., Chen, Y., Ji, W., Qu, A., Xu, P., James, D.E., and Xu, T. (2007). Dissecting multiple steps of GLUT4 trafficking and identifying the sites of insulin action. *Cell Metab.* 5, 47–57.
- Barati, M.T., Rane, M.J., Klein, J.B., and McLeish, K.R. (2006). A proteomic screen identified stress-induced chaperone proteins as targets of Akt phosphorylation in mesangial cells. *J. Proteome Res.* 5, 1636–1646.
- Basso, A.D., Solit, D.B., Chiosis, G., Giri, B., Tsihchlis, P., and Rosen, N. (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* 277, 39858–39866.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332.
- Biggs, W.H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7421–7426.
- Bottermann, K., Reinartz, M., Barsoum, M., Kötter, S., and Gödecke, A. (2013). Systematic Analysis Reveals Elongation Factor 2 and α -Enolase as Novel Interaction Partners of AKT2. *PLoS ONE* 8, e66045.
- Bozulic, L., Surucu, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. (2008). PKB α /Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol. Cell* 30, 203–213.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857–868.
- Bürckstümmer, T., Bennett, K.L., Preradovic, A., Schütze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G., and Bauch, A. (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods* 3, 1013–1019.
- Calera, M.R., Martinez, C., Liu, H., Jack, A.K., Birnbaum, M.J., and Pilch, P.F. (1998). Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* 273, 7201–7204.
- Campanella, M.E., Chu, H., and Low, P.S. (2005). Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *PNAS* 102, 2402–2407.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318–1321.
- Chan, T.O., Rittenhouse, S.E., and Tsihchlis, P.N. (1999). AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 965–1014.

- Chen, G.I., and Gingras, A.-C. (2007). Affinity-purification mass spectrometry (AP-MS) of serine/threonine phosphatases. *Methods* 42, 298–305.
- Chen, K., Luo, Z., Tang, J., and Zheng, S.J. (2011). A critical role of heat shock cognate protein 70 in Apoptin-induced phosphorylation of Akt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 200–204.
- Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F., and Birnbaum, M.J. (2001a). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 276, 38349–38352.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., and Birnbaum, M.J. (2001b). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728–1731.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.
- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell* 6, 41–51.
- Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D.R., Hue, L., and Rider, M.H. (1997). Phosphorylation and Activation of Heart 6-Phosphofructo-2-kinase by Protein Kinase B and Other Protein Kinases of the Insulin Signaling Cascades. *J. Biol. Chem.* 272, 17269–17275.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499–3511.
- Drummond, A., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., et al. (2011). Geneious v5.4.
- Dunham, W.H., Mullin, M., and Gingras, A.-C. (2012). Affinity-Purification coupled to Mass Spectrometry: Basic Principles and Strategies. *PROTEOMICS* 12, 1576–1590.
- Everett, A.D., Stoops, T.D., Nairn, A.C., and Brautigan, D. (2001). Angiotensin II regulates phosphorylation of translation elongation factor-2 in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H161–H167.
- Fayard, E., Tintignac, L.A., Baudry, A., and Hemmings, B.A. (2005). Protein kinase B/Akt at a glance. *J. Cell. Sci.* 118, 5675–5678.
- 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.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245–246.
- Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T.A., McCabe, T.J., Fujita, N., Tsuruo, T., and Sessa, W.C. (2002). Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ. Res.* 90, 866–873.
- Frech, M., Andjelkovic, M., Ingley, E., Reddy, K.K., Falck, J.R., and Hemmings, B.A. (1997). High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 8474–8481.
- Gao, T., and Newton, A.C. (2002). The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 277, 31585–31592.
- Gao, T., Furnari, F., and Newton, A.C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol. Cell* 18, 13–24.
- Gao, X., Zhang, Y., Arrazola, P., Hino, O., Kobayashi, T., Yeung, R.S., Ru, B., and Pan, D. (2002). Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 699–704.
- Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., et al. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 112, 197–208.

- Gavin, A.-C., Bösche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.-M., Cruciat, C.-M., et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141–147.
- Gottlob, K. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes & Development* 15, 1406–1418.
- Graham, J.W.A., Williams, T.C.R., Morgan, M., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G., and Sweetlove, L.J. (2007). Glycolytic Enzymes Associate Dynamically with Mitochondria in Response to Respiratory Demand and Support Substrate Channeling. *Plant Cell* 19, 3723–3738.
- Hanada, M., Feng, J., and Hemmings, B.A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 1697, 3–16.
- 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.
- Hawley, S.A., Selbert, M.A., Goldstein, E.G., Edelman, A.M., Carling, D., and Hardie, D.G. (1995). 5'-AMP Activates the AMP-activated Protein Kinase Cascade, and Ca²⁺/Calmodulin Activates the Calmodulin-dependent Protein Kinase I Cascade, via Three Independent Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270, 27186–27191.
- Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated Protein Kinase Kinase from Rat Liver and Identification of Threonine 172 as the Major Site at Which It Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 27879–27887.
- Herzberg, C., Weidinger, L.A.F., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J., and Commichau, F.M. (2007). SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics* 7, 4032–4035.
- Hiester, A. (2013), Proteininteraktionen der Proteinkinase AKT1, Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, *Promotionsverfahren eröffnet*
- Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F., and Wymann, M.P. (2000). Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287, 1049–1053.
- Horman, S., Beauloye, C., Vertommen, D., Vanoverschelde, J.-L., Hue, L., and Rider, M.H. (2003). Myocardial Ischemia and Increased Heart Work Modulate the Phosphorylation State of Eukaryotic Elongation Factor-2. *J. Biol. Chem.* 278, 41970–41976.
- Horman, S., Vertommen, D., Heath, R., Neumann, D., Mouton, V., Woods, A., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., Hue, L., et al. (2006). Insulin Antagonizes Ischemia-induced Thr172 Phosphorylation of AMP-activated Protein Kinase α -Subunits in Heart via Hierarchical Phosphorylation of Ser485/491. *J. Biol. Chem.* 281, 5335–5340.
- Huang, Q., Lan, F., Zheng, Z., Xie, F., Han, J., Dong, L., Xie, Y., and Zheng, F. (2011). Akt2 kinase suppresses glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-mediated apoptosis in ovarian cancer cells via phosphorylating GAPDH at threonine 237 and decreasing its nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* 286, 42211–42220.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 648–657.
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K.-L. (2003a). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development* 17, 1829–1834.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003b). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577–590.
- Jahn, R., Lang, T., and Südhof, T.C. (2003). Membrane Fusion. *Cell* 112, 519–533.
- Jiang, Z.Y., Zhou, Q.L., Coleman, K.A., Chouinard, M., Boese, Q., and Czech, M.P. (2003). Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7569–7574.
- Jones, S., and Thornton, J.M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 13–20.

- Jørgensen, S.B., Nielsen, J.N., Birk, J.B., Olsen, G.S., Viollet, B., Andreelli, F., Schjerling, P., Vaulont, S., Hardie, D.G., Hansen, B.F., et al. (2004). The $\alpha 2$ -5'AMP-Activated Protein Kinase Is a Site 2 Glycogen Synthase Kinase in Skeletal Muscle and Is Responsive to Glucose Loading. *Diabetes* 53, 3074–3081.
- Katome, T., Obata, T., Matsushima, R., Masuyama, N., Cantley, L.C., Gotoh, Y., Kishi, K., Shiota, H., and Ebina, Y. (2003). Use of RNA interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/protein kinase B isoforms in insulin actions. *J. Biol. Chem.* 278, 28312–28323.
- Kaul, G., Pattan, G., and Rafeequi, T. (2011). Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochemistry and Function* 29, 227–234.
- Kelly, J.J., and Wildeman, A.G. (1991). Role of the SV40 enhancer in the early to late shift in viral transcription. *Nucleic Acids Res* 19, 6799–6804.
- Kim, A.H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T.F., and Chao, M.V. (2001). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* 21, 893–901.
- Kito, K., Kawaguchi, N., Okada, S., and Ito, T. (2008). Discrimination between stable and dynamic components of protein complexes by means of quantitative proteomics. *Proteomics* 8, 2366–2370.
- Knuesel, M., Wan, Y., Xiao, Z., Holinger, E., Lowe, N., Wang, W., and Liu, X. (2003). Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system. *Mol Cell Proteomics* 2, 1225–1233.
- Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Roth, R.A. (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 271, 31372–31378.
- Koren, J., 3rd, Jinwal, U.K., Jin, Y., O'Leary, J., Jones, J.R., Johnson, A.G., Blair, L.J., Abisambra, J.F., Chang, L., Miyata, Y., et al. (2010). Facilitating Akt clearance via manipulation of Hsp70 activity and levels. *J. Biol. Chem.* 285, 2498–2505.
- Kornau, H., Schenker, L., Kennedy, M., and Seeburg, P. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737–1740.
- Kovacic, S., Soltys, C.-L.M., Barr, A.J., Shiojima, I., Walsh, K., and Dyck, J.R.B. (2003). Akt Activity Negatively Regulates Phosphorylation of AMP-activated Protein Kinase in the Heart. *J. Biol. Chem.* 278, 39422–39427.
- Kovacina, K.S., Park, G.Y., Bae, S.S., Guzzetta, A.W., Schaefer, E., Birnbaum, M.J., and Roth, R.A. (2003). Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J. Biol. Chem.* 278, 10189–10194.
- Krebs, E.G., and Beavo, J.A. (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu. Rev. Biochem* 48, 923–959.
- Kumar, C.C., and Madison, V. (2005). AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* 24, 7493–7501.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C., and Semenza, G.L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3995–4004.
- Li, Y. (2011). The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnol. Lett.* 33, 1487–1499.
- Li, Q., Dai, X.-Q., Shen, P.Y., Cantiello, H.F., Karpinski, E., and Chen, X.-Z. (2004). A modified mammalian tandem affinity purification procedure to prepare functional polycystin-2 channel. *FEBS Lett* 576, 231–236.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.-H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., et al. (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat. Med.* 8, 1153–1160.
- Lin, Y., Wang, Z., Liu, L., and Chen, L. (2011). Akt is the downstream target of GRP78 in mediating cisplatin resistance in ER stress-tolerant human lung cancer cells. *Lung Cancer* 71, 291–297.

- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261–1274.
- Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* 10, 1247–1255.
- Matheny, R.W., and Adamo, M.L. (2009). Current perspectives on Akt Akt-ivation and Akt-ions. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 234, 1264–1270.
- Mayer, B.J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *Journal of Cell Science* 114, 1253–1263.
- Millward, T.A., Zolnierowicz, S., and Hemmings, B.A. (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci* 24, 186–191.
- Miyamoto, S., Murphy, A.N., and Brown, J.H. (2009). Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. *J. Bioenerg. Biomembr* 41, 169–180.
- 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.
- Naguib, M. (2009). Protein-Protein-Interaktion Des Kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins, CARP, Mit Dem Zytoplasmatischen β -Aktin. Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- New, D.C., Wu, K., Kwok, A.W.S., and Wong, Y.H. (2007). G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis. *FEBS J* 274, 6025–6036.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193–199.
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 1, 376–386.
- Pawson, T., Raina, M., and Nash, P. (2002). Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Lett.* 513, 2–10.
- Peng, X.-D., Xu, P.-Z., Chen, M.-L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W.S., Crawford, S.E., Coleman, K.G., et al. (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 17, 1352–1365.
- Peterson, R.T., and Schreiber, S.L. (1999). Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr. Biol.* 9, R521–524.
- Pfaffenbach, K.T., Pong, M., Morgan, T.E., Wang, H., Ott, K., Zhou, B., Longo, V.D., and Lee, A.S. (2012). GRP78/BiP is a novel downstream target of IGF-1 receptor mediated signaling. *J. Cell. Physiol.* 227, 3803–3811.
- 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.
- Potapova, I.A., El-Maghrabi, M.R., Doronin, S.V., and Benjamin, W.B. (2000). Phosphorylation of recombinant human ATP:citrate lyase by cAMP-dependent protein kinase abolishes homotropic allosteric regulation of the enzyme by citrate and increases the enzyme activity. Allosteric activation of ATP:citrate lyase by phosphorylated sugars. *Biochemistry* 39, 1169–1179.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218–229.
- Raupach, A. (2010). Isoform-Spezifische Funktionen Der Proteinkinase Akt in Kardiomyozyten. Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Redpath, N.T., Foulstone, E.J., and Proud, C.G. (1996). Regulation of translation elongation factor-2 by insulin via a rapamycin-sensitive signalling pathway. *EMBO J.* 15, 2291–2297.

- 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.
- Sambrook, J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W., and Lienhard, G.E. (2003). Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* 278, 14599–14602.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101.
- 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.
- Shearer, G., Lee, J.C., Koo, J., and Kohl, D.H. (2005). Quantitative estimation of channeling from early glycolytic intermediates to CO₂ in intact *Escherichia coli*. *FEBS Journal* 272, 3260–3269.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99–111.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1995). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Protein Sci* 3, 2435–2446.
- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.-Y., Bakin, A.V., Baselga, J., and Arteaga, C.L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat. Med.* 8, 1145–1152.
- Shiota, M., Kusakabe, H., Izumi, Y., Hikita, Y., Nakao, T., Funae, Y., Miura, K., and Iwao, H. (2010). Heat shock cognate protein 70 is essential for Akt signaling in endothelial function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 491–497.
- Singh, P., Salih, M., Leddy, J.J., and Tuana, B.S. (2004). The Muscle-specific Calmodulin-dependent Protein Kinase Assembles with the Glycolytic Enzyme Complex at the Sarcoplasmic Reticulum and Modulates the Activity of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase in a Ca²⁺/Calmodulin-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* 279, 35176–35182.
- 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.
- Söderberg, O., Leuchowius, K.-J., Gullberg, M., Jarvius, M., Weibrecht, I., Larsson, L.-G., and Landegren, U. (2008). Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods* 45, 227–232.
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., and Mak, T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29–39.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D. (2005). Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiol Rev* 85, 1093–1129.
- Stein, A., Pache, R.A., Bernadó, P., Pons, M., and Aloy, P. (2009). Dynamic interactions of proteins in complex networks: a more structured view. *FEBS J.* 276, 5390–5405.
- Stumpf, M.P.H., Thorne, T., de Silva, E., Stewart, R., An, H.J., Lappe, M., and Wiuf, C. (2008). Estimating the size of the human interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 6959–6964.
- Summers, S.A., Kao, A.W., Kohn, A.D., Backus, G.S., Roth, R.A., Pessin, J.E., and Birnbaum, M.J. (1999). The role of glycogen synthase kinase 3 β in insulin-stimulated glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 274, 17934–17940.
- Tackett, A.J., DeGrasse, J.A., Sekedat, M.D., Oeffinger, M., Rout, M.P., and Chait, B.T. (2005). I-DIRT, a general method for distinguishing between specific and nonspecific protein interactions. *J. Proteome Res.* 4, 1752–1756.

- Tschopp, O., Yang, Z.-Z., Brodbeck, D., Dümmler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., and Hemmings, B.A. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132, 2943–2954.
- Vander Haar, E., Lee, S.-I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.-H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* 9, 316–323.
- Ventura, A., Meissner, A., Dillon, C.P., McManus, M., Sharp, P.A., Van Parijs, L., Jaenisch, R., and Jacks, T. (2004). Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 10380–10385.
- Vizcaino, J.A., Cote, R.G., Csordas, A., Dianes, J.A., Fabregat, A., Foster, J.M., Griss, J., Alpi, E., Birim, M., Contell, J., et al. (2012). The Proteomics Identifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013. *Nucleic Acids Research* 41, D1063–D1069.
- Wang, X., and Huang, L. (2008). Identifying dynamic interactors of protein complexes by quantitative mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* 7, 46–57.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., and Proud, C.G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.* 20, 4370–4379.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *J. Gen. Physiol.* 8, 519–530.
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* 6, 359–362.
- Wolfrum, C., Besser, D., Luca, E., and Stoffel, M. (2003). Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11624–11629.
- Wymann, M.P., Zvelebil, M., and Laffargue, M. (2003). Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 366–376.
- Xu, X., Song, Y., Li, Y., Chang, J., Zhang, H., and An, L. (2010). The tandem affinity purification method: an efficient system for protein complex purification and protein interaction identification. *Protein Expr. Purif.* 72, 149–156.
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Hemmings-Mieszczak, M., Feng, J., Brodbeck, D., Perentes, E., and Hemmings, B.A. (2003). Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J. Biol. Chem.* 278, 32124–32131.
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Baudry, A., Dümmler, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. (2004). Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem Soc Trans* 32, 350–354.
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Di-Poï, N., Bruder, E., Baudry, A., Dümmler, B., Wahli, W., and Hemmings, B.A. (2005). Dosage-Dependent Effects of Akt1/Protein Kinase B α (PKB α) and Akt3/PKB γ on Thymus, Skin, and Cardiovascular and Nervous System Development in Mice. *Mol Cell Biol* 25, 10407–10418.
- Yao, L.-L., Wang, Y.-G., Liu, X.-J., Zhou, Y., Li, N., Liu, J., and Zhu, Y.-C. (2012). Phenylephrine protects cardiomyocytes from starvation-induced apoptosis by increasing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) activity. *J. Cell. Physiol.* 227, 3518–3527.
- Yap, T.A., Walton, M.I., Hunter, L.-J.K., Valenti, M., de Haven Brandon, A., Eve, P.D., Ruddie, R., Heaton, S.P., Henley, A., Pickard, L., et al. (2011). Preclinical pharmacology, antitumor activity, and development of pharmacodynamic markers for the novel, potent AKT inhibitor CCT128930. *Mol. Cancer Ther.* 10, 360–371.
- Yung, H.W., Charnock-Jones, D.S., and Burton, G.J. (2011). Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner. *PLoS ONE* 6, e17894.
- Zhang, Y.-H.P. (2011). Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications. *Biotechnology Advances* 29, 715–725.
- Zhang, R., Luo, D., Miao, R., Bai, L., Ge, Q., Sessa, W.C., and Min, W. (2005). Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene* 24, 3954–3963.

Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H., and Hung, M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* 3, 245–252.

6 Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich bei meinem Chef und Doktorvater Prof. Dr. Axel Gödecke bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Thema und in diesem Institut zu arbeiten und zu forschen. Vielen Dank für die stetige Unterstützung, das immer offene Ohr, das manchmalige „Piesacken“ und das „Darauf bestehen“.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wilhelm Stahl für das Korreferat dieser Dissertation.

Natürlich möchte ich auch allen Mitarbeitern und Ex-Mitarbeitern des Instituts danken. Ihr seid die besten Kollegen der Welt!

Allen voran Dr. Michael Reinartz, der mir bei so vielen Dingen in dieser Arbeit geholfen hat, und den ich immer mit Fragen nerven konnte.

Meinen nicht nur Kolleginnen, sondern auch guten Freundinnen Dr. Sabine Hamer (Du bist die allerbeste Nachbarin gewesen!), Dr. Annika Raupach (Vielen Dank für die vielen schönen Urlaube mit und ohne Pferd!), Nina Blasberg und Julia Albrecht für's Mitschwitzen, -fluchen und jede Menge Spaß bei und nach der Arbeit.

Susanne Küsters und Dr. Barbara Emde für die viele Hilfe bei Gelen, Western Blots und PLAs.

Vielen Dank auch an unsere (Ex)-Postdocs:

Dr. Stephanie Gödecke - für das Korrigieren und die vielen guten Ratschläge, die ich von dir bekommen habe!

Dr. Sarah Möllendorf - für's manchmalige „Auf die Füße treten“.

Dr. Torben Söker - für die vielfältige Hilfe bei Experimenten und theoretischen Fragen.

Den beiden Nachbararbeitsgruppen AG Krüger und AG Schrader danke ich für die gute Zusammenarbeit, sowohl im Labor als auch nach Feierabend.

Meinem Freund Linus Weinitschke danke ich für die abschließenden Korrekturen dieser Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich natürlich auch meine Eltern nicht vergessen, die es mir ermöglicht haben, zu studieren und damit auch zu promovieren. Vielen Dank für eure Unterstützung!

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass diese Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den

Katharina Bottermann