

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

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

# Proteininteraktion der Proteinkinase AKT 1

Dissertation

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

vorgelegt von

**Andreas Hiester**

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Prof. Dr. Gödecke

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Wesselborg

## Inhaltsverzeichnis

1	Theoretischer Hintergrund	8
1.1	Signaltransduktion	8
1.2	Kinasen und Enzymkaskaden	10
1.3	AKT – Aufbau, Struktur und Funktion	10
1.4	Fragestellung – AKT Isoform spezifische Funktion	19
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Antikörper und Reinigungsbeads	22
2.1.2	Bakterien und Zellkultur Medium	22
2.1.3	Chemikalien	22
2.1.4	Enzyme	23
2.1.5	Restriktionsenzyme	23
2.1.6	Kits	23
2.1.7	Oligonukleotide und Primer	23
2.1.8	Plasmide	24
2.1.9	Puffer und Lösungen	26
2.1.10	Datenbanken	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	27
2.2.2	Agarosegelelektrophorese	27
2.2.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelbanden	27
2.2.4	Ligation von DNA Fragmenten	28
2.2.5	Restriktionsverdauung	28
2.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA	28
2.2.7	Transformation von E-coli	28
2.2.8	Amplifikation von Plasmid DNA	29
2.2.9	Kultur von HEK-293T-Zellen	29
2.2.10	Bestimmung definierter Zellzahlen	30
2.2.11	Transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen	30
2.2.12	Stimulation und Inhibition	30
2.2.13	Präparation von Protein Zellextrakten	30
2.2.14	Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.2.15	Tandem-Affinity-Purification (TAP)	31
2.2.16	Konzentration des Proteineluates nach TAP	33

2.2.17	SDS-Polyacrylgelelektrophorese zur Trennung von Proteinen	33
2.2.18	Detektion von Proteinen nach Western Blot	34
2.2.19	Färbung von Proteinen nach SDS Polyacrylgelaufftrennung	34
2.2.20	Tryptische Proteinverdauung in Gelfragmenten	35
2.2.21	Nano-LC-MS/MS Analyse	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Klonierung	39
3.2	Stimulation	44
3.3	Tandem Affinitätsreinigung (TAP)	48
3.4	Massenspektrometrie	53
4	Diskussion	57
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	67

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
aE	arbiträre Einheiten
AGC-Kinase	Proteinfamilie, verwandt mit cAMP-abhängiger Protein Kinase/cGMPabhängiger Kinase und PKC
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AS160	<i>Akt substrate of 160 kDa</i>
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
BAD	<i>Bcl-2-AN-Tagonist-of-Cell-Death</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BGH pA	Polyadenylierungssignal des <i>bovine growth hormone</i>
bla	β-Lactamase Promotors
bidest.	Zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BCA Assay	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Serumalbumin vom Rind
bzw.	beziehungsweise
CAGGS	<b>C</b> ytomegalovirus-Enhancer, Hühner β- <b>A</b> ktin Promotor und Kaninchen β- <b>G</b> lobin poly-A <b>S</b> ignal
CMV	Zytomegalie-Virus
env	<i>envelope</i> (Hüllprotein)
c	centi-
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CH <sub>2</sub> O	Formaldehyd
CMV	Cytomegalovirus
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	doppeltdeionisiertes Wasser
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EGRF / EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Rinderserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FOXO 1-4	<i>forkhead box 1-4</i>
g	Gramm, gravidation
gag	<i>Group Antigen</i> , Gruppenspezifisches Antigen
GLUT	Glukosetransporter
GSK	Glykogensynthase Kinase
h	<i>hour</i> , Stunde
HA	<i>Human influenza hemagglutinin</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure

IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>
I/R injury	<i>ischemia/reperfusion (I/R) injury</i> ; Ischämie/Reperfusionsschaden
IKK	<i>IκB kinase (Inhibitor of kappa B)</i>
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
k	kilo-
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Kaliumhexacyanidoferrat(III)
KO	Knock Out
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie
loxP	<i>locus of crossing over</i>
μ	micro-
m	milli- /Meter
M	molar
MDM	<i>murine double minute</i>
min	Minute(n)
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC	mTOR Komplex
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
n	nano-
NaBH <sub>3</sub> CN	Cyanoborhydrid
NaCH <sub>3</sub> COOH	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Natriumthiosulfat
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> , nicht essentielle Aminosäuren
NP-40	Nonoxinol 40
OD	optische Dichte
p21 CIP	<i>p21 CDK-interacting protein 1</i>
p21 KIP	<i>p21 Kinase inhibitory protein</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS (PBST)	<i>Phosphate buffered Saline</i> (mit 0,1 % Tween)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> , Plättchenaktivierender Faktor (PAF)
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
PEI	Polyethylenamin
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PHLPP	<i>PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase</i>
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PP2A	Protein-Phosphatase-2A
PRAS40	<i>proline-rich Akt substrate of 40 kilodaltons</i>
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten

REV	<i>regulator of virion expression</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RRE	REV-responsive Element
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
TBS (TBST)	<i>Tris buffered Saline</i> (mit 0,1 % Tween)
TE-Puffer	Tris EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tsc2	<i>Tuberous sclerosis protein 2</i>
U	Unit
UTR	<i>Untranslated region</i> , untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
Ser	Serin
VIP	Vasoaktive Intestinale Polypeptide
WB	Western Blot
WBA	Western Blot Analyse
z.B.	zum Beispiel
Zeo	Zeozin

## **1 Theoretischer Hintergrund**

### **1.1 Signaltransduktion**

Das Leben und Überleben eines Organismus ist maßgeblich davon abhängig, in welchem Rahmen er auf die Umwelt mit deren Einflüssen, Gefahren und Unwägbarkeiten reagiert. Auf sich ändernde Umgebungen und Situationen muss er stets adäquat reagieren, damit der Organismus weiter bestehen kann.

Ebenso, wie der Mensch sich an neue Umgebungen und Situationen anpassen und auf sie reagieren muss, so muss auch eine einzelne Zelle Informationen aus der Umgebung aufnehmen und auf sie reagieren.

Wie aus der Grundlagenliteratur zu entnehmen ist, antworten Zellen auf spezifische chemische Stoffe in ihrer Umgebung mit gerichteten Reaktionen. Dabei äußert sich dieses Ansprechen auf chemische Botenstoffe in einer Veränderung der Zelleigenschaften, Expression von Genen und unter Umständen auch der Apoptose (Berg, 2007).

Über den veränderten Zellstoffwechsel, die Expression von Genen oder den kontrollierten Zelltod reagiert die Zelle auf die Einflüsse der Umwelt und gibt Informationen weiter.

Im Allgemeinen läuft die Signalübertragung stets nach dem gleichen Muster ab.

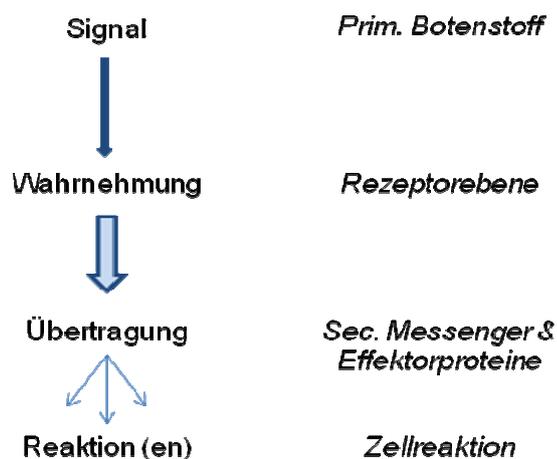
Zunächst wird ein primärer Botenstoff ausgeschüttet. Primäre Botenstoffe sind chemische Signalmoleküle, die durch direkte Reizung des Organismus freigesetzt werden, wie z. B. nach Verletzung, nach Nahrungsaufnahme (VIP, Insulin) oder anderen Reizen, wie z.B. Verbrennungen, Schmerz, Gefahr und Erregung.

Primäre Botenstoffe werden ins Blut abgegeben (endokrin) oder wirken lokal (parakrin). Bei parakrinen Botenstoffen befindet sich die Rezeptorzelle in der unmittelbaren Umgebung, bei endokrinen Signalstoffen kann die Rezeptorzelle weiter entfernt im Körper liegen, und der Botenstoff wird über das Blut dorthin transportiert. In beiden Fällen wird der Signalstoff von einem Rezeptor erkannt und gebunden. Man unterscheidet transmembranöse Rezeptoren von intrazellulären Rezeptoren. Substrate für intrazelluläre Rezeptoren müssen lipophile Eigenschaften besitzen, um die Zellmembran durchdringen zu können. Wasserlösliche, lipophobe Hormone binden daher immer an transmembranöse Rezeptoren. Durch die Detektion des Botenstoffes kommt es zur Veränderung der Tertiär- und Quartärstruktur des Rezeptors, und somit zu einer Weiterleitung der Information nach intrazellulär.

## 9 Theoretischer Hintergrund

Hier wird das Signal durch *second messenger Proteine* weitergeleitet. *Second messenger* werden nach Aktivierung eines Hormonrezeptors freigesetzt, dienen der Signalverstärkung und initiieren nachgeschaltete Signalkaskaden. Zu den wichtigsten *second messengern* zählt zyklisches AMP (cAMP), zyklisches GMP (cGMP), Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>), Diacylglycerin (DAG) und Calciumionen (Ca<sup>2+</sup>) (Löffler et al. 2007, S. 773 ff). Über den Einsatz von *second messengern* lässt sich ein Signal verstärken. Auch konvergieren verschiedenste Rezeptorsubstrate auf dieselben sekundären Botenstoffe, so dass unterschiedliche Faktoren Auslöser gleicher intrazellulärer Reaktionen sein können.

Im Folgenden werden durch die *second messenger* Effektoren aktiviert die zu einer Reaktion der Zelle auf den dargebotenen Reiz führen. Die Aktivierung der Effektorproteine erfolgt durch Phosphorylierung, Konformationsänderung, limitierte Proteolyse oder induzierte Interaktion von Proteinen (Löffler et al. 2007, S. 773 ff).



**Abb. 1:** Signale aus der Umwelt werden über Rezeptoren aufgenommen und nach intrazellulär weitergeleitet, wo auf der Ebene der *second messenger* eine Verstärkung des Signals stattfindet. Über Effektorproteine wird eine für das eingehende Signal spezifische zelluläre Antwort ausgelöst. (Modifiziert nach Berg, 2007).

## 1.2 Kinasen und Enzymkaskaden

Das von außen an die Zelle herangetragene Signal kann durch eine Vielzahl intrazellulärer Reaktionen weitergeleitet werden. Einer der wichtigsten Mechanismen ist die Proteinphosphorylierung durch eine Kinase. Proteinkinasen übertragen in der Regel Phosphatreste von ATP auf Serin- bzw. Threoninreste eines Zielproteins.

Durch diese kovalente Modifikation wird das Zielsubstrat in seinen Eigenschaften verändert und häufig aktiviert oder deaktiviert. Auch Änderung der subzellulären Lokalisation kann eine Folge sein. Eine Proteinkinase, die eine zentrale Rolle bei der Weiterleitung von Signalen spielt, ist die Proteinkinase B (AKT).

## 1.3 AKT – Aufbau, Struktur und Funktion

AKT ist eine intrazelluläre Serin/Threonin-Kinase, welche wesentliche zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Apoptose, Proliferation und Metabolismus reguliert (Gonzalez and McGraw, 2009). Desweiteren wird AKT im Zusammenhang mit Zell-Motilität, Angiogenese, Herzhypertrophie und Modulation der Transkription beschrieben (Brazil et al., 2002). Einige wichtige Erkrankungen, wie z.B. die Entstehung von Diabetes mellitus, sowie die Tumorgenese sind eng mit der Proteinkinase AKT verknüpft (Clayton et al., 2010).

Die Proteinkinase B (AKT) wurde erstmalig 1991 beschrieben (Hill and Hemmings, 2002). Hierbei gelang es der Gruppe um Coffey und Woodgett, sowie Jones et al. durch PCR aus cDNA aus *human cell lines* MCF-7 und WI38 die Information für die Proteinkinase B (AKT) zu amplifizieren. Wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den bereits bekannten Proteinkinasen A und C wurde sie Proteinkinase B genannt (Coffey and Woodgett, 1991), (Jones et al., 1991). Die neu entdeckte Proteinkinase, die in allen Zellen vorkommt, vornehmlich aber in den Zellen der Lunge, des Herzens und des Gehirns zu finden ist, wurde weiter untersucht und es wurden drei Isoformen, AKT 1, AKT 2 und AKT 3 (auch PKB $\alpha$ , PKB $\beta$  und PKB $\gamma$ ) isoliert und charakterisiert (Manning and Cantley, 2007).

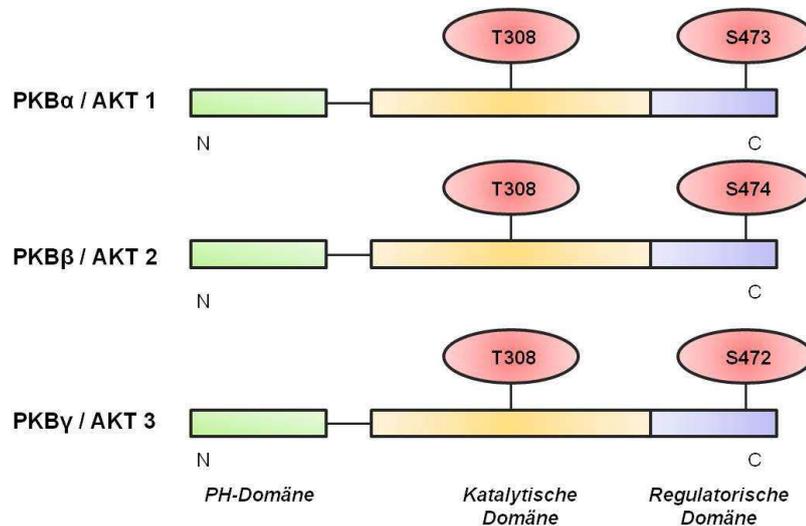
### Struktureller Aufbau von AKT

Obwohl die drei Isoformen von AKT von drei verschiedenen Genen codiert werden, weist ihre Primärstruktur eine 80 - prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz, sowie eine gleiche Domänenstruktur auf (Yang et al., 2004).

AKT 1 besteht aus 480 Aminosäuren, AKT 2 aus 481 Aminosäuren und AK 3 aus 479 Aminosäuren, und sie besitzen somit ein Molekulargewicht um ca. 55,7 kDa. Alle 3

## 11 Theoretischer Hintergrund

Isoformen des Enzyms bestehen aus einer N-terminalen Pleckstrin Homologie Domäne (PH), einer zentral gelegenen katalytischen Domäne und einer C-terminalen regulatorischen Domäne.



**Abb. 2:** Darstellung der drei Isoformen AKT 1, AKT 2 und AKT 3. Die Struktur der drei Formen ist gleich, bestehend aus einer PH-Domäne, einer mittig liegenden katalytischen Domäne und einer regulatorischen Domäne am C-Terminus. (Abbildung modifiziert nach Hill and Hemmings, 2002).

Die ca. 100 Aminosäuren lange N-terminale PH-Domäne dient im Zuge der Aktivierung von AKT zur Translokation an die Plasmamembran. Über eine kurze Helix (ca. 40 Aminosäuren) ist die PH-Domäne mit der katalytischen Domäne verbunden. Die C-terminal gelegene regulatorische Einheit weist hydrophobe Eigenschaften auf, ein Charakteristikum der Familie der AGC-Kinasen (Song et al., 2005).



**Abb. 3:** Darstellung der Aminosäuresequenz von AKT 1 mit farblich gekennzeichneten Domänen. Grau dargestellt ist die N-terminale PH Domäne. Über eine kurze Helix ist diese mit der katalytischen Domäne verbunden (gelb). C-terminal befindet sich die hydrophobe regulatorische Einheit (grün).

### Aktivierung und Inaktivierung von AKT

AKT gehört zu der Klasse der Serin/Threonin Proteinkinasen und katalysiert die Übertragung von Phosphatgruppen auf Hydroxylgruppen seiner Substratproteine.

Dabei unterliegt AKT selbst einer Regulation, die über Phosphorylierung an Threonin 308 und im Falle von AKT 1 an Serin 473 die Aktivität des Enzyms bestimmt (Alessi et al., 1996). Die Phosphorylierung von AKT ist ein wichtiges Glied in der Signaltransduktionskette, die durch Insulin und Wachstumsfaktoren, wie z.B. IGF1, PDGF (Franke et al., 1995), EGF und *basic FGF* ausgelöst wird (Burgering and Coffey, 1995). Dabei ist zu erwähnen, dass der Aktivierungsweg über den Insulinrezeptor für alle AKT Isoformen gleich ist.

Der Insulinrezeptor gehört zur Familie der Rezeptor Tyrosin-Kinasen (RTK). Er besteht aus zwei  $\alpha$ -Untereinheiten, die extrazellulär liegen und zwei transmembranösen  $\beta$ -Untereinheiten. Die Einheiten sind jeweils über Disulfidbrücken verbunden. Im intrazellulären Teil der  $\beta$ -Untereinheit befindet sich die Proteinkinasedomäne. Diese Proteinkinase wird durch extrazelluläre Bindung von Insulin bzw. von Wachstumsfaktoren an die  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert und löst so eine intrazelluläre

Signalkaskade aus. An die phosphorylierten Rezeptoruntereinheiten bindet eine Vielzahl von Proteinen, die in ihrer Gänze als Insulinrezeptorsubstrat bezeichnet werden (IRS). Einmal an den Insulinrezeptor gebunden vermittelt das IRS durch die Lipidkinase Phosphoinosid-3-kinase die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>). Hiernach teilt sich der Phosphorylierungsweg. Der Serinrest wird durch *Mammalian Target of Rapamycin Complex 2* (mTORC2) phosphoryliert, während Threonin 308 durch die PIP<sub>3</sub>-abhängige Proteinkinase (PDK1) phosphoryliert wird. Beide Enzyme aktivieren unter Verbrauch von ATP AKT (Berg, 2007, Gonzalez and McGraw, 2009).

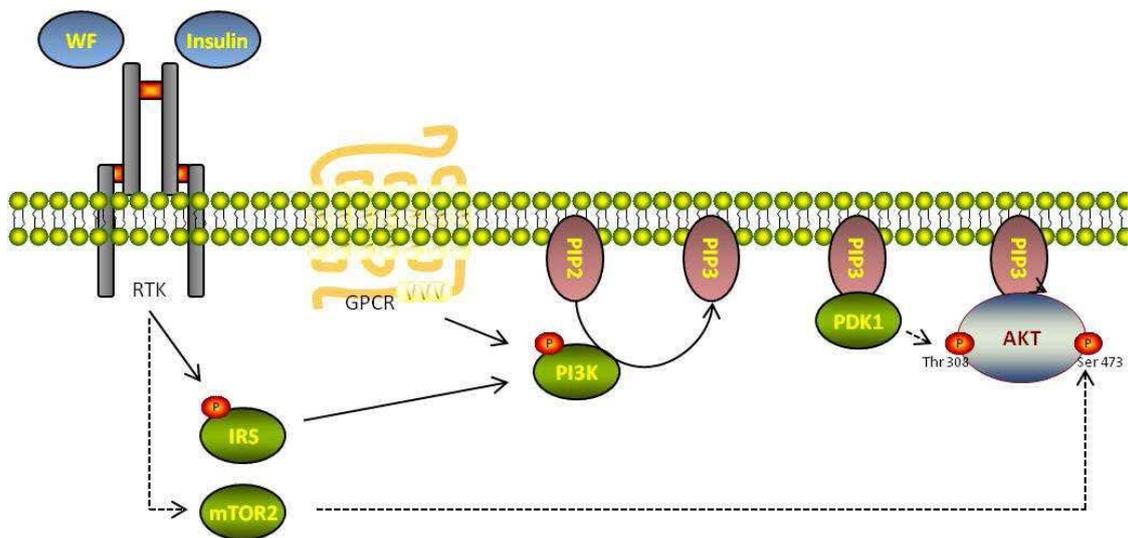
Zur vollständigen Aktivierung des Enzyms ist eine Phosphorylierung beider Phosphorylierungsstellen notwendig. Song et. al. zeigte 2005, dass die alleinige Phosphorylierung von Threonin 308 zur partiellen Aktivierung der Kinase führt, die alleinige Phosphorylierung von Serin 473 jedoch so gut wie keinen Effekt auf die Aktivität des Enzyms hat (Song et al., 2005).

Durch die Aktivierung des Insulinrezeptors werden gleichzeitig Phosphatasen aktiviert, die durch Dephosphorylierung das Insulinsignal beenden. Maßgeblich beteiligt sind Lipidphosphatasen, die PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> hydrolysieren, sowie Protein-Tyrosin Phosphatasen zur Beseitigung von Phosphogruppen am Insulinrezeptor (Berg, 2007). Die Inaktivierung von AKT selbst erfolgt vornehmlich über die Dephosphorylierung der regulatorischen Phosphorylierungsstellen die Protein-Phosphatase-2A (PP2A) (Cazzolli et al., 2001).

Die Lipidphosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), welche im Wesentlichen den PIP<sub>3</sub> – Spiegel reduziert, ist in hohem Maße an der Inaktivierung von AKT beteiligt (Stambolic et al., 1998).

In Vitro führt eine Behandlung mit den PI-3 Kinase Inhibitoren Wortmannin und LY 294002 zur herabgesetzten Phosphorylierung und Aktivität von AKT (Alessi et al., 1996).

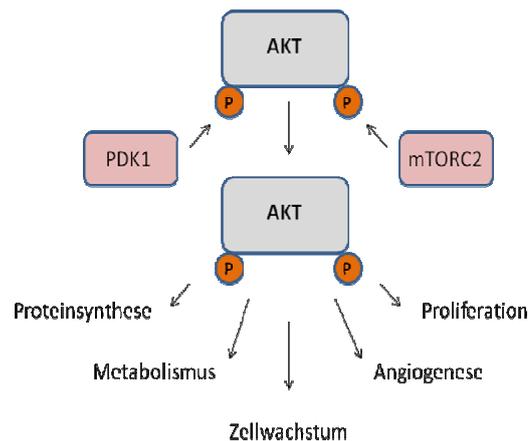
## 14 Theoretischer Hintergrund



**Abb. 4:** PI3-Kinase/AKT Signalweg. Über Bindung von Wachstumsfaktoren (WF) oder Insulin an Tyrosinkinase-Rezeptoren, sowie über Ligandenbindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren wird die Aktivierung von AKT initiiert. Dabei wird die Phosphoinosid-3-kinase (PI3K) direkt oder indirekt über ein Insulinrezeptorsubstrat (IRS) phosphoryliert und katalysiert die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3). PIP3 rekrutiert die PIP3-abhängige Proteinkinase (PDK1) und AKT an die Zellmembran und phosphoryliert AKT an Thr 308. Vollständig wird AKT durch die Phosphorylierung an Ser 473 aktiviert, was durch *Mammalian Target of Rapamycin Complex 2* (mTORC2) vermittelt wird. (Abbildung modifiziert nach Manning and Cantley, 2007)

### Physiologische und Pathophysiologische Funktion von AKT

Wie bereits beschrieben spielt AKT eine zentrale Rolle bei der Kontrolle vielfältiger zellulärer Funktionen, wie z.B. Proteinsynthese, Apoptose, Zellwachstum, Metabolismus und Angiogenese (Gonzalez and McGraw, 2009) und übt somit Einfluss auf physiologische, sowie pathophysiologische Prozesse aus (Brazil and Hemmings, 2001).



**Abb. 5:** Physiologische Wirkgebiete von AKT; durch die Phosphorylierung wird AKT aktiviert und nimmt Einfluss auf die verschiedensten zellulären Prozesse. (Abbildung modifiziert nach Gonzalez and McGraw, 2009).

### AKT und Herzwachstum

Aus der Literatur ist stets ein enger Zusammenhang zwischen AKT und dem postnatalen Herzwachstum zu erkennen. Unter Insulin- und Ernährungseinflüssen (Shiojima et al., 2002), durch verstärkte Belastung, z.B. beim Ausdauertraining (Wilkins et al., 2004; Konhilas et al., 2004; Konhilas et al., 2005), erhöhte Herzbelastung, wie bei der Hypertonie und durch fortgeschrittene Herzerkrankung, z.B. bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz (Haq et al., 2001; Taniyama et al., 2005) kommt es zu einer Aktivierung von AKT. AKT reguliert über eine Inhibition des GSK3 $\beta$ - und des FOXO-Signalweges und über die Aktivierung des mTOR-abhängigen *progrowth pathway* die Größe der Kardiomyozyten (Walsh, 2006). Dabei ist der Effekt von AKT auf das Myokard abhängig von der Dauer der Aktivierung.

O'Neill und Abel zeigten 2005, dass kurze, physiologische Stimuli, wie z.B. Insulineinfluss, IGF1 oder Ausdauertraining zu einer physiologischen Hypertrophie des Myokards führen, sowie zu einer erhöhten Ausschüttung von VEGF, welches

hinsichtlich möglicher Ischämie/Reperfusionsschäden (*I/R injury*) protektiv auf den Herzmuskel wirkt. Langanhaltende Aktivierung von AKT führt zu maladaptiven Prozessen. Aufgrund der hohen AKT Spiegel in der Zelle kommt es unabhängig von der Aktivierung des Insulinrezeptors zur Phosphorylierung von IRS 1/2 und zur Degradation des Proteins. Im Weiteren führt dies zu einer herabgesetzten Aktivität der PI3-Kinase, die u.a. die Herzmuskelzelle vor *I/R injury* schützt.

Desweiteren führt eine langanhaltende Aktivierung von AKT zu einer verminderten Freisetzung von VEGF bei gleichbleibendem Hypertrophiesignal für die Kardiomyozyten, was im Verlauf zu einem Ungleichgewicht zwischen Herzmuskelmasse und Angiogenese, und folglich zu Zelltod und Fibrose führt (O'Neill and Abel, 2005).

### AKT und Tumorerkrankungen

Als wichtiger Angelpunkt für Zellproliferation konnte ein enger Zusammenhang zwischen AKT und verschiedensten Tumorerkrankungen dargestellt werden. Eine Überexpression wird bei Ovarial-, Mamma-, Prostata- und Pankreaskarzinomen beschrieben (Ruggeri et al., 1998, Bellacosa et al., 1995). Die prokanzerogene Wirkung von erhöhten AKT Spiegel in der Zelle resultiert aus dem regulatorischen Einfluss von AKT auf Apoptose, Zellproliferation und Angiogenese.

AKT greift auf verschiedenste Weise in die Zellapoptose ein. Beispielsweise ist eines der ersten jemals identifizierten anti-apoptotischen Substrate von AKT BAD (*Bcl-2-AN-Tagonist-of-Cell-Death*). Dieses Protein ist Teil der proapoptotischen BCL-2 Familie, die nach Aktivierung zur Ausschüttung von Cytochrom C ins Zytosol führt. AKT wiederum führt über Phosphorylierung an einem Serinrest (Ser136) zur Bindung von BAD an zytosolische Proteine und so zu Inaktivierung der apoptotischen Kaskade (Hill and Hemmings, 2002).

Im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen konnte ebenfalls ein Einfluss von AKT auf die Zellproliferation gezeigt werden. Zhou et al. konnten 2001 nachweisen, dass HER2/neu über den AKT Signalweg Einfluss auf wachstumsregulierende Proteine in Karzinomzellen nimmt (Zhou et al., 2001).

Eines der als erstes identifizierten Zielproteine von AKT ist das mit dem Glucosestoffwechsel eng verbundene GSK3 $\beta$  (Cross et al., 1995). Neben dem bekannten Einfluss auf den Glucosestoffwechsel führt eine Inaktivierung von GSK3 $\beta$  durch AKT zu einer Inhibierung der Degradation von DNA-Transkriptionsfaktoren (Hill and Hemmings, 2002).

Invasives Zellwachstum ist ein wesentliches Merkmal maligner Tumorerkrankungen. Verschiedene Studien haben ergeben, dass AKT möglicherweise ein invasives Wachstum von Tumorzellen unterstützt. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen mit hoher AKT-Expression auch erhöhte Level an Metalloproteasen aufweisen, die zur Zerstörung der umliegenden Matrix von Nöten und somit grundlegend für ein invasives Wachstum sind (Kim et al., 2001; Park et al., 2001).

### AKT und Pankreashypertrophie

Die Wirkung von Insulin ist aus der Literatur weitreichend bekannt. Neben der Aufnahme von Glucose aus dem Blut in Muskel und Leberzellen, ist für Insulin eine anabole Wirkung hinsichtlich vieler Organe beschrieben (Clayton et al., 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Translokation von GLUT4 Rezeptoren zur Zellmembran durch AKT vermittelt wird. In Zellkulturversuchen konnte nachgewiesen werden, dass eine Herunterregulation von AKT zu einer verminderten Translokation von GLUT4 Rezeptoren an die Zellmembran und hierdurch zu einer verringerten Glucoseaufnahme in die Zelle führt (Gonzalez and McGraw, 2009).

Wie bereits für verschiedene Tumorentitäten, sowie für die Herzhypertrophie beschrieben, führt eine Überexpression an AKT auch zu einer Hypertrophie des Pankreas. Hierbei wird eine Hypertrophie der Pankreaszelle, wie auch eine Zunahme der Zellzahl beschrieben (Yang et al., 2004). Da in diesem Rahmen auch die Größe und Zahl der Langerhans'schen Inselzellen zunimmt, wird die Insulinproduktion verändert und führt über diesen veränderten Glucosestoffwechsel zum Diabetes mellitus.

Protein	Phosphorylierungsstelle	Effekt
AS160	Ser588, Thr642	Inhibiert
ASK1	Ser83	Inhibiert
Bcl-2-AN-Tagonist-of-Cell-Death (BAD)	Ser99	Inhibiert
Caspase-9	Ser196	Inhibiert
Chk1	Ser280	Inhibiert
eNOS	Ser1177	Aktiviert
FOXO1	Thr24, Ser256, Ser319	Inhibiert
FOXO3	Thr32, Ser253, Ser315	Inhibiert
FOXO4	Thr32, Ser197, Ser262	Inhibiert
GSK3 $\alpha, \beta$	Ser21/Ser9	Inhibiert
IKK $\alpha$	Thr23	Aktiviert
MDM2	Ser166	Aktiviert
p21 CIP1	Thr157	Inhibiert
p27 KIP1	Thr157	Inhibiert
PRAS40	Thr246	Inhibiert
RAF1	Ser259	Inhibiert
TSC2	Ser939, Thr1462	Inhibiert

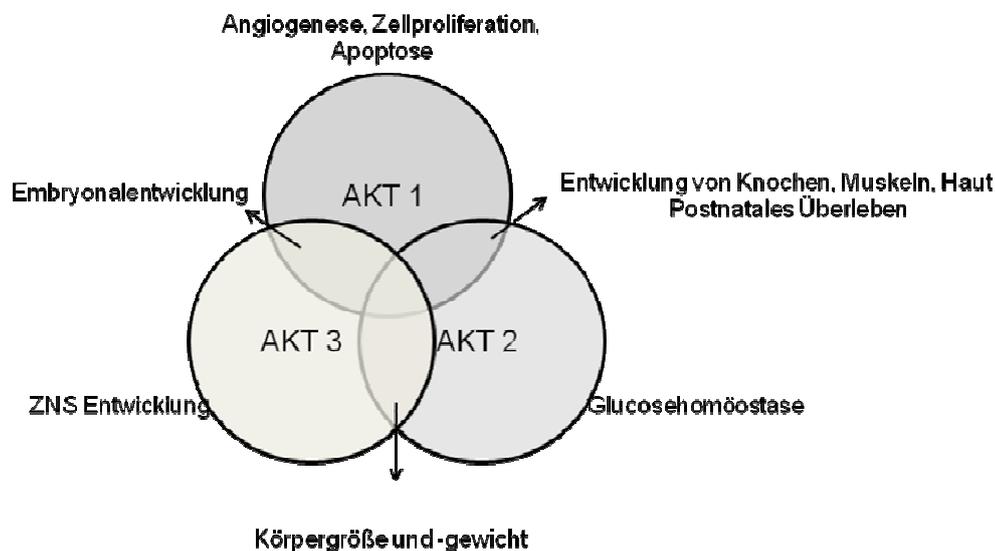
**Tab. 1:** Die Tabelle zeigt die Substrate, die von AKT nach seiner Aktivierung phosphoryliert werden und somit in ihrer Funktion aktiviert, bzw. inhibiert werden. Die mittlere Spalte zeigt die Phosphorylierungsstellen der einzelnen Proteine an. (Tabelle modifiziert nach Manning and Cantley, 2007).

## 1.4 Fragestellung – AKT Isoform spezifische Funktion

Wie in Kapitel 1.3 erwähnt konnten bei der Entdeckung von AKT drei Isoformen beschrieben werden, AKT 1, AKT 2 und AKT 3. In weiterführenden Versuchen wurden AKT Isoform-spezifische Knockout-Mäuse erzeugt, deren unterschiedliche Phänotypen auf spezifischen Funktionen der einzelnen Isoformen hinweisen (Gonzalez and McGraw, 2009). So fielen Zellen, die kein AKT 1 exprimieren durch eine erhöhte Apoptoserate, AKT 1-Knockout Mäuse durch eine geringe Körpergröße auf (Chen et al., 2001; Cho et al., 2001b). AKT 2-Knockout Mäuse entwickelten einen Diabetes mellitus Typ 2. In der Zellkultur waren Glucoseverwertungsstörungen auffällig (Cho et al., 2001a; Garofalo et al., 2003)

Durch Ausschalten des Gens, welches für AKT 3 kodiert, fallen Mäuse durch ein beeinträchtigtetes Gehirnwachstum auf (Tschopp et al., 2005).

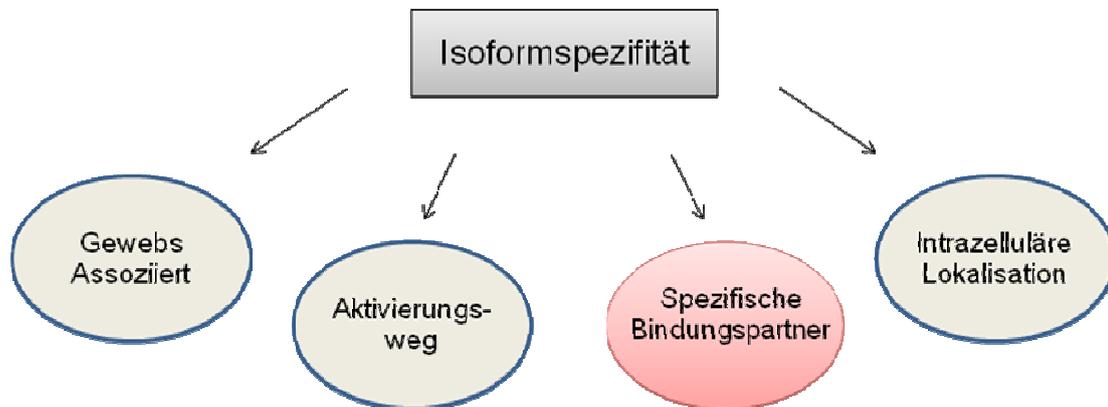
Bei kombinierten Knockouts der AKT Isoformen konnte nachgewiesen werden, dass sich die oben genannten metabolischen Vorgänge nicht strikt unter der Kontrolle der jeweiligen Isoform befinden, sondern dass es überlappende Kompensationsmechanismen unter den drei Isoformen gibt (Gonzalez and McGraw, 2009)



**Abb. 6:** Überlappende Funktionen der einzelnen AKT Isoformen nachgewiesen durch separate und kombinierte Knockouts der verschiedenen Proteinkinasen. Nachgewiesen wurden phänotypische Ausfälle bei Einzel- und Doppelknockout. (Abbildung modifiziert nach Gonzalez and McGraw, 2009)

Die hohe Homologie der AKT Isoformen auf Proteinebene wirft nun die Frage auf, auf welche Weise die Isoform-spezifische Funktion von AKT ausgeübt werden könnte. Ausschlaggebend müssen hier die geringen Sequenzunterschiede in den AKT-

Isoformen sein, die letztlich dazu führen, dass die Isoformen unterschiedliche Funktionen wahrnehmen und die Zellfunktion in spezifischer Weise modulieren. Dabei können die in Abb. 7 zusammengefassten Mechanismen eine Rolle spielen:



**Abb.7:** Potentielle Mechanismen isoformspezifischer Funktionen im Körper. (Abbildung modifiziert nach Gonzalez and McGraw, 2009).

- *Aktivierungsweg:* Die AKT Isoformen könnten durch aktivierende Signale unterschiedlich stark aktiviert werden, so dass eine der Isoformen eine dominante Funktion in verschiedenen Zellen übernimmt.
- *Selektives Expressionsniveau:* Unterschiede im Expressionsniveau könnten bei Co-Expression dazu führen, dass eine Zelle unter dem dominierenden Einfluss einer der exprimierten Isoformen steht.
- *Intrazelluläre Lokalisation:* Die Sequenzunterschiede zwischen AKT-Isoformen, könnten eine unterschiedliche Assoziation mit subzellulären Kompartimenten begründen.
- *Spezifische Bindungspartner:* AKT-Isoformen könnten aufgrund der Sequenzunterschiede mit unterschiedlichen Bindungspartnern interagieren und auf diesem Wege verschiedene Signalwege aktivieren.

## 21 Theoretischer Hintergrund

Insbesondere stellt die Möglichkeit, dass AKT 1 und AKT 2 durch spezifische Komplexbildung mit anderen Proteinen in unterschiedlichem Maße Stoffwechsel und Zellwachstum beeinflussen, eine interessante Hypothese dar, da man heute weiß, dass Signaltransduktion häufig nicht durch Einzelproteine, sondern vielmehr durch Proteinkomplexe ausgeführt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob sich mittels Tandem Affinitätsreinigung (TAP) und Massenspektrometrie spezifische Interaktionspartner von AKT 1 identifizieren lassen, die Rückschlüsse auf die AKT abhängige Signaltransduktion zulassen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper und Reinigungsbeads

*Prim. Antikörper:* mouse anti-HA (Sigma), mouse anti-AKT 1 (Sigma), rabbit anti-panAKT (Sigma), rabbit anti-phosphoAKT-Ser (Sigma)

*Sek. Antikörper:* Goat Anti-Mouse, IRD<sup>®</sup>eye 680 CW, Lot # B80508-01 (LICOR Biosciences, Lincoln, USA)

Goat Anti-Rabbit, IRD<sup>®</sup>eye 800 CW, Lot # B90302-03 (LICOR Biosciences, Lincoln, USA)

*Beads:* anti-Flag M2 Affinity Gel, Streptactin Sepharose – 50% Suspension (IBA), StrataClean Resin (Stratagene)

#### 2.1.2 Bakterien und Zellkultur Medium

LB-Nährmedium: (Hefeextrakt (5 g/l), Trypton (10 g/l), NaCl (0,5–10 g/l))

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen)

Einfrier-Medium: 4/5 Volumen DMEM, 1/10 FCS 10% (*fetal calve serum*), 1/10 DMSO (Dimethylsulfoxid)

Optimem<sup>®</sup> (Invitrogen)

#### 2.1.3 Chemikalien

Acrylamid/Bis Rotiphorese Gel 40 (29:1) (Roth), Agar (Roth), Agarose electrophoresis grade (Invitrogen), Ammoniumbicarbonat (Roth), Ampicillin (Roth), Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Sigma), Biotin (Sigma), Bromphenolblau (Serva), Bovines Serum Albumin (BSA) (Fluka), Calciumchlorid - CaCl<sub>2</sub> (Merck), Dimethylsulfoxid (DMSO) (Invitrogen), Dithiothreitol (DTT) (Roche), Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Sigma), Essigsäure (Merck), Ethanol (Merck), Ethidiumbromid (ICN Biomedicals), FCS (*fetal calve serum*) (Invitrogen), Glycerol (Sigma), Glycin (Merck), Indol-3-essigsäure (IAA) (Merck) Iodacetamid (Sigma), Isopropanol (Merck), Kaliumferricyanid (=Kaliumhexacyanidoferrat(III)) - K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (Merck), Lipofectamin (Invitrogen), Magermilchpulver (Sucofin), Methanol (Merck), Natriumacetat (Merck), Natriumbutyrat (Sigma), Natriumcarbonat (Roth), Natriumchlorid (Merck), Dinatriumhydrogenphosphat - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck),

## 23 Material und Methoden

Natriumdihydrogenphosphat -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck), Natriumthiosulfat –  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (Merck), 1M Natronlauge (Roth), Nonoxinol 40 (NP-40) (Sigma), ortho-Phosphorsäure (Merck), Paraformaldehyd 37% (Merck), Polyethylenamin (PEI) (Sigma), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma), Proteinase-Inhibitoren-Cocktail (Sigma), 37% Salzsäure (Merck), Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid (SDS) (Roth), Silbernitrat (Roth), Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Roth), Tris Ultra Pure (MP Biomedicals), Tween 20 (Sigma)

### 2.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Roche), Klenow (exo-), NheI, Phosphonukleotidkinase / T4-PNK, PstI, SbfI, SmaI, T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase, Platinum-Pfx-DNA-Polymerase (Invitrogen), Taq-Polymerase (Invitrogen), Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma),

### 2.1.5 Restriktionsenzyme

BsrGI, EcoRI, HpaI, BamHI, AgeI, XbaI (New England Biolabs),

### 2.1.6 Kits

BCA Protein Assay Kit (Pierce), NucleoBond PC100/500 Midi/Maxi DNA Kit (Macherey Nagel), QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

### 2.1.7 Oligonukleotide und Primer

Zur Amplifikation der c-DNA von AKT 1 und des TAP-Tags wurden folgende Primer verwendet:

1	N-Tag-for	5` - ATGGGCGGGTACCCATACGACGTGCCCGAC – 3`
2	N-Tag-rev	5` - AACCCCTTATCGTCATCGTCTTTATAG – 3`
3	AKT 1+Stop	5` - TCAGGCTGTGCCACTGGCTGAGTAGG – 3`
4	AKT 1-ATG	5` - ATGAACGACGTAGCCATTGTGAAGGA – 3`
5	AKT 1-STOP	5` - TTTCTGCAGGGGCTGTGCCACTGGCTGAGTAGG – 3`

Tab. 2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

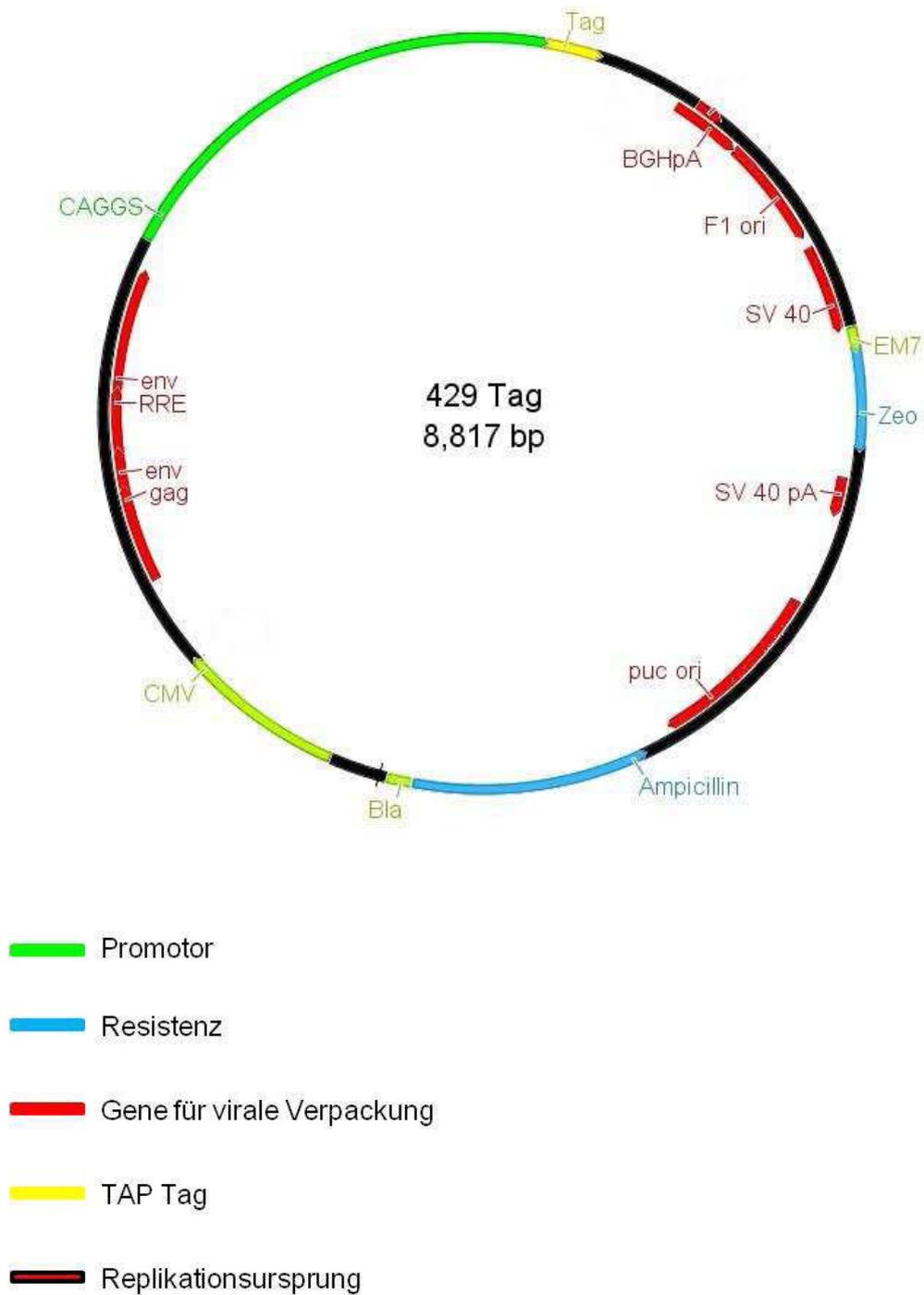
### 2.1.8 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektorkonstrukte basieren auf dem Ausgangsvektor pGJ-C-CAGGS (Abbildung 8, hier genannt 429 Tag), der von Frau Dr. Marian Naguib konstruiert und in ihrer Arbeit ausführlich beschrieben wurde (Naguib, 2009).

Dieses Plasmid ist ein Expressionsvektor, bei dem die zu exprimierenden c-DNA`s unter der Kontrolle des CAG-Promotors (*Cytomegalovirus-Enhancer*, dem Hühner  $\beta$ -Aktin Promotor und dem Kaninchen  $\beta$ -Globin poly-A Signal) exprimiert werden (Niwa et al., 1991). Außerdem ist in diesem Ausgangsvektor das unter 3.2.14 beschriebenen TAP-Tags bereits vorhanden.

Weitere Elemente des Plasmids sind:

- Zwei Antibiotika Resistenzgene (bla –  $\beta$  Lactamase, EM7 Zeozin)
- pUC Ori (Replikationsursprung zur Vermehrung der Plasmide in E-coli)
- Elemente des HIV Virus (CMV, 5' & 3' UTR, gag, env, RRE [= **REV Responsive Elements**; REV = *regulator of virion expression*]), die bei Bedarf zur Produktion lentiviraler Partikel genutzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit kam dies jedoch nicht zum Einsatz, da der Vektor nur mittels transienter Transfektion in die Zelle eingeschleust wurde.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung des Ursprungsvektors pGJ-C-CAGGS (hier genannt 429 Tag). Erklärung im Text. Die Farbkodierung ist für alle weiteren Plasmidkartenabbildungen identisch.

### 2.1.9 Puffer und Lösungen

<b>Biotin Elution Puffer</b>	2,5 mM Biotin in Strep-Puffer
<b>Ladepuffer</b>	30 % Glycerol, 0,25 % Bromphenolblau
<b>Laufpuffer SDS Gel</b>	25 mM Tris, 250 mM Glycin (pH 8,3), 0,1 % SDS
<b>PBS</b>	2,7 mM KCl, 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4
<b>Sammelgelpuffer</b>	1 M Tris (pH 6,8)
<b>SDS-Lämmli Puffer</b>	0,25 M Tris (pH 6,8), 8 % SDS, 20 % Glycerol, 100 mM DTT, 0,1 mg/mL Bromphenolblau
<b>S-EDTA</b>	0,7 mM EDTA, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
<b>Semi-Dry Blotpuffer</b>	190 mM Glycine, 25 mM Tris (pH 8,5), 0,1 % SDS, 20 % Methanol
<b>Strep-Puffer</b>	100 mM Tris-Cl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0
<b>TAE-Puffer</b>	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA
<b>TBS</b>	150 mM NaCl, 3 mM KCL, 25 mM Tris-Cl pH 7,4
<b>TE</b>	10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,4
<b>Trypsinlösung</b>	Trypsin (12,5 ng/µl) in: 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 80 mM Ammoniumbicarbonat ad H <sub>2</sub> O
<b>Trenngelpuffer</b>	1,5 M Tris (pH 8,8)
<b>Zellysispuffer</b>	10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,1% NP 40 pH 8,0 Unmittelbar vor Gebrauch Zugabe von Phosphataseinhibitor

### 2.1.10 Datenbanken

Die nach Silberfärbung und Massenspektrometrie in den einzelnen Banden identifizierten Proteine wurden anschließend mit der Human Protein Reference Database (<http://www.hprd.org>) und der Universal Protein Database (<http://www.uniprot.org/>) abgeglichen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten, in diesem Fall die c-DNA von AKT 1 sowie des TAP-Tags, kam die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Einsatz. Die Pfx-DNA-Polymerase wurde nach Angaben des Herstellers in den empfohlenen Puffern und Settings eingesetzt.

### 2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde sowohl als Trennverfahren verschieden großer DNA-Fragmente als auch als Nachweis erfolgreicher DNA-Modifikation verwendet.

Die restriktionsverdaute DNA wurde in Agarose-Gelen (1-2 %) aufgetrennt. Hierfür wurde Agarose in Wasser aufgekocht und mit 1/100 Volumen TAE-Puffer und Ethidiumbromid (0,006% (v/v)) in Gelwannen gegossen. Zur Aussparung der Geltaschen wurden Plastikämme in die Wannens eingehängt. Nach Abkühlen des Gels wurde es in die mit 0,5 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen eingefüllt. Als Größenstandard diente Lambda-EcoRI/HindIII Marker. Die Elektrophorese wurde bei 150 Volt durchgeführt. Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente mit UV-Licht bei 366 nm sichtbar gemacht.

### 2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelbanden

Die im Agarosegel nach Größe aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter Sichtbarmachung durch UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Elektro-Elution isoliert. Das Gelstück wurde hierzu in einen mit 500 µl TAE-Puffer gefüllten Dialyse-Schlauch überführt und in einer mit 0,5 x TAE Puffer gefüllten Elektrophoresekammer eine Stunde bei 120 Volt eluiert. Anschließend wurde der DNA-haltige Puffer in ein Reaktionsgefäß überführt, in 50% Isopropanol bei 4°C gefällt, zentrifugiert und das Pellet im Anschluss mit 70% Ethanol gewaschen. Hiernach wurde die DNA in TE aufgenommen.

Alternativ zu der manuell durchgeführten Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* eingesetzt, bei dem DNA Fragmente mittels Anionentauschersäulen aus dem Gel gereinigt werden. Bei diesem Verfahren wurde nach den Empfehlungen des Herstellers vorgegangen.

### **2.2.4 Ligation von DNA Fragmenten**

Die durch Extraktion gewonnen DNA Fragmente wurden durch Ligation in Plasmid-DNA eingebracht. Um die Ligationseffizienz zu verbessern wurde die linearisierte Vektor-DNA durch alkalische Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert. Die linearisierte Vektor-DNA wurde hierbei mit 1/10 Volumenanteil 10x Reaktionspuffer und 2U alkalischer Phosphatase für 30 Minuten bei 37°C in Isius inkubiert. Zur Ligation wurde Vektor DNA (100 ng) mit einem vierfachen molaren Überschuss des DNA-Fragmentes mit 1/10 Vol. Ligasepuffer und TE gemischt und mit 400 U T4-Ligase bei 37° Celsius für 2 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65°Celsius für 10 Minuten.

### **2.2.5 Restriktionsverdauung**

Die Restriktionsverdauung von DNA erfolgte nach den von den Herstellern empfohlenen Angaben. Pro µg DNA wurden in der Regel 2 U des Restriktionsenzym eingesetzt. Die Restriktion wurde durch Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen (10 min bei 65°C) beendet .

Alternativ zur Hitzeinaktivierung wurde eine Extraktion des Enzyms mit Phenol-Chloroform durchgeführt. Hierzu wurde im gleichen Reaktionsvolumen Phenol-Chloroform zur Probe gegeben durch vortexen gemischt und für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die DNA befand sich in der oberen wässrigen Phase.

### **2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch das Photometer Nanodrop. Die photometrisch bestimmte  $OD_{260}$  erlaubt Rückschlüsse auf die DNA Konzentration in der vorliegenden Probe (1A 260 U = 50 µg DNA / ml).

### **2.2.7 Transformation von E-coli**

Zu den hier verwendeten kompetenten E-coli XL-1-Blue Zellen wurde Plasmid DNA, bzw. ein Ligationsansatz hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C, mit darauffolgender Abkühlung auf 0 °C für eine Minute. Nach Zugabe von 250 µl LB-Medium (ohne Ampicillin) wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C und 800 rpm geschüttelt.

Im Anschluss wurde der Transformationsansatz auf zwei Agarplatten, eine mit etwa 10 % und die andere mit 90 % des Ansatzes, ausgestrichen. Die über Nacht gewachsenen Kolonien dienten zum Animpfen von Minikulturen (ca. 2 ml), welche bei 37 °C über Nacht geschüttelt wurden.

### **2.2.8 Amplifikation von Plasmid DNA**

Für die Amplifikation der Plasmid DNA wurden 150 ml LB Medium mit 50 µg/ml Ampicillin entweder durch eine Mini-Kultur (2 ml) oder durch eine auf Agar gewachsene Kolonie transformierter E.coli Zellen angeimpft. Die Kultur wurde anschließend bei 37 °C über Nacht geschüttelt.

Zur Gewinnung von Plasmid DNA aus E.coli Zellen wurde das *NucleoBond PC500 DNA Kit* (Macherey & Nagel) verwendet. Die lysierten Zellen wurden hierbei über einen Filter auf die Anionentauschersäulen gegeben. Zur Neutralisation, zum Waschen der Säule und zum Eluieren der gebundenen DNA von der Säule, sowie zur Equibrilierung der Säule im Vorfeld, wurden die vom Hersteller mitgelieferten der Lösungen und Puffer verwendet.

Im Anschluss wurde die DNA mit Isopropanol bei 4 °C gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in TE aufgenommen.

### **2.2.9 Kultur von HEK-293T-Zellen**

Die hier zum Einsatz gekommenen HEK-293T-Zellen wurden in DMEM-Medium unter Zugabe von 10 % FCS (*fetal calve serum*), Glutamin, Aminosäuren und Penicillin/Streptomycin kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt. Bei vollständiger Konfluenz der Kulturschale wurde das Medium abgenommen und die Zellen, nach zwei Waschgängen mit S-EDTA, mittels Trypsin-EDTA von der Zellkulturschale gelöst. Hierbei wurde Trypsin für ca. 5 min bei 37 °C eingesetzt. Das Trypsin-Zellgemisch wurde in DMEM/FCS Medium zur Blockade des Trypsins aufgenommen und die Zellen bei 500 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturschalen ausgesät. Bei Aussähen der Zellen zur folgenden Transfektion wurden die Zellkulturschalen zuvor mit Gelatine beschichtet.

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden diese nach Trypsinisierung und Zentrifugieren in Einfriermedium aufgenommen und umgehend bei -80 °C eingefroren. Das Auftauen erfolgte in normalem DMEM Medium bei Raumtemperatur.

### **2.2.10 Bestimmung definierter Zellzahlen**

Zum Ausplattieren definierter Zellzahlen wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Es wurde eine angemessene Verdünnung der Zellsuspension auf die Zählkammer aufpipetiert, vier Planquadrate unter dem Auflichtmikroskop ausgezählt und deren Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert in Verbindung mit dem Verdünnungsfaktor ergab die Zellzahl.

### **2.2.11 Transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen**

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA in die Zelle wurde die transiente Transfektion mit PEI (Polyethylenamin) durchgeführt. Hierbei wurden tags zuvor  $2 \times 10^7$  Zellen auf einer mit Gelatine beschichteten 15 cm Zellkulturschale ausplattiert und mit 20 ml DMEM-Medium über Nacht inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Pro Zellkulturschale wurden 4 ml Optimem (Invitrogen), 45 µg der Plasmid DNA und 160 µl PEI (Polyethylenimin, 1 µg/ml) auf dem Vortex vermischt und bei Raumtemperatur 30 min ruhen gelassen. Anschließend wurde der Ansatz zu den Zellen gegeben, die nach drei Tagen geerntet wurden.

### **2.2.12 Stimulation und Inhibition**

Für die Stimulation bzw. Inhibition durch Insulin und PI3-Kinaseinhibitoren (LY 294002) wurden die Zellen über Nacht in Hungermedium (DMEM, NEAA, Penicillin/Streptomycin, Glutamin, kein Serum) kultiviert. Für die Versuche wurde das Hungermedium abgenommen und durch Hungermedium mit Insulin oder LY294002 ersetzt.

Zur Stimulation wurde 1 µl (40 I.E.) Insulin pro 1 ml Hungermedium eingesetzt. Für eine Zellkulturschale mit 15 cm Durchmesser wurden 10 ml Medium verwendet. Die Stimulation erfolgte für 15 Minuten bei 37 °C.

Für die Behandlung mit PI3-Kinaseinhibitoren wurde 100 µM LY294002 und ein Volumen von 10 ml Medium eingesetzt. Die Inhibition erfolgte für eine Stunde bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen geerntet.

### **2.2.13 Präparation von Protein Zellextrakten**

Zur Gewinnung der Proteine aus kultivierten Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen. Nach zwei aufeinander folgenden Waschgängen mit 0 °C kaltem PBS (pro 15 cm Zellkulturschale jeweils 10 ml) wurde Zellysispuffer (1,5 ml pro 15 cm

Zellkulturschale) aufpipettiert, welcher zuvor mit Phosphataseinhibitor (Sigma) versehen wurde. Die Zellen wurden mittels Zellschaber (*Fa. Biochrom*) von der Kulturschale gelöst und in ein Falcon-Röhrchen übertragen. Nach Zentrifugieren (45 min bei 4000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand mit den darin gelösten Zellproteinen abgenommen werden. Die gesamte Präparation erfolgte bei 0 °C (auf Eis).

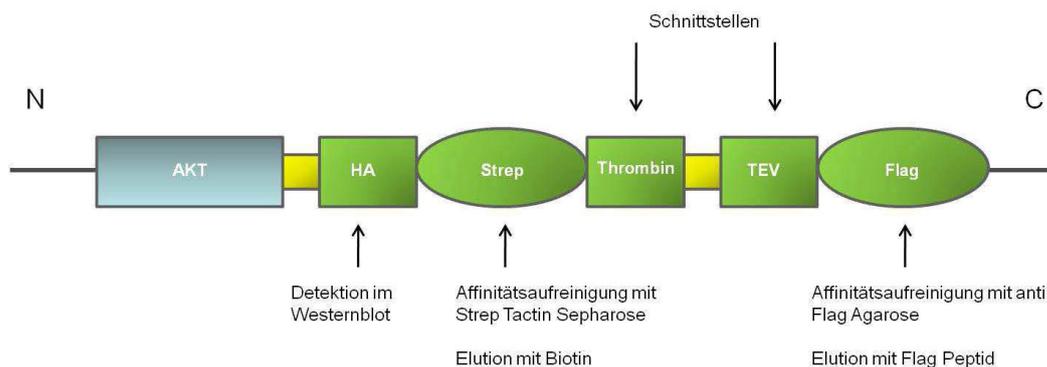
### 2.2.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteinmengenbestimmung wurde ein BCA-Assay angewandt (Smith et al., 1985). Als Referenzwert wurde eine BSA Reihe (25 – 1000 µg/µl) auf einer 96-Loch Mikrotiterplatte vorgelegt. Zur genaueren Bestimmung wurde eine Dreifachbestimmung und eine Mittelung der Werte durchgeführt. Zur Referenzreihe, sowie zu den Proben wurden die mit dem BCA Protein Assay Kit mitgelieferten Reagenzien gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurde eine Absorptionsmessung bei 577 nm mit dem *ELISA Absorbance Reader* durchgeführt.

### 2.2.15 Tandem-Affinity-Purification (TAP)

Die Tandem-Affinity-Purification (TAP) ist eine Methode, die zur Reinigung von Proteinextrakten und Extraktion einzelner Proteine in ihrer physiologischen Bindung an Interaktionspartner etabliert wurde (Puig et al., 2001).

Das Zielprotein musste zunächst mit einem TAP-Tag, entweder N- oder C-terminal, versehen werden. (Puig et al., 2001)



**Abb. 9:** Schematische Darstellung des TAP-Tags, hier N-Linker Strep-TEV-FLAG

Das TAP-Tag besteht aus zwei Bindungsstellen für die Affinitätsreinigungen (STREP und FLAG), einer HA-Bindungsstelle für spätere Detektion im Western Blot, sowie zwei Protease-Schnittstellen (Thrombin und TEV), die jedoch in dieser Versuchsreihe nicht zum Einsatz kamen.

Die TAP erfolgte in zwei Reinigungsschritten und wurde in Säulen bei 4 °C durchgeführt.

### *1. Reinigungsschritt:*

- I. 200 µl Anti-Flag-Agarose in 50 ml Falcon Gefäße überführen
- II. Das abzentrifugierte Proteinlysate wurde zu der Anti-Flag-Agarose gegeben und 1 h bei 4 °C unter Bewegung (400 rpm) binden gelassen. Anschließend lässt man die Anti-Flag-Agarose absetzen.
- III. Der Überstand wurde abgenommen und für spätere Analysen bei 0 °C verwahrt
- IV. Die Anti-Flag-Agarose wurden anschließend die mit Puffer benetzten Säulen gegeben und mit 2 ml TBS gewaschen. Der Waschlösung wurde aufgefangen und für spätere Analysen bei 0 °C verwahrt.
- V. Das gebundene Protein wurde in diesem Schritt durch 1 ml FLAG-Peptid (300 µg/ml) mittels kompetitiver Hemmung aus der Bindung gelöst. 30-50 µl des Eluates wurden für die spätere Analyse bei 0 °C verwahrt, der Rest wurde in den zweiten Reinigungsschritt gegeben.
- VI. Resuspendieren der Anti-Flag-Agarose in 1 ml TBS-Puffer und verwahren derselben für spätere Analysen bei 0 °C.
- VII. Anschließend wurden die Säulen gründlich mit H<sub>2</sub>O dest. gereinigt.

### *2. Reinigungsschritt:*

- I. Befeuchten der Säule mit 10 ml dest H<sub>2</sub>O.
- II. Die Säule wurde verschlossen und mit 10 ml STREP-Wasch-Puffer aufgefüllt. Anschließend wurden 200 µl Streptactinsepharose in die Säule gegeben und die Säule wieder geöffnet.
- III. Das FLAG-Eluat des ersten Reinigungsschrittes wurde anschließend in kleinen Schritten auf die Säule gegeben (10 Tropfen/min). In diesem Schritt bindet die STREP-Sequenz des TAP-Tags an das Streptactin der Streptactinsepharose. Das gesamte Eluat wurde einmal durchlaufen gelassen und der Durchlauf II für die spätere Analyse bei 0°C verwahrt.

- IV. 2 ml STREP-Wasch-Puffer wurde über die Säule gegeben und der Wasch-Durchlauf ebenfalls für spätere Analyse bei 0 °C verwahrt.
- V. In diesem Schritt wurde das gebundene Protein mit 1 ml 2,5 mM Biotin aus seiner Bindung an die Beads gelöst. Das Biotin wurde in 4 x 250 µl Schritten in die Säule geben. Das STREP-Eluat wurde ebenfalls für spätere Analysen bei 0 °C verwahren.
- VI. Die STREP-Beads wurden in 1ml TBS-Puffer resuspendiert und für spätere Analysen bei 0 °C verwahrt.
- VII. Zum Schluss wurden die Säulen gründlich mit H<sub>2</sub>O dest. gereinigt

### 2.2.16 Konzentration des Proteineluates nach TAP

Am Ende des zweiten Reinigungsschrittes (Strep-Eluat) lag das Protein in einem Volumen von 1 ml vor. Durch Zentrifugieren des Eluats durch einen Filter wurde die Proteinmenge konzentriert. Hierzu wurden Filter (Fa. Amicon) mit einer molekularen Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet (*Amicon® Centricon® Centrifugal Filter Devices YM-10*) und das Eluat mit 2500 g für 60 Minuten entsprechend den Herstellerangaben bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Probenröhrchen gedreht und der Überstand wurde für 2 min bei 200 g in ein Sammelgefäß zentrifugiert. Die Proteinprobe wurde in SDS-Lämmli-puffer aufgenommen und für 5 Minuten auf 96 °C erhitzt.

### 2.2.17 SDS-Polyacrylgelelektrophorese zur Trennung von Proteinen

Nach der Reinigung und der Konzentration des Proteinextraktes erfolgte die Gelelektrophorese über ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel. Zur Aussparung der Geltaschen wurden Plastikämme in das Sammelgel eingehängt und nach dessen Polymerisation entfernt. Die 2 mm dicken Gele wurden anschließend in die mit Elektrophoresepuffer (100 ml 10x Tris-Glycin, 5 ml SDS 10 %, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O) gefüllte Elektrophoresekammern überführt. Die im Verhältnis 1:1 mit Lämmli-Puffer versetzten Proteinproben wurden anschließend in die Geltaschen eingefüllt und bei 50 Volt / 16 mA 12 Stunden laufen gelassen.

Trenngel (20 ml)		Sammelgel (20 ml)
5 ml	<i>Acrylamid/Bis Rotiphorese Gel 40 (29:1)</i>	2,5 ml

5 ml (1,5M pH 8.8)	<i>Tris-Puffer</i>	2.5 ml (1M pH 6.8)
0,2 ml	<i>10 % SDS</i>	0,2 ml
10 ml	<i>H<sub>2</sub>O</i>	15 ml
40 µl	<i>TEMED</i>	40 µl
100 µl	<i>APS (10 %)</i>	60 µl

### 2.2.18 Detektion von Proteinen nach Western Blot

Zur Fixierung der im SDS-Acrylamidgel aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose wurde die Western-Blot-Analyse durchgeführt. Das Gel und die Folie wurden hierzu mit Semi-Dry Blotpuffer angefeuchtet und in die Blotkammer überführt. Es wurde ein Strom von 2 mA / cm<sup>2</sup> für 75 min laufen gelassen. Anschließend wurde die Membran 1 h in PBS / Licor Blockierlösung 1:1 bei Raumtemperatur inkubiert.

Der erste Antikörper wurde nach Herstellerangaben 1:1000 in 5 % BSA + 0,1 % Tween bei 4 °C über Nacht eingesetzt. Es folgten 3 Waschgänge mit TBS + 0,1 % Tween. Der zweite Antikörper wurde 1:10.000 in 1:1 PBS / Licorlösung + 0,1 % Tween für 1 h bei Raumtemperatur eingesetzt.

Die anschließende Detektion der hier eingesetzten Fluoreszenzantikörper erfolgte im Infrarot-Bildgebungs-System (Odyssey Sanner, LICOR Biosciences, Lincoln, USA). Das hier eingesetzte System kann zwei unterschiedliche Wellenlängen detektieren (700 nm und 800 nm). Zusätzlich ist eine quantitative Intensitätsbestimmung der Fluoreszenzbanden möglich, da sich die Infrarot-Detektionsmethode linear verhält.

### 2.2.19 Färbung von Proteinen nach SDS Polyacrylgelaufreinigung

Zur Sichtbarmachung der Proteine im Gel nach der Gelelektrophorese wurde die Silberfärbung angewandt (Shevchenko et al., 1996).

Die Volumina der einzelnen Lösungen sind abhängig vom Gelvolumen. Bei einem Gelvolumen von 20 ml wurden je 250 ml der unterschiedlichen Lösungen eingesetzt.

<i>H<sub>2</sub>O dest.</i>	<i>15 min</i>
<i>Fixierlösung I Essigsäure (100 %) 50 ml/l, Methanol 500 ml/L</i>	<i>20 min</i>

<b>Fixierlösung II</b> 500 ml/l Methanol	2 x 10 min
<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	10 min
<b>Thiosulfatreagenz</b> Natriumthiosulfat 200 mg/l	1 min
<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	3 x 20 sek.
<b>Silbernitratlösung</b> Silbernitrat 2 g/l, Formaldehyd (37 %) 200 µl/l	20 min
<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	3 x 20 sek.
<b>Entwickler</b> Natriumcarbonat 30 g/l, Formaldehyd (37 %) 500 µl/l, Natriumthiosulfat 5 mg/l	Sichtkontrolle 5 - 15 min
<b>Stoppreagenz</b> Essigsäure (5 %)	5 min
<b>Lagerung</b> Essigsäure (2 %)	

Tab. 3: Ablauf der Silberfärbung nach Shevchenko et al., 1996

### 2.2.20 Tryptische Proteinverdauung in Gelfragmenten

Zur Vorbereitung der Gelbanden für die Messung der Proteine im Massenspektrometer gehören drei Schritte, das Waschen und Entfärben des Geles, die Reduktion und Alkylierung der Proteine und die Extraktion der Proteine aus dem SDS-Acrylamidgel.

#### Waschen und Entfärben

Im ersten Schritt wurden die Gele nach Silberfärbung zunächst für 2 x 15 min in H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen. Anschließend wurde jede angefärbte Proteinbande mit einem Skalpell möglichst knapp, das heißt ohne nicht gefärbte Gelanteile ausgeschnitten und als etwa 1 mm<sup>3</sup> große Stücke in silikonisierte Eppendorf Gefäße (0,5 ml) überführt und bei 60 °C für 45 min in einer Vakuumzentrifuge dehydriert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 40 µl einer 1:1 Lösung 30 mM Kaliumferricyanid / 100 mM Natriumthiosulfat und Inkubation bei Raumtemperatur. Nach 15 min wurde die Lösung wieder abgenommen, 80 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat zugegeben und bei Raumtemperatur für 15 min gewaschen. Der Waschschrift wurde mindestens dreimal wiederholt, bis die Gelbanden komplett entfärbt waren. Nach dem letzten

Abnehmen der Lösung wurden die Proben erneut für 60 min bei 45 °C in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

### Reduktion und Alkylierung

Zu den nun entfärbten und getrockneten Proben wurden 40 µl 10 mM DTT / 100 mM Ammoniumbicarbonat gegeben. Die Reduktion erfolgte bei 56 °C für 15 min. Nach Abkühlen der Proben wurde die Lösung abgenommen und zur Alkylierung 40 µl 55 mM IAA / 100 mM Ammoniumbicarbonat zugegeben. Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur für 30 min im Dunkeln durchgeführt. Nach Abnahme der Lösung wurden die Gelstücke mit 40 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat für etwa 5 min gewaschen. Es folgte die Zugabe von 40 µl Acetonitril um eine 1:1 Lösung von Ammoniumbicarbonat und Acetonitril zu erhalten. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min wurde die Lösung abgenommen und die Proben erneut für 45 min bei 60 °C in der Vakuumzentrifuge dehydriert.

### Enzymatische Proteinspaltung und Peptidextraktion

Zur enzymatischen Spaltung der Proteine aus den Gelstücken wurden diese mit Trypsinlösung bedeckt (Trypsin 12,5 ng/µl in 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 100 mM Ammoniumbicarbonat) und für 45 min bei 4 °C inkubiert. Zwischendurch wurde regelmäßig kontrolliert, ob die Lösung komplett von den Gelstücken resorbiert wurde und gegebenenfalls nachpipettiert. Nach Ablauf der 45 minütigen Inkubationszeit wurde die überschüssige Lösung abgenommen und die Gelstücke in 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 100 mM Ammoniumbicarbonat für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand, der nun die aus dem Gel extrahierten Peptide beinhaltet, abgenommen und in neue Eppendorf Gefäße überführt.

Zur weiteren Extraktion von Peptiden aus den Gelbanden wurde zu den verbliebenen Gelstücken 20 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat gegeben und die Proben bei Raumtemperatur 10 min durch kräftiges Schütteln bzw. Vortexen vermischt und im Anschluss für 5 Min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde 20 µl Acetonitril zugegeben und erneut für 10 min kräftig geschüttelt und für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem bereits vorhandenen Überstand vereint. Die Gelstücke wurden nun mit 20 µl 5% Ameisensäure versetzt und erneut zehn Min geschüttelt und anschließend für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl Acetonitril und erneutes Schütteln und Inkubieren im Ultraschallbad für 10 bzw. 5 min. Der Überstand wurde zu dem bereits

vorhandenen Überstand hinzugegeben. Die Extraktion mit Ameisensäure und Ammoniumbicarbonat wurde wiederholt. Der Überstandspool wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C verwahrt.

### **2.2.21 Nano-LC-MS/MS Analyse**

Die massenspektrometrischen Analysen der trypsinisierten Proteine wurden von Herrn Dr. rer. nat. Michael Reinartz (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt.

Verwendet wurde ein nano-LC-MS/MS (UltiMate 3000 LC System, Dionex; LTQ-Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific). Die Steuerung erfolgte automatisiert. Hierfür wurde die Chromeleon-Software (Version 6.80, SP2c) für das UltiMate 3000 LC System und die Software XCalibur 2.0.7 für das Massenspektrometer verwendet.

Die nach in 2.2.20 beschriebenenem Verfahren für massenspektrometrische Messung vorbereiteten Peptide wurden zunächst resuspendiert und anschließend zur Entsalzung auf eine mit C-18 Umkehrphasenmaterial gefüllte (Reprosil-Pur C18 AQ, 3 µm, Dr. Maisch), 2 cm lange und 100 µm durchmessende Quarzglas-Vorsäule aufgetragen. Zur chromatographischen Trennung der Probe wurde eine 15-18 cm lange 75 µm durchmessende Quarzglas-Trennsäule eingesetzt. Die Elution der gebundenen Peptide erfolgte entlang eines linearen Lösungsmittelgradienten (Flussrate 230 nl/min). Eingesetzt wurden die Puffer B 1 (84 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure) und A (4 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure). Der Puffer B 1 wurde ansteigend von 4 % bis 60 % über 60 min eingesetzt, anschließend folgte 99 % Puffer B 1 für 5 min. Im Anschluss wurde die Säule mit Puffer A gespült. Die eluierten Peptide wurden anschließend über Elektrosprayionisation (positiver Modus, 2 kV) über eine Transferkapillare (SilicaTip Emitter, New Objectiv, Woburn, USA) bei 140 °C in das Massenspektrometer gegeben.

Die MS Analyse erfolgte automatisiert mit der o.g. Software. Im Anschluss an jeden Scan (Verhältnis Masse/Ladung  $m/z$  300-2000, Ionenfüllwert 1.000.000 Ionen, Auflösung  $r = 60.000$  bei  $m/z = 400$ ) folgte ein MS/MS-Scan der zehn intensivsten Ionen. Hierbei wurden folgende Parameter gewählt: normalisierte Kollisionsenergie der kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) von 35 U, einmalige Wiederholung nach 20 sek bei einer max. Masseabweichung von 10 ppm.

Mit Hilfe der Uniprot Taxonomie 9609-Datenbank wurden die MS/MS-Spektren mit Hilfe des SEQUEST-Algorithmus mit der Bioworks-Software (Thermo-Fischer Scientific) analysiert.

### Parameter und Filter

Enzym:	Trypsin
Massegenauigkeit der Vorläuferionen:	10 ppm
Modifikation:	Cystein-Oxid. Carboxyaminomethylierung, Phosphorylierung von Serin, Threonin, Tyrosin
Delta CN:	0,1
Cross-correlation-Score vs. Charge state:	1,5; 2,0; 2,5; 3,0 für einfach, zweifach, dreifach und vierfach geladene Ionen
Peptidwahrscheinlichkeit:	0,05
Nummer der Haupttreffer:	1

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Klonierung**

Als Ausgang für die Generierung der AKT 1 C-Tag und AKT 1 N-Tag Vektoren wurde das Plasmid pGJ-C-CAGGS (429 Tag) verwendet (Abb. 8).

Die hier eingesetzte copy-DNA (cDNA) von AKT 1 wurde mittels RT-PCR aus RNA gewonnen, welche aus Kardiomyozyten von Mäusen isoliert worden war. Hierzu wurden die Primer Nummer 3, 4 und 5 verwendet (Tab. 2). Da das TAP-Tag sowohl C- als auch N-terminal an AKT 1 angefügt werden sollte, wurden bei der PCR zur Gewinnung der AKT 1 cDNA sowohl Primer mit einem Stop-Codon (Primer Nummer 3, Tab. 2) als auch Primer ohne Stop-Codon (Primer Nummer 5, Tab. 2) eingesetzt.

##### **AKT 1 C-Tag**

Für die Erstellung des C-Tag Vektors wurde das Ausgangsplamid zunächst mit der Restriktionsendonuklease HpaI linearisiert und anschließend das cDNA Fragment von AKT 1 in den Vektor hineinligiert (Abb. 10 B). Die AKT 1 cDNA für den AKT 1 C-Tag Vektor wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer Nummer 5 und Nummer 4 aus Mäuse-Kardiomyozyten amplifiziert (Tab. 2). Der Primer Nummer 5 enthält kein Stop-Codon, was eine Fusion der AKT 1 Sequenz mit dem bereits im Ausgangsvektor vorhandenen TAP-Tag erlaubte. Der Erfolg der Ligation wurde durch Restriktionsanalyse mit dem Enzym PstI überprüft. Abb. 10 B zeigt, dass im Vektor 454 AKT 1 C-Tag die Restriktionsendonuklease PstI drei Schnittstellen aufweist, während im Vektor 429 Tag keine PstI Schnittstelle vorhanden ist. Abb. 10 E zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese nach Restriktionsverdauung der Vektoren 454 AKT 1 C-Tag und 429 Tag mit PstI. Es zeigt sich, dass im Vektor 454 im Gegensatz zum Vektor 429 das AKT 1 Fragment enthalten ist, erkennbar an den DNA-Banden bei 9036 bp, 838 bp und 372 bp. Da der Vektor 429 keine Schnittstelle für PstI vorweist, sieht man nach der Restriktionsverdauung lediglich eine Bande bei 8817 bp.

##### **AKT 1 N-Tag**

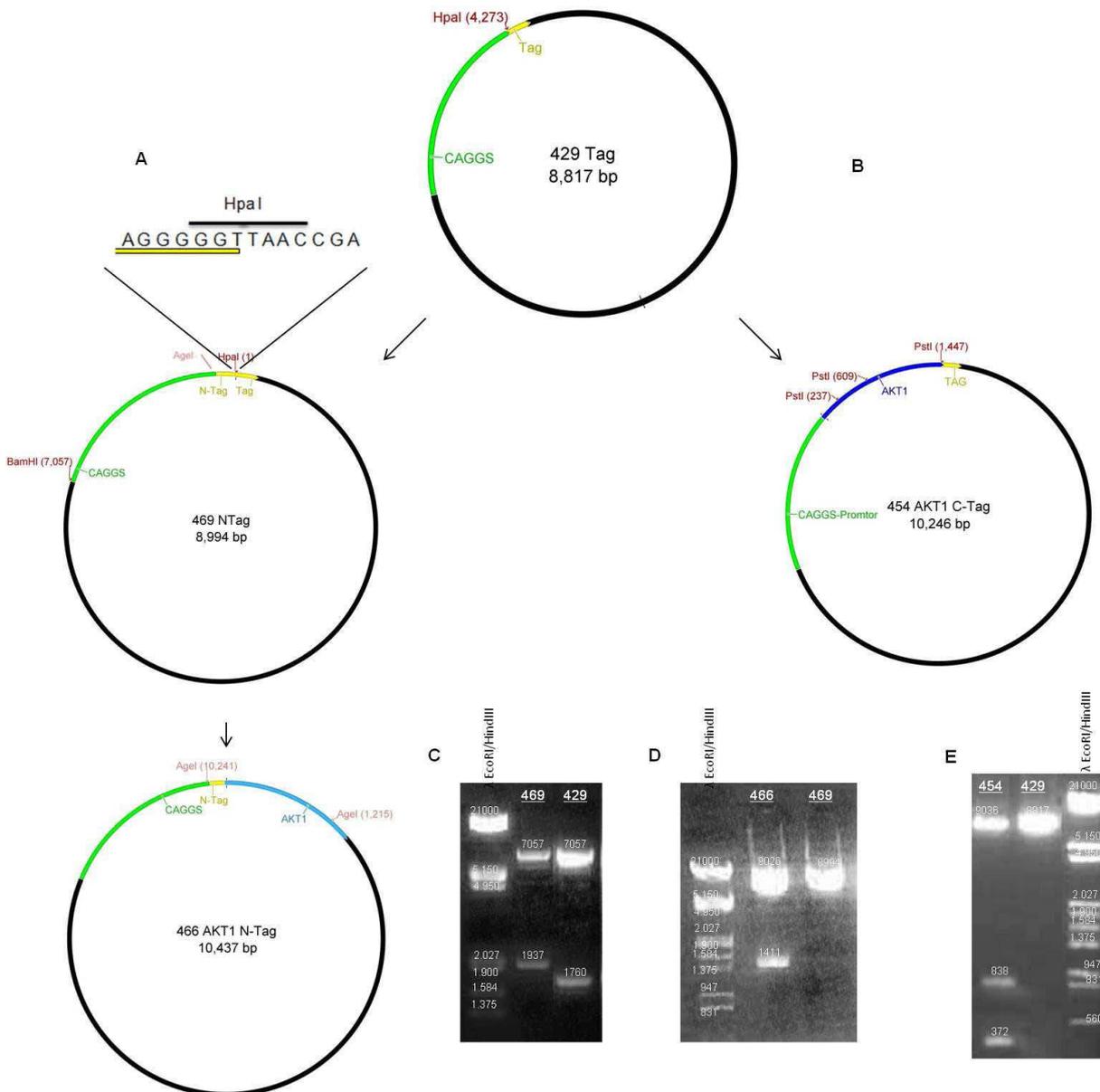
Zur Generierung des AKT 1 N-Tag Vektors waren zwei Klonierungsschritte notwendig. Zunächst wurde die Sequenz für das TAP-Tag aus dem Vektor pGJ-C-CAGGS (429 Tag) unter Verwendung der Primer Nummer 1 und Nummer 2 (Tab. 2) mittels PCR amplifiziert. Dieses PCR Produkt wurde nach Klenow-Behandlung in das Ausgangsplasmid pGJ-C-CAGGS (429 Tag) hineinligiert. Hierzu wurde das Plasmid

## 40 Ergebnisse

429 Tag mit HpaI linearisiert und das zuvor amplifizierte TAP-Tag eingefügt. Hierdurch entstand der Vektor 469 N-Tag, welcher die Tagsequenz zweimal in Tandemanordnung trägt. Durch Ligation des Vektors mit dem TAP-Tag regenerierte sich die Enzymschnittstelle für die Restriktionsendonuklease HpaI genau zwischen den beiden Tags. Abb. 10 A stellt die einzelnen Klonierungsschritte des AKT 1 N-Tag Vektors dar. Die korrekte Ligation des TAP-Tags in den Ausgangsvektor wurde durch Restriktionsanalyse mit BamHI und HpaI überprüft. Abb. 10 C zeigt das gelektrophoretische Ergebnis nach entsprechender Enzymverdauung. Der Vektor 469 weist neben der Bande bei 7057 bp eine weitere Bande bei 1937 bp auf. Der Vektor 429 weist neben der Bande bei 7057 bp eine weitere Bande bei 1760 bp auf. Dies belegt den Einbau des 177 bp großen TAP-Tags in den Vektor 469.

Im nächsten Klonierungsschritt wurde der mit zwei Tags ausgestattete Vektor 469 erneut mit dem Restriktionsenzym HpaI exakt zwischen den beiden Tags linearisiert, und die Sequenz für AKT 1 in den Vektor eingefügt (Abb. 10 A). Um zu verhindern, dass sich an beiden Enden der Gensequenz für AKT 1 ein Tag befindet, wurden zur Amplifikation der cDNA von AKT 1 für den AKT 1 N-Tag Vektor die Primer Nummer 3 und Nummer 4 (Tab. 2) verwendet, wodurch am C-terminalen Ende der AKT 1 Sequenz ein Stop-Codon entstand. Der Erfolg dieses Ligationsschrittes wurde durch Restriktionsanalyse mit der Endonuklease AgeI verifiziert. In Abb. 10 A sieht man, dass sich in Vektor 469 eine AgeI Schnittstelle befindet. Durch Insertion von AKT 1 in den Vektor 469 generiert sich eine zweite Schnittstelle für das Enzym AgeI. Hierdurch entsteht bei Restriktionsverdauung von 466 AKT 1 N-Tag mit AgeI das charakteristische Bandenmuster mit einer Bande bei 9026 bp und 1411 bp, während bei entsprechendem Restriktionsverdau von 469 N-Tag lediglich eine Bande bei 8994 zu finden ist (Abb. 10 D).

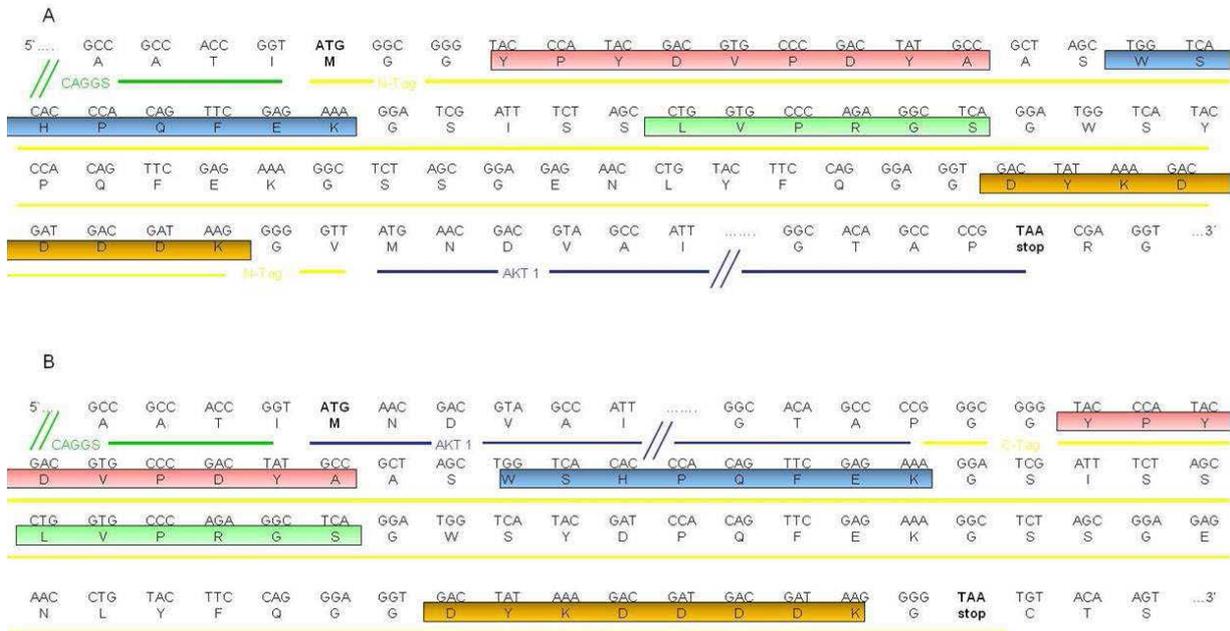
## 41 Ergebnisse



**Abb. 10:** Die Abbildung zeigt die Klonierungswege der Vektoren AKT 1 C-Tag und AKT 1 N-Tag. Ausgangsvektor ist in beiden Fällen der Vektor 429 Tag. A) Nach Ligation des Vektors mit dem N-Tag regeneriert sich die Enzymschnittstelle für HpaI und macht eine erneute Linearisierung des Vektors mit der Restriktionsendonuklease HpaI möglich. Die durch PCR aus dem Vektor 454 AKT 1 C-Tag mit den Primern Nummer 3 und Nummer 4 (Tab. 2) gewonnene AKT 1 Sequenz, welche ein C-terminales Stop-Codon aufweist kann anschließend in das linearisierte Plasmid integriert werden. B) Nach Linearisierung des Ausgangsvektors mit HpaI wird die Gensequenz für AKT 1 in das Plasmid hineinligiert. C) Diagnostische Restriktionsanalyse der Vektoren 429 Tag und 469 N-Tag mit den Endonukleasen BamHI und HpaI. Die erwarteten Fragmentgrößen sind als Zahlen den entsprechenden Banden in Basenpaaren zugeordnet. Links ist der Größenstandard  $\lambda$  - EcoRI/Hind III zu sehen. D) Diagnostische Restriktionsanalyse der Vektoren 466 AKT 1 N-Tag und 469 N-Tag mit der Endonuklease Agel. Die erwarteten Fragmentgrößen sind als Zahlen den entsprechenden Banden in Basenpaaren zugeordnet. Links ist der Größenstandard  $\lambda$  - EcoRI/Hind III zu sehen. E) Diagnostische Restriktionsanalyse der Vektoren 429 Tag und 454 C-Tag mit der Endonuklease PstI. Die erwarteten Fragmentgrößen sind als Zahlen den entsprechenden Banden in Basenpaaren zugeordnet. Links ist der Größenstandard  $\lambda$  - EcoRI/Hind III zu sehen.

## 42 Ergebnisse

Die Vollständigkeit des Inserts, sowie die richtige Orientierung wurden durch Sequenzierung überprüft.



**Abb 11:** Dargestellt sind Auszüge aus der Sequenzanalyse des AKT 1 C-Tag und AKT 1 N-Tag Vektors. Dabei sind das TAP-Tag, sowie Teile des Promotors und Teile der Sequenz von AKT 1 farblich unterstrichen. In den farbigen Kästen sind die Sequenzabschnitte der Tag-Bestandteile für HA (roter Balken), Flag (gelber Balken), Strep (blauer Balken) und die Thrombinschnittstelle (grüner Balken) hervorgehoben. Desweiteren sind die Start- und Stop-Codons fett dargestellt.

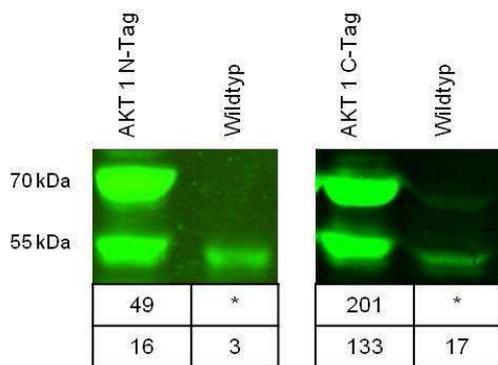
In der Abbildung 11 sieht man Ausschnitte aus den Sequenzanalysen von AKT 1 C-Tag und AKT 1 N-Tag. Im TAP-Tag, welches gelb unterstrichen ist, sind die Anteile HA (rot), Strep (blau), Flag (gelb) und eine in dieser Arbeit nicht verwendete Thrombinschnittstelle (grün) durch farbige Umrandung dargestellt. Man sieht, dass unter A das TAP-Tag N-terminal an die Sequenz von AKT 1 angefügt ist. Ein Start-Codon (ATG) steht nach Übergang aus dem CAGGS Promoter am 5'-Ende des TAP-Tags, die Sequenz von AKT 1 weist am Ende ein Stop-Codon (TAA) auf. Unter B ist die Sequenzanalyse von AKT 1 C-Tag dargestellt. Hier steht nach dem Übergang aus der Promotorsequenz das Startcodon ATG am 5'-Ende des AKT 1. Am 3'-Ende des C-Tags befindet sich ein Stop-Codon (TAA).

An der farblichen Markierung der Tag-Bestandteile (s.o.) sieht man, dass die Orientierung des TAP-Tags bei AKT 1 C-Tag und AKT 1 N-Tag dieselbe ist. Somit steht die HA-Detektionsstelle immer am 5' Ende, während die Flag-Sequenz stets am 3'-Ende zu finden ist.

## 43 Ergebnisse

Nach erfolgreicher Klonierung stand nun ein Plasmid zur Verfügung, welches die Expression von AKT 1 mit einem N-terminalen bzw. C-terminalen Tag zur Affinitätsreinigung erlaubte.

Im Anschluss an die Klonierungsphase wurde die DNA transient in HEK-293T-Zellen transfiziert. 48 – 60 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen von der Kulturschale gelöst, lysiert und ein kernfreies AKT 1 Zellysat präpariert. Zur Kontrolle der Expression wurde dieses anschließend elektrophoretisch getrennt und mittels Western Blot Verfahren detektiert und sichtbar gemacht. Zur Kontrolle wurden gleiche Proteinmengen aus gleich behandelten Wildtypzellen mit auf das Gel aufgetragen.



**Abb. 12:** Westernblot AKT 1 C-Tag und N-Tag aus HEK-293T-Zellen. Primärer Antikörper ist ein Rabbit-Pan-AKT. Sek. Antikörper Anti-Mouse Fluoreszenzantikörper. Endogenes AKT läuft bei 57 kDa, getaggttes AKT bei 70 kDa. Die Tabelle gibt die quantitativen Werte der Intensitätsmessungen der Fluoreszenzbanden an. Die Messergebnisse werden in abiträren Einheiten angegeben (aE).

In Abb. 12 sieht man das Ergebnis der Westernanalyse transfizierter und nichttransfizierter Zellen. Sowohl in den transfizierten als auch in den Wildtypzellen ist eine Bande bei 57 Kilodalton sichtbar, welche dem endogen exprimierten AKT 1 entspricht. Bei den transfizierten Zellen ist zusätzlich eine Bande bei 70 Kilodalton sichtbar. Diese entspricht dem getaggtten AKT 1, da dieses durch das TAP-Tag etwa 13 kDa größer ist als das endogene AKT 1. Des Weiteren ist auffällig, dass die Intensität der endogenen AKT 1 Banden wesentlich schwächer ist als die Intensität der getaggtten AKT 1 Bande. Die Werte der quantitativen Intensitätsmessungen der endogenen AKT Fluoreszenzbanden transfizierter Zellen fallen bei AKT 1 N-Tag um den Faktor 5,3, bei AKT 1 C-Tag sogar um den Faktor 7,8 höher aus als bei Wildtypzellen. Da hier gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, ist davon auszugehen, dass die Gesamtmenge von AKT 1 im Zellysat transfizierter Zellen höher ist als in Wildtypzellen. Eine mögliche Erklärung könnte eine starke Überexpression des getaggtten, sowie des endogenen AKT 1 in transfizierten Zellen sein.

### **3.2 Stimulation**

Um herauszufinden, ob die Fusionsproteine einer ähnlichen Regulation wie das endogene AKT unterliegen, wurden Stimulationstests durchgeführt.

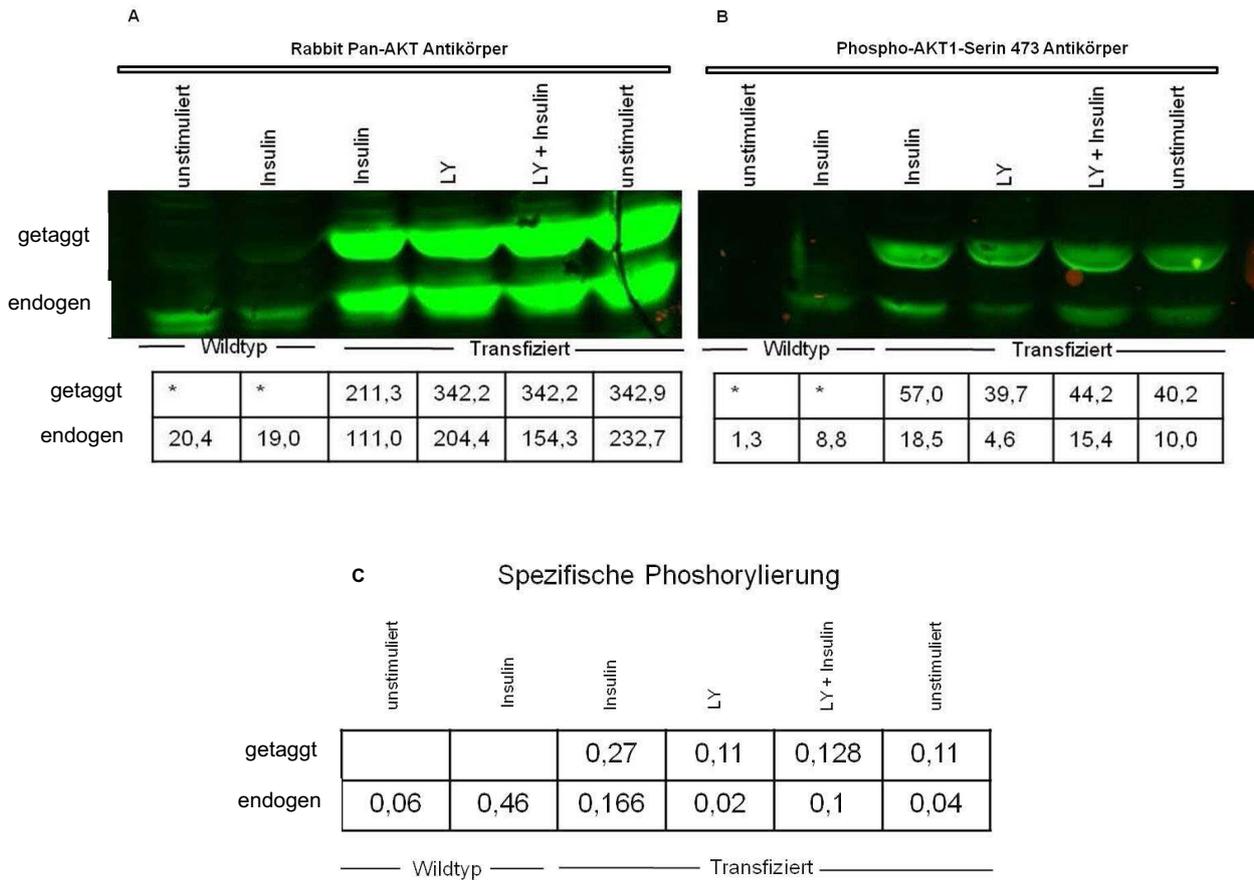
Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wird AKT nach Stimulation der Zelle mit Insulin oder Wachstumsfaktoren phosphoryliert und damit aktiviert. Die Phosphorylierung von Thr 307 und Ser 473 erfolgt nach Stimulation der PI-3 Kinase und anschließender Aktivierung von PDK 1 und dem mTORC Komplex.

Die Zellen wurden zur Stimulation mit Insulin und zur Hemmung der PI-3 Kinase mit LY 294002 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, lysiert und das kernfreie Zelllysate nach gelektrophoretischer Trennung im Western Blot mit unterschiedlichen Antikörpern sichtbar gemacht.

Zum Nachweis eines Stimulationseffektes wurden sechs Zellkulturschalen verglichen. Vier der sechs Schalen wurden transient mit der AKT 1 C- bzw. N-Tag DNA transifiziert, in zwei Schalen wuchsen Wildtypzellen.

Exemplarisch wird hier ein Stimulationsversuch mit AKT 1 C-Tag dargestellt. Stimulation von AKT 1 N-Tag Zellen erbrachte vergleichbare Ergebnisse.

## 45 Ergebnisse



**Abb.13:** Westernblot aus HEK 293 AKT 1 C-Tag nach Stimulation bzw. Inhibition. Primärer Antikörper ist bei A. ein Rabbit Pan-AKT Antikörper, bei B. ein Rabbit Phospho-AKT 1-Serin 473 Antikörper. Sekundärer Antikörper ist in beiden Fällen ein Anti-Rabbit Fluoreszenzantikörper. In den Tabellen sind die Werte der quantitativen Intensitätsmessung der Fluoreszenzbanden eingetragen. Unter Teilabbildung C ist das Verhältnis von phosphoryliertem AKT 1 zur Gesamtmenge von AKT 1 dargestellt. Weitere Beschreibung und Interpretation s. Text.

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der Westernanalyse nach Stimulation bzw. Inhibition von AKT 1. Die verwendeten Antikörper detektieren zum einen das gesamte in der Probe befindliche AKT (Abb. 13 A), zum anderen ausschließlich phosphoryliertes AKT 1 (Serin 473). Letzterer weist somit eine Aktivierung von AKT 1 nach (Abb. 13 B). In den Tabellen unter der Westernanalyse sind die Werte der quantitativen Intensitätsmessung der Fluoreszenzbanden angezeigt. Aufgrund gleicher Probenvolumina ist hier ein quantitativer Vergleich möglich.

In Teilabbildung A der Abbildung 13 wird das Ergebnis des Westernblots nach Umsetzung der Membran mit einem Pan-AKT Antikörper abgebildet. Somit erfolgt hier ein Nachweis der AKT Gesamtmenge. Durch Intensitätsmessung der Fluoreszenzbanden lässt sich auf die Gesamtmenge des detektierten AKT in den

einzelnen Proben rückschließen. Angegeben sind arbiträre Einheiten, daher ist nur ein Vergleich untereinander möglich.

Im Vergleich von unstimulierten zu stimulierten Wildtypzellen erkennt man an den Werten der Intensitätsmessung, dass durch eine Stimulation mit Insulin keine quantitative Veränderung der Banden zu verzeichnen ist, was auf gleichbleibende Mengen von AKT schließen lässt. Vergleicht man die Intensitätswerte von endogenem AKT aus Wildtypzellen mit endogenem AKT aus transfizierten Zellen, so fällt auf, dass in transfizierten Zellen etwa die 5 – 12 fache Menge an nicht-getagtem AKT zu detektieren ist.

Der in Teilabbildung B der Abbildung 13 verwendete Antikörper bindet an phosphoryliertes Serin 473 von AKT 1. Die verschiedenen Intensitäten der Fluoreszenzbanden lassen also Rückschluss auf den Phosphorylierungsgrad und folglich auf die Aktivierung von AKT 1 zu. Vergleicht man zunächst die Intensitätsmessungen der Wildtypzellen miteinander, so fällt auf, dass nach Stimulation der Wildtypzellen mit Insulin die Intensität der Fluoreszenzbande etwa um den Faktor 6 ansteigt. Es lässt sich hier auf eine erhöhte Phosphorylierungsrate und somit auf eine Aktivierung von AKT 1 in Wildtypzellen durch externe Stimulation mit Insulin schließen. Ein ähnlicher Effekt, wenngleich auch nicht so ausgeprägt, lässt sich bei dem getagten AKT 1 beobachten. In den unstimulierten Zellen, also Zellen im Ruhezustand beträgt der Wert der Intensitätsmessung etwa 40. Bei Stimulation der Zellen mit Insulin steigt dieser Wert auf 57 an. Bei Hemmung der PI3-Kinase durch LY bleibt der Phosphorylierungsgrad auf dem Niveau der Zelle im Ruhezustand (40,2 in Ruhe, 39,7 nach LY Behandlung). Bei Behandlung der Zelle mit LY und anschließender Stimulation mit Insulin zeigt sich nur ein geringer Anstieg der Intensität der Fluoreszenzbande (44,2), was im Vergleich zur Bande der Insulinstimulierten Zellen (57,0) auf eine suffiziente Hemmung der PI3-Kinase und damit des Aktivierungsweges von AKT 1 über das hier eingesetzte LY 294002 schließen lässt.

Vergleicht man nun die Intensitäten der Banden von endogenem AKT von nicht stimulierten Wildtypzellen zu nicht stimulierten transfizierten Zellen, so sieht man auch hier, dass sich analog zur etwa zwölffachen Gesamtmenge von AKT 1 (s.o.) auch ein etwa zehnfach intensiveres Phosphorylierungssignal in den transfizierten Zellen erkennen lässt, was den Schluss nahelegt, dass AKT 1 in transfizierten Zellen auch in Abwesenheit von Insulin in einem höheren Maße phosphoryliert vorkommt als in Wildtypzellen.

## 47 Ergebnisse

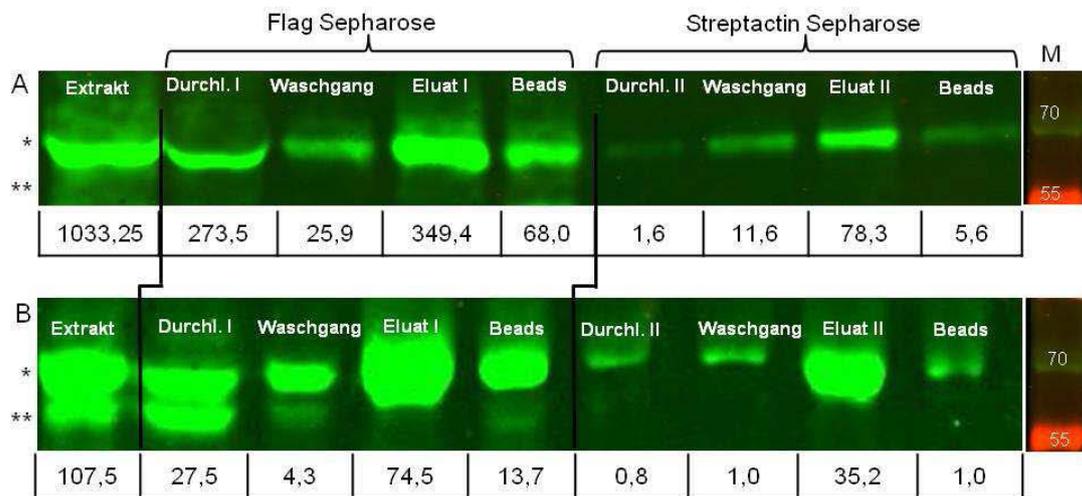
In Teilabbildung C der Abbildung 13 wird die spezifische Stimulation dargestellt, d.h. es wird das Verhältnis von phosphoryliertem AKT 1 zur Gesamtmenge des AKT abgebildet. Bereits in den Wildtypzellen ist ein deutlicher Anstieg des Phosphorylierungsgrades von AKT unter der Stimulation durch Insulin zu beobachten. So steigt der prozentuale Anteil von phosphoryliertem AKT 1 an der Gesamtmenge von AKT durch die externe Stimulation mit Insulin von 6 % auf 46 % an. Ebenso lässt sich in den transfizierten Zellen ein prozentualer Anstieg des phosphorylierten AKT 1 vermerken. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit LY die folgende Stimulation beeinträchtigt, jedoch nicht vollständig hemmen kann.

Der direkte Vergleich der Intensitäten der Fluoreszenzbanden von getaggetem und nicht getaggetem AKT 1 legt die Vermutung nahe, dass endogenes AKT 1 in transfizierten Zellen sensibler auf eine externe Stimulation reagiert als getaggetes AKT. Dies zeigt sich an einem relativen Anstieg des phosphorylierten AKT 1 um den Faktor 4 bei endogenem AKT 1 versus einem Anstieg um den Faktor 2,5 bei getaggetem AKT 1. Jedoch ist hierbei darauf hinzuweisen, dass das getaggte AKT 1 in der unstimulierten Zelle in höherem Maße phosphoryliert vorliegt als das endogene AKT 1. In Betrachtung der Intensitätsmessungen der Fluoreszenzbanden und der Messwerte in den Tabellen der Abbildung 13 lässt sich zusammenfassen, dass die Phosphorylierung von endogenem wie getaggetem AKT 1 einer externen Stimulation unterliegt. Diese externe Stimulation nimmt jedoch keinen Einfluss auf die Gesamtmenge des in der Zelle exprimierten AKT vielmehr steigt der prozentuale Anteil des phosphorylierten AKT 1 an der AKT Gesamtmenge. Analog zu den Expressionskontrollen zeigt sich weiterhin, dass endogenes AKT in transfizierten Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen stark überexprimiert wird.

### 3.3 Tandem Affinitätsreinigung (TAP)

In ersten Experimenten wurde nun überprüft, ob das getaggte AKT 1 effizient mittels Tandem Affinitätsreinigung isoliert werden kann.

Für ein typisches Experiment wurden etwa 90 mg Protein aus AKT 1 C-Tag bzw. N-Tag Zellen für die Reinigung über Anti-Flag- und Anti-Streptactinsepharose eingesetzt. Zur Überprüfung der Effizienz der Reinigung wurden gleiche Volumenanteile aus den einzelnen Reinigungsschritten mittels Westernblot auf AKT 1 C-Tag und N-Tag untersucht. Lediglich vom Gesamtextrakt und dem Durchlauf I wurden abhängig von dem Gesamtvolumen des Zelllysates variable Volumenanteile zwischen  $1/200$  und  $1/1000$  gewählt. Abb. 14 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Westernanalyse mit AKT 1 C-Tag und AKT 1 N-Tag nach Tandem-Affinitätsreinigung.



**Abb. 14:** Westernblot nach TAP; HEK-293T-Zellen stimuliert mit Insulin. Primärer Antikörper ist ein rabbit anti-pan-AKT Antikörper, sekundärer Antikörper ein Anti-Rabbit Fluoreszenzantikörper. A) AKT 1 N-Tag, B) AKT 1 C-Tag. Dargestellt wird AKT entsprechend der einzelnen Reinigungsschritte, somit ist dies auch ein Nachweis, dass die TAP sowohl bei C-Tag als auch bei N-Tag AKT 1 erfolgreich ist. Die Tabellen unter A und B geben die Intensitäten der quantitativen Fluoreszenzmessung an. Sämtliche Werte sind nach Korrektur etwaiger Verdünnungen.

\*) getaggtetes AKT \*\*) endogenes AKT.

Auf Kosten einer hohen Spezifität für das TAP-Tag muss bei der Tandem Affinitätsreinigung mit hohen Proteinverlusten gerechnet werden (Li, 2011). In Abb. 14 lässt sich anhand der Intensitätsmessungen exemplarisch der Proteinverlust im Laufe der TAP mit AKT 1 N-Tag und AKT 1 C-Tag ablesen.

Unter A der Abb. 14 sieht man das Westernergebnis nach TAP von AKT 1 N-Tag. Eingesetzt wurde ein Volumen von 2 ml mit einer Proteinkonzentration von 7,9 mg/ml. Das Extrakt wurde  $1/100$  verdünnt und auf das Gel aufgetragen. Durchlauf I wurde korrespondierend zum Extrakt im selben Volumenanteil eingesetzt. Die Proben der

restlichen Reinigungsschritte wurden in einem Volumenanteil von 1/40 des jeweiligen Probenvolumens eingesetzt.

Im Vergleich von Extrakt zu Durchlauf I erkennt man an den Werten der Intensitätsmessungen, dass bereits im ersten Bineschritt etwa 25 % der Gesamtmenge des Proteins verloren gehen. Eluat I weist einen Intensitätswert von 349,5 auf, was lediglich 33,8 % des Ausgangswertes beträgt. Im Laufe der Reinigung über Streptactinsepharose kommt es zu einem weiteren Proteinverlust, so dass über den Intensitätswert des zweiten Eluates errechnet werden kann, dass die Effizienz der TAP bezogen auf die eingesetzte AKT 1 Menge etwa 10 % beträgt.

Unter B der Abb. 14 ist das Ergebnis der Westernanalyse mit AKT 1 C-Tag exemplarisch dargestellt. In diesem Falle wurden 11 mg Protein in einem Volumen von 5,5 mg/ml eingesetzt. Das Extrakt wurde hier 1/200 verdünnt in die Analyse gegeben. Der Durchlauf I wurde analog zum Extrakt äquivolumetrisch eingesetzt, die übrigen Proben sind mit einem Volumenanteil von 1/40 auf das Gel aufgetragen worden. Wie bereits unter A beschrieben fällt auch hier ein Proteinverlust von etwa 25 % beim ersten Bineschritt auf. Nach Reinigung mit Flag-Sepharose konnten hier 69 % der ursprünglichen AKT 1 Menge in den Streptactin-Reinigungsschritt überführt werden. Hier beträgt der Proteinverlust weitere 50 %, so dass in diesem konkreten Falle nach beiden Schritten der Affinitätsreinigung die Effizienz bei etwa 35 % des eingesetzten AKT 1 C-Tags liegt.

Große Proteinverluste lassen sich im Streptactinsepharose Schritt ausmachen, hier beträgt der Proteinverlust in den beiden gezeigten Fällen einmal 78 % (Abb. 14 A) und einmal 52 % (Abb. 14 B). Die entsprechenden Banden der Durchläufe II, der Waschdurchgänge und der Streptactin-Beads zeigen eher geringe Intensitätswerte an, was die Vermutung nahelegt, dass ein wesentlicher Anteil des Proteinverlustes am Säulenmaterial stattfindet und durch eine unvollständige Elution erklärt werden kann.

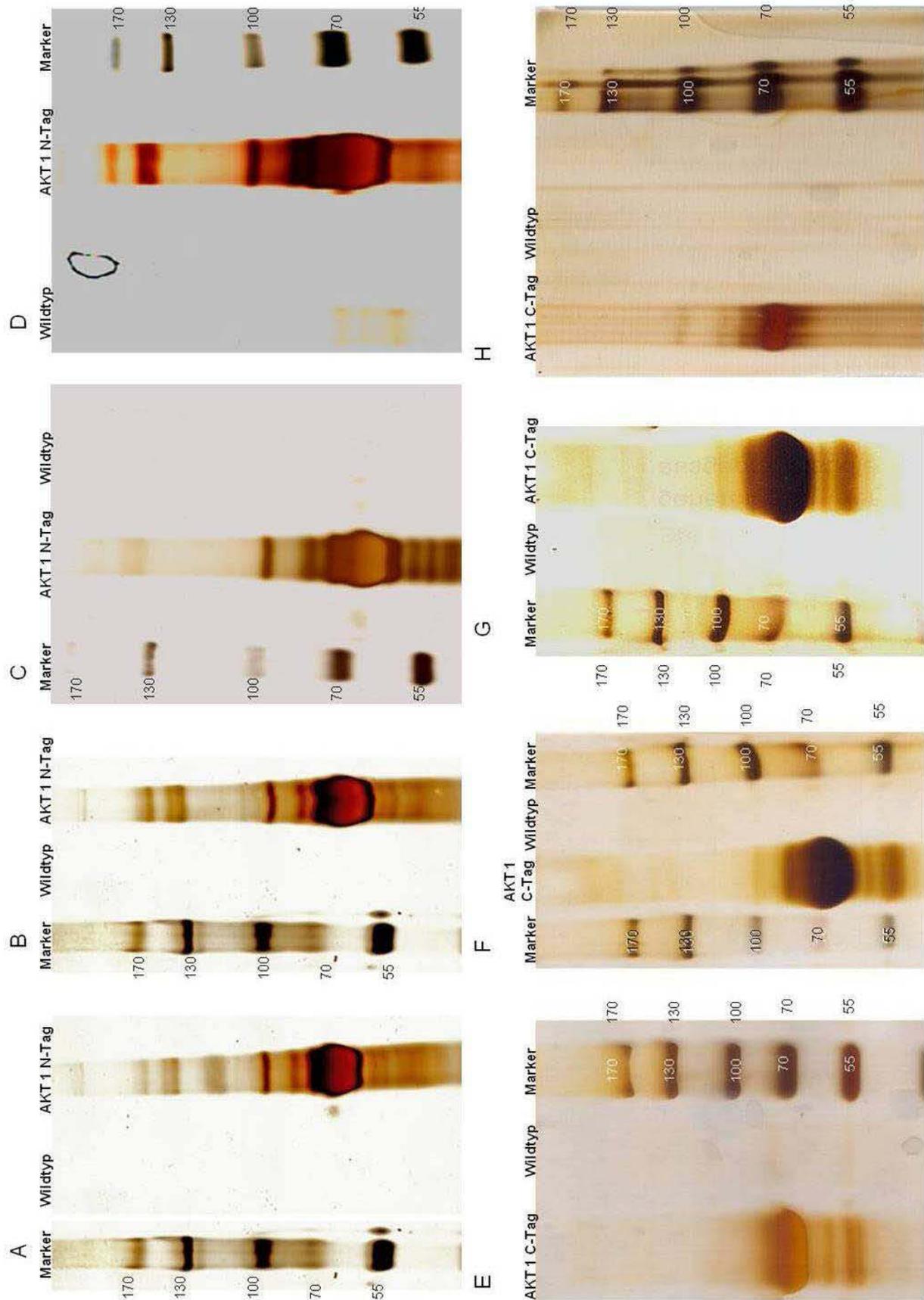
### Tandem Affinitätsreinigung

Nach dem beschriebenen Verfahren wurden nun zur Identifizierung von AKT 1 assoziierten Proteinen 8-mal AKT 1 C-Tag und 10-mal AKT 1 N-Tag transfizierte Zellen aufgearbeitet, von denen exemplarisch jeweils vier in der Abbildung 15 dargestellt sind. Zu jedem Experiment wurde die gleiche Proteinmenge aus nicht transfizierten gleich behandelten Kontrollzellen aufgearbeitet und mittels SDS-Page verifiziert.

Das Eluat aus dem 2. Reinigungsschritt, welches nun ausschließlich AKT 1 und seine Bindungspartner beinhaltete, wurde im Anschluss an die TAP durch Zentrifugation (Fa.

## 50 Ergebnisse

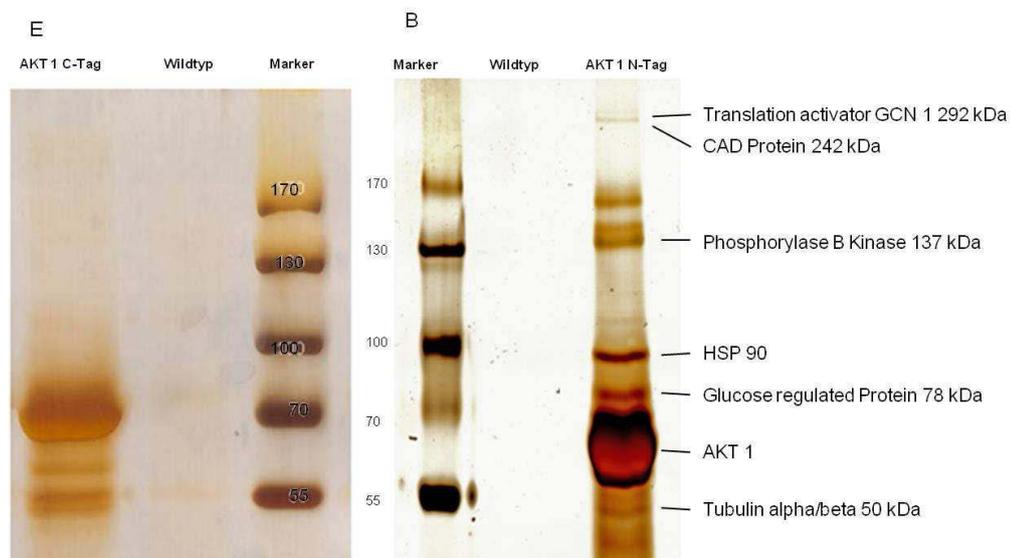
Amicon, molekulare Ausschlussgröße 10 kDa) konzentriert. So wurde das Volumen der Probe von etwa 2 ml auf ungefähr 100 µl reduziert. Die Probe wurde anschließend in SDS-Lämmli Puffer aufgenommen. Die Einzelproteine wurden durch Gelelektrophorese entsprechend der molekularen Größe der Proteine getrennt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Silberfärbung sichtbar gemacht.



**Abb. 15:** Silberfärbung nach TAP insulinstimulierter HEK-293 Zellen. A - D zeigt die mit Silbernitrat angefärbten Proteinbanden nach Tandem Affinitätsreinigung von AKT 1 C-Tag. E - H zeigt Silberfärbungen von AKT 1 C-Tag. Das reproduzierbare Bandenmuster des AKT 1 N-Tag (B-D) lässt sich in der Silberfärbung des AKT 1 C-Tag (A) nicht nachweisen.

Zur Identifizierung spezifischer Bindungspartner von AKT 1 wurde die Tandem Affinitätsreinigung sowohl mit AKT 1 N-Tag wie auch mit AKT 1 C-Tag durchgeführt. Unter A - D der Abbildung 15 sieht man die silbergefärbten Proteinbanden nach TAP von AKT 1 N-Tag. Hier erkennt man in den vier exemplarisch aufgeführten Beispielen ein ähnliches Bandenmuster, welches in allen TAPs von AKT 1 N-Tag reproduzierbar war. Es zeigen sich neben der stark angefärbten Bande bei etwa 70 kDa, die von Intensität und Menge ausgehend das Hauptprotein, in diesem Falle AKT 1 darstellt, eine zusätzliche Bande bei 100 kDa, eine Doppelbande zwischen 130 und 170 kDa, sowie eine weitere Bande bei 240 kDa. Diese Banden waren in allen AKT 1 N-Tag TAPs nachweisbar. Zusätzlich ließen sich vereinzelt weitere Banden anfärben. Die Intensität der Färbung war unter anderem abhängig von der Proteinmenge, wie auch von der Färbedauer.

Unter E – H (Abb. 15) sieht man die Silberfärbung nach TAP von AKT 1 C-Tag. Wie in Abbildung 14 nachgewiesen ist die TAP sowohl für C-terminal, wie auch N-terminal getaggetes AKT 1 erfolgreich. Interessanterweise zeigt sich in der Silberfärbung des AKT 1 C-Tag neben der AKT 1 Bande bei etwa 70 kDa kein charakteristisches reproduzierbares Bandenmuster. Dies könnte darauf hinweisen, dass AKT 1 durch das C-terminale TAP-Tag in seinen Bindeeigenschaften zu seinen Interaktionspartnern beeinflusst wird und somit keine Bindungspartner im Silbergel detektierbar sind. Da sich wiederholt keine verwertbaren Banden in den Silbergelen von AKT 1 C-Tag zeigten wurden die weiteren Analysen ausschließlich mit AKT 1 N-Tag durchgeführt.



**Abb. 16:** Vergleichende Darstellung von AKT 1 C-Tag und AKT 1 N-Tag nach TAP und Silberfärbung. Den entsprechenden Banden sind die hier gefundenen Proteine zugeordnet. Es ist zu erkennen, dass das charakteristische Bandenmuster von AKT 1 N-Tag (B) bei AKT 1 C-Tag (E) nicht zu erkennen ist.

### 3.4 Massenspektrometrie

Nach erfolgreicher gelelektrophoretischer Trennung und Silberfärbung von AKT 1 N-Tag und den assoziierten Proteinen folgte die Vorbereitung der Gelbanden für die massenspektrometrische Messung nach dem unter 2.2.20 beschriebenen Protokoll. Die Messung wurde, wie in 2.2.21 beschrieben von Dr. rer. nat. Michael Reinartz (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt. Für die Messung wurden reproduzierbar auftretende Gelbanden aus dem Gel isoliert und analysiert.

Bei den hier gewonnen Rohdaten wurde zunächst der Proteinanteil von AKT 1 aus der Messung herausgerechnet. Ebenso wurden sämtliche offensichtliche Verunreinigungen, wie z.B. Keratin als Interaktionspartner außer Acht gelassen, da trotz möglichst sauberer Arbeitsweise Keratin häufig als Kontamination in den ausgeschnittenen Gelfragmenten auftrat.

Die in den einzelnen Banden identifizierten Proteine wurden anschließend mit der Human Protein Reference Database (<http://www.hprd.org>) und der Universal Protein Database (<http://www.uniprot.org/>) abgeglichen.

Schwerpunkt für die sichere Identifizierung eines Proteins wurde auf den hohen prozentualen Anteil des identifizierten Proteins an der Gesamtmenge der in der jeweiligen Bande isolierten Proteine gelegt (sogenannte „*peak area*“). Desweiteren wurde die gefundene Peptidzahl, sowie die Sequenzabdeckung bestimmt, die angibt welcher prozentuale Anteil des identifizierten Proteins in Form der eluierten Peptide tatsächlich gefunden wurde. Alle diese Parameter halfen bei der sicheren Identifizierung der Proteine.

Für die valide Identifizierung von Interaktionspartnern wurden immer wiederkehrende Banden analysiert. Die Ergebnisse der Analyse der in Abbildung 15 unter A – D abgebildeten TAP`s finden sich in der Tabelle 4. Die farbliche Hinterlegung kennzeichnet jeweils eine Gelbande.

Man sieht, dass wiederholt dieselben Proteine identifiziert werden konnten. Hierbei handelt es sich z.T. um bereits bekannte Interaktionspartner von AKT 1 wie z.B. HSP 70 und HSP 90 (Flynn et al., 1989) und GRP78 (Dai et al., 2010). Allerdings wurden auch Proteine gefunden, die bisher nicht im Zusammenhang mit AKT 1 beschrieben wurden und somit Aufschluss auf neue Funktionen von AKT 1 geben können.

Abbildung 16 zeigt die Zuordnung der identifizierten Proteine zu den entsprechenden Gelbanden. In den nicht beschrifteten Banden wurden in den verschiedenen Gelen

## 54 Ergebnisse

unterschiedliche Proteine gefunden, oder diese Banden waren nicht reproduzierbar und wurden somit in die Ergebnisse nicht einbezogen.

Protein	MW	TAPI		TAP II		TAP III		TAP IV	
		Peak Area (%)	Sequenz abgleich (% AS)	Peak Area (%)	Sequenz abgleich (% AS)	Peak Area (%)	Sequenz abgleich (% AS)	Peak Area (%)	Sequenz abgleich (% AS)
[Q922616] Translation activator GCN1	292	n.d.	n.d.	40,45	17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
[P27708] CAD Protein	242	82,21	79	36,18	12,76	64,46	31	17,93	45,93
[P46020] Phosphorylase B kinase regulatory subunit alpha	137	n.d.	n.d.	6,77	30,17	-	-	-	8,35
[Q92598] Heat shock protein 105 kDa	97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	44,01	24	30,07	27,9
[P07900] Heat shock protein 90 alpha	84	18,07	71	47,54	48,68	26,77	39	32,24	13,02
[P08238] Heat shock protein 90 beta	83	8,41	42	29,01	26,38	11,45	19	22,79	4,81
[Q59FF8] Putative HSP 90 beta-2	44	18,13	25	18,9	19,42	22,39	12	16,8	6,77
[Q58FF7] Putative HSP 90 beta-3	68	19,15	42	16,58	16,42	24,02	19	13,74	7,9
[P11021] 78 kDa Glucose-regulated protein	72	11,33	27	36,09	47,25	38,99	32	46,94	32,93
[P08107] Heat shock 70 kDa protein 1	70	32,36	32	41,5	41,97	21,53	19	26,97	28,12
[P34931] Heat shock 70 kDa protein 1 L	70	29,02	17	16,22	18,88	15,55	12	20,44	18,42
[P11142] Heat shock cognate 71 kDa protein	71	4,86	16	23,22	29,26	4,79	11	18,42	5,2
[Q71U36] Tubulin alpha-1A chain	50	72,54	79	73,39	64,52	4,97	14	44,79	n.d.
[Q9H4B7] Tubulin beta-1 chain	50	3,95	10	15,32	6,43	22,09	12	6,43	n.d.
[Q13885] Tubulin beta-2A chain	50	4,89	22	32,36	28,54	27,44	32	43,6	n.d.
[P68371] Tubulin beta-2C chain	50	2,47	9	14,16	14,16	23,44	12	14,16	n.d.
[P31689] DNA J homolog subfamily A member 1	45	7,71	16	39,29	41,31	12,25	16	n.d.	11,8
[O60884] DNA J homolog subfamily A member 2	52	16,68	21	53,16	48,79	14,81	18	n.d.	21,99
[P68104] Elongation factor 1-alpha	50	38,26	19	40,69	35,06	15,83	22	n.d.	-
[Q16543] HSP 90 co-chaperone CDC 37	45	6,4	13	34,39	33,6	14,79	14	n.d.	-

## 56 Ergebnisse

**Tab. 4:** Die Tabelle zeigt exemplarisch für 4 TAPs zusammengefasst das massenspektrometrische Ergebnis der korrespondierenden Banden.

Farblich hinterlegt sind Proteine, die in einer Bande gefunden wurden. Es wurden alle korrespondierenden Banden aus den Gelen ausgeschnitten.

Die Peak Area beschreibt den prozentualen Anteil des detektierten Proteins an der Gesamtmenge der in dieser Bande detektierten Proteine. Im Vorfeld wurde AKT 1, sowie Keratin aus der Gesamtmenge der Proteine subtrahiert. In der Zeile „Pept.“ ist die gefundene Peptidanzahl festgehalten. Der Sequenzabgleich gibt an wieviel Prozent der Aminosäuren des vermuteten Proteins tatsächlich in Form der eluierten und gemessenen Peptide gefunden wurde.

n.d. : *not determined* (in diesem Gel konnte keine Bande bei entsprechendem MW bearbeitet werden)

- : Das Protein konnte aus der entsprechenden Bande nicht isoliert werden

## **4 Diskussion**

Die Signaltransduktion stellt im lebenden Organismus einen wesentlichen Teil der Kommunikation von Zellen und Organen untereinander dar. Signale, die von Oberflächenrezeptoren aufgenommen werden, müssen zur adäquaten Zellreaktion intrazellulär prozessiert, bewertet und weitergeleitet werden. Die Proteinkinase AKT nimmt mit ihren Isoformen AKT 1, AKT 2 und AKT 3 eine Schlüsselrolle im Rahmen metabolischer und pathophysiologischer Vorgänge, sowie eine zentrale Rolle bei Signaltransduktion und Motilität der Zelle ein. Aus der Literatur ist hinlänglich bekannt, dass AKT essentiell für die Entwicklung das Überleben der Zelle ist (Brazil and Hemmings, 2001). AKT ist mit seinen funktionellen Beziehungen zu PI3-Kinase und mTORC2 als Dreh- und Angelpunkt der Zellphysiologie auch aus klinischer und pharmakologischer Sicht ein interessanter Angriffspunkt zur Modulation der Zelleigenschaften, wie sich hinsichtlich der Therapie des Ovarialkarzinoms und des Prostatakarzinoms zeigt (Fekete u. a. 2012; Squillace u. a. 2012). Voraussetzung für den gezielten therapeutischen Einsatz ist jedoch die genaue Darlegung und das detaillierte Verständnis des Signaltransduktionsweges von AKT und seinen Isoformen. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der drei Isoformen, die bei über 85 % liegt, ist eine Identifizierung der einzelnen spezifischen Aufgaben und Funktionen schwierig (Jones et al., 1991; Altomare et al., 1995; Brodbeck et al., 1999; Nakatani et al., 1999). Ein Erklärungsansatz zum Verständnis der Isoformenspezifität ist die Ausbildung spezifischer Proteinkomplexe.

In dieser Arbeit konnten durch Bildung eines Fusionsproteins, über ein zweischrittiges Reinigungsverfahren Interaktionspartner von AKT 1 isoliert und mittels massenspektrometrischer Analysen identifiziert werden. Hierbei ist es zu folgenden Ergebnissen und interessanten Erkenntnissen gekommen:

- Das Fusionsprotein lässt sich durch das C-terminale bzw N-terminale TAP-Tag erfolgreich mittels zweischrittigem Reinigungsverfahren detektieren und aus dem Zelllysate isolieren.

Zuvor wurde das getaggte AKT 1 erfolgreich in HEK-293T-Zellen transfiziert und von diesen exprimiert. Bei den Expressionskontrollen zeigte sich, dass das TAP-Tag offenbar Einfluss auf die Expression von AKT 1 nimmt.

- Die C- oder N-terminale Lage des TAP-Tags beeinflusst die Bindungseigenschaften von AKT 1 auf Proteinebene.

- Durch das gewählte Verfahren konnte neben bekannten Interaktionspartnern auch neue Bindungspartner identifiziert werden, die mit AKT 1 nicht nur interagieren sondern sogar stabile Komplexe eingehen.

Zur spezifischen Untersuchung von AKT 1 und seinen Bindungspartnern mit Hilfe der Tandem-Affinity-Purification (TAP) wurde zunächst ein TAP-Tag C-terminal bzw. N-terminal an AKT 1 angefügt. Nach erfolgreicher Klonierung wurde dieser Vektor transient in HEK-293T-Zellen transfiziert. Hier zeigte sich, dass AKT 1 in transfizierten Zellen stark überexprimiert wird. Im Vergleich zu Wildtypzellen wurde offenbar, dass in transfizierten Zellen neben dem getaggten auch das endogene AKT 1 heraufreguliert wird. Im direkten Vergleich mit den Wildtypkontrollen ließ sich nachweisen, dass bei Zellen, die mit Vektor-DNA von AKT 1 C-Tag oder AKT 1 N-Tag transfiziert wurden, die 5-10 fache Menge von endogenem AKT 1 nachweisbar ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch die starke Überexpression von getaggttem AKT 1 auch die basale Expression von endogenem, also nicht getaggttem AKT 1 heraufreguliert wird. Eine alternative Erklärung könnte sein, dass es zur Degradation von getaggttem AKT 1 kommt und das TAP-Tag abspaltet wird. Gelektrophoretisch ist das degradierte AKT 1 in derselben Bande zu detektieren wie das endogene AKT 1. Das Phänomen der Überexpression von AKT 1 ist sowohl bei N-terminal wie C-terminal getaggttem AKT 1 zu sehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich AKT 1 suffizient durch die Tandem-Affinity-Purification (TAP) aus einem Zellysat isolieren lässt. Durch zwei aufeinander folgende Reinigungsschritten konnte getaggttes AKT 1 detektiert werden, jedoch auf Kosten hoher Verluste im Bereich der Gesamtproteinmenge. Quantitätsmessungen haben gezeigt, dass der Proteinverlust im Laufe der beiden Reinigungsschritte im Mittel 70% der Gesamtproteinmenge (50% – 90%) beträgt. Die größten Proteinverluste sind hierbei beim zweiten Reinigungsschritt (STREP) zu verzeichnen. Da sich in den einzelnen Wasch- und Durchlaufschritten nur geringe Proteinverluste nachweisen lassen, ist zu vermuten, dass ein Großteil der Proteinmenge am Säulenmaterial verloren geht. In dem hier verfolgten Protokoll wurde im zweiten Reinigungsschritt die Elution mit Biotin lediglich ein Mal durchgeführt. Hier ergibt sich als Optimierungsversuch der Methode, dass eine Wiederholung der Elution die Ausbeute an Protein erhöhen und den Proteinverlust am Säulenmaterial reduzieren könnte. Alternativ könnte versucht werden, eine höhere Biotinkonzentration

einzusetzen, um die hoch-affine Bindung des STREP-Tags an das Streptactin zu lösen.

Trotz des hohen Proteinverlustes weist die TAP klare Vorteile auf. Die TAP ist durch die zwei aufeinanderfolgenden Reinigungsschritte hoch spezifisch, was absolut essentiell zur Detektion spezifischer Bindungspartner von AKT 1 ist. Desweiteren ist die Tandem-Affinity-Purification als „natives“ Verfahren anzusehen, da sich AKT 1 in seinem physiologischen subzellulären Kompartiment befindet bzw. verbleiben darf. Im Gegensatz zu der etablierten und weitverbreiteten Yeast Two-Hybrid Methode, wo die Protein-Protein-Interaktion im Zellkern stattfindet, muss AKT 1 nicht in ein anderes Zellkompartiment verbracht werden (Fields and Song, 1989).

Zur optimalen spezifischen Isolation von AKT 1 wurde sowohl N-terminal, wie auch C-terminal das TAP-Tag an AKT 1 angefügt. Hier zeigten sich hinsichtlich der Expression der beiden Fusionsproteine keine Unterschiede. Wie bereits beschrieben wird sowohl das getaggte wie auch nicht getaggte AKT 1 in transfizierten Zellen stark überexprimiert. Dabei machte es keinen Unterschied, ob das TAP-Tag am C-Terminus oder am N-Terminus angebracht war. Im Anschluss wurde die TAP durchgeführt. Anhand der Westernblot Kontrollen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass sich sowohl AKT 1 C-Tag wie auch AKT 1 N-Tag spezifisch aus dem Zellysat isolieren lassen. Nach gelektrophoretischer Trennung des Eluates des zweiten Reinigungsschrittes und Silberfärbung der Proteine, zeigte sich für AKT 1 N-Tag ein reproduzierbares Bandenmuster koeluerter Proteine, während AKT 1 C-Tag kein entsprechendes Bandenmuster aufwies. Folglich lässt sich hier vermuten, dass das TAP-Tag am C-Terminus Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit von AKT 1 nimmt. Hier stellt sich die Frage warum sich N-terminal getaggtes AKT 1 in der Protein-Protein-Interaktion anders verhält als AKT 1 C-Tag.

AKT 1 besteht aus drei Domänen unterschiedlicher Funktion. N-terminal befindet sich die PH-Domäne (Pleckstrin Homologie), die für die Translokation der Kinase an die Zellmembran im Zuge der Aktivierung wichtig ist. Über eine kurze Helix verbunden schließt sich die katalytische Domäne von AKT 1 an. Hier befindet sich auch eine der zwei Phosphorylierungsstellen von AKT 1, Thr 308, deren Phosphorylierung essentiell zur Aktivierung der Kinase ist. C-terminal befindet sich eine regulatorische Domäne, die u. a. die zweite Phosphorylierungsstelle von AKT 1 (Ser 473) beinhaltet.

Hinsichtlich der Expression lassen sich keine Unterschiede zwischen AKT 1 N-Tag und C-Tag darstellen. Daher kann man vermuten, dass das C-terminal angefügte Tag zur Störung der C-terminale Phosphorylierung von Ser 473 führt und somit die Aktivierung

von AKT 1 unterbindet. In Stimulationsversuchen konnte diese Theorie jedoch widerlegt werden. Nach Stimulation mit Insulin wurde sowohl bei C-terminal als auch bei N-terminal getagtem AKT 1 spezifisch eine gesteigerte Phosphorylierung von Ser 473 nachgewiesen und so belegt werden, dass die Fusion von AKT 1 mit einem C-Tag oder einem N-Tag keinen Einfluss auf die Phosphorylierung an Ser 473 und somit auf die Aktivierung von AKT 1 nimmt.

In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass HSP 90, welches auch in dieser Arbeit als Bindungspartner von AKT 1 identifiziert werden konnte, an das C-terminale Ende von AKT bindet. Die Funktion ist einerseits eine Stabilisierung von Akt 1 durch das Chaperon HSP 90. Andererseits wurde gezeigt, dass die AKT abhängige Aktivierung der endothelialen NO Synthase (eNOS) in Form eines ternären Komplexes mit AKT 1, HSP 90 und eNOS erfolgt (Basso et al., 2002). Somit scheint die Bindung von HSP 90 auch für die Interaktion von AKT mit Substratproteinen essentiell zu sein. Während die Reinigung von AKT 1 N-Tag reproduzierbar zum Nachweis von HSP 90 führte, konnte für AKT 1 C-Tag keine HSP 90 Interaktion des getaggen Proteins gezeigt werden (Abb. 15). Daher lässt sich vermuten, dass das C-terminale Tag mit der Bindung von HSP 90 interferiert und somit auch die Interaktion mit weiteren Proteinen gestört wird.

Da sich nach der TAP von AKT 1 C-Tag keine wesentlichen Bindungspartner zeigten, wurden die folgenden MS-Analysen sämtlich an AKT 1 N-Tag durchgeführt. Korrespondierende Banden wurden aus den Gelen isoliert, die Proteine extrahiert und im Massenspektrometer analysiert. Hierbei ließen sich interessanterweise sowohl bereits bekannte, wie auch neue Interaktionspartner von AKT 1 nachweisen. Die gefundenen Interaktionspartner wurde mit der Human Protein Reference Database (<http://www.hprd.org>) und der Universal Protein Database (<http://www.uniprot.org/>) abgeglichen.

#### Heat shock Proteine (HSP) und bekannte Co-Chaperone

Eine Proteinfamilie, die sich in allen Probenansätzen nachweisen ließ, ist die Familie der Heat Shock Proteine (HSP). Diese Proteinfamilie kommt in nahezu allen pro- und eukaryontischen Zellen teils konstitutiv, teils induzierbar vor. Die Proteine werden nach ihrem molekularen Gewicht bezeichnet, welches von 17 kDa bis über 100 kDa reicht. Die Einteilung der HSP erfolgt in sechs Gruppen (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, und small-HSP) die ebenfalls nach ihrem Molekulargewicht geordnet sind

(Mansilla et al., 2012). Die Aufgabe dieser HSP ist u.a. die Stabilisierung von Proteinen durch Faltung und Komplexbildung, um diese vor der Degradation zu schützen. Eine weitere Aufgabe der HSP ist der intrazelluläre Transport von Proteinen in verschiedenste Zellkompartimente (Flynn et al., 1989). In dieser Arbeit konnten vornehmlich die Heat Shock Proteine HSP105, HSP90 und HSP70 festgestellt werden welche als Interaktionspartner von AKT bekannt und eng mit dessen Konservierung assoziiert sind. Besonders HSP90 wird eng mit AKT in Verbindung gebracht. In verschiedenen klinischen und pharmakologischen Ansatzpunkten induziert die Inhibition von HSP90 Tumorzell-Apoptose u.a. durch eine Degradation von AKT (Wang et al., 2012).

Ein weiteres Protein, welches in der vergleichbaren Molekulargewichtsgröße wie HSP 70 gefunden wurde, ist 78-kDa glucose regulated Protein (GRP 78). Hier handelt es sich ebenfalls um ein Protein, welches intrazellulär am Endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Stabilisierung von Proteinen beiträgt (Schröder and Kaufman, 2005). 2010 konnte eine enge Verbindung von AKT 1 und GRP 78 dargestellt werden. Es zeigte sich, dass ER-stress zu einer erhöhten Phosphorylierung von AKT 1 führt, welches über eine Akkumulation von GRP 78 zellstabilisierend und somit antiapoptotisch wirkt. (Dai et al., 2010)

CDC 37 ist ein Co-Chaperon, welches durch Komplexbildung mit einer Vielzahl von Kinasen deren Aktivität und Funktion modifiziert. So ist auch HSP90 eng mit CDC 37 assoziiert und ebenfalls in den hier durchgeführten Proteinanalysen nachweisbar (Perdew et al., 1997).

In derselben Bande wie CDC 37 wurden mehrere Isoformen der DNA-J Proteinfamilie gefunden. Aus den Datenbanken geht hervor, dass es sich auch hier um Co-Chaperone von HSP70 und somit um bereits bekannte Interaktionspartner mit AKT 1 handelt (<http://www.uniprot.org/uniprot/O75190>).

Durch die Fusion von AKT mit einem Tag besteht immer das Risiko, dass sich die Faltung und somit die physiologischen Eigenschaften von AKT 1 ändern und sich folglich auch keine oder nicht-physiologische Interaktionspartner nachweisen lassen. Die Tatsache, dass sich bereits bekannte Interaktionspartner nachweisen lassen spricht für ein physiologisches Bindungsverhalten von AKT 1 N-Tag und stellt somit eine Validierung der Ergebnisse dar.

### Phosphorylase B Kinase

In einigen Versuchsansätzen konnte das Enzym Phosphorylase B Kinase identifiziert werden. Dieses Enzym katalysiert die Aktivierung der Glycogenphosphatase und spielt in der Aktivierungskaskade des Glycogenabbaus eine entscheidende Rolle (Tang et al., 2012a). Dieser Zusammenhang ist insofern sehr interessant, da die Glucosehomöostase bekanntermaßen eng mit AKT 2 und nicht mit AKT 1 assoziiert ist (Roe and Ren, 2011).

Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass sich die Isoformenfunktionen in bestimmten Teilbereichen überlappen und daher AKT 1 ebenfalls einen gewissen Einfluss auf den Glycogenabbau ausüben kann. Aufgrund der geringen prozentualen Anteiligkeit an der Gesamtproteinmenge und der Tatsache, dass die Phosphorylase B Kinase lediglich in wenigen Versuchsansätzen nachgewiesen werden konnte, ist jedoch nicht davon auszugehen, dass es sich hier um einen stabilen und stets reproduzierbaren Bindungspartner handelt.

### Tubulin

Eines der redundant isolierten Proteine ist Tubulin mit seinen verschiedenen Ketten. Tubuline sind der Hauptbestandteil des mikrotubulären Systems der menschlichen Zelle und stellen somit den Hauptbestandteil des Zytoskeletts. Im Rahmen von Zellzyklusvorgängen und Mitosen werden Mikrotubuli mit der Serin/Threoninkinase MARK 1-4 assoziiert (Tang et al., 2012b), jedoch ist bisher kein Zusammenhang mit AKT 1 beschrieben. Vor dem Hintergrund, dass die Zellproliferation bei AKT 1 KO Mäusen gestört ist, ist der Zusammenhang von AKT 1 und dem Zytoskelett eine interessante Option, die weiter untersucht werden sollte.

### CAD-Protein

In allen analysierten TAPs wurde mit hoher prozentualer Anteiligkeit an der Gesamtproteinmenge das CAD-Protein nachgewiesen. Dabei handelt es sich hierbei um ein Protein, welches aus drei Domänen besteht, der Glutaminabhängigen Carbamoylphosphat Synthetase, der Aspartat Carbamoyltransferase und der Dihydroorotase. CAD katalysiert die Pyrimidin-de-novo-Synthese.

Pyrimidine sind neben Purinen die Hauptbausteine der RNA und DNA. Die de-novo Synthese von Pyrimidinen, das heißt die komplette Neubildung ohne Verwendung von Nukleotidderivaten erfolgt in sechs Schritten, von denen die ersten vier von dem hier isolierten CAD Protein katalysiert.

Im ersten Schritt erfolgt die Synthese von Carbamoylphosphat aus Hydrogencarbonat und Ammoniak welche durch das Enzym Carbamoylphosphat Synthetase katalysiert wird. Der zweite Schritt, die Umsetzung von Carbamoylphosphat und Aspartat zu Carbamoylaspartat werden durch das Enzym Aspartat Carbamoyltransferase katalysiert. Im dritten Schritt erfolgt die Kondensation von Carbamoylaspartat zu Dihydroorotat, katalysiert durch die Dihydroorotase. Im vierten Schritt wird durch das Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase Dihydroorotat zu Orotat oxidiert. In den zwei darauffolgenden Schritten folgt der Ribosetransfer und die Decarboxylierung, so dass Uridinmonophosphat (UMP) entsteht, was als Ausgangsprodukt für die Pyrimidinnukleotide fungiert (Witz et al., 2012).

Das CAD Protein ist mit seinen unterschiedlichen katalytischen Einheiten somit von essenzieller Bedeutung in der Synthese von Pyrimidinen und damit direkt in die DNA-Synthese involviert. Ein direkter Zusammenhang zu AKT 1 ist in den hier verwendeten Datenbanken bisher nicht zu finden.

([http://www.hprd.org/summary?hprd\\_id=01995&isoform\\_id=01995\\_2&isoform\\_name=isoform\\_1](http://www.hprd.org/summary?hprd_id=01995&isoform_id=01995_2&isoform_name=isoform_1)).

Unter der Kenntnis der generellen Wirkung und Funktion von AKT 1 stellt die erstmalige Identifizierung eine interessante Verbindung zur Zellproliferation her.

In dieser Arbeit wurden in einem zweiseitigen Reinigungsverfahren neue Interaktionspartner von AKT 1 identifiziert. Aufgrund der Tatsache, dass zwei aufeinanderfolgende Reinigungsschritte mit mehreren Waschschritten und zweifacher Elution vorgenommen wurden, kann man hier sogar davon ausgehen, dass die identifizierten Proteine stabile Komplexe mit AKT 1 ausbilden. Im Rahmen der bereits bekannten Funktionen, die Proliferation, Zellwachstum und Apoptose umfassen, sind die neu identifizierten Proteine durchaus in diesen Kontext einzuordnen. In dieser Arbeit wurde damit die Grundlage für weitere, vor allem funktionelle Analysen gelegt.

Mittels TAP wurden sowohl bekannte als auch neue Interaktionspartner von AKT 1 identifiziert. Trotz dieser interessanten Befunde ist die Zahl der identifizierten AKT Substrate scheinbar gering.

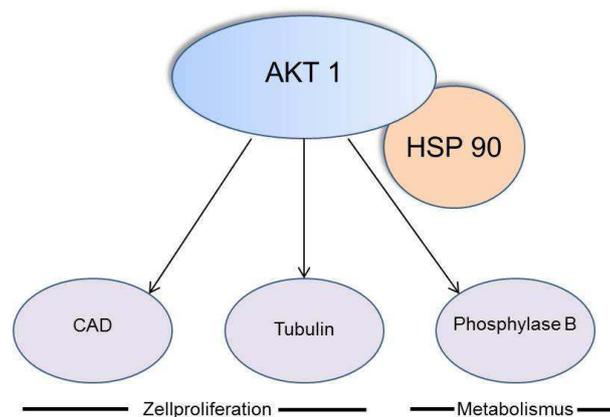
Möglicherweise bildet AKT 1 im Rahmen seiner Signaltransduktion nur wenig stabile Proteinkomplexe aus. Diese niedrig-affinen Interaktionen sind jedoch mit der TAP nicht zu erfassen, da diese Komplexe während des Reinigungsverfahrens dissoziieren können. Ferner ist nicht auszuschließen, dass durch das TAP-Tag eine Beeinflussung

der Interaktion von AKT stattfindet und dadurch nur eine Untergruppe der mit AKT interagierenden Proteine identifiziert werden konnten.

Die TAP stellt somit eine Methode unter mehreren anderen dar, die zur Identifizierung von Proteininteraktionen genutzt werden kann.

Ergänzend zur TAP steht die Yeast Two-Hybrid (Y2H) Methode als ein etabliertes Verfahren zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen zur Verfügung. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass das Zielprotein, in diesem Falle AKT 1 in den Zellkern verbracht werden muss, da nur hier die Transkription des Reportergens stattfinden kann (Yang et al., 1995). Da sich AKT 1 in diesem Falle in hoher Konzentration im Zellkern befindet, ist diese Methode anfällig für falsch positive Ergebnisse. So ist es auch möglich, dass in der Y2H Methode Proteine miteinander interagieren, die jedoch im Zellzyklus, Kompartiment oder Zelltyp nicht gleichzeitig auftreten und deshalb keine tatsächlichen Interaktionspartner sein können. Auch FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) ist eine alternative Möglichkeit zum Nachweis bzw. zur Validierung von Protein-Protein Interaktionen. Allerdings ist in diesem Fall eine Fusion mit einem fluoreszierenden Protein von AKT 1 und dem Bindungspartner erforderlich, so dass mit diesem Ansatz nur bereits bekannte Interaktionspartner untersucht werden können. Eine Identifizierung unbekannter Proteine ist so nicht möglich.

Somit ist zusammenfassend festzustellen, dass für die hier gestellten Ansprüche und Zielsetzungen die TAP trotz hoher Proteinverluste und den Folgen der Proteinmodulation nach wie vor das geeignetste Verfahren zur Detektion von AKT 1 und seinen Bindungspartnern bleibt.



**Abb. 17** AKT 1 und HSP 90 nehmen über die Interaktionspartner CAD, Tubulin und Phosphylase B Einfluss auf zentrale Mechanismen der Zelle wie Metabolismus und Zellproliferation

## **5 Zusammenfassung**

Hintergrund: Die Proteinkinase AKT 1 spielt eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Zellwachstum, Proliferation, Apoptose und Metabolismus. AKT 1 wurde erstmals 1991 beschrieben, und man kennt inzwischen zwei weitere Isoformen, die als AKT 2 und AKT 3 bezeichnet werden. Die drei Isoformen werden von drei verschiedenen Genen codiert und besitzen auf Sequenzebene eine 80-prozentige Homologie. Häufig werden in derselben Zelle mehrere der Isoformen exprimiert und prinzipiell über dieselben Signalwege aktiviert. Trotz Koexpression und Sequenzhomologie zeigen selektive Knockout (KO) Mäuse der drei Isoformen stark unterschiedliche phänotypische Ausbildungen. So fallen AKT 1 KO Mäuse durch erhöhte Apoptoserate und geringe Körpergröße auf, AKT 2 KO Mäuse präsentieren Glucoseverwertungsstörungen, und AKT 3 KO Mäuse zeigen ein beeinträchtigtes Gehirnwachstum. Die Mechanismen der Isoformspezifität sind für die AKT Kinasen nur ansatzweise verstanden.

Fragestellung: Spezifische Funktionen der AKT Isoformen setzen spezifische Interaktionen mit anderen Proteinen voraus, die sich in der Organisation von AKT-assoziierten Proteinkomplexen äußern könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob sich mittels Tandem-Affinitätsreinigung (TAP) gefolgt von massenspektrometrischer Analyse (MS Analyse) spezifische Bindungspartner von AKT 1 isolieren und identifizieren lassen, die einen Einblick in die AKT 1 vermittelte Signaltransduktion und somit ihre spezifischen Funktionen geben können.

Methodik: Zur Tandemaffinitätsreinigung wurde die cDNA von AKT 1 sowohl am C-terminalen als auch N-terminalen Ende mit einem 8 kDa großen Tag fusioniert, welches die Sequenzen für das HA-, FLAG- und Strep-Tag enthielt. Die Fusionsproteine wurden in HEK293T Zellen exprimiert und über zwei Affinitätsreinigungsschritte (anti-FLAG-Agarose; Streptactin Sepharose) gereinigt. Um die mit AKT 1 assoziierten Proteinkomplexe nicht zu zerstören, erfolgte die Elution vom Säulenmaterial jeweils unter nativen Bedingungen. Nach erfolgreicher TAP folgte die gelektrophoretische Trennung, Silberfärbung des Gels und anschließende Isolierung der Proteinbanden aus dem Gel. Diese wurden einer tryptischen Verdauung unterworfen und zur Identifizierung massenspektrometrisch analysiert. Die isolierten

Proteine wurden durch Datenbankabgleich der erhaltenen Peptidsequenzen identifiziert.

Ergebnisse: Die TAP wurde sowohl für AKT 1 C-Tag als auch AKT 1 N-Tag transfizierte Zellen wiederholt durchgeführt. Interessanterweise ließen sich für nur für AKT 1 N-Tag assoziierte Proteine in den Gelen und der MS Analyse nachweisen, jedoch nicht bei entsprechender Verwendung von AKT 1 C-Tag. Analyse der mit AKT 1 N-Tag assoziierten Proteine führte zur Identifizierung bereits bekannter AKT-Interaktionspartner (HSP90, GRP78, HSP70, CDC37). Allerdings wurden hier erstmalig Tubulin  $\alpha$ 1 und  $\beta$ 1, Phosphorylase B Kinase und CAD Protein als neue Interaktionspartner von AKT 1 nachgewiesen.

Schlussfolgerung: Die Funktion der erstmalig identifizierten AKT 1 Interaktionspartner lässt darauf schließen, dass AKT 1 neue regulatorische Funktionen bei der Modulation des Metabolismus (Phosphorylase Kinase), sowie der Zellteilung (Tubuline, CAD Protein) ausübt.

## 6 **Literaturverzeichnis**

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15, 6541–6551.

Altomare, D.A., Guo, K., Cheng, J.Q., Sonoda, G., Walsh, K., and Testa, J.R. (1995). Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse AKT 2 oncogene. *Oncogene* 11, 1055–1060.

Basso, A.D., Solit, D.B., Chiosis, G., Giri, B., Tschlis, 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.

Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A.K., Bell, D.W., Cheng, J.Q., Altomare, D.A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V., et al. (1995). Molecular alterations of the AKT 2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 64, 280–285.

Berg, J. (2007). *Biochemie* (Heidelberg [u.a.]: Elsevier Spektrum Akad. Verl.).

Brazil, D.P., and Hemmings, B.A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci* 26, 657–664.

Brazil, D.P., Park, J., and Hemmings, B.A. (2002). PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 111, 293–303.

Brodbeck, D., Cron, P., and Hemmings, B.A. (1999). A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J. Biol. Chem.* 274, 9133–9136.

Burgering, B.M., and Coffey, P.J. (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376, 599–602.

Cazzolli, R., Carpenter, L., Biden, T.J., and Schmitz-Peiffer, C. (2001). A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Czeta, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* 50, 2210–2218.

Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., et al. (2001). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the AKT 1 gene. *Genes Dev* 15, 2203–2208.

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. (2001a). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase AKT 2 (PKB beta). *Science* 292, 1728–1731.

Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F., and Birnbaum, M.J. (2001b). AKT 1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem* 276, 38349–38352.

Clayton, P.E., Banerjee, I., Murray, P.G., and Renehan, A.G. (2010). Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. *Nat Rev Endocrinol*.

Coffer, P.J., and Woodgett, J.R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem* 201, 475–481.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–789.

Dai, R.Y., Chen, S.K., Yan, D.M., Chen, R., Lui, Y.P., Duan, C.Y., Li, J., He, T., and Li, H. (2010). PI3K/Akt promotes GRP78 accumulation and inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in HEK293 cells. *Folia Biol. (Praha)* 56, 37–46.

Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245–246.

Flynn, G.C., Chappell, T.G., and Rothman, J.E. (1989). Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 245, 385–390.

Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R., and Tsichlis, P.N. (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727–736.

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 AKT 2/PKB $\beta$ . *J Clin Invest* 112, 197–208.

Gonzalez, E., and McGraw, T.E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8, 2502–2508.

Haq, S., Choukroun, G., Lim, H., Tymitz, K.M., del Monte, F., Gwathmey, J., Grazette, L., Michael, A., Hajjar, R., Force, T., et al. (2001). Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 103, 670–677.

Hill, M.M., and Hemmings, B.A. (2002). Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol. Ther* 93, 243–251.

Jones, P.F., Jakubowicz, T., and Hemmings, B.A. (1991). Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul* 2, 1001–1009.

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.

Konhilas, J.P., Maass, A.H., Luckey, S.W., Stauffer, B.L., Olson, E.N., and Leinwand, L.A. (2004). Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 287, H2768–2776.

Konhilas, J.P., Widegren, U., Allen, D.L., Paul, A.C., Cleary, A., and Leinwand, L.A. (2005). Loaded wheel running and muscle adaptation in the mouse. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 289, H455–465.

Li, Y. (2011). The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnol. Lett.* 33, 1487–1499.

Löffler, G. Petrides P., Heinrich P.: *Biochemie und Pathobiochemie*, Heidelberg, Springer Verlag, 8. überarbeitete Ausgabe, 2007

Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261–1274.

Mansilla, M.J., Montalban, X., and Espejo, C. (2012). Heat Shock Protein 70: Roles in Multiple Sclerosis. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 18, 1018-28

Nakatani, K., Sakaue, H., Thompson, D.A., Weigel, R.J., and Roth, R.A. (1999). Identification of a human AKT 3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 906–910.

Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193–199.

O'Neill, B.T., and Abel, E.D. (2005). AKT 1 in the cardiovascular system: friend or foe? *J. Clin. Invest* 115, 2059–2064.

Park, B.K., Zeng, X., and Glazer, R.I. (2001). AKT 1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 61, 7647–7653.

Perdew, G.H., Wiegand, H., Vanden Heuvel, J.P., Mitchell, C., and Singh, S.S. (1997). A 50 kilodalton protein associated with raf and pp60(v-src) protein kinases is a mammalian homolog of the cell cycle control protein cdc37. *Biochemistry* 36, 3600–3607.

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.

Roe, N.D., and Ren, J. (2011). AKT 2 knockout mitigates chronic iNOS inhibition-induced cardiomyocyte atrophy and contractile dysfunction despite persistent insulin resistance. *Toxicol. Lett.* 207, 222–231.

Ruggeri, B.A., Huang, L., Wood, M., Cheng, J.Q., and Testa, J.R. (1998). Amplification and overexpression of the AKT 2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol. Carcinog* 21, 81–86.

Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* 569, 29–63.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.

- Shiojima, I., Yefremashvili, M., Luo, Z., Kureishi, Y., Takahashi, A., Tao, J., Rosenzweig, A., Kahn, C.R., Abel, E.D., and Walsh, K. (2002). Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J. Biol. Chem* 277, 37670–37677.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem* 150, 76–85.
- Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med* 9, 59–71.
- 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.
- Tang, B., Xu, Q., Zou, Q., Fang, Q., Wang, S., and Ye, G. (2012a). Sequencing and characterization of Glycogen Synthase and Glycogen Phosphorylase Genes from *Spodoptera exigua* and analysis of their function in starvation and excessive sugar intake *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 80, 42–62.
- Tang, E.I., Xiao, X., Mruk, D.D., Qian, X.-J., Mok, K.-W., Jenardhanan, P., Lee, W.M., Mathur, P.P., and Cheng, C.Y. (2012b). Microtubule affinity-regulating kinase 4 (MARK4) is a component of the ectoplasmic specialization in the rat testis. *Spermatogenesis* 2, 117–126.
- Taniyama, Y., Ito, M., Sato, K., Kuester, C., Veit, K., Tremp, G., Liao, R., Colucci, W.S., Ivashchenko, Y., Walsh, K., et al. (2005). AKT 3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol* 38, 375–385.
- Tschopp, O., Yang, Z.-Z., Brodbeck, D., Dummler, 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/AKT 3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132, 2943–2954.
- Walsh, K. (2006). Akt signaling and growth of the heart. *Circulation* 113, 2032–2034.
- Wang, H.-C., Tsai, Y.-L., Wu, Y.-C., Chang, F.-R., Liu, M.-H., Chen, W.-Y., and Wu, C.-C. (2012). Withanolides-induced breast cancer cell death is correlated with their ability to inhibit heat protein 90. *PLoS ONE* 7, e37764.
- Wilkins, B.J., Dai, Y.-S., Bueno, O.F., Parsons, S.A., Xu, J., Plank, D.M., Jones, F., Kimball, T.R., and Molkentin, J.D. (2004). Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ. Res* 94, 110–118.
- Witz, S., Jung, B., Fürst, S., and Möhlmann, T. (2012). De Novo Pyrimidine Nucleotide Synthesis Mainly Occurs outside of Plastids, but a Previously Undiscovered Nucleobase Importer Provides Substrates for the Essential Salvage Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 1549–1559.

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.

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.

Eidesstattliche Versicherung

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

Düsseldorf, den 12.11.2013

(Andreas Hiester)