

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

**Charakterisierung des neuen Akt- interagierenden  
Proteins AIP**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

der Medizinischen Fakultät der  
Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Franziska Eckert  
aus  
Traunstein

**2008**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Lammers  
2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Bedeutung von Akt</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Struktur</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2 Einbindung in das Netzwerk der Signaltransduktion</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3 Physiologische Funktionen von Akt</b>	<b>5</b>
1.1.3.1 Funktionen im Insulinsignalweg	5
1.1.3.2 Funktionen in der Signaltransduktion von T-Zellen	6
1.1.3.3 Weitere Funktionen in anderen Systemen	7
<b>1.1.4 Bisher bekannte Bindungspartner</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Suche nach neuen Akt-Bindungspartnern</b>	<b>10</b>
<b>1.3 Ausgangspunkt und Zielsetzung</b>	<b>10</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Chemikalien, Enzyme und Kits</b>	<b>14</b>
<b>2.3 Bakterienstämme, Zellen und Plasmide</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Oligonukleotide</b>	<b>19</b>
2.4.1 Primer für Charakterisierung des EST-Klons AIP 476	19
2.4.2 Primer für Charakterisierung des EST-Klons AIP 1236	19
2.4.3 Primer für Charakterisierung des EST-Klons AIP 4205rev	19
2.4.4 Primer für Charakterisierung des EST-Klons AIP 3718	20

<b>2.4.5 Primer für Charakterisierung des EST-Klons AIP 6595rev</b>	<b>20</b>
<b>2.4.6 Primer für die Klonierung von AIP 476</b>	<b>20</b>
<b>2.4.7 Primer für die Klonierung von AIP 3'a</b>	<b>20</b>
<b>2.4.8 Primer für die Klonierung von AIP 3'b</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Antikörper</b>	<b>21</b>
<b>2.6 Nährmedien, Lösungen und Puffer</b>	<b>22</b>
<b>2.7 Methoden</b>	<b>30</b>
<b>2.7.1 Datenbankanalysen</b>	<b>30</b>
2.7.1.1 Gesamte Sequenz	30
2.7.1.2 Offenes Leseraster	30
2.7.1.3 Homologien zu bekannten Protein-Domänen und Erkennungssequenzen	31
<b>2.7.2 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>31</b>
2.7.2.1 PCR	31
2.7.2.1.1 Standard PCR zur Identifizierung von DNA-Fragmenten	32
2.7.2.1.2 Überlappende PCR	32
2.7.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	33
2.7.2.3 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	33
2.7.2.4 Phenol-Extraktion von DNA	33
2.7.2.5 Restriktionsverdau von DNA	34
2.7.2.6 Auffüllen von überhängenden Enden	35
2.7.2.7 Konzentrationsbestimmung von DNA	35
2.7.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten	35
2.7.2.9 Transformation von DNA in E. coli	36
2.7.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli	36

2.7.2.11 Selektion positiver Klone	37
2.7.2.11.1 Identifizierung positiver Klone mittels Kontroll-Restriktions-Verdau	37
2.7.2.11.2 Identifizierung positiver Klone mittels Kontroll-PCR	37
2.7.2.11.3 Identifizierung positiver Klone mittels Pool-Test	38
2.7.2.12 Sequenzierung	38
<b>2.7.3 Herstellung von GST-Fusionsproteinen und Proteinassoziation</b>	<b>39</b>
2.7.3.1 Überexpression des Proteins in E. coli	39
2.7.3.2 Bakterienaufschluss und Proteingewinnung	40
2.7.3.3 Affinitätsreinigung	41
2.7.3.4 Proteinassoziation	42
<b>2.7.4 Herstellung von polyklonalen Antikörpern</b>	<b>42</b>
<b>2.7.5 Proteinanalyse</b>	<b>43</b>
2.7.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
2.7.5.2 Coomassie-Färbung von Protein-Gelen	44
2.7.5.3 Western Blot	44
2.7.5.4 Immundetektion von immobilisierten Proteinen	44
<b>2.7.6 Zellkultur-Techniken</b>	<b>45</b>
2.7.6.1 Passage von Zellen	45
2.7.6.2 Transfektion von Zellen	46
2.7.6.3 Stabil exprimierende Zelllinien	47
2.7.6.4 Einfrieren von Zellen	47
2.7.6.5 Auftauen von Zellen	48
2.7.6.6 Lyse von Zellen	48
2.7.6.7 Co-Immunopräzipitation	48
2.7.6.8 Glykogensynthese-Bestimmung	49

2.7.6.9	In-vitro-Kinase-Aktivität	50
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
3.1	<i>Datenbankanalysen</i>	51
3.1.1	Gesamte Sequenz des analysierten Proteins	51
3.1.2	Protein-Domänen und Phosphorylierungs-Sequenzen	53
3.1.3	Verteilung in verschiedenen Gewebetypen	54
3.2	<i>Klonierung des offenen Leserasters von AIP</i>	55
3.2.1	Charakterisierung der EST-Klone	55
3.2.2	Klonierungsstrategie	58
3.2.3	Vorbereitung von pRK <sub>RS</sub>	59
3.2.4	Vorbereitung von AIP 476	60
3.2.5	Vorbereitung von AIP 1236	61
3.2.6	Klonierung von AIP 3' (3'-Ende der cDNA)	62
3.2.6.1	Klonierung von AIP 3'a	62
3.2.6.2	Klonierung von AIP 3'b	64
3.2.6.3	Klonierung von AIP 3'	65
3.2.6.4	Vorbereitung von AIP 3'	67
3.2.7	Klonierung der gesamten cDNA von AIP	68
3.3	<i>Sequenzierung des Konstruktes AIP</i>	69
3.4	<i>Klonierung eines VSV-Konstruktes</i>	70
3.5	<i>Klonierung von pGEX-Konstrukten</i>	72
3.5.1	GST-AIP 476	73
3.5.2	GST-AIP 6595s	75

<b>3.6 Protein-Assoziation zwischen GST-AIP 6595s und Akt</b>	<b>77</b>
<b>3.7 Transiente Expression des AIP-VSV Konstrukts</b>	<b>79</b>
<b>3.8 Co-Immunopräzipitation von Akt und AIP</b>	<b>80</b>
<b>3.9 Konstante Expression des Konstrukts AIP-VSV in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen</b>	<b>81</b>
<b>3.10 Akt-Phosphorylierung nach Insulin-Stimulation AIP-überexprimierender Zellen</b>	<b>82</b>
<b>3.11 In-vitro-Kinase-Aktivität von Akt in Abhängigkeit von AIP-Koexpression</b>	<b>84</b>
<b>3.12 GSK3-Phosphorylierung in AIP-überexprimierenden Zellen</b>	<b>86</b>
<b>3.13 Glykogensynthese-Bestimmung</b>	<b>87</b>
3.13.1 Vorversuche	88
3.13.2 Glykogensynthese in Abhängigkeit von der Insulin-Konzentration	90
<b>4. Diskussion</b>	<b>92</b>
<b>4.1 Datenbankergebnisse</b>	<b>92</b>
<b>4.2 Klonierung des offenen Leserasters</b>	<b>94</b>
<b>4.3 GST-Konstrukte</b>	<b>94</b>
<b>4.4 Nachweis der Interaktion zwischen Akt und AIP</b>	<b>95</b>
4.4.1 Protein-Assoziation mit GST-AIP 6595s	95
4.4.2 Co-Immunopräzipitation	97
4.4.3 Nachweis der Interaktion	99
<b>4.5 Funktionelle Charakterisierung von AIP</b>	<b>100</b>
4.5.1 Einfluss von AIP auf die Akt-Phosphorylierung	101

4.5.2	Einfluss von AIP auf die in-vitro-Kinase-Aktivität von Akt	102
4.5.3	Einfluss von AIP auf die GSK3-Phosphorylierung	104
4.5.4	Einfluss von AIP auf die Glykogensynthese	107
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>108</b>



# 1. Einleitung

Zur Aufrechterhaltung der Kommunikation einer Zelle mit ihrem umgebenden Milieu ist es unerlässlich, dass Signale von außerhalb in die Zelle weitergeleitet und in sinnvolle Reaktionen umgesetzt werden.

Dazu steht eukaryoten Zellen eine Vielzahl an Signaltransduktions-Mechanismen zur Verfügung. Diese reichen von vergleichsweise einfachen Mechanismen wie der Öffnung von Ionen-Kanälen als Folge der Bindung von extrazellulären Substanzen bis zu hochkomplexen Signaltransduktionswegen, die über zwischengeschaltete kleine Signalmoleküle und Kaskaden von Protein-Phosphorylierungen und -Dephosphorylierungen die verschiedensten zellulären Prozesse beeinflussen. Rezeptoren sind in der Lage, auf verschiedene Signalwege einzuwirken und so Einfluss auf mehrere Zellfunktionen nehmen. Auch können die Signalwege mehrerer Rezeptoren in einer gemeinsamen Endstrecke zusammenlaufen.

## 1.1 Bedeutung von Akt

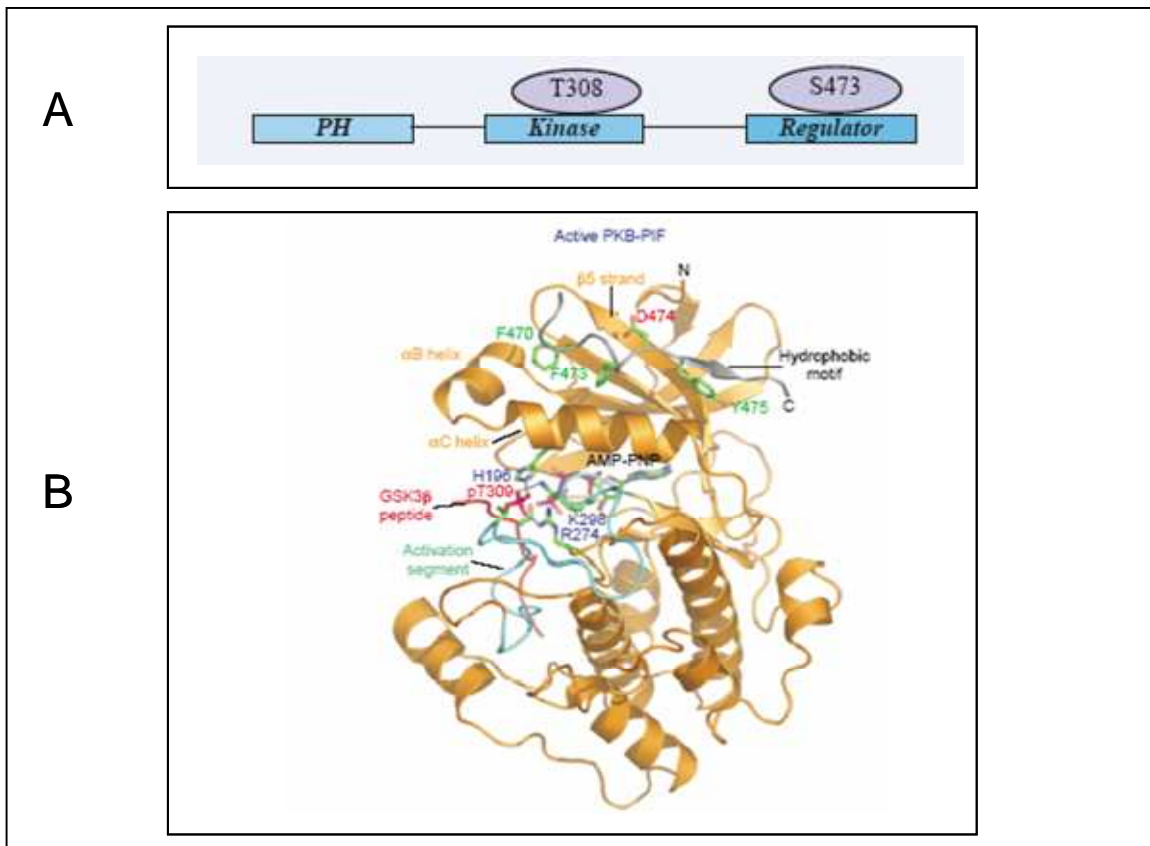
Die Serin-Threonin-Kinase Akt, auch PKB genannt, von der drei Isoformen existieren, ist ein Beispiel für ein Protein, das in der Signaltransduktion eine herausragende Rolle spielt. Sie ist an der Übertragung des Insulinsignals ebenso beteiligt wie an der Signaltransduktion in T-Zellen, der Regulation von Zelldifferenzierung und Wachstum, sowie neurobiologischen Prozessen. Damit ist sie ein Faktor in der Pathogenese so verschiedener Krankheiten wie des Diabetes mellitus Typ 2, Tumorerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen.

### 1.1.1 Struktur

Akt wurde 1987 identifiziert als putative Serin-Threonin-Kinase homolog zur katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase. Aufgrund der Ähnlichkeit zu PKA (Proteinkinase A) und PKC (Proteinkinase C) wurde es auch als PKB (Proteinkinase B) bezeichnet. Unabhängig davon wurde c-Akt als zelluläres Homologes des Onkogens v-Akt des AKT-8-Maus-Leukämie-Virus entdeckt, daher der synonyme Name Akt.

Von Akt existieren die drei Isoformen Akt1, Akt2, Akt3 (PKB $\alpha$ , PKB $\beta$ , PKB $\gamma$ ). Sie sind in der Struktur sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch in ihrer Expressionsstärke in verschiedenen Geweben. Es gibt Hinweise auf eine redundante Funktion der einzelnen Isoformen. Akt besteht aus drei stark konservierten Domänen, einer aminoterminalen PH (Pleckstrin Homologie)-Domäne, die die Bindung an Phosphatidyl-Inositol(3,4,5)Tris-Phosphat (PtdIns(3,4,5)P3) vermittelt, der katalytischen Domäne mit der Proteinkinase-Aktivität und einer carboxyterminalen regulatorischen Domäne (Mirza et al., 2000).

Zytosolisches Akt ist inaktiv. Erst durch Lokalisation an der Plasmamembran über die Bindung der PH-Domäne an PtdIns (3,4,5)P3 wird Akt aktiviert, indem der Serin-Rest 473 und der Threonin-Rest 308 phosphoryliert werden. Die Threonin 308-Phosphorylierung geschieht durch PDK1, der genaue Prozess der Serin 473-Phosphorylierung wurde noch nicht geklärt. In der Diskussion sind unter anderem die DNA-PK (Feng et al., 2004), ILK-1 (Delcommenne et al., 1998), PKC $\alpha$  (Partovian und Simons, 2004) und PKC $\beta$ 2 (Kawakami et al., 2004).



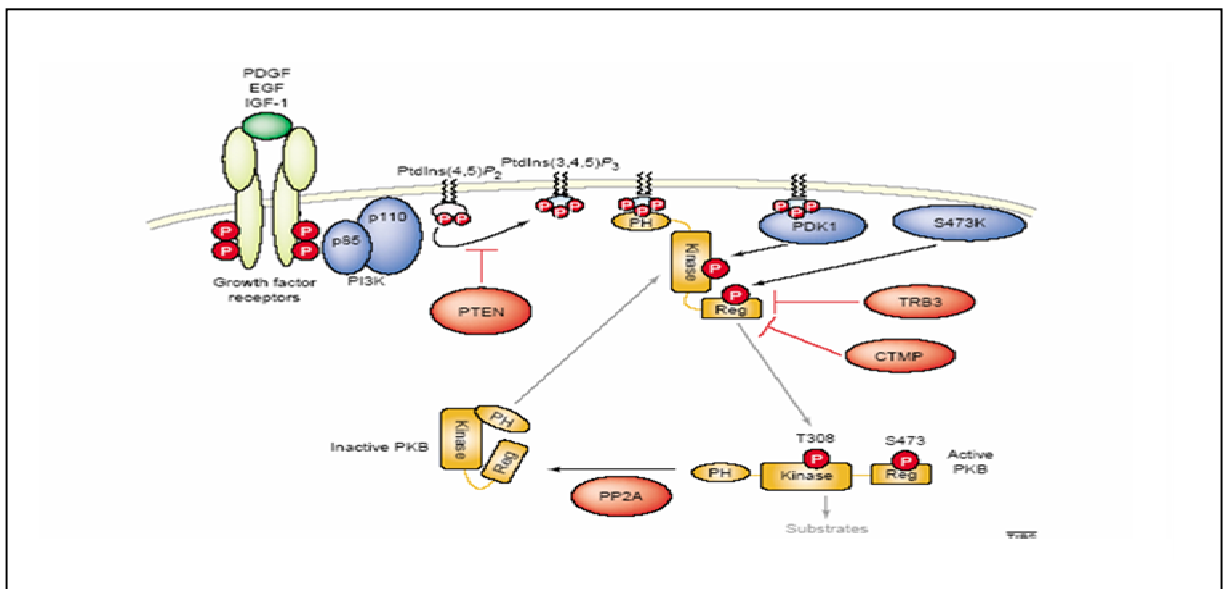
**Abb1.1. Struktur der Serin-Threonin-Kinase Akt.** Die Abbildung zeigt die Struktur von Akt mit der aminoterminalen PH-Domäne, der katalytischen Domäne, sowie der carboxyterminalen regulatorischen Domäne. Zusätzlich sind die beiden Phosphorylierungsstellen zu sehen (A). Das Proteinmodell zeigt die dreidimensionale Struktur des Proteins (B). Quelle: Song et al., 2005 (A); Brazil et al., 2004 (B)

### 1.1.2 Einbindung in das Netzwerk der Signaltransduktion

Die Aktivierung von Akt ist abhängig von der Lokalisation an der Plasmamembran, die über die Bindung der PH-Domäne an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> vermittelt wird. Daher ist die Aktivität der Phospho-Inositol-3-Kinase (PI3K) (Leevers et al., 1999) und des Phosphatase-und-Tensin-Homologen (PTEN) (Maehama und Dixon, 1999) entscheidend für das Aktivitätsniveau von Akt (Scheid und Woodgett, 2001).

Auch der von Akt distale Signalweg ist sehr komplex und beeinflusst, auch abhängig vom Zelltyp, viele verschiedene zelluläre Prozesse wie Glukose-Metabolismus, Zellwachstum und Differenzierung, Apoptose und die

Expression spezifischer Gene. Die Phosphorylierungs-Stellen für Akt sind durch folgende Aminosäure-Sequenz charakterisiert: RXRXXS/T (Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren, X steht für eine beliebige Aminosäure). Die ersten Akt-Substrate, die identifiziert wurden, waren GSK3 (Cross et al., 1995), 6-Phosphofructo-2-Kinase (Deprez et al., 1997) und das proapoptotische Protein BAD (Datta et al., 1997). Schon hier wurden die Vernetzung von Akt im Insulin-Signalweg und der Einfluss auf den Glukose-Metabolismus ebenso deutlich wie der Einfluss auf Apoptose-Mechanismen. Später wurden die Forkhead-Transkriptionsfaktoren als weitere Substrate von Akt identifiziert (Brunet et al., 1999, Biggs et al., 1999, Kops et al., 1999), die durch Phosphorylierung gehemmt werden. Dadurch kommt es bei der Aktivierung von Akt unter anderem zu einer Zell-Zyklus-Progression über die Reduktion von p27Kip und die Aufrechterhaltung der Konzentration von CyclinD1 (Brazil et al., 2004). Auch Querverbindungen zum Ras/MAPK- Signalweg (Zimmermann und Moelling, 1999) und zur NF- $\kappa$ -B Regulation (Ozes et al., 1998; Romashkova und Makarov, 1999) wurden beschrieben (Scheid und Woodgett, 2001).



**Abb1.2. Aktivierung von Akt mit Regulatoren.** Die Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 wird durch die dargestellten regulatorischen Proteine verstärkt (blau dargestellt) oder inhibiert (rot dargestellt). Während einige dieser Proteine direkt an Akt binden (PDK1, CTMP), regulieren andere die Aktivität von Akt indirekt (PI3K, PTEN). Quelle: Brazil et al., 2004.

### **1.1.3 Physiologische Funktionen von Akt**

Zwei wichtige Funktionen von Akt sind die entscheidende Rolle in der Insulin-Signaltransduktion und der Einfluss auf die T-Zellfunktion.

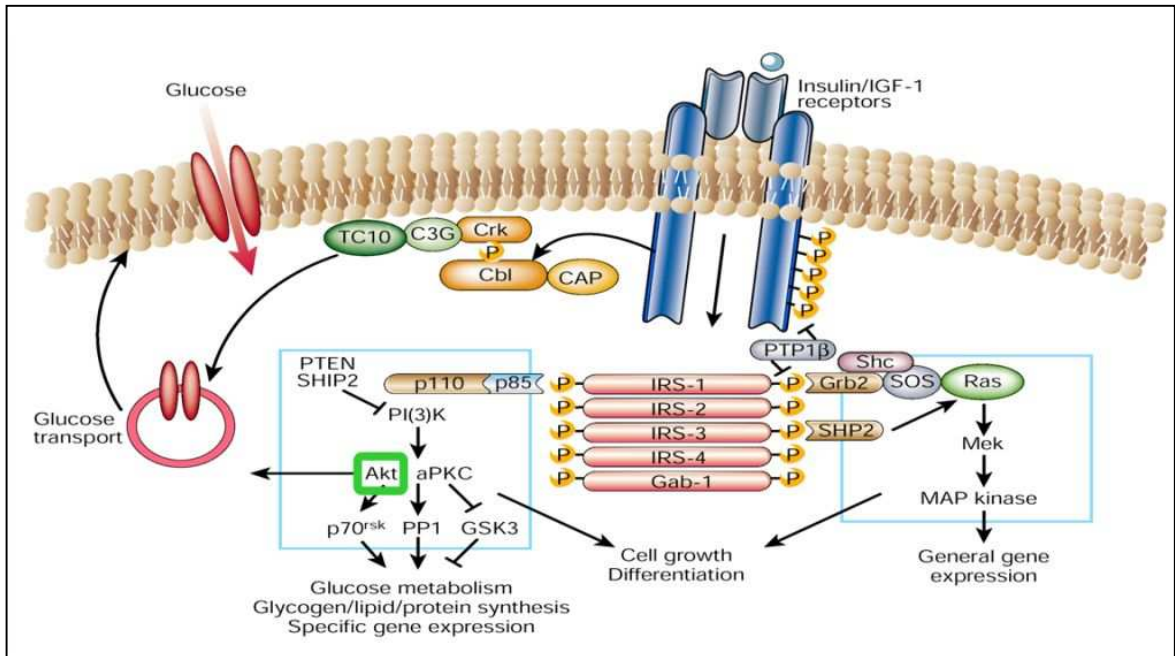
#### 1.1.3.1 Funktionen im Insulin Signalweg

Der Insulin-Signalweg ist von immenser klinischer Bedeutung, da hier der pathogenetische Mechanismus für die Insulinresistenz in Leber, Muskeln und Fettgewebe als kausaler Faktor für Diabetes mellitus Typ 2 zu suchen ist. Diabetes mellitus Typ 2 wurde schon vor einiger Zeit als „Pandemie“ bezeichnet (Hjelm et al., 2003). Er ist eines der größten gesundheitlichen Probleme mit einer hohen Zuwachsrate in den letzten Jahren. Die Prävalenz von Diabetes mellitus ist in den Jahren 1993 bis 2003 von 30 Millionen auf 130 Millionen gestiegen (Hjelm et al., 2003). Im Hinblick auf die gravierenden Folgekrankheiten, die makrovaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose und mikrovaskuläre Komplikationen wie Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie (Yale, 2000) einschließen, ist der Aufklärung des pathogenetischen Mechanismus und der Entwicklung kausaler Therapien eine große Bedeutung beizumessen.

Der proximale Teil des Insulin-Signalwegs ist schon sehr gut aufgeklärt. Auf die Autophosphorylierung der Insulin-Rezeptor-Untereinheiten folgt die Bindung und Phosphorylierung der IRS-Moleküle 1 bis 4. Diese haben auch Einfluss auf den MAP-Kinase Signalweg, IRS-1 aktiviert aber hauptsächlich PI3K. Über diesen Weg wird in der Plasma-Membran Insulin-sensitiver Zellen PtdIns (3,4,5)P3 gebildet. Wie oben beschrieben, führt dies zu einer Aktivierung von Akt (Saltiel und Kahn 2001).

Akt hat im Insulin-Signalweg verschiedene Funktionen. Über einen noch unbekanntem Mechanismus wird die Translokation des Glukosetransporters GLUT4 in die Plasmamembran gefördert. GSK3 wird gehemmt und somit die

Glykogensynthese gesteigert. Auch das durch Insulin induzierte Zell-Wachstum wird über Akt vermittelt (Saltiel und Kahn, 2001).



**Abb1.3. Insulin-Signalweg.** Das Insulinsignal wird durch den Insulinrezeptor vermittelt, der durch eine Auto-Phosphorylierung der Untereinheiten aktiviert wird. Durch Bindung der Insulinrezeptor-Substrate wird das Signal weitergeleitet und über verschiedene Mechanismen werden Glukose-Verwertung, Zellwachstum und Genexpression beeinflusst. Quelle: Saltiel und Kahn, 2001

### 1.1.3.2 Funktionen in der Signaltransduktion von T-Zellen

Die Rolle von Akt in T-Zellen ist noch nicht eindeutig geklärt, die Wichtigkeit dieser Kinase in der Signaltransduktion in T-Zellen, vor allem in der Folge der Aktivierung des costimulatorischen Rezeptors CD28 wird aber immer deutlicher. Funktionelle Auswirkungen einer Akt-Aktivierung, die derzeit diskutiert werden, sind unter anderem die Induktion von Transkription, Überleben der Zellen, Glukose-Stoffwechsel und Translations-Mechanismen (Kane und Weiss, 2003).

Auch in T-Zellen wird die Akt-Aktivierung durch eine Erhöhung der PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub>-Konzentration ausgelöst, also einen PI3K-abhängigen Prozess (Ward

et al., 1992). Die PI3K-Aktivierung in T-Zellen ist jedoch nicht nur insulinabhängig, sondern wird auch durch spezifische Signalwege beeinflusst. So wurde eine Erhöhung der PI3K-Aktivität als Folge einer Stimulation von CD28 beschrieben (Wu et al., 2005). CD28 ist das bei T-Zell-Aktivierung benötigte „zweite Signal“. Ohne diese Co-Stimulation werden T-Zellen bei Antigen-Kontakt anerg. Weder die klonale Expansion noch die Differenzierung der T-Zellen ist ohne dieses zusätzliche Signal möglich (Acuto et al., 2003). Jedoch auch die Signaltransduktion bei Antigen-Kontakt des T-Zell-Rezeptors schließt eine Aktivierung von Akt ein (Okkenhaug et al., 2004).

Die Effekte einer Akt-Aktivierung in T-Zellen sind sehr komplex und bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Einige der Effekte, die in Mäusen beobachtet wurden, die eine konstitutiv aktive Form von Akt in Thymozyten und peripheren T-Zellen exprimierten, können mit dem heutigen Wissen über Akt-interagierende Proteine erklärt werden, zum Beispiel die Apoptose-Hemmung. Wie in 1.1.2 beschrieben hemmt Akt das proapoptotische Protein BAD. Andere Effekte sind in ihrer Entstehung und ihrer Bedeutung noch nicht verstanden. So wurde auch eine vermehrte Selektion zugunsten der CD4-Linie beobachtet, also der T-Helfer-Zellen. Der Einfluss auf die Selektion wird vermutlich über eine Aktivierung von Erk und Lck vermittelt, da eine erhöhte Aktivität in T-Zellen oben genannter Mäuse beobachtet wurde, und der Einfluss dieser Proteine auf die Selektion bekannt ist (Na et al., 2003).

#### 1.1.3.3. Weitere medizinisch bedeutsame Akt-Funktionen

Da der PI3K-Signalling-Weg ubiquitär ist, konnte auch in vielen anderen Zell- und Organsystemen ein Einfluss der Akt-Aktivität auf zelluläre Funktionen und physiologische Prozesse nachgewiesen werden.

Von den vielfältigen Prozessen, die durch Akt beeinflusst werden, sollen hier zwei Bereiche näher erläutert werden, die Rolle von Akt in der Tumorentstehung und in neurodegenerativen Prozessen.

Schon die Entdeckung von Akt als Homologes zu v-Akt, einem Protein eines Retrovirus, der Leukämien bei Mäusen verursacht (Staal et al., 1988), wies auf die Bedeutung von Akt in der Tumorgenese hin. Die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse wurde durch die Beschreibung der Akt-Amplifikation oder Überexpression in verschiedenen Tumoren, zum Beispiel Mamma-Carcinomen (Jones et al., 1991), Ovarial-Carcinomen (Cheng et al., 1992) und Pankreas-Carcinomen (Cheng et al., 1996), unterstrichen. Als molekularer Mechanismus kommt der positive Einfluss von Akt auf das Zellwachstum, sowie die Apoptose-Hemmung durch Akt in Frage. Mirza et al. wiesen 2000 nach, dass nicht nur die unphysiologische dauerhafte Akt-Stimulation zu einer onkogenen Transformation führt, sondern schon die Aktivierung einer konditional aktiven Form von Akt ausreicht, um die Tumorgenese auszulösen.

Während der Einfluss von Akt auf die Tumorentstehung durch die Apoptose-Hemmung und den positiven Einfluss auf das Zellwachstum erklärt werden kann und bei allen Tumoren demselben Mechanismus entspricht, ist die Rolle von Akt in neurodegenerativen Erkrankungen sehr spezifisch. So spielt Akt bei der Spinozerebellären Ataxie eine positive Rolle in der Pathogenese (Cheng et al., 2003), bei Chorea-Huntington verlangsamt es den Krankheitsverlauf und wirkt neuroprotektiv (Humbert et al., 2002).

Bei der Gruppe der Spinozerebellären Ataxien handelt es sich um Krankheiten, die aufgrund verschiedener genetischer Veränderungen zu zerebellären Symptomen wie Stand- und Gang-Ataxie sowie Dysarthrie führen. Der molekulare Mechanismus besteht in einer Protein-Aggregation von Ataxin 1, die über 14-3-3 Proteine vermittelt wird. Diese Proteinbindung ist Folge einer Phosphorylierung von Ataxin 1 durch Akt (Chen et al., 2003).

Die neuroprotektive Wirkung von Akt bei Chorea-Huntington wurde schon 2002 von Humbert et al. beschrieben. Chorea-Huntington ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die mit Bewegungsstörungen und Demenz einhergeht. Auf molekularer Ebene basiert die durch Akt vermittelte Neuroprotektion zum Einen auf einer direkten Phosphorylierung von Huntingtin,



es sind aber auch indirekte Mechanismen, zum Beispiel die Phosphorylierung von Arfaptin 2, beteiligt, das einen Einfluss auf den Proteinabbau durch Proteasomen hat (Rangone et al., 2005). Diese Mechanismen verlangsamen den Prozess der Proteinaggregation und somit den Krankheitsverlauf.

#### **1.1.4 Bisher bekannte Bindungspartner**

Neben den schon lange bekannten Akt-Substraten GSK3 (Cross et al., 1995), 6-Phospho-Fructo-Kinase (Deprez et al., 1997), dem proapoptotischen Protein BAD (Datta et al., 1997) und der Klasse der Forkhead-Transkriptionsfaktoren (Brunet et al., 1999; Biggs et al., 1999; Kops et al., 1999) wurden später andere Akt-interagierende Proteine beschrieben.

Als erster Hinweis auf eine Querverbindung zwischen dem PI3Kinase-Signalweg und dem MAP-Kinase-Signalweg gilt das 1999 als Akt-Substrat identifizierte RAF (Zimmermann und Moelling, 1999).

In den folgenden Jahren wurden weitere Akt-interagierende Proteine beschrieben, die jedoch nicht in erster Linie zur Klasse der Akt-Substrate gehören, sondern die Akt-Aktivität modulieren oder die Akt-Lokalisation steuern. Als Beispiele für Regulatoren seien hier CTMP und TRB3 genannt. CTMP bindet an die carboxyterminale regulatorische Domäne von Akt und verhindert die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von Akt (Maira et al., 2001). TRB3 wurde als Homologes des Drosophila-Protein tribbles beschrieben und inhibiert die Akt-Aktivierung in der Leber (Du et al., 2003). Aktin und Periplakin spielen eine große Rolle bei der intrazellulären Lokalisierung von Akt (Cenni et al., 2003; Van den Heuvel et al., 2002) und bewirken eine Bindung an das Zytoskelett beziehungsweise das System der Intermediärfilamente (Plakin). Die Bindung an Plakin vermindert die Phosphorylierung von nukleären Akt-Substraten wie FOXO4 (Van den Heuvel et al., 2002). Daneben wurden noch weitere Akt-bindende Proteine identifiziert, so zum Beispiel hFt1 (Remy und Michnick, 2004), JIP1 (Kim et al., 2002), POSH (Figuroa et al., 2003) und ERK1/2 (Sinha et al., 2004).

## **1.2 Suche nach neuen Akt-Bindungspartnern**

Trotz der zahlreichen schon identifizierten Akt-interagierenden Proteine ist weitere Forschung hier Erfolg versprechend, da noch viele physiologische Funktionen von Akt mit den bisher bekannten Signalwegen nicht erklärbar sind. Einer der wichtigsten ungeklärten Signalwege ist die Insulin-induzierte Glukose-Aufnahme durch Translokation von GLUT-4 in die Plasmamembran insulinempfindlicher Zellen. Dass Akt für die GLUT-4-Translokation essentiell ist, wurde schon 1998 gezeigt (Kohn et al., 1998), bis heute konnte jedoch selbst mit neuen Methoden wie siRNA-Ansätzen (Ishiki und Klip, 2005) nicht geklärt werden, wie Akt den Vesikel-Transport und die Verschmelzung der GLUT-4-enthaltenden Vesikel mit der Plasma-Membran vermittelt.

Auch in T-Zellen ist die Aktivierung und Regulation von Akt noch nicht vollständig verstanden. Die Bindung an PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> in der Plasmamembran ist für manche Effekte von Akt als Erklärung nicht ausreichend. Das konnte in Systemen mit einer myristylierten Form von Akt, die in der Plasmamembran lokalisiert ist, jedoch keine PH-Domäne hat, gezeigt werden. Nach der oben genannten Theorie zur Aktivierung von Akt müsste eine Lokalisation an der Plasmamembran für eine Aktivierung von Akt ausreichen. Experimentelle Daten zeigen jedoch, dass die Deletion der PH-Domäne auch bei einer an der Plasmamembran lokalisierten Form die Aktivität von Akt drastisch senkt. Das wurde unter anderem bezüglich der NFκB-Aktivierung in T-Zellen gezeigt (Kane und Weiss, 2003). Das könnte auf eine weitere Funktion der PH-Domäne in Protein-Protein-Interaktionen hinweisen. Die genauen Zusammenhänge sind jedoch noch gänzlich ungeklärt.

### **1.3 Ausgangspunkt und Zielsetzung**

Die Serin-Threonin-Kinase Akt hat eine große Bedeutung in den unterschiedlichsten physiologischen Vorgängen wie Zell-Wachstum und Differenzierung, Insulin-Wirkung und Glukose-Stoffwechsel, sowie T-Zell-Entwicklung und Aktivierung. Die meisten der Signaltransduktions-Wege sind noch nicht vollständig geklärt und in vielen Fällen fehlt auch noch ein entscheidendes Bindeglied zwischen Akt und den beobachteten physiologischen Effekten. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass einige Akt-interagierende Proteine existieren, die noch nicht als solche bekannt sind.

Ziel der Arbeit ist es, ein mögliches Akt-interagierendes Protein zu beschreiben, die Interaktion zu verifizieren und die physiologischen Folgen einer Interaktion zu charakterisieren.

Als erstes sollten die Recherche-Ergebnisse aus den bestehenden Datenbanken zusammengestellt werden, um eine vollständige cDNA darstellen und daraus eine Abschätzung der Größe und der Struktur des Proteins (Transmembran-Domänen, Phosphorylierungs-Sequenzen für bestimmte Kinasen und ähnliches) geben zu können.

Zur Analyse in Zellkultur-Experimenten wurden spezifische Antikörper hergestellt und die gesamte DNA wurde in einen Expressionsvektor kloniert. In der Zellkultur wurden die Interaktion der Proteine bestätigt und funktionelle Untersuchungen durchgeführt.

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### Allgemeine Geräte

Magnetrührer	Reo	Ikamay
Mikrowelle	MCCD 2127	Bauknecht
pH-Elektrode	SenTix 97T	WTW
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Genesys5	Spectronics
Pipetten	2,5 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf
Wippe	Rocky	Fröbel Labortechnik
Scanner	Sharp JX-330	Sharp
Thermoblock		Störktronic
Vortex Mixer	Genie 2	Scientific Industries
Waagen	PG2002	Mettler Toledo
	AB104	Mettler Toledo
Wasseraufbereitung	Milli-Q plus	Millipore
Wasserbad, thermostatisierbar	7A	Julabo
Zentrifugen	Avanti™ J-25 mit Rotoren JA-17	Beckmann

und JLA-10.500

Biofuge fresco

Heraeus

Biofuge pico

Heraeus

### **Molekularbiologische Arbeiten**

Elektrophoreseapparatur

Horizontal Elektrophorese

Harnischmacher

Labortechnik

Zentrifugationsröhrchen

Centri Sep

Applied Biosystems

PCR Maschine

Techne Progene

UV Tisch

UVT-28MP

Herolab

MidiDoc Documentation System

Herolab

B & W Monitor

Monacor

Video Copy Processor P67E

Mitsubishi

Kapillarelektrophorese

Abi Prism 310

Applied Biosystems

### **Bakterienkultivierung**

Autoklav

Varioklav 500

H+P Labortechnik

Brutschrank

Function Line

Heraeus

Bakterienschüttler

HAT

Infors AG

Blotting Apparatur

Transblot

Hölzel

Elektrophoreseapparaturen

Minigelapparatur (10 x 10 cm<sup>2</sup>)

Harnischmacher

Labortechnik

Maxigelapparatur (20 x 20 cm<sup>2</sup>)

Harnischmacher

Labortechnik

Filmcassette

für die Detektion der  
Chemilumineszenz von  
Proteinblots

Dr. Goos Supreme

Filme

Hyperfilm MP

Amersham

Biosciences

Nitrocellulose Membran

Hybond ECL

Amersham

### **Zelkulturarbeiten**

Binokular	Axiovert 25	Zeiss
Brutschrank	Function line	Heraeus/ Kendro
Cleanbench	Herasafe	Heraeus/ Kendro

## **2.2 Chemikalien, Enzyme und Kits**

### **Chemikalien**

β-Mercaptoethanol		Merck
Agarose, peqGold		peqLab Biotechnologie GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)		Merck
Aprotinin		Roche
Bromphenolblau		Merck
BSA für Restriktionsverdau, Fraction V Lösung (10 %)		NEB
Calciumchlorid		Sigma
Coomassie BrilliantBlue R-250®		Serva
Desoxynukleotide		peqLab
Di-Natriumhydrogenphosphat		Merck
Dithiothreitol (DTT)		Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)		Merck
DOG (1,2-Dioctanoyl-sn-glycerin)		Calbiochem
EDTA		Sigma
EGTA		Sigma
Eisessig		Merck
Entwickler		Kodak

Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Fixierer	Kodak
Formaldehyd	Aldrich
Gelatine	Merck, Darmstadt
Geneticin (G418)	Gibco
Glucose	Sigma
Glutathion	Roche
Glycerin	Merck
Glycin	Bio-Rad
HEPES	Sigma
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid)	Roth
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin-Monosulfat	Roth
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck
Methanol	Merck
Natriumacetat	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumfluorid	Roth
Natriumorthovanadat	Sigma
Natriumpyrophosphat	Sigma
Natriumthiosulfat x 5 H <sub>2</sub> O	Merck
Natronlauge	Merck
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Roche
Ponceau S	Sigma
Protein A Sepharose	Amersham
Protein Assay Dye reagent concentrate	BioRad
Protein G Sepharose	Amersham

Rothiphorese Gel 30, 30 % Acrylamid /0,8 % (w / v)	Roth
Bisacrylamid, Stammlösung (37,5:1)	
Salzsäure	Merck
SDS ultrapure	Roth
Sephadex G 50	Pharmacia
Sequenzier Premix: Big Dye <sup>®</sup> Terminator v.1.1. Cycle	Applied Biosystems
Silbernitrat	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Trichloressigsäure	Roth
TritonX-100 (t-Octylphenoxy-polyethoxyethanol)	Roth

### **Enzyme**

Restriktionsenzyme ( <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>MfeI</i> , <i>NotI</i> , <i>AatII</i> , <i>SmaI</i> , <i>XhoI</i> , <i>ApaI</i> , <i>HindIII</i> , <i>HincII</i> , <i>SacI</i> , <i>BamHI</i> )	New England Biolabs
DNase, RNase	Roche
Lysozym	Roth
Taq Polymerase	Eppendorf
Pwo Polymerase	peqLab
Pfx Polymerase	Invitrogen
T4-DNA Ligase	New England Biolabs
T4-DNA Polymerase	New England Biolabs

### **Kits**

NucleoSpin Extract	Macherey+Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey+Nagel
QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification-Kit	Qiagen



### **2.3 Bakterienstämme, Zellen und Plasmide**

<i>E.coli</i> BL21(DE3)	Novagen
<i>E.coli</i> BL21-RP	Stratagene
<i>E.coli</i> 298 F'	Genentech
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	NEB

#### **Zellen**

HEK 293 mit den Adenovirus Genen E1A und E1B transformierte humane embryonale Nierenfibroblasten

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblastische Zell-Linie

#### **Plasmide**

pGEX5X2	Expressionsvektor mit Ampicillinresistenz, <i>tac</i> Promotor, N-terminaler GST-Tag, N-terminaler Faktor Xa-Schnittstelle	Amersham
pGEX5X3	Expressionsvektor mit Ampicillinresistenz, <i>tac</i> Promotor, N-terminaler GST-Tag, N-terminaler Faktor Xa-Schnittstelle	Amersham
pCR $\emptyset$	Klonierungsvektor für PCR-Produkte, mit Kanamycinresistenz, <i>lac</i> -	Invitrogen

	Promotor, <i>ccdB</i> - und <i>lacZ<math>\alpha</math></i> -Genen	
pRK <sub>RS</sub>	Säugerzellen Expressionsvektor, mit Ampicillinresistenz, CMV-Promotor	Genentech
pRK5	Säugerzellen Expressionsvektor, mit Ampicillinresistenz, CMV-Promotor	Genentech
<b>EST-Klone</b>		
AIP 476	Clone ID 3906864, Accession BC041160 Vektor pCMV SPORT6 Länge 476 – 2729 (2253 bp)	
AIP 1236	Clone ID 6176807, Accession BQ428196 Vektor pCMV SPORT6 Länge 1236 – ca. 3700 (ca. 2500 bp)	
AIP 4205rev	Clone ID 1370828, Accession AA907246 Vektor pT7T3D Pac Länge 2792 – 4205 (1472 bp)	

## REVERS

AIP 3718                      Clone ID 823575,  
                                    Accession AA497122  
                                    Vektor pT7T3D Pac  
                                    Länge 3718 – 4722 (1004 bp)

AIP 6595rev                      Clone ID 2308434,  
                                    Accession AI653128  
                                    Vektor pT7T3D  
                                    Länge 4558 – 6597 (2238 bp)

## REVERS

### 2.4 Oligonukleotide

#### 2.4.1 Primer für Charakterisierung des EST-Klons AIP 476

Name	Sequenz	Länge in bp
AIP983fwd	5'- ACAGACATTTCCAGCGCAG -3'	19
AIP2536rev	5'- GATATCTGTTCCAGTTCCCAGC -3'	22

fwd = *forward*, rev = *reverse*;

#### 2.4.2 Primer für Charakterisierung des EST-Klons AIP 1236

Name	Sequenz	Länge in bp
M13fwd	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	17
M13rev	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'	19
AIP2112fwd	5'- ATGAATTTGCTTTCCGGATGC -3'	20
AIP2536rev	5'- GATATCTGTTCCAGTTCCCAGC -3'	22

#### 2.4.3 Primer für Charakterisierung des EST-Klons AIP 4205rev

Name	Sequenz	Länge in bp
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	20
AIP3117rev	5'- CAAGTTCTTCAGCTCGTTCTCC -3'	22

#### 2.4.4 Primer für Charakterisierung des EST-Klons AIP 3718

Name	Sequenz	Länge in bp
AIP4389fwd	5'- GAAAATTCCACCCTTAATTCCC -3'	22
IP4579rev	5'- TCTGAAGCCTGACGTTTCATG -3'	20

#### 2.4.5 Primer für Charakterisierung des EST-Klons AIP 6595rev

Name	Sequenz	Länge in bp
AIP5875fwd	5'-AGGCTTGGTCCAGCAGTG -3'	18
AIP6594rev	5'-ATTAGGAGCTTTGTTGCTCCC -3'	21

#### 2.4.6 Primer für die Klonierung von AIP 476

Name	Sequenz	Länge in bp
AIP1163fwd	5'-CTCGAGAGTGACCAATTCCCTAGGCG -3'	26
Xho		
AIP2536rev	5'- GATATCTGTTCCAGTTCACAGC-3'	22

#### 2.4.7 Primer für die Klonierung von AIP 3'a

Name	Sequenz	Länge in bp
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	20
AIP3762rev	5'-CTGCTTGTTCGAGTCTCTT -3'	22
AIP3741fwd	5'-AAGAGACTCCGACAACAAGCAG-3'	22

AIP4584rev 5'-CATACTCTGAAGCCTGACGTTTCAT-3'

24

#### 2.4.8 Primer für die Klonierung von AIP 3'b

Name	Sequenz	Länge in bp
AIP3741fwd	5'-AAGAGACTCCGACAACAAGCAG-3'	22
AIP4584rev	5'-CATACTCTGAAGCCTGACGTTTCAT-3'	24
AIP4561fwd	5'-ATGAACGTCAGGCTTCAGAGTATG-3'	24
AIP6594rev	5'-ATTAGGAGCTTTGTTGCTCCC-3'	21

#### 2.5 Antikörper

Antikörper	Antigen	Herkunft / Referenz
<b>proteinspezifische Antikörper</b>		
Anti-Akt1-3	GST-akt2 (410-481)	AG Lammers
<b>Phospho-spezifische Antikörper</b>		
Anti-phospho-Akt (Threonin 308)	phospho-Threonin 308 Akt	Cell Signalling
anti-phospho-GSK3	phospho-GSK3	Cell Signalling

### **Sekundäre Antikörper**

anti-Kaninchen IgG-  
HRP, Ziege

Sigma

Sigma

anti-Maus IgG-HRP,  
Ziege

anti-Schaf IgG-HRP,  
Ziege

Biorad

## ***2.6 Nährmedien, Lösungen und Puffer***

### **Bakterienkultivierung**

LB-Medium	Trypton	10 g / l
	Hefeextrakt	5 g / l
	NaCl	10 g / l
LB-Agar	LB + Agar	15 g / l
LB/Kan	LB + Kanamycin	50 µg / mL
LB/Amp	LB + Ampicilin	100 µg / mL

### Plasmidpräparation

KCM-Lösung	KCl	0,5 M
	CaCl <sub>2</sub>	0,15 M
	MgCl <sub>2</sub>	0,25 M

Lyselösung	NaOH	0,2 M
	SDS	1 % (w/v)

Neutralisationslösung	Kaliumacetat	3 M
	Essigsäure	2 M pH 4,8-5,3

TE-Puffer	EDTA	0,1 mM
	Tris/HCl	10 mM pH 8

TE/RNase	TE + RNase	10 µg/ml
----------	------------	----------

### Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer	Tris	40 mM
	Natriumacetat	5 mM
	EDTA	1 mM
	Essigsäure	pH 8

Ethidiumbromidlösung	TAE Puffer mit Ethidiumbromid	10 mg / ml
----------------------	----------------------------------	------------

Probenpuffer 5x	EDTA	100 mM
-----------------	------	--------

Xylencyanol	0,05 % (w / v)
Glycerin	30 % (v / v)
Bromphenolblau in TAE-Puffer	0,05 % (w / v)

DNA Größen-Marker  
9267 bp, 5167 bp, 4398  
bp, 2988 bp, 2390 bp,  
2268 bp, 1970 bp, 1657  
bp, 1256 bp, 999 bp, 835  
bp, 785 bp, 643 bp, 630  
bp, 411 bp

### **Proteinpräparation**

GST-Lysepuffer	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM

GST-Elutionspuffer	Glutathion	5 mM
	Tris	50 mM
		pH 8

Laufpuffer (Gelfiltration)	Tris	25 mM
	NaCl	200mM
	DTT	10mM
		pH8

### **SDS-PAGE**



Elektrophoresepuffer	Tris	25 mM
	Glycin	190 mM
	SDS	0.1 % (w / v)
Sammelgelpuffer (4x)	Tris	0.5 M
	SDS	0,4 % (w / v)
		pH 6.8
Sammelgel (10 x 10 cm Gel)	30 % Acrylamid/0,8 % (w/v) Bisacrylamid- Stammlösung	0,4 mL
	Sammelgelpuffer	0,75 mL
	dH <sub>2</sub> O	1,85 mL
	APS 10 % (w/v)	30 µL
	TEMED	5 µL
Sammelgel (20 x 20 cm Gel)	30 % Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid- Stammlösung	2 mL
	Sammelgelpuffer	3,75 mL
	dH <sub>2</sub> O	9,25 mL
	APS 10 % (w/v)	150 µL
	TEMED	25 µL
Trenngelpuffer (4x)	Tris	1.5 M
	SDS	0,4 % (w / v)
		pH 8.8
Trenngel 10 % (w / v) (10 x 10 cm Gel)	30 % Acrylamid/0,8 % (w/v) Bisacrylamid-	3,3 mL

	Stammlösung	2,5 mL
	Trenngelpuffer	4,2 mL
	dH <sub>2</sub> O	67,5 µL
	APS 10 % (w/v)	16,5 µL
	TEMED	
Trenngel 8 % (w / v) (20 x 20 cm Gel)	30 % Acrylamid/0,8 % (w/v) Bisacrylamid-	10,56 mL
	Stammlösung	10 mL
	Trenngelpuffer	19,44 mL
	dH <sub>2</sub> O	270 µL
	APS 10 % (w/v)	66 µL
	TEMED	
SDS-Probenpuffer (Laemmli) 2x	SDS	3 % (w / v)
	Glycerin	20 % (w / v)
	β-Mercaptoethanol	3 % (v / v)
	Bromphenolblau	0.05 % (w / v)
	EDTA	10 mM
Protein Marker	200 kDa, 116 kDa, 97 kDa, 66 kDa, 43 kDa, 31 kDa, 21 kDa, 14 kDa	
Coomassielösung	Coomassie R-250	0.25 % (w / v)
	Methanol	45 % (v / v)
	Wasser	45 % (v / v)
	Eisessig	10 % (v / v)
Entfärbelösung	Methanol	40 % (v / v)

Wasser	50 % (v / v)
Eisessig	10 % (v / v)

### Western Blot

Transferpuffer	Methanol	40 % (v / v)
	Tris	48 mM
	Glycin	39 mM
	SDS (w / v)	0.04 % (w / v)

Ponceau S-Lösung	Ponceau S	0,2 % (w / v)
	Trichloressigsäure	2 % (v / v)

Stripping Puffer	Tris pH 6,8	66 mM
	β-Mercaptoethanol	0,5 % (v / v)
	SDS	2 % (w / v)

NET	NaCl	0,15 M
	EDTA	5 mM
	Tris pH 7,4	50 mM
	Triton-X-100	0,05 % (v / v)

NET-G	NET mit Gelatine	0,25 % (w / v)
-------	------------------	----------------

ECL Lösung A	Amersham
ECL Lösung B	Amersham

### Zellkultur

DMEM high Glucose	mit 4,5 g / l Glucose, mit L-Gln, ohne NaPyruvat	Cambrex
-------------------	--	---------

DMEM / F-12	15 mM HEPES, mit L-Gln	Cambrex
Fötales Kälberserum	Mycoplasmen und Virus getestet	Gibco
Trypsinlösung	EDTA (200 mg / l), Trypsin (500 mg / l)	Cambrex
HEK 293 Kulturmedium	DMEM/F-12 FCS	10 %
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Kulturmedium	DMEM High Glucose FCS	10 %
HEK 293 Transfektionsmedium	DMEM/F12 DMEM High Glucose FCS	1 / 3 2 / 3 10 %
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Transfektionsmedium	DMEM FCS	10 %
Hungermedium	DMEM/F-12 FCS	0,5 %
Einfriermedium	FCS DMSO	90 % 10 %
PBS (autoklaviert)	NaCl KCl	137 mM 2,7 mM

	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM
2 x BBS	BES pH 6,96	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 mM
Lysepuffer	Glycerin	10 % (v / v)
	Triton X-100	1 % (v / v)
	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
	HEPES pH 7,5	50 mM
	NaCl	150 mM
	EGTA	1 mM
	NaF	100 mM
	Na Pyrophosphat	10 mM
	Na Orthovanadat	1 mM
	PMSF	1 mM
	Aprotinin	10 µg / mL
HNTG	HEPES pH 7,5	20 mM
	NaCl	150 mM
	Triton X-100	0,1 % (v / v)
	Glycerin	10 % (v / v)
	NaF	10 mM
	Na Orthovanadat	1 mM

## **2.7 Methoden**

### **2.7.1 Datenbankanalysen**

#### **2.7.1.1 Gesamte Sequenz**

Um von dem sequenzierten Teil der cDNA auf die ganze Sequenz zu schließen, wurde die erhaltene Sequenz mit Sequenzen von EST-Klonen in Internetdatenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) verglichen. Fand man eine entsprechende Sequenz, wurde das 3'-Ende beziehungsweise das 5'-Ende erneut in die Suchmaschine eingegeben, so erhielt man den nächsten Teil der Sequenz. So ging man weiter vor, bis man die vollständige Sequenz erhalten hatte. Am Ende wurde noch die Lokalisation der einzelnen Sequenzen auf den Chromosomen verglichen. Lagen alle gefundenen Sequenzen nebeneinander auf dem gleichen Chromosom, war das ein weiterer Hinweis auf die Korrektheit der Daten.

#### **2.7.1.2 Offenes Leseraster**

Es gibt sechs Möglichkeiten, ein Leseraster auf eine DNA-Sequenz zu legen (je drei verschiedene Startpunkte auf zwei DNA-Strängen). Versuchte man, diese sechs möglichen Leseraster in Protein-Sequenzen zu übertragen (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>), traten in fünf davon nur sehr kurze translatierbare Bereiche auf, da die Translation sehr schnell durch Stop-Codons unterbrochen worden wäre. In einer Variante ergab sich ein langes Offenes Leseraster. Die Aminosäure-Sequenz, die sich hier ergab, wurde den weiteren Analysen zugrunde gelegt.

### **2.7.1.3 Homologien zu bekannten Protein-Domänen und Erkennungssequenzen**

Analysierte man die Aminosäure-Sequenz eines Proteins mit den auf den Webseiten Prosite (<http://www.expasy.org/prosite>) und Scansite (<http://scansite.mit.edu>) zur Verfügung gestellten Methoden, erhielt man Informationen über Homologien zu Proteindomänen, Phosphorylierungs-Sequenzen für bestimmte Kinasen sowie hydrophobe und hydrophile Bereiche.

## **2.7.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.7.2.1 PCR**

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von doppelsträngiger DNA (Mullis, 1990), die in Abwandlungen für verschiedene Zwecke eingesetzt wird. Der Reaktionsansatz besteht im Prinzip aus der DNA-Vorlage (die zu amplifizierende DNA), Primern (Oligonukleotide mit einer Länge von 20 bis 30 Basenpaaren, die komplementär zur Anfangs- oder Endsequenz der zu synthetisierenden DNA sind), Desoxynukleotidtriphosphaten und einer thermostabilen DNA-Polymerase. Das Grundprinzip der PCR besteht aus der mehrfachen Wiederholung dreier Schritte. Erst wird die Doppelstrang-DNA thermisch denaturiert, die DNA liegt in Einzelsträngen vor. Dann findet bei einer nach den Merkmalen der Primer ausgewählten Temperatur das sogenannte Annealing statt, die Primer hybridisieren mit der einzelsträngigen DNA und bilden so den Ausgangszustand für den dritten Schritt, die eigentliche DNA-Synthese. Die DNA-Polymerase startet an den Primer-besetzten Stellen die DNA-Synthese. Da die bei diesem Zyklus synthetisierten DNA-Fragmente beim nächsten Zyklus auch als Ausgangsmoleküle fungieren, ergibt sich eine exponentielle Amplifikation der gewünschten DNA.

#### 2.7.2.1.1 Standard PCR zur Identifizierung von DNA-Fragmenten

Die Methode kann auch verwendet werden, wenn man ein spezifisches DNA-Fragment nachweisen will. Hierzu wurden Primer verwendet, die nur an die vorhandene DNA banden, wenn dort die komplementären Sequenzen vorhanden waren. Die erwartete Länge des DNA-Fragments wurde aus den Primer-Daten und der Sequenz der DNA berechnet. Entsprach die Länge des PCR-Produkts der erwarteten Länge, war das DNA-Fragment identifiziert.

Bei Konstrukten mit unklarer Länge des klonierten DNA-Fragments (zum Beispiel bestimmte EST-Klone, deren Länge nicht bekannt war), konnte die PCR auch zur Bestimmung der Länge des DNA-Konstrukts verwendet werden. Dazu wurden Primer gewählt, die am Vektor auf beiden Seiten des klonierten DNA-Abschnittes binden. Die Länge des PCR-Produktes entsprach dann der Länge der klonierten DNA.

#### 2.7.2.1.2 Überlappende PCR

Mit der überlappenden PCR können zwei beliebige DNA-Fragmente kombiniert werden. Die Primer, die an den zu kombinierenden Enden der beiden Ausgangs-Fragmente liegen, enthalten nicht nur die 20 bis 30 Basenpaare für die Bindung an die DNA, sondern sind etwa 40 Basenpaare lang. Der zweite Teil des Primers ist komplementär zum Ende der zweiten DNA-Vorlage. Als zweiter Primer wurde ein Primer komplementär zu den gewünschten Enden des gesamten DNA-Fragments eingesetzt. Nach den ersten PCRs erhielt man so zwei DNA-Fragmente, die eine überlappende Sequenz enthielten. Bei einer dritten PCR, für die man diese DNA-Fragmente zusammen mit den äußeren Primern der gesamten gewünschten Sequenz einsetzte, hybridisierten bei der Anlagerung der Primer nicht nur die außen gelegenen Primer, sondern auch die überlappenden Teile der eingesetzten DNA-Fragmente. Die DNA-Polymerase synthetisierte also ein DNA-Fragment, das vom 3'-Ende des ersten DNA-Fragments bis zum 5'-Ende des zweiten DNA-Fragments reichte.



#### 2.7.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zum Nachweis und zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. In Gelen aus 1 % Agarose in TAE-Puffer, dem 0,5 µg / ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde, wurden die DNA-Fragmente, die in Laufpuffer gelöst waren, durch das Anlegen einer Spannung bei einer konstanten Stromstärke von 60 – 90 mA in TAE-Puffer aufgetrennt. Die Detektion wurde mittels UV-Licht durchgeführt.

#### 2.7.2.3 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Banden der gewünschten Größe wurden mit einem Skalpell möglichst eng ausgeschnitten. Die DNA wurde entweder mit Hilfe des NucleoSpin Extract isoliert, meist jedoch mittels „Freeze-Squeeze“. Dazu wurde ein PCR-Eppendorf-Gefäß verwendet, in das mit einer Kanüle ein Loch gestochen wurde und das zu etwa einem Drittel mit Glaswolle ausgestopft war. In dieses Gefäß wurde das Agarose-Gel-Stück mit der DNA gegeben. Von einem anderen Eppendorf-Gefäß (2 ml) wurde der Deckel entfernt und es wurde eine der Größe des Gelstückes entsprechende Menge Phenol vorgelegt (ca. 50 bis 150 µl). Nachdem das kleine Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff gefroren wurde, wurden die zwei Eppendorf-Gefäße ineinander gestellt und zentrifugiert. Bei diesem Vorgang wurde der Puffer mit der gelösten DNA aus der Agarose extrahiert und in das untere Gefäß überführt. Danach wurde eine Standard-Phenol-Extraktion der DNA durchgeführt.

#### 2.7.2.4 Phenol-Extraktion von DNA

Um die DNA nach einem Freeze-Squeeze-Verfahren oder nach einem Restriktionsverdau von Proteinen und anderen Verunreinigungen zu reinigen, wurde eine Phenol-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde eine der DNA-Lösung entsprechende Menge an Phenol zur DNA-Lösung gegeben (ca. 1 / 3 der DNA-

Lösung), das Eppendorf-Gefäß wurde gevortext und dann 1 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthielt, wurde abgenommen und mit Ethanol versetzt (Endkonzentration 70 % Ethanol), um die DNA auszufällen. Nach 30 min bei -80 °C wurde die Lösung 10 min bei 13.000 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen, die DNA blieb als Pellett im Eppendorf-Gefäß. Nach zweimaligem Waschen mit 180 µl 70 %igem Ethanol wurde die DNA bei 66 °C getrocknet und in der gewünschten Menge TE-Puffer gelöst.

#### 2.7.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Seit ihrer Entdeckung finden Endonukleasen eine breite Anwendung in der molekularbiologischen Technologie. Es handelt sich um bakterielle Enzyme, die DNA an spezifischen Stellen spalten (McClarin et al., 1986). Die Erkennungssequenz besteht aus Palindromsequenzen von 4 – 8 bp. Dabei entstehen entweder glatte oder überhängende („sticky“) Enden, die die Ligation von DNA ermöglichen. Die Verdau-Reaktionen wurden nach Vorgaben des Herstellers mit den entsprechenden Puffern durchgeführt.

Nach dem Verdau wurde die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt um die Fragment-Größe kontrollieren zu können und gegebenenfalls einzelne Banden zu isolieren.

Eine spezielle Methode ist der „limitierte Verdau“. Gab es in einem gewünschten DNA-Abschnitt zwei Schnittstellen für ein Restriktionsenzym, von denen man aber nur eine verwenden wollte, gab es die Möglichkeit, die Kinetik der Reaktion zu nutzen. Man verwendete nur wenig Enzym und stoppte nach verschiedenen Zeitabschnitten (zum Beispiel 3 min, 5 min, 7,5 min, 10 min, 15 min) die Reaktion mit Elektrophorese-Laufpuffer. Das Enzym schnitt in zufälliger Reihenfolge ohne Bevorzugung einer bestimmten Schnittstelle alle DNA-Moleküle. Stoppte man die Reaktion, bevor der Verdau abgeschlossen war, entstanden DNA-Moleküle, bei denen nur die gewünschte Restriktions-Stelle geschnitten war.

#### 2.7.2.6 Auffüllen von überhängenden Enden

Um eine DNA mit überhängenden Enden mit einer anderen DNA mit glatten Enden ligieren zu können, kann man die Enden „auffüllen“. Dazu wurde die verdaute DNA mit dNTPs, T4-DNA-Polymerase und dem entsprechenden Puffer laut Angaben des Herstellers inkubiert.

#### 2.7.2.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die meisten Reaktionsansätze ist eine Abschätzung der DNA-Konzentration ausreichend. Dafür wurde 1 µl der DNA-Lösung zusammen mit Mengenstandards (5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng und 100 ng DNA) auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Über den Vergleich der Banden-Intensität unter UV-Licht wurde die DNA-Konzentration abgeschätzt.

#### 2.7.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Um die DNA-Fragmente in E.coli vermehren zu können, mussten sie in Plasmide integriert werden. Dazu wurden die Plasmide und das DNA-Fragment mit Restriktionsenzymen so verdaut, dass die Enden zueinander passen. Es ist auch möglich, drei oder mehr DNA-Fragmente mit entsprechenden Enden zu ligieren. Das verwendete Enzym war die T4-DNA-Ligase, die die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen katalysiert. Der Standard-Reaktions-Ansatz mit 10 µl enthielt 0,5 µl Ligase (1 Unit / µl), 1 µl 10x Ligase-Puffer sowie Vektor-DNA und Insert-DNA im molaren Verhältnis 1:2. Der Ansatz wurde teilweise variiert. Bei Ligationen von Fragmenten mit glatten Enden wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:5 eingesetzt. Bei Mehr-Faktor-Ligationen (Ligationen von mehr als zwei DNA-Fragmenten) wurden die Fragmente äquimolar eingesetzt.

#### 2.7.2.9 Transformation von DNA in E.coli

Die Transformation von Plasmid-DNA in E. coli erfolgte mittels Hitzeschock. Der Ligationsansatz (10 µl) wurde mit 20 µl KCM-Lösung und 70 µl dH<sub>2</sub>O versetzt. Nach der Zugabe von 100 µl kompetenten E.coli 298 beziehungsweise E.coli DH5α wurde der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 40 s. Danach wurde der Ansatz mit 800 µl LB Medium versetzt, auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den Einzelkolonien wurden Flüssigkulturen in je 2 ml LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum hergestellt.

#### 2.7.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Dabei wurden die Bakterien mit Natriumhydroxid und Natriumdodecylsulfat aufgeschlossen. Anschließend wurde die Lösung mit Kaliumacetat neutralisiert, wobei das schwerlösliche Kaliumdodecylsulfat zusammen mit Zellwandfragmenten, denaturierten Proteinen, genomischer DNA und hochmolekularer RNA ausfiel. Die Plasmid-DNA verblieb im Überstand. Nach anschließender Phenolisierung und Fällung konnte die Plasmid-DNA in TE/RNase aufgenommen werden. Nach dem Verdau der niedermolekularen RNA erhielt man aufgereinigte DNA.

Das Medium einer Bakterien-Übernacht-Kultur wurde nach dem Zentrifugieren (13000 g, 30 s) abgenommen, das Pellet wurde in 200 µl TE resuspendiert. Nachdem 100 µl Lyselösung zupipettiert und die Lösung gemischt wurde, wurden 50 µl Neutralisationslösung zugegeben. Nach abermaligem Mischen und 5 min Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat bei 13000 g für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Gefäß, in das 200 µl Phenol vorgelegt worden waren, überführt. Nach Vortexen und Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen, die DNA wurde mit 200 µl Isopropanol gefällt. Bei Zentrifugation der gevortexten Lösung bei 13000 g für 5 min bildete die DNA ein Pellet, das nach

zweimaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol getrocknet und in 50 µl TE/RNase gelöst wurde.

Alternativ wurde der NucleoSpin Plasmid Kit verwendet, da die Plasmid DNA hierbei noch weiter aufgereinigt wurde und sich so zur Transfektion von Zellen eignete. Dabei wurde die DNA nach Angaben des Herstellers an eine Silika-Säule gebunden und konnte von dort nach Wasch-Schritten mit 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert werden.

#### 2.7.2.11 Selektion positiver Klone

Da auch falsch-positiven Bakterien-Klonen mit Plasmiden ohne Insert wachsen, ist es entscheidend, einzelne Klone auf das gewünschte Plasmid zu testen. Dazu stehen verschiedene Methoden, die auf der PCR oder dem Restriktionsverdau basieren, zur Verfügung.

##### 2.7.2.11.1 Identifizierung positiver Klone mittels Kontroll-Restriktions-Verdau

Erstellt man eine „Karte“ des DNA-Konstrukts mit allen vorhanden Restriktions-Stellen, kann man die erwartete Größe der Fragmente nach Verdau mit Restriktionsendonukleasen ermitteln und diese mit den tatsächlich auftretenden Fragment-Größen nach dem Verdau mit den entsprechenden Enzymen vergleichen.

Die Restriktionsverdau wurden nach Angaben der Hersteller durchgeführt, die Proben wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und die gewünschten Klone mittels des Längenvergleichs identifiziert.

##### 2.7.2.11.2 Identifizierung positiver Klone mittels Kontroll-PCR

Alternativ zum Kontroll-Restriktions-Verdau konnte eine PCR mit spezifischen Primern für das DNA-Konstrukt durchgeführt werden. Erhielt man bei der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese ein Fragment der erwarteten Länge,

handelte es sich um das gewünschte Plasmid. Testete man gekaufte EST-Klone, war oft die Länge des klonierten Fragments unbekannt und musste getestet werden. Dazu verwendete man Vektor-spezifische Primer, die direkt neben dem 5'- und dem 3'- Ende des Fragments banden. Die Länge des PCR-Produkts entsprach so der Länge der cDNA. Diese PCR-Produkte wurden meist nicht weiter verwendet, die PCR konnte also mit Taq-Polymerase durchgeführt werden, da Punktmutationen keine Auswirkungen auf das Ergebnis hatten. Die PCR wurde nach Angaben des Herstellers in 25 µl angesetzt, als DNA-Vorlage wurde 1 µl der Bakteriensuspension eingesetzt, ein separater Aufschluss der Bakterien war nicht nötig.

#### 2.7.2.11.3 Identifizierung positiver Klone mittels Pool-Test

Mussten sehr viele Klone getestet werden, konnte man mit dieser Methode eine Vorauswahl treffen, welche Klone mittels Kontroll-Verdau oder Kontroll-PCR getestet werden sollten.

Von Kolonien auf den Agar-Platten wurden Kulturen in 96-Loch-Schalen angelegt (in 200 µl LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 20 µl von 12 Kulturen zusammen pipettiert, mit diesen Kulturen wurde eine Kontroll-PCR für das klonierte DNA-Fragment durchgeführt. Ergab sich eine positive Reaktion, wurden die zwölf Klone einzeln getestet, ergab sich keine PCR-Bande, konnten alle zwölf Klone verworfen werden.

#### 2.7.2.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Abbruch-Methode von Sanger durchgeführt (Sanger et al., 1977). Dabei wird durch Didesoxynukleotide ein Strangabbruch induziert. Da die Didesoxynukleotide zufällig eingebaut werden, wird bei jeder Position mit der entsprechenden Base ein Strangabbruch in bestimmten DNA-

Molekülen induziert. Trennt man die DNA-Stränge nach ihrer Größe auf, kann man die Sequenz ablesen. Anstatt der ursprünglichen Methode mit vier verschiedenen Ansätzen mit je einem Didesoxynukleotid wurde ein Ansatz mit verschiedenfarbig fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden verwendet. Die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillar-Elektrophorese. Dazu wurde der Sequenzierungs-Ansatz durch Gelfiltration in Sephadex G50-Säulen (Centri Sep-Zentrifugationsröhrchen) aufgereinigt (Zentrifugation 3 min bei 5000 g).

### **2.7.3 Herstellung von GST-Fusionsproteinen und Proteinassoziation**

Zur Herstellung von Antikörpern und für erste funktionelle Tests wurden GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteine hergestellt. Da bei großen Proteinen die Gefahr steigt, dass das Protein in den Bakterien präzipitiert und Einschlusskörperchen bildet, wurden nur einzelne Proteinabschnitte zusammen mit GST exprimiert. In dieser Arbeit wurde je ein GST-Fusionsprotein des aminoterminalen Teils von AIP und des carboxyterminalen Abschnittes exprimiert. Das aufgereinigte Protein konnte dann zur Antikörperherstellung verwendet werden. Mit der Proteinassoziation hatte man auch eine weitere Möglichkeit, die Interaktion des GST-Fusionsproteins mit anderen Proteinen zu zeigen.

#### **2.7.3.1 Überexpression des Proteins in E.coli**

Zur Überexpression in E.coli (Stamm BL21) wurden Teile des AIP-Gens in einen pGEX-Vektor kloniert, so dass das Leseraster nicht unterbrochen wurde. Dieser Vektor enthält eine Ampicillin-Resistenz, das  $lacI^q$ -Gen und das GST-Gen unter der Kontrolle eines  $P_{tac}$ -Promotors. Dem GST-Gen vorgeschaltet gibt es eine DNA-Sequenz, die viele Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme enthält. Hier können DNA-Sequenzen kloniert werden. Das  $lacI^q$ -Gen kodiert für den lac-Repressor, der die Transkription des GST-Fusionsproteins durch Interaktion mit dem  $P_{tac}$ -

Promotor inhibiert. Durch Induktion mit IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid, einem künstlichen Induktor des Lactose-Operons) wird die Repression aufgehoben, und das Fusionsprotein wird exprimiert.

Die Kultur der transformierten und getesteten E.coli BL21-Stämme erfolgte in einer 100 ml Über-Nacht-Kultur in LB mit Ampicillin (Konzentration 100  $\mu$ g / ml). Am nächsten Morgen wurden 1000 ml LB mit Ampicillin hinzugefügt. Unter Schütteln wurde die Suspension circa 1 h inkubiert, bis sie eine optische Dichte von 0,6 bis 0,8 erreichte (photometrische Kontrollen mit LB mit Ampicillin derselben Flasche als Leerwert). Anschließend wurde mit IPTG (Endkonzentration 100  $\mu$ M) induziert und weitere 3 h unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min bei 8000 g) wurde der Überstand verworfen und das Bakterien-Pellet in 18 ml PBS suspendiert.

#### 2.7.3.2 Bakterienaufschluss und Proteingewinnung

Zum Bakterienaufschluss wurde die Frier-Tau-Methode verwendet. Die resuspendierten Bakterien wurden mit 1 ml Lysozym (100 mg / ml), EGTA (Endkonzentration 1 mmol / l) und 20  $\mu$ l Aprotinin (2 mg / ml) versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2 ml 10 % TritonX-100 zugesetzt und die Suspension bei -20 °C gefroren. War die Suspension ganz gefroren, wurde sie bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Dieser Vorgang des Einfrierens und Auftauens wurde so oft wiederholt, bis die Suspension eine erhöhte Viskosität annahm (ca. 3 bis 4 Mal). Nach Zugabe von 0,2 ml PMSF (100 mmol / l) und 20  $\mu$ l DNaseI (10 mg / ml) wurde so lange bei Raumtemperatur inkubiert, bis die DNA abgebaut war und die Viskosität wieder stark abgenommen hatte. Von dieser Suspension wurden 10  $\mu$ l (mit 10  $\mu$ l Laemmli-Puffer) gesichert. Dann wurde die Suspension 20 min bei 20000g zentrifugiert, der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert. Von beiden Anteilen wurden Proben gesichert (10  $\mu$ l Überstand mit 10  $\mu$ l Laemmli-Puffer, 5  $\mu$ l gelöstes Pellet mit 15  $\mu$ l Laemmli-Puffer). Bei einer erfolgreichen Aufreinigung fand sich das GST-Fusionsprotein im



Überstand, der auch weiter verarbeitet wurde. Befand sich das GST-Fusionsprotein in den unlöslichen Zellbestandteilen, sprach das für die Bildung von Einschluss-Körperchen und das Protein konnte nur unter hohem Aufwand noch gewonnen werden.

### 2.7.3.3 Affinitätsreinigung

Zur Affinitätsreinigung des GST-Fusionsproteins wurde die Bindung von GST an sein Substrat Glutathion benutzt. Erst wurde das Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose in einer Chromatographie-Säule gebunden, alle anderen Proteine wurden in mehreren Wasch-Schritten entfernt. Anschließend wurde das GST-Fusionsprotein von der Säule eluiert, indem gelöstes, reduziertes Glutathion, das ebenfalls an GST bindet, im Überschuss auf die Säule gegeben wurde. Dadurch erhielt man aufgereinigtes GST-Fusionsprotein.

Zur Proteinlösung (entspricht dem Überstand aus der Proteingewinnung) wurde 1 ml Glutathion-Sepharose gegeben. Dazu wurden 0,5 ml Glutathion-Sepharose mit PBS gewaschen. Nach 2 min Zentrifugation bei 2000 g wurde der Überstand abpipettiert und nochmals mit PBS aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, im letzten Schritt wurde mit 0,5 ml PBS suspendiert. Die Proteinlösung mit der Glutathion-Sepharose wurde dann für 15 min auf einem Drehrad inkubiert. Der Überstand wurde abzentrifugiert (1 min bei 1000 g) und 10 µl aufbewahrt. Das Protein war nun an die Sepharose gebunden. Gab man die Sepharose in eine Säule und wusch sie mit PBS (mindestens 10 ml), konnte man das Protein mit reduziertem Glutathion (100 µl Glutathion 100 mmol / l mit 1900 µl Tris, pH 8,0) eluieren. Die ersten 200 µl wurden verworfen, dann wurde eine Fraktion von 1,4 ml eluiert, dann eine zweite mit 0,4 ml. Von jeder Fraktion wurden eine Probe mit 1 µl und eine Probe mit 3 µl in 10 µl Laemmli-Puffer gelöst.

#### 2.7.3.4 Proteinassoziation

Um eine Interaktion eines Proteins mit einem GST-Fusionsprotein nachzuweisen, wurde ein Proteinassoziations-Experiment durchgeführt. Dies ist noch kein Nachweis einer physiologischen Interaktion, ein positives Ergebnis gibt jedoch einen starken Hinweis auf eine Protein-Protein-Interaktion auch unter physiologischen Bedingungen.

Aufgereinigtes GST-Fusionsprotein wurde mit Glutathion-Sepharose und dem zu testenden Protein bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach zwei Wasch-Schritten mit PBS wurde die Suspension mit Laemmli-Puffer versetzt, eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und ein Western Blot durchgeführt. Die Suspension enthielt das GST-Fusionsprotein, sowie Proteine, die eine direkte Interaktion mit diesem GST-Fusionsprotein aufweisen. Wies man ein Protein im Western Blot spezifisch nach, sprach das für eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit dem GST-Fusionsprotein.

#### **2.7.4 Herstellung von polyklonalen Antikörpern**

Um Proteine spezifisch detektieren zu können, ist es unerlässlich, Antikörper gegen das gewünschte Protein herzustellen. Dazu stehen zwei Verfahren zur Verfügung, die Immunisierung von Tieren und Gewinnung der polyklonalen Antikörper aus deren Blut oder die Herstellung monoklonaler Antikörper. Dabei werden Antikörper produzierende B-Zellen immunisierter Mäuse mit Myelom-Zellen hybridisiert, und die Antikörper aus der Zellkultur gewonnen. In der vorliegenden Arbeit wurde die erstgenannte Methode angewandt.

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen wurden GST-Fusionsproteine in ausreichender Menge und Konzentration hergestellt und die Seren von einer externen Firma (Eurogentech) produziert.

## 2.7.5 Proteinanalyse

### 2.7.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist die verbreitetste Methode, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen (Laemmli et al., 1970).

Dazu wurden Gele durch Copolymerisation von Acrylamid und N,N-Methylenbisacrylamid hergestellt. Um die Reaktion zu starten, wurde noch Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator zugesetzt. Durch Variation der Konzentration und des Verhältnisses der beiden Monomere konnte der Vernetzungsgrad und somit die Porengröße des Gels beeinflusst werden. Die Proteinlösung wurde vor der Elektrophorese mit Laemmli-Puffer, der unter anderem SDS, ein anionisches Detergenz, sowie  $\beta$ -Mercaptoethanol enthält, gekocht. Dadurch bindet SDS in einem konstanten Massenverhältnis an die Proteine, die so denaturiert werden und deren Eigenladung maskiert wird, so dass die Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld ungefähr proportional zum Logarithmus der Molekülmasse ist.

Um die Proteinbanden zu fokussieren und die Trennleistung der Elektrophorese zu steigern, wurde dem eigentlichen Trennvorgang ein Sammelgel vorgeschaltet (6 %iges Gel mit pH 6,8).

Wie bei der Agarose-Gelelektrophorese von DNA konnte auch hier ein Marker mit Proteinen bekannter Größe mit aufgetrennt werden und ermöglichte eine Abschätzung der Masse der aufgetrennten Proteine.

Zur Charakterisierung von GST-Fusionsproteinen wurden 10 x 10 cm große, 10 %ige Acrylamidgele verwendet. Zur Proteinanalyse von Zellkulturexperimenten wurden 20 x 20 cm große, 8 %ige Gele verwendet.

Je Probestasche wurden 10 bis 50  $\mu$ l Proteinlösung aufgetragen, die entsprechend mit Laemmli-Puffer 3 min bei 99°C aufgeköcht worden waren. Die Elektrophorese wurde in Lauffpuffer bei 22 mA durchgeführt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

#### 2.7.5.2 Coomassie-Färbung von Protein-Gelen

Zur Färbung wurden die Gele in Coomassielösung gekocht (30 s) und anschließend für 2 h auf dem Schüttler inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel in Entfärbelösung gewaschen (2 h). Um die Gele aufbewahren zu können, wurden sie auf Filterpapier gelegt und auf einem Gelrockner getrocknet.

#### 2.7.5.3 Western Blot

Um die durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine immunologisch nachweisen zu können, wurden sie auf Nitrocellulosemembranen übertragen (Towbin et al., 1992). Der Transfer erfolgte mittels einer Semi-Dry-Blot-Apparatur in Transblot Puffer bei 0,8 mA / cm<sup>2</sup> für 3 h.

Um vor der Immundetektion die Proteinbanden sichtbar zu machen, den Größenmarker anzeichnen zu können und gegebenenfalls die gewünschten Anteile der Membran ausschneiden zu können, wurden die Nitrocellulosemembranen 1 min in Ponceau-S-Lösung inkubiert und mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, bis die Banden sichtbar wurden.

#### 2.7.5.4 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Da alle Proteine unspezifisch an die Nitrocellulose-Membran binden, mussten freie Bindungsstellen der Membran durch Proteine gesättigt werden, bevor der spezifische Antikörper dazugegeben wurde, da dieser sonst nicht nur an sein Antigen, sondern auch an der Membran gebunden hätte. Dazu wurde mit NET-G inkubiert, die Gelatine sättigte die Bindungsstellen ab, so dass der Antikörper nur noch an das spezifische Protein binden konnte. Auf die so vorbereitete Membran wurde der primäre Antikörper gegeben, der in NET-G gelöst war, und für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Neben Protein-spezifischen Antikörpern konnten auch phospho-Protein-spezifische Antikörper eingesetzt werden, die nur an die an einem bestimmten Aminosäurerest phosphorylierte Form

des Proteins band. Die Antikörper-Lösung konnte anschließend wieder verwendet werden. Durch Inkubation mit NET-Puffer (3 Mal jeweils 20 min) wurden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Danach wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären, für den F<sub>C</sub>-Teil des primären Antikörpers spezifischen Antikörper, inkubiert, der 1:10 000 in NET-Puffer verdünnt eingesetzt wurde. Darauf folgten wieder drei Waschschriffe mit NET-Puffer. Zur Entwicklung wurden die Membranen mit einer 1:1 Mischung aus ECL-Lösung A und ECL-Lösung B inkubiert. Dann wurden Filme für 30 sec, 5 min und 30 min belichtet und anschließend entwickelt.

## **2.7.6 Zellkultur-Techniken**

### 2.7.6.1 Passage von Zellen

Die Zellen wurden in entsprechendem Medium kultiviert. Für HEK 293 Zellen wurde DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) verwendet, für C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 4,5 g / ml Glukose, es wurden 10 % fötales Kälber-Serum zugesetzt. Das Medium wurde etwa zweimal pro Woche gewechselt. Die Zellen wurden passagiert, bevor die Kulturschalen konfluent bewachsen waren. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Schale wurde mit PBS gewaschen, dann wurden 1 ml bzw. 3 ml Trypsin/EDTA Lösung (für 10 cm, bzw. 25 cm-Zellkultur-Schale) draufgegeben, um die Zell-Zell-Verbindungen zu lösen. Nach 5 bis 10 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 10 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen suspendiert. Die Zellen wurden in 1:2 bis 1:10 Verdünnung erneut ausgesät und entsprechend Medium dazugegeben. Für Transfektionsexperimente, bei denen eine exakte Bestimmung der Zellzahl erforderlich war, wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt und nach entsprechender Verdünnung ausgesät.

#### 2.7.6.2 Transfektion von Zellen

Das Ziel der Transfektion ist es, DNA in eukaryote Zellen einzuschleusen und die kodierten Proteine zu exprimieren. Um eine Expression zu erreichen, wurden der pRK<sub>RS</sub>- sowie der pRK5-Vektor benutzt, bei denen das Insert unter dem Einfluss eines CMV-Promotors steht. Die DNA wurde mittels Copräzipitation von Plasmid-DNA mit Calciumphosphat durchgeführt (Chen und Okayama, 1987). Dabei wurde die DNA erst mit Calciumchlorid versetzt. Gab man dann phosphathaltigen Puffer dazu, fiel Calciumphosphat aus. Auch die phosphathaltige DNA wurde dabei mit präzipitiert. Gab man dieses Transfektionsgemisch auf Zellen in Transfektionsmedium, wurde die DNA über Endozytose-Mechanismen in die Zellen aufgenommen und lag zunächst als Transgenom vor, das 48 - 72 h nach der Transfektion transient exprimiert wurde. In manchen Zellen wurde die DNA auch in das Genom integriert, wodurch es zur stabilen Expression des Proteins kam, deren Ausprägung je nach Integrationsort variierte.

Am Vortag wurden die Zellen mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen / ml in Transfektionsmedium ausgesät (für HEK 293 1/3 DMEM-F12, 2/3 DMEM High Glucose, 10 % FCS; für C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> DMEM High Glucose, 10 % FCS). Für eine Vertiefung einer Sechs-Loch-Schale wurden 2 ml Zellsuspension verwendet, für 10 cm-Schalen 10 ml. Die Transfektion erfolgte 24 h später mit 200 µl Transfektionsgemisch für eine Vertiefung einer Sechs-Loch-Schale, bzw. 1 ml für eine 10 cm Schale, das vorher für 10 – 20 min inkubiert wurde, damit sich die Präzipitate bilden konnten.

Die Kulturen wurden über Nacht bei 3 % CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend wurde das Medium mit dem Transfektionsgemisch entfernt und nach einem Waschschrift wurden die Zellen in frischem Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für Experimente verwendet.

### 2.7.6.3 Stabil exprimierende Zelllinien

Zur Herstellung stabil exprimierender Zellklone wurde das gewünschte Plasmid mit dem Neomycinresistenzgen cotransfiziert. So wurde erreicht, dass mit Aminoglykosiden, die die eukaryotische Proteinbiosynthese hemmen, die transfizierten Klone bei Zusatz von 1 mg / ml Geneticin (G418)-Racemat (aktive Form: 0,5 mg / ml) selektioniert werden konnten. Diese wurden auf die Expression des gewünschten Proteins getestet und dann für weitere Experimente verwendet.

Die Zellen für die Transfektion wurden auf 10 cm-Schalen ausgesät, mit dem Plasmid und dem Neomycin-Resistenz-Vektor cotransfiziert und zwei Wochen mit G418 inkubiert (bei halbwochentlichem Medienwechsel). Je nach Dichte wurden die Zellen noch einmal trypsiniert und verdünnt ausgesät, oder die Klone wurden direkt geerntet. Dazu wurden die Klone einzeln mit einer 1000 µl-Pipette abgekratzt und in 24-Loch-Schalen (1 ml Medium pro Vertiefung) überführt. Waren diese Klone konfluent, wurden die Zellen mit wenigen Tropfen Trypsin gelöst und der Großteil in eine zweite 24-Loch-Platte überführt. Die Zellen der zweiten Platte wurden geerntet, sobald sie konfluent waren und mittels Western Blot und immunologischem Proteinnachweis auf die Expression des gewünschten Proteins getestet. Die positiven Klone mit der höchsten Expression wurden von der ersten 24-Loch-Platte, wo sie bis dahin weiter kultiviert worden waren, in 6-Loch-Schalen überführt. Baldmöglichst wurden Zellen dieses Klons eingefroren, die Zellen standen auch zur Durchführung von Experimenten zur Verfügung.

### 2.7.6.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren mussten die Zellen in ein spezielles Medium überführt werden, in dem möglichst wenige Eiskristalle entstehen.

Eine konfluent bewachsene 10 cm Schale wurde trypsiniert, die Zellsuspension wurde 2 min bei 1300 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen. Das Sediment wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in speziellen cryo-

Röhrchen über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Danach wurden die Zellen im Flüssigstickstofftank gelagert.

#### 2.7.6.5 Auftauen von Zellen

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde die Zellsuspension mit 9 ml Kulturmedium gemischt und ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um Zelldetritus und DMSO zu entfernen.

#### 2.7.6.6 Lyse von Zellen

HEK 293 Zellen sind nicht so stark adhärent und können deshalb im Medium resuspendiert werden. Nach Zentrifugation in Eppendorf-Gefäßen (1 min bei 5000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 200  $\mu\text{l}$  Lysepuffer resuspendiert.

Andere Zelllinien wurden in den Schalen lysiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit Lysepuffer versetzt (200  $\mu\text{l}$  pro Schale) und auf Eis inkubiert.

Die Lysate wurden 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13000 g zentrifugiert, die Proteine fanden sich im Überstand, der für nachfolgende Experimente verwendet wurde.

#### 2.7.6.7 Co-Immunopräzipitation

Um die Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen, kann man Proteinkomplexe in Zellen isolieren und deren einzelne Bestandteile spezifisch nachweisen. Dazu wurde ein Antikörper gegen ein Protein mit dem Zell-Lysat gemischt und zu Sepharose gegeben, die den Antikörper bindet. Alle Proteine, die mit dem Antikörper-gebundenen Protein interagieren, wurden indirekt an der Sepharose gebunden, alle übrigen Zellproteine wurden durch Waschschriffe entfernt. Führt man nun eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der an die



Sepharose gebundenen Proteine durch, konnte man mit spezifischen Antikörpern gegen einen vermutlichen Bindungspartner die Interaktion nachweisen.

Eine definierte Menge Zell-Lysat (meist 150 µl) wurde zusammen mit 2 µg gereinigtem Antikörper, bzw. 3 µl Antikörper-Serum, 20 µl Sepharose und 200 µl HNTG 2 h bei 4 °C auf einem rotierenden Rad inkubiert. Für Ansätze mit Kaninchen-Antiseren wurde Protein A-Sepharose 1:1 verwendet, für Ansätze mit monoklonalen Antikörpern (Maus) Protein G-Sepharose 1:1.

Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen, und es folgten drei Waschschriffe mit 500 µl HNTG. Die Sepharose wurde mit 25 µl Laemmli-Puffer versetzt und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

#### 2.7.6.8 Glykogensynthese-Bestimmung

Um die Glykogensynthese der C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen in Abhängigkeit von der Insulin-Stimulation zu bestimmen, wurden die Zellen in 6-Loch-Schalen kultiviert. Nachdem sie mit KRHB-Puffer (Krebs-Ringer-HEPES-BSA-Puffer) gewaschen wurden, wurde KRHB-Puffer mit Insulin in verschiedener Konzentration (Gesamtvolumen 380 µl) zugefügt und die Zellen wurden 1 h im Inkubator inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl <sup>14</sup>C-Glukose-Lösung (0,1 µCi / µl) wurden die Zellen wieder 1 h inkubiert, danach auf Eis gestellt und mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 500 µl KOH und Inkubation bei Raumtemperatur (für mindestens 30 min) wurde das Glykogen gelöst. Das Lysat wurde für 30 min gekocht um eine weitere Homogenisation des Präzipitats zu erreichen, auf Eis gestellt und mit 900 µl kaltem Ethanol versetzt um das Glykogen zu fällen. Nach 4,5 min Zentrifugation bei 10000 rpm wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 1 ml kaltem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl H<sub>2</sub>O gelöst, diese Lösung wurde in 5 ml Szintillationslösung aufgenommen, das Eppendorfgefäß wurde nochmals mit 500 µl H<sub>2</sub>O gewaschen und diese Lösung wurde ebenfalls zur Szintillationslösung

gegeben. Anschließend wurde die Radioaktivität in der Szintillationslösung bestimmt.

#### 2.7.6.9 In-vitro-Kinase-Aktivität

Die Kinase-Aktivität eines Proteins kann über den Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in ein Substrat des entsprechenden Enzyms gemessen werden.

Dazu wurden Zellen lysiert, ein Teil des Lysats wurde mit 10 µl Laemmli-Puffer versetzt und bei -20 °C aufbewahrt. Der Rest des Lysats wurde in zwei Immunpräzipitationen eingesetzt. Nachdem diese zwei Ansätze dreimal mit 500 µl HNTG gewaschen wurden, wurde in einem Ansatz die Menge des immunpräzipitierten Proteins bestimmt. Dazu wurden 25 µl Laemmli-Puffer dazugegeben. Dieser Ansatz wurde gekocht und auf ein Protein-Gel geladen.

Der zweite Ansatz wurde zweimal mit 500 µl speziellem Puffer (20 mM Tris pH 7.6, 5 mM β-Glycerophosphat, 2 mM DTT, 0,1 mM Natrium-Pervanadat, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM kaltes ATP) gewaschen, danach wurde das Substrat, ein für die zu testende Kinase spezifisches Polypeptid in einer Konzentration von 2 µg / Reaktion dazugegeben, der Ansatz wurde mit 50 µl speziellem Puffer versetzt. Nach Zugabe von 10 µCi [γ-p<sup>32</sup>]-ATP lief die Phosphorylierung des Substrates bei 30 °C für 15 min. Nach Zugabe von 10 µl Glutathion-Sepharose (mit HNTG gewaschen) wurde noch einmal 15 min bei 30 °C inkubiert. Nachdem der Ansatz dreimal mit 500 µl HNTG gewaschen wurde, wurde er mit 25 µl Laemmli-Puffer versetzt, gekocht und auf ein Protein-Gel geladen.

Nachdem die Proteine auf dem Gel aufgetrennt worden waren, wurde das Gel mit zwei Lagen Filterpapier getrocknet und in eine Expositionskammer gelegt, in der sich Verstärker-Folie, ein Film und das getrocknete Gel mit der Oberseite zum Film befanden. Die Autoradiographie wurde bei -80 °C durchgeführt. Die Intensität des Autoradiographie-Signals wurde auf die Proteinmenge im entsprechenden Ansatz bezogen.

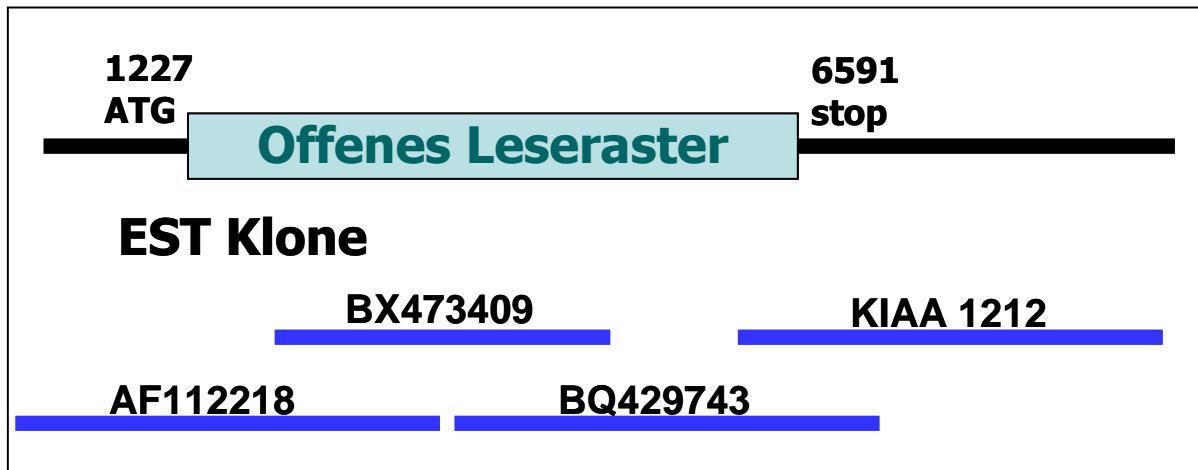
## **3 Ergebnisse**

### ***3.1 Datenbankanalysen***

Im Hefe-2-Hybrid-System mit Akt1 als Köder wurde wiederholt eine Sequenz gefunden, die keinem bekannten Protein zugeordnet werden konnte. Die Analyse dieser Sequenz in Datenbanken sollte eine Abschätzung ermöglichen, ob Experimente mit dem kodierten Protein Erfolg versprechend waren und Aufschluss über die mögliche Struktur und Funktion des Proteins geben konnten.

#### **3.1.1 Gesamte Sequenz des analysierten Proteins**

Die gefundene Sequenz wurde auf Homologien zu EST Klonen untersucht. Der längste dieser Klone mit einer identischen Sequenz war der Klon KIAA 1212. Dieser Klon musste dem 3'-Ende der cDNA entsprechen, da die sequenzierte DNA den Poly-A-Anteil der cDNA enthielt. Nun wurde der 5'-Anteil von KIAA 1212 erneut auf Homologien zu EST Klonen untersucht, indem der 5'-Anteil der Sequenz in Datenbanken auf Identität mit anderen EST-Klonen überprüft wurde. Als nächster Klon wurde der Klon mit der Zugangsnummer BQ429743 gefunden. Von diesem wurde wieder der 5'-Anteil in die Suchmaschine eingesetzt und eine Homologie zum Klon mit der Zugangsnummer BX473409 gefunden. Wurde das 5'-Ende dieses Klons in die Suchmaschine eingesetzt, ergab sich der Klon mit der Zugangsnummer AF112218. Zum 5'-Ende dieses Klons wurde keine homologe Sequenz gefunden.



**Abb. 3.1. EST-Klone zur Rekonstruktion der gesamten Sequenz von AIP.** Die Datenbankanalysen zur Ermittlung der gesamten Sequenz von AIP ergaben eine cDNA von 9697 bp, die aus den Sequenzen von vier EST-Klonen zusammengesetzt wurde.

Die Rekonstruktion der vollständigen Sequenz der cDNA ergab eine DNA von 9697 bp (siehe Abbildung 3.1). Es ergaben sich jedoch Hinweise auf alternative Spleiß-Varianten, da die Sequenzen einzelner Klone Homologien in verschiedenen Bereichen aufwiesen, die jedoch durch nicht-homologe Bereiche unterbrochen waren. Für die folgenden Experimente wurde die 9697 bp große Variante als Ausgangspunkt gewählt.

Um einen weiteren Hinweis darauf zu erhalten, dass die EST-Klone für einzelne Abschnitte eines Proteins kodieren und die überlappenden Sequenzbereiche nicht zufällig zustande kommen, wurde überprüft, welchen Abschnitten der genomischen DNA die gesamte Sequenz entspricht. Alle homologen Abschnitte auf der genomischen DNA lagen in einer kontinuierlichen Sequenz auf Chromosom 2, was die Korrektheit der Sequenz bestätigte.

Das offene Leseraster umfasst die Basenpaare 1227 bis 6591. Das entspricht einer Länge von 5364 Basenpaaren, dementsprechend 1788 Aminosäuren. Das voraussichtliche Molekulargewicht beträgt 206 kDa (Berechnung mit [http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/mwcalc\\_in.pl](http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/mwcalc_in.pl)).

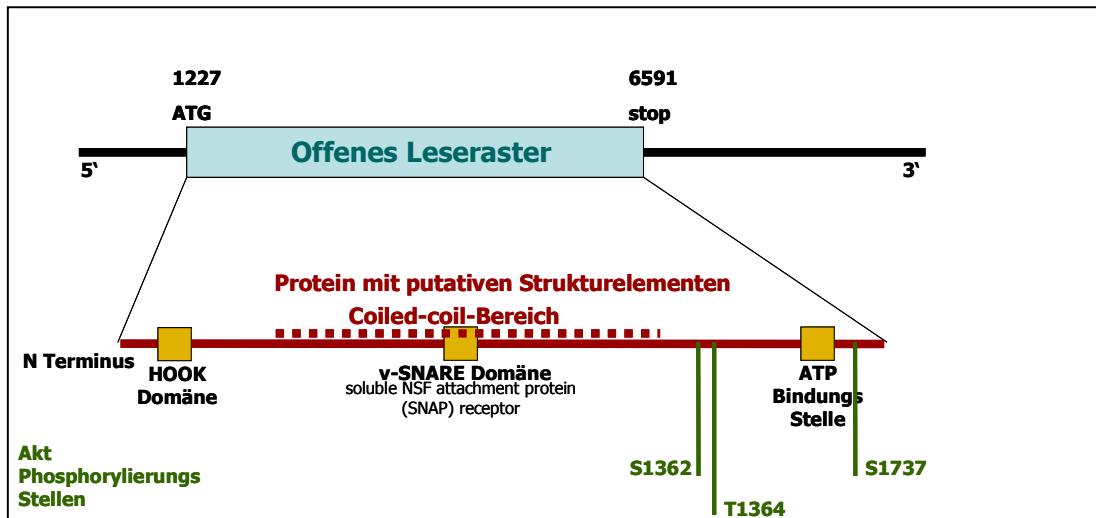
Neben dieser Spleiß-Variante, die bei anderen Autoren als die vorrangig embryonale Form des Proteins beschrieben war (Simpson et al., 2005), wurde

auch eine andere mit 1843 Aminosäuren gefunden, deren voraussichtliches Molekulargewicht 212 kDa beträgt und die die in adultem Gewebe vorherrschende Variante darstellt.

### 3.1.2 Protein-Domänen und Phosphorylierungs-Sequenzen

Um Homologien zu bekannten Protein-Domänen und Phosphorylierungs-Sequenzen abschätzen zu können, wurde die Aminosäure-Sequenz des neuen Proteins, das im weiteren als AIP (Akt interagierendes Protein) bezeichnet wird, mit Prosite (<http://www.expasy.org/prosite>) und Scansite (<http://scansite.mit.edu>) analysiert. Die Analyse mit Prosite ergab eine Homologie zu v-SNARE-Domänen für den Bereich der Aminosäuren 781 bis 848. Andere Proteine mit SNARE-Domänen sind meist am Transport von Vesikeln beteiligt. Auch Homologien zu einem ATP-GTP-bindenden Motiv im Bereich der Aminosäuren 1649 bis 1656 wurden festgestellt. Im aminoterminalen Teil (Aminosäuren 8 bis 682) wurde auch eine Homologie zur HOOK-Domäne angegeben, die eine Bindung des Proteins an Mikrotubuli wahrscheinlich macht. Darüber hinaus wurde die Bindung des Proteins AIP an Aktin-Filamente wahrscheinlich, da sich eine Homologie zu einer CH-Domäne (Calponin-Homologie-Domäne) ergab. Diese Domänen wurden jedoch nur mit mittlerer Sensitivität festgestellt. Im zentralen Bereich von AIP ist ein coiled-coil-Bereich zu finden, ein Motiv, das zum Beispiel als Leucin-Zipper der Dimer-Bildung und der DNA-Bindung dienen kann. Allein aufgrund der Homologien kann jedoch nur bedingt auf die tatsächliche Funktion des Proteins geschlossen werden. Des Weiteren konnten drei putative Akt-Phosphorylierungs-Stellen identifiziert werden (ein Serin-Rest an der Position 1362, ein Threonin-Rest an der Position 1364 und ein Serin-Rest an der Position 1737), die auch in der Analyse mit Scansite bestätigt wurden. Auf Scansite konnte auch ausgeschlossen werden, dass es sich bei AIP um ein Trans-Membran-Protein handelt, da keine ausgeprägt hydrophoben Abschnitte nachgewiesen wurden.

Insgesamt ergab sich folgendes Bild der cDNA (siehe Abbildung 3.2).



**Abb. 3.2. Voraussichtliche Struktur von AIP laut Datenbankrecherchen** Die Datenbankanalyse ergab eine cDNA von 9697 bp mit einem offenen Leseraster von 5346 bp (Basenpaare 1227 bis 6591). Die sich ergebende Aminosäure-Sequenz (1788 AS) enthält laut Prosite und Scansite drei putative Akt-Phosphorylierungs-Stellen, und es wurden Homologien zur v-SNARE-Domäne, einer ATP-Bindungs-Stelle und einer HOOK-Domäne, sowie ein coiled-coil-Bereich angegeben.

### 3.1.3 Verteilung in verschiedenen Gewebetypen

Um eine erste Abschätzung der Verteilung in verschiedenen Geweben vornehmen zu können, wurden die Gewebe, die als Ausgangsmaterial für die Isolierung von EST-Klonen, die Homologien zum EST-Klon mit der Zugangsnummer BX648138 aufweisen, aufgelistet und in ihrer Häufigkeit analysiert. Die Analyse wurde mithilfe der Webseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> durchgeführt. Die folgende Tabelle zeigt die Gewebe, die am häufigsten aufgeführt waren. Somit ergab sich ein weitgehend ubiquitäres Vorkommen von AIP mit einer Präferenz für Testis und B-Zellen.

<b>Gewebe</b>	<b>Anzahl der daraus isolierten Klone, die zu AIP homolog sind</b>
Testis	19
B-Zellen (Keimzentrum)	19
Gehirn (komplett)	10
Nerv	9
Leiomyosarkom (Uterus)	6
Embryonale Stammzellen	6
Plazenta	6
Skelettmuskel	5
Chondrosarkom	5

**Tab. 3.1. Abschätzung der Gewebeverteilung von AIP** Um die Gewebeverteilung von AIP abschätzen zu können, wurden die Gewebe aufgelistet, die als Ausgangsgewebe für die Herstellung von zu AIP homologen EST-Klonen angegeben waren. Die Tabelle enthält die am häufigsten genannten Gewebe. In der Häufigkeitsverteilung zeigt sich ein ubiquitäres Vorkommen mit einer Präferenz für Testis und B-Zellen.

### **3.2 Klonierung des vollständigen offenen Leserasters von AIP**

Um das Protein AIP in Zellkultur-Systemen untersuchen zu können, wurde ein Konstrukt des gesamten Leserasters der cDNA in einen Vektor kloniert, der zur Expression in Säugerzellen geeignet ist.

#### **3.2.1 Charakterisierung der EST-Klone**

Zur Klonierung des vollständigen offenen Leserasters wurden EST-Klone verwendet, die zusammen die gesamte Sequenz von AIP abdecken und so überlappen, dass sie zur Klonierung verwendet werden konnten. Dazu wurde die gesamte Sequenz von AIP zur Suche nach IMAGE-Klonen eingesetzt, da diese Klone bei der Firma Invitrogen bestellt werden können. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von Klonen für die Sequenz von AIP wurde nicht

die in den Datenbankanalysen untersuchte 1788 Aminosäuren lange Spleiß-Variante kloniert, sondern die Variante mit 1843 Aminosäuren, die auch vorrangig in adultem Gewebe exprimiert wird.

Der hier verwendete Name der EST-Klone ergab sich aus der Position des ersten Basenpaares des Klons in der Sequenz von AIP. Waren die Klone revers (die Sequenz ist nicht in 5'-3'-Richtung, sondern umgekehrt in den Vektor kloniert), wurde zusätzlich die Bezeichnung „rev“ angefügt. Die Klone wurden auf ihre Identität untersucht, da Verunreinigungen und Verwechslungen durch die Firma nicht ausgeschlossen werden konnten. Für den Klon AIP 476 (Zugangsnummer BC041160) wurde eine definierte Länge von 2253 bp angegeben, er umfasst die Sequenz AIP476 bis 2729. Um nachzuweisen, dass die gelieferten Bakterien die gewünschte Sequenz enthielten, wurde eine PCR mit den Primern AIP983fwd und AIP2536rev durchgeführt, das erwartete Fragment (Länge 1553 bp) konnte nachgewiesen werden. Durch Ausplattieren von Einzelklonen und anschließende Isolierung der Plasmid-DNA wurden DNA-Präparate hergestellt, das Konstrukt wurde durch einen Verdau mit EcoRI analysiert. Laut Datenbanken wurde ein ca. 600 bp langes Fragment erwartet, das in der Gelelektrophorese des Verdau auch nachgewiesen wurde.

Vom Klon AIP 1236 (Zugangsnummer BQ428196), war die Länge nicht bekannt, da nur sein 5'-Ende sequenziert worden war. Neben einer spezifischen PCR zum Nachweis des klonierten DNA-Abschnittes (Primer AIP2112fwd und AIP2536rev, Fragment mit einer Länge von 424 bp) wurde deshalb auch eine PCR mit Vektor-spezifischen Primern durchgeführt, um die Länge des klonierten Abschnittes zu bestimmen. Die PCR mit den Primern M13fwd und M13rev ergab ein ca. 2500 bp großes Fragment. Bei einem Restriktionsverdau der hergestellten Plasmid-DNA mit HincII wurden Fragmente von 726 bp und 634 bp erwartet (HincII-Schnittstellen in AIP liegen laut Datenbanken bei AIP1962 und AIP2596, dazu kommen Schnittstellen im Vektor). Diese Fragmente konnten in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Das dritte Fragment war jedoch statt der errechneten 1300 bp ca. 1700 bp lang, die Länge des gesamten Inserts konnte damit genauer



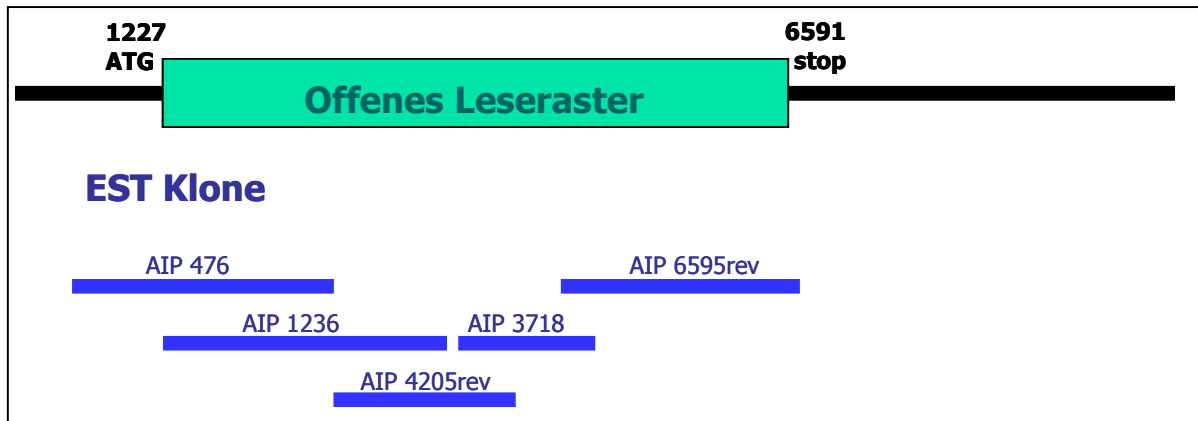
geschätzt werden und liegt bei ca. 2700 bp, der Klon umfasst also die AIP Sequenz von AIP1236 bis ca. AIP3900.

Der Klon AIP 4205rev (Zugangsnummer AA907246), wurde charakterisiert als reverser Klon mit einer Länge von 1472 bp. Die PCR zum Nachweis seiner Identität mit den Primern T7 (Vektor) und AIP3117rev ergab das erwartete Fragment von ca. 350 bp. Der Verdau der hergestellten Plasmid-DNA mit EcoRI sollte laut Datenbanken ein Fragment von ca. 950 bp ergeben (AIP3311 bis AIP4264). Dieses Fragment wurde in der Gelelektrophorese des Verdau nachgewiesen.

Zur Charakterisierung des Klons AIP 3718 (Zugangsnummer AA497122) mit der definierten Länge von 1004 bp wurde eine PCR mit den Primern AIP4389fwd und AIP4579rev durchgeführt, die ein Fragment mit einer Länge von 190 bp ergab. Beim Verdau der gereinigten Plasmid-DNA mit HindIII wurde laut Datenbank-Analysen ein Fragment von 666 bp (5'-Ende der cDNA mit Schnittstelle im Vektor bis AIP4377) erwartet, welches in der Gelelektrophorese des Verdau auch nachgewiesen werden konnte.

Für den Klon AIP 6595rev (Zugangsnummer A1653128), wurde eine Länge von 2238 bp angegeben, die cDNA ist revers im Vektor und umfasst die Sequenz von AIP4558 bis 6597. Die spezifische PCR mit den Primern AIP5875fwd und AIP6594rev ergab das erwartete Fragment von 719 bp. Laut Datenbank-Analysen wurden beim Verdau der gereinigten Plasmid-DNA mit HindIII und EcoRI zwei Fragmente von 750 bp und 1493 bp erwartet. Der Verdau der DNA ergab diese erwarteten Fragmente.

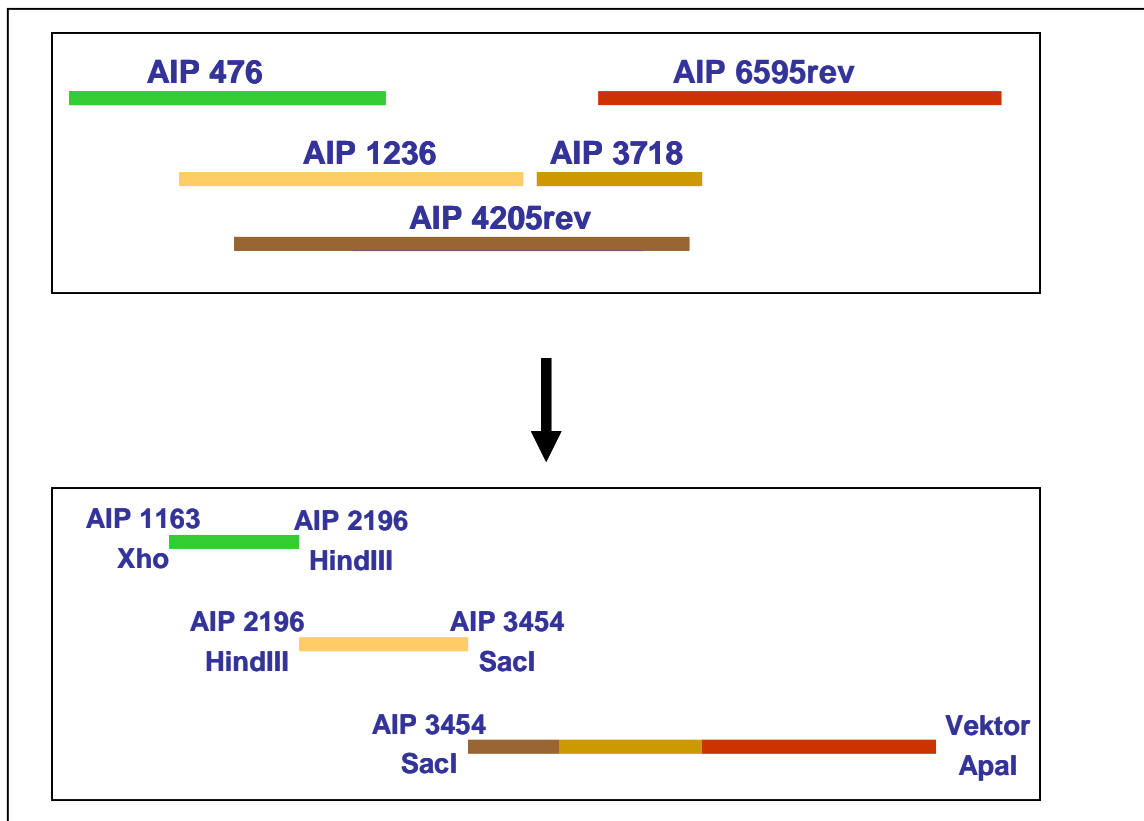
Die beschriebenen EST-Klone umfassen das gesamte Offene Leseraster und überlappen so, dass eine Klonierung des gesamten kodierenden Bereichs möglich ist.



**Abb. 3.3. EST-Klone zur Klonierung des vollständigen Leserasters von AIP.** Die aufgeführten EST-Klone (AIP 476, AIP 1236, AIP 4205rev, AIP 3718 und AIP 6595rev) umfassen die gesamte Sequenz des offenen Leserasters von AIP und überlappen so, dass sie zur Klonierung des gesamten kodierenden Bereichs verwendet werden konnten. Diese Klone wurden statt den in Abb. 3.1 gezeigten Klonen gewählt, da sie bei der Firma Invitrogen bestellt werden konnten.

### 3.2.2 Klonierungsstrategie

Die Strategie zur Klonierung bestand aus mehreren Schritten mit überlappenden PCRs und Verdaus, die in einer Vier-Faktor-Ligation mündeten, bei der die Teile dann zur vollständigen cDNA zusammengefügt wurden. Die Fragmente AIP 476 und AIP 1236 konnten nach vorbereitenden Schritten direkt mit Restriktions-Enzymen geschnitten werden, die die Ligation der Fragmente miteinander und mit dem Vektor ermöglichten. Das 3'-Ende der cDNA wurde über zwei überlappende PCRs aus den EST-Klonen AIP 4205rev, AIP 3718 und AIP 6595rev kloniert. Diese drei Fragmente wurden in einer Vier-Faktor-Ligation in den zur Expression in eukaryoten Zellen geeigneten Vektor pRK<sub>RS</sub> kloniert.



**Abb. 3.4. Klonierungs-Strategie.** Zur vollständigen Klonierung wurden aus den im oberen Diagramm angegebenen und farblich markierten EST-Klonen die unten dargestellten Fragmente zum Teil über mehrere Zwischenschritte mit den angegebenen Schnittstellen hergestellt. Die angegebenen Enden mit den entsprechenden Enzymen, mit denen die Konstrukte verdaut wurden, geben zu erkennen, dass die Fragmente in einer Vier-Faktor-Ligation mit dem XhoI und Apal geschnittenen Vektor pRK<sub>RS</sub> zu einem Konstrukt der vollständigen cDNA ligiert werden können.

### 3.2.3 Vorbereitung von pRK<sub>RS</sub>

Die gesamte Sequenz von AIP wurde in den Vektor pRK<sub>RS</sub> kloniert, da hier in den Polylinkern Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen vorhanden sind, die sich zur Klonierung eignen und die cDNA in diesem Vektor in eukaryoten Zellen exprimiert werden kann. Die Expression steht unter der Kontrolle eines CMV-Promoters. Zur Selektion positiver Klone in Bakterien-Kulturen wurde eine auf dem Vektor kodierte Ampicillin-Resistenz verwendet. Der Vektor wurde mit XhoI und Apal verdaut und dephosphoryliert.

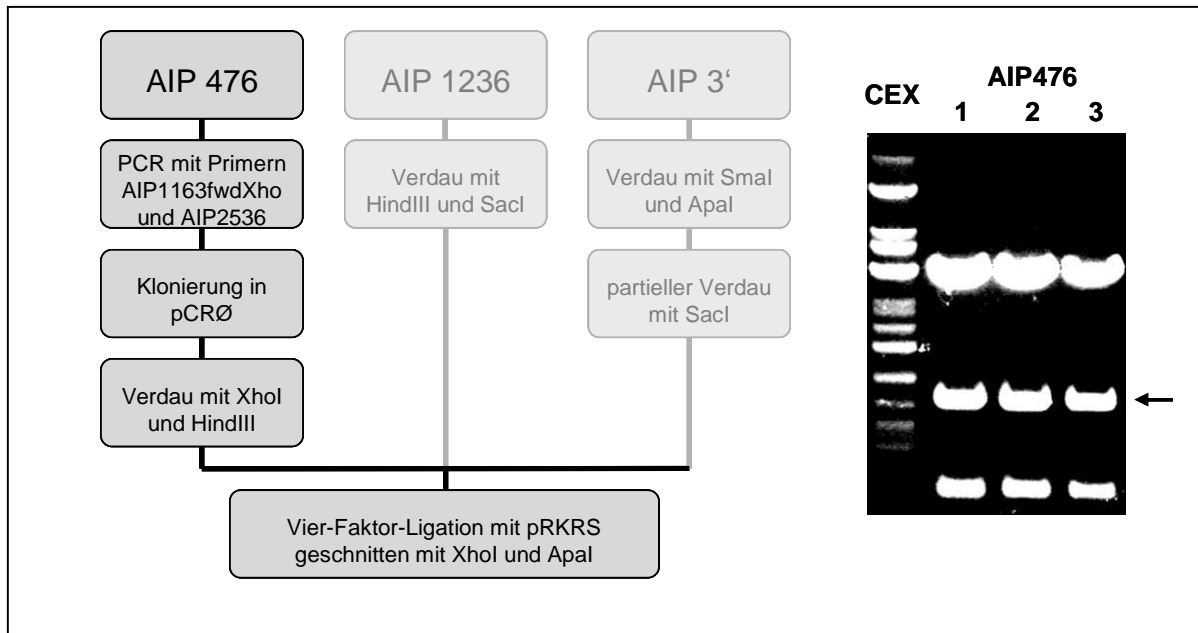
### 3.2.4 Vorbereitung von AIP 476

Zur Klonierung der gewünschten Sequenz von AIP mit Schnittstellen, die zur Klonierung in pRK<sub>RS</sub> geeignet ist, wurde ein spezieller Primer hergestellt. Dieser ist zur Sequenz AIP1163 bis AIP1183 komplementär (Beginn des offenen Leserasters) und enthält am 5'-Ende zusätzliche Basenpaare mit einer XhoI-Schnittstelle. Dieser Primer (AIP1163fwdXho) wurde in einer PCR mit dem EST-Klon AIP 476 eingesetzt. Der zweite Primer war AIP2536rev.

Das PCR-Produkt wurde in den Klonierungsvektor pCRØ kloniert, der eine Kanamycin-Resistenz zur Identifizierung transformierter Bakterien enthält. Ein Verdau mit EcoRI sollte nach den laut Datenbank vorhandenen Sequenzen zu zwei Fragmenten von ca. 500 bp und ca. 900 bp führen. Diese Fragmente wurden nachgewiesen und somit die Korrektheit des Konstruktes bestätigt.

Zur Klonierung des gesamten offenen Leserasters wurde das Fragment AIP1163 bis AIP 2196 mit einer XhoI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer HindIII-Schnittstelle am 3'-Ende benötigt. Laut Datenbanken sollte der Verdau mit XhoI und HindIII zusätzlich zu diesem Fragment noch zu einem 340 bp-Fragment führen. Wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist, konnten diese Fragmente in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

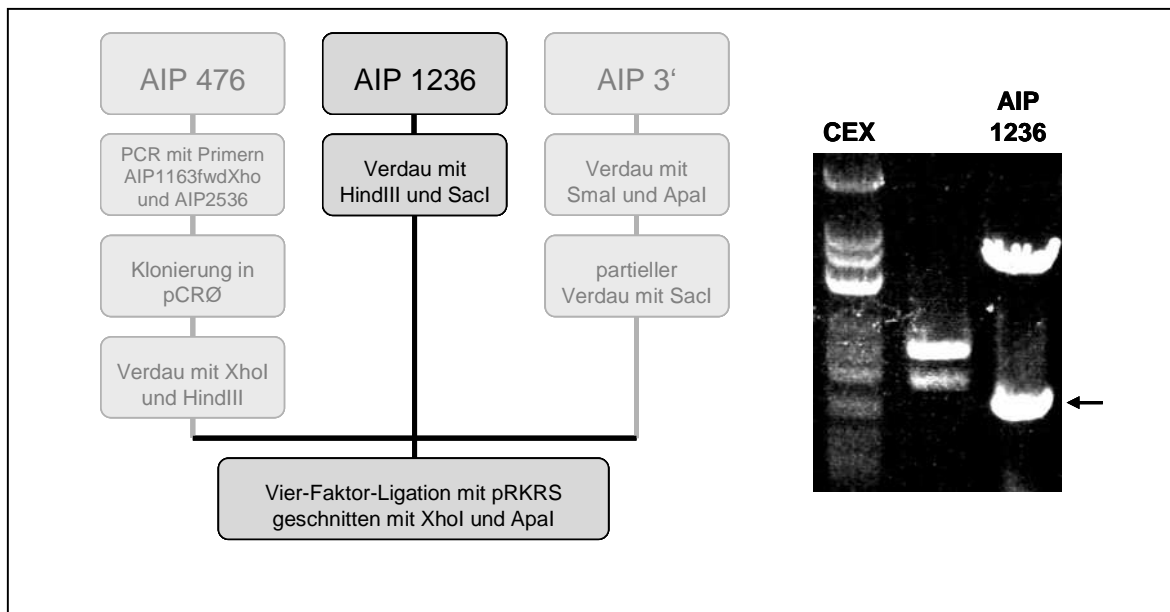
Das 1033 bp große Fragment AIP1163 bis AIP2196 wurde aus dem Gel isoliert und aufgereinigt, um dann in die Vier-Faktor-Ligation eingesetzt werden zu können, mit der das gesamte offene Leseraster von AIP in den Vektor pRK<sub>RS</sub> kloniert wurde.



**Abb. 3.5. Vorbereitung des Fragments AIP 476.** Der EST-Klon AIP 476 wurde als Ausgangsmaterial für eine PCR mit den Primern AIP1163fwdXho und AIP2536rev verwendet. Das erhaltene Fragment wurde in pCRØ kloniert und anschließend mit XhoI und HindIII verdaut. Die abgebildete Gelelektrophorese dieses Verdauens von DNA, die aus Bakterien isoliert worden war, zeigte die erwarteten Fragmente von 340 bp und 1033 bp. Das 1033 bp-Fragment (←) wurde isoliert und für die Vier-Faktor-Ligation eingesetzt.

### 3.2.5 Vorbereitung von AIP 1236

Das anschließende Fragment AIP2196 bis AIP3454 konnte direkt aus dem vorhandenen EST-Klon AIP 1236 ausgeschnitten werden. Laut Datenbanken wurden neben diesem 1258 bp großen Fragment noch ein 991bp-Fragment und ein ca. 480 bp großes Fragment erwartet. Wie in Abbildung 3.6 zu sehen, wurde das 1258 bp große Fragment bei der Gelelektrophorese nachgewiesen und anschließend isoliert und aufgereinigt. Die beiden anderen Fragmente waren aufgrund mangelnder Färbung des Gels nicht zu erkennen.



**Abb. 3.6. Vorbereitung des Fragments AIP 1236.** Der EST-Klon AIP 1236 wurde mit HindIII und SacI verdaut. Die abgebildete Gelelektrophorese dieses Verdaus von DNA aus transformierten Bakterien zeigt das aus den Datenbanken erwartete Fragment von 1258 bp (←), die Fragmente von 991bp und 480 bp sind aufgrund mangelnder Färbung des Gels nicht erkennbar. Das 1258 bp-Fragment wurde isoliert und für die Vier-Faktor-Ligation eingesetzt.

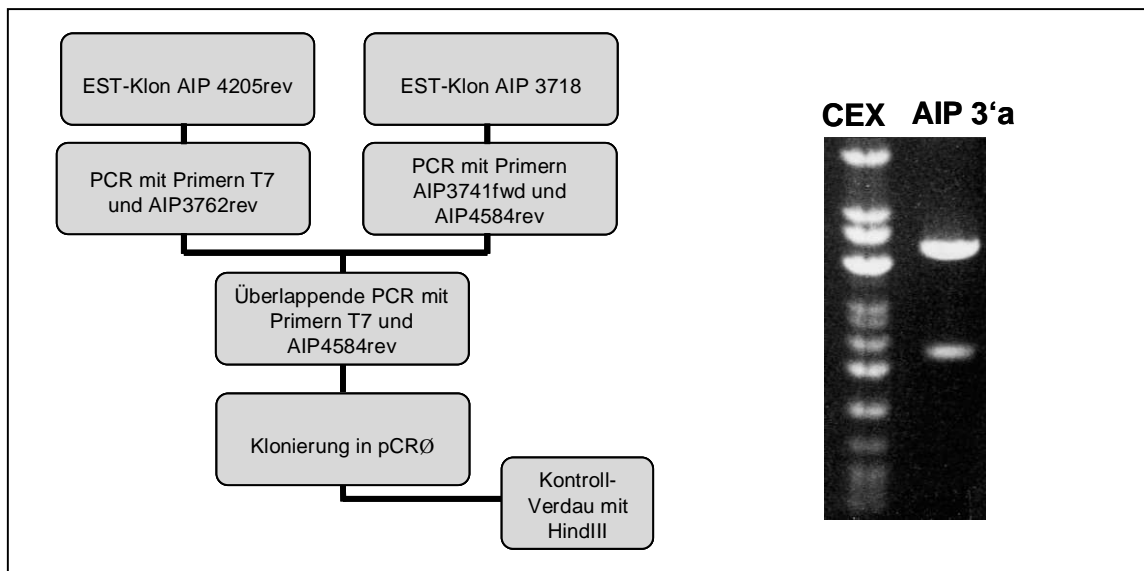
### 3.2.6 Klonierung von AIP 3' (3'-Ende der cDNA)

Zur Klonierung des 3'-Endes der cDNA von AIP waren mehrere Zwischenschritte nötig. In den Datenbanken wurden für kein Restriktionsenzym Schnittstellen angegeben, mit denen die Klonierung des 3'-Endes der cDNA aus den EST-Klonen AIP 4205rev, AIP 3718 und AIP 6595rev über Verdau und Ligation möglich gewesen wäre. Deshalb wurde erst die Methode der überlappenden PCR eingesetzt. Die Produkte dieser PCRs wurden dann über Restriktion und Ligation miteinander verknüpft, um das gesamte 3'-Ende der cDNA zu erhalten, das zur Klonierung des vollständigen offenen Leserasters eingesetzt werden konnte.

#### 3.2.6.1 Klonierung von AIP 3'a

Um die EST-Klone AIP 4205rev und AIP 3718 durch überlappende PCR verknüpfen zu können, wurden PCRs durchgeführt, deren Produkte um ca. 20 bp

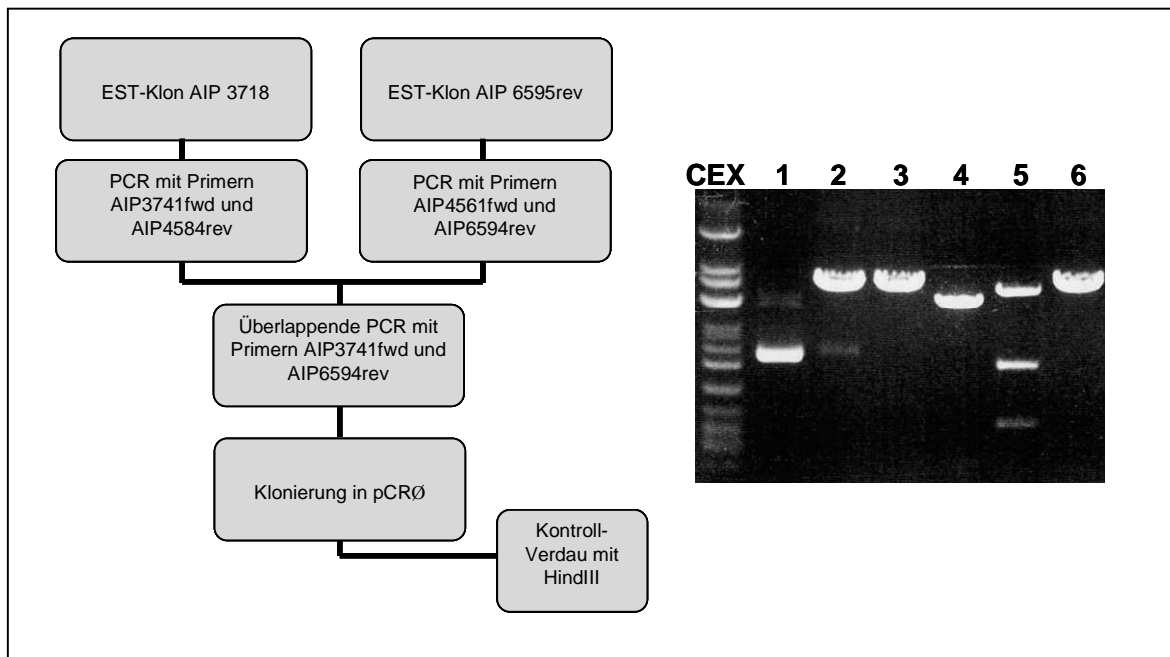
überlappen (für den EST-Klon AIP 4205rev mit den Primern T7 und AIP3762rev, für den EST-Klon AIP 3718 mit den Primern AIP3741fwd und AIP4584rev). Diese Produkte wurden in die überlappende PCR eingesetzt, die mit den Primern T7 und AIP4584rev durchgeführt wurde. Das Produkt umfasst die Basenpaare 2792 bis 4584 der Sequenz von AIP (ca. 1800 bp). Nach Klonierung in den Vektor pCRØ wurde ein Verdau mit HindIII durchgeführt. Laut Datenbanken wurde ein ca. 1700 bp langes Fragment erwartet, das in der Gelelektrophorese auch nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.7).



**Abb. 3.7. Klonierung von AIP3'a.** Nach vorbereitenden PCRs auf den EST-Klonen AIP 4205rev und AIP 3718 wurde eine überlappende PCR mit den Primern T7 und AIP4584rev durchgeführt und das Produkt in pCRØ kloniert. Aufgrund der Datenbank-Analysen wurde bei dem Verdau mit HindIII ein Fragment von ca. 1700 bp erwartet, welches in der abgebildeten Gelelektrophorese des Verdau von DNA aus transformierten Bakterien nachgewiesen werden konnte.

### 3.2.6.2 Klonierung von AIP 3'b

Ähnlich wie zur Klonierung von AIP 3'a wurden auch zur Klonierung des Fragments AIP 3'b erst vorbereitende PCRs und dann eine überlappende PCR durchgeführt. Die PCRs, deren Produkte in die überlappende PCR eingesetzt werden konnten, wurden mit dem EST-Klon AIP 3718 mit den Primern AIP3741fwd und AIP4584rev und mit dem EST-Klon AIP 6595rev mit den Primern AIP4561fwd und AIP6594rev durchgeführt. Die Produkte dieser PCRs wurden für die überlappende PCR eingesetzt. Mit den Primern AIP3741fwd und AIP6594rev erhielt man ein ca. 2900 bp großes Fragment, das in pCRØ kloniert wurde. Aus den Datenbanken wurden bei einem Verdau mit HindIII ein 716 bp großes Fragment und ein 1674 bp großes Fragment erwartet. Diese Fragmente konnten für das klonierte Produkt nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.8).



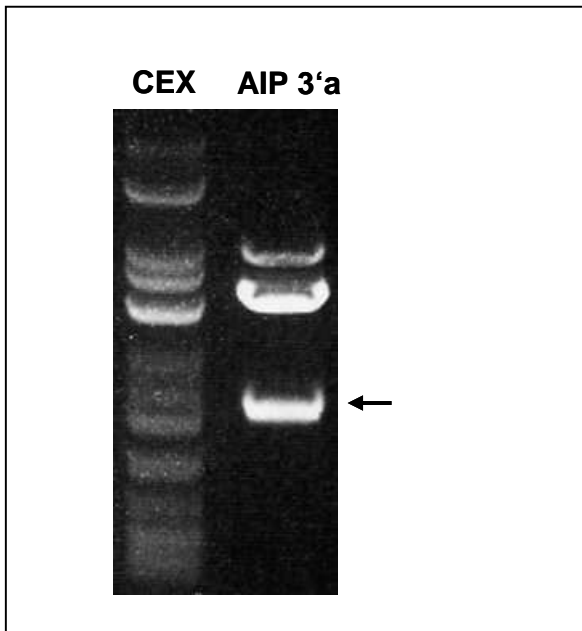
**Abb. 3.8. Klonierung von AIP 3'b.** Nach vorbereitenden PCRs auf den EST-Klonen AIP 4205rev und AIP 3718 wurde eine überlappende PCR mit den Primern AIP3741fwd und AIP6594rev durchgeführt und das Produkt in pCRØ kloniert. Die abgebildete Gelelektrophorese des Verdau von DNA aus transformierten Bakterien mit HindIII zeigt bei 5 die aus den Datenbanken erwarteten Fragmente von 716 bp und 1674 bp.



### 3.2.6.3 Klonierung von AIP 3'

Um das komplette 3'-Ende der cDNA von AIP zu klonieren, wurden die Fragmente AIP 3'a und AIP 3'b durch Verdau und Drei-Faktor-Ligation mit pCRØ miteinander verknüpft.

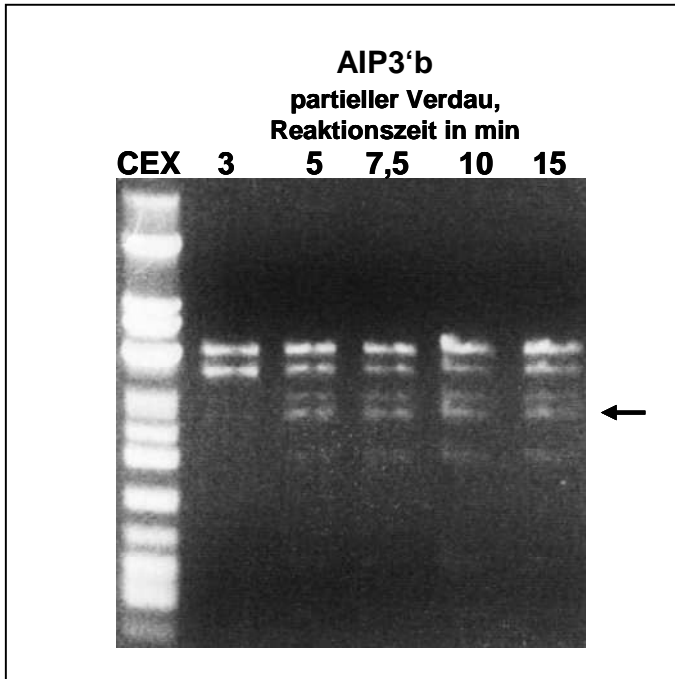
Dazu wurde der Vektor pCRØ mit BamHI und EcoRI verdaut und dephosphoryliert. Das Konstrukt AIP 3'a wurde mit BamHI und HindIII verdaut. Die BamHI-Schnittstelle liegt im Vektor (am 5'-Ende der cDNA), die HindIII-Schnittstelle beim Basenpaar 4377 der Sequenz von AIP. Das erhaltene, ca. 1700 bp umfassende Fragment wurde isoliert und aufgereinigt.



**Abb. 3.9. Gelelektrophorese des Fragments AIP 3'a.** Das Konstrukt pCRØ AIP 3'a wurde mit BamHI und HindIII verdaut. Die Gelelektrophorese dieses Verdaus von DNA aus transformierten Bakterien zeigt das erwartete Fragment von 1700 bp (←). Dieses Fragment wurde isoliert und für die Drei-Faktor-Ligation eingesetzt.

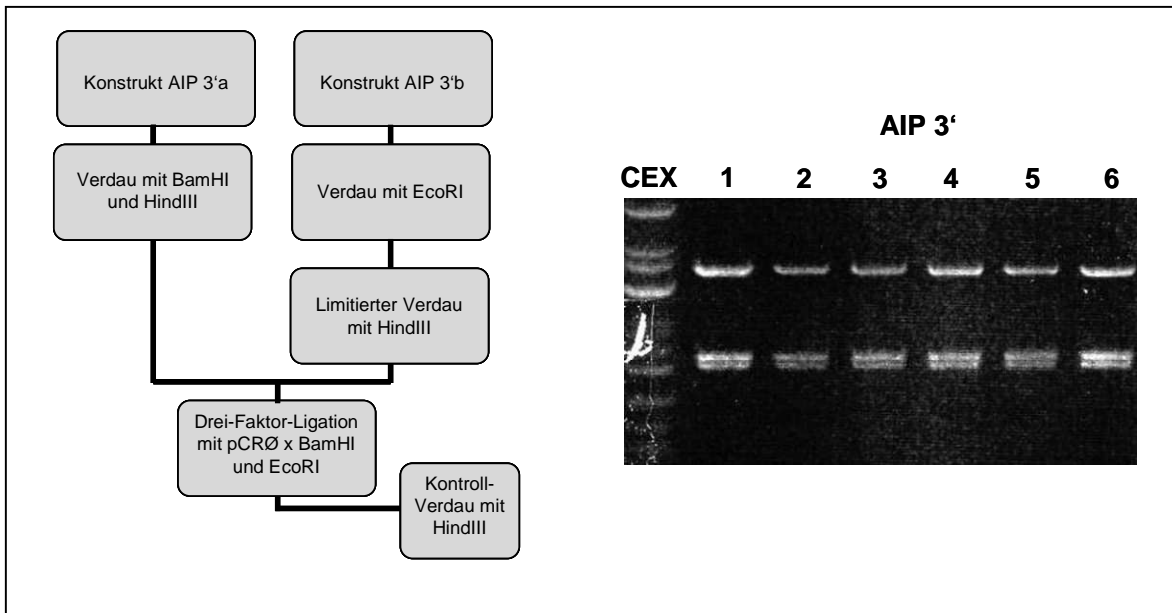
Das Konstrukt AIP 3'b wurde mit EcoRI verdaut. Zwischen der HindIII-Schnittstelle AIP4377, die zur Klonierung verwendet wurde, und der EcoRI-Schnittstelle liegt noch eine zweite HindIII-Schnittstelle (Basenpaar 6051 der Sequenz von AIP). Um

das 2221 bp große Fragment (Basenpaare 4377 bis 6594 von AIP) zu erhalten, wurde ein limitierter Verdau mit HindIII durchgeführt.



**Abb. 3.10. Gelelektrophorese des Fragments AIP 3'b.** Das Konstrukt pCRØ AIP 3'b wurde mit EcoRI und partiell mit HindIII verdaut. Die Gelelektrophorese dieses Verdaus von DNA aus transformierten Bakterien zeigt das erwartete Fragment von 2200 bp (←) in steigender Konzentration in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer. Dieses Fragment wurde isoliert und für die Drei-Faktor-Ligation eingesetzt.

Die Fragmente AIP 3'a und AIP 3'b wurden mit dem vorbereiteten Vektor pCRØ in einer Drei-Faktor-Ligation eingesetzt. Das erhaltene Konstrukt wurde mit HindIII verdaut, um die korrekte Klonierung zu bestätigen. Laut Datenbanken wurden ein 1575 bp großes Fragment und ein 1674 bp großes Fragment erwartet, diese konnten in der Gelelektrophorese des Verdaus nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.11).

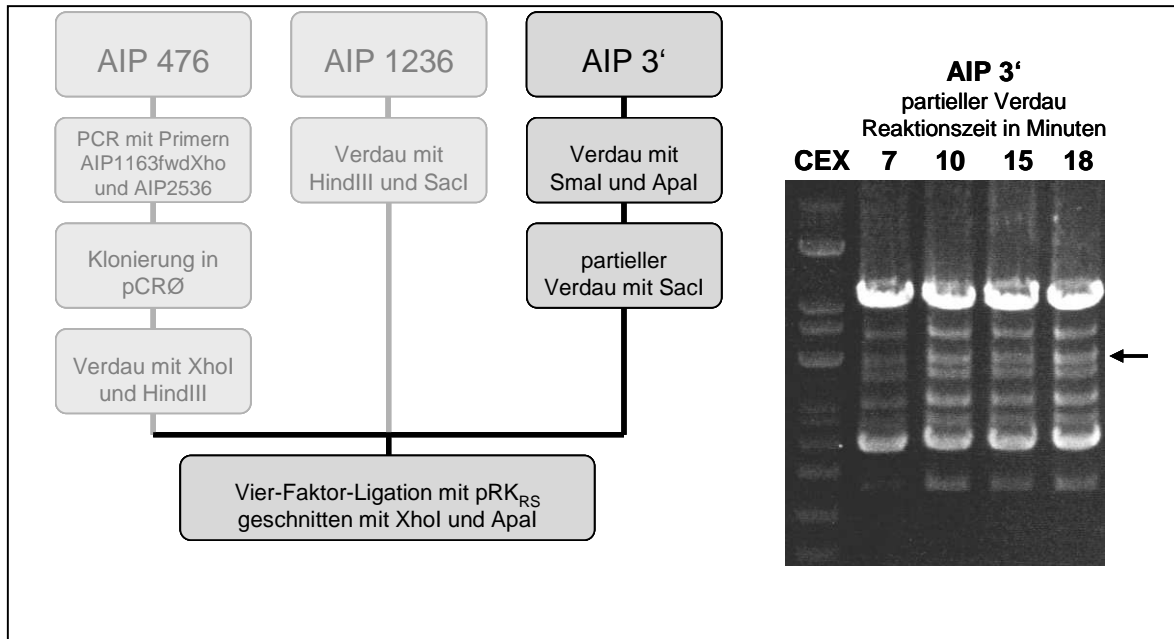


**Abb. 3.11. Klonierung von AIP3'.** Nachdem die Fragmente AIP 3'a und AIP 3'b mit BamHI und HindIII, beziehungsweise EcoRI und HindIII (limitierter Verdau) verdaut worden waren, wurden die Fragmente mit dem vorbereiteten Vektor pCRØ in einer Drei-Faktor-Ligation eingesetzt. Bei dem Verdau mit HindIII wurden Fragmente von 1575bp und 1674 bp erwartet, die in der Gelelektrophorese des Verdau von DNA aus transformierten Bakterien auch nachgewiesen werden konnten.

#### 3.2.6.4 Vorbereitung von AIP 3'

Um das Fragment AIP3454 bis AIP6594 mit den benötigten SacI- und ApaI-Schnittstellen (ApaI-Schnittstelle im Vektor am 3'-Ende der cDNA) zu erhalten, wurde das Konstrukt AIP 3' mit ApaI verdaut. Da es eine zusätzliche SacI-Schnittstelle in dem benötigten Bereich gibt, wurde ein limitierter Verdau mit SacI durchgeführt. Neben dem ca. 3200 bp langen Fragment, das zur Klonierung von AIP verwendet wurde, wurde aufgrund der Datenbank-Informationen noch ein weiteres ca. 3200 bp großes Fragment des Vektors erwartet. Um das für die Klonierung des Offenen Leserasters benötigte Fragment ohne Verunreinigungen isolieren zu können, wurde noch ein Verdau mit SmaI durchgeführt, der das Vektor-Fragment in zwei kürzere Fragmente spaltete. Wie in Abbildung 3.12 gezeigt, konnte das ca. 3200 bp große Fragment, das die Basenpaare 3454 bis

6594 der cDNA von AIP enthält, in der Gelelektrophorese der verdauten DNA dargestellt werden und wurde isoliert und aufgereinigt.

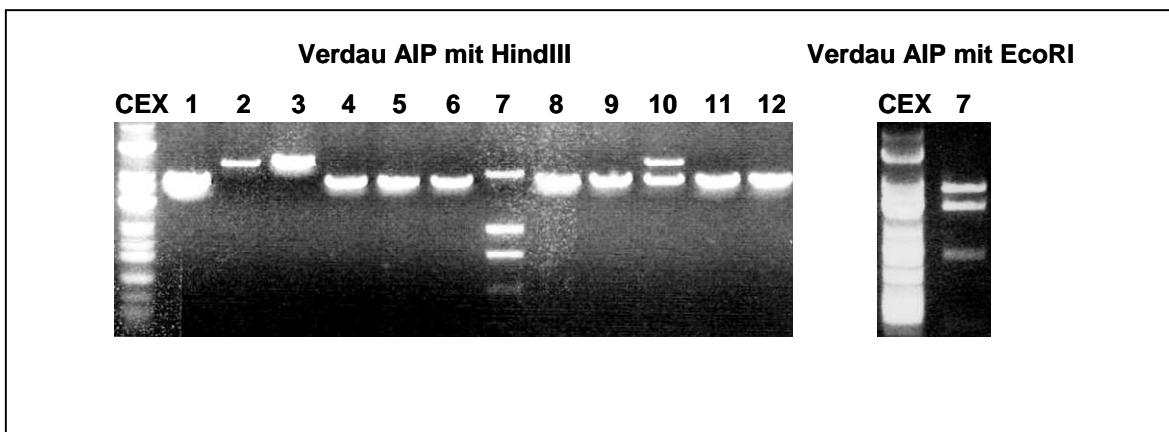


**Abb. 3.12. Vorbereitung von AIP 3'.** Nach dem Verdau des Konstrukts AIP 3' mit ApaI und SmaI wurde ein limitierter Verdau mit SacI durchgeführt. Die abgebildete Gelelektrophorese des Verdau von DNA aus transformierten Bakterien zeigt die aus den Datenbanken erwarteten Fragmente. Das ca. 3200 bp große Fragment (←) wurde isoliert und aufgereinigt.

### 3.2.7 Klonierung der gesamten cDNA von AIP

Der vorbereitete Vektor (siehe 3.2.3) und die drei vorbereiteten Fragmente AIP 476 (siehe 3.2.4), AIP 1236 (siehe 3.2.5) und AIP 3' (siehe 3.2.6) wurden in einer Vier-Faktor-Ligation eingesetzt. Da die Transformation der Ligation in *E. coli* sehr viele Kolonien ergab, wurde nicht jeder einzelne Klon mittels Restriktionsverdau getestet, sondern je zwölf Klone wurden zusammen mit einer für das Konstrukt spezifischen PCR getestet. Dazu wurden die Primer AIP2498fwd und AIP3762rev verwendet. Innerhalb dieses Bereiches liegt die Ligationsstelle zwischen den Fragmenten AIP 1236 und AIP 3'. Somit ergab sich nur bei den Klonen ein positives Ergebnis, die DNA enthielten, bei der diese Ligation stattgefunden hatte.

Zeigte sich in einem Ansatz ein positives PCR-Ergebnis, wurde die DNA aller zwölf Klone einzeln mittels Restriktionsverdau getestet. Bei dem Verdau mit HindIII wurden aufgrund der Informationen aus den Datenbanken ein ca. 1100 bp großes Fragment, ein ca. 1700 bp großes Fragment und ein ca. 2200 bp großes Fragment erwartet. Wie in Abbildung 3.13 zu sehen, konnten diese Fragmente in der Gelelektrophorese des Verdau 7 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ein Verdau mit EcoRI durchgeführt. Laut Datenbanken wurden hier drei Fragmente der Längen 530 bp, 1650 bp und 3000 bp erwartet, welche ebenso in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 3.13. Gelelektrophorese des Verdau von AIP.** Das Konstrukt pRK<sub>RS</sub>-AIP wurde mit HindIII verdaut. Die Gelelektrophorese dieses Verdau von DNA aus transformierten Bakterien zeigte im Ansatz 7 die Fragmente von 1100 bp, 1700 bp und 2200 bp. Auch der rechts dargestellte Verdau mit EcoRI des Konstrukts 7 bestätigt die Korrektheit der Klonierung. Das 530 bp große Fragment ist aufgrund mangelnder Färbung des Gels nicht zu erkennen.

### 3.3 Sequenzierung des Konstruktes AIP

Um die Sequenz des Konstruktes pRK<sub>RS</sub>-AIP zu überprüfen und Punktmutationen auszuschließen, wurde die gesamte Sequenz des offenen Leserasters sequenziert. Dazu wurden mehrere Sequenzierungsreaktionen mit verschiedenen Primern durchgeführt, bis das gesamte offene Leseraster abgedeckt war (siehe Tabelle 3.2).

<b>Primer</b>	<b>cDNA-Abschnitt</b>
AIP1156fwd	1203 - 1926
AIP2536rev	1815 - 2484
AIP2112fwd	2165 - 3030
AIP2464fwd	2525 - 3405
AIP3449rev	2881 - 3318
AIP3762rev	3033 - 3703
AIP3489fwd	3534 - 4223
AIP4553rev	3758 - 4504
AIP3741fwd	3811 - 4564
AIP4707rev	3983 - 4636
AIP4389fwd	4442 - 5354
AIP4684fwd	4736 - 5726
AIP5454rev	5048 - 5255
AIP5875fwd	5929 - 6590
pRKrev	5951 - 6590

**Tab. 3.2. Sequenzierung des gesamten offenen Leserasters von AIP.** Durch Sequenzierungsreaktionen mit verschiedenen Primern wurde die gesamte Sequenz des offenen Leserasters von AIP abgedeckt. Das sequenzierte Konstrukt entspricht der Spleiß-Variante mit 1843 Aminosäuren.

Das sequenzierte Konstrukt entspricht der 1843 Aminosäuren langen Spleißvariante des Proteins AIP und somit der in höherer Konzentration in adultem Gewebe auftretenden Form.

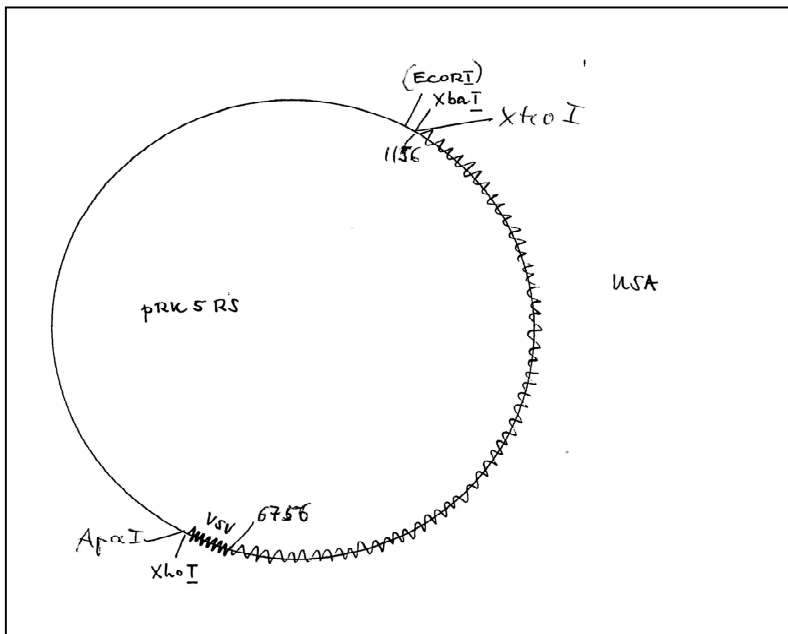
### **3.4 Klonierung eines VSV-Konstruktes**

Da spezifische Antikörper gegen AIP erst hergestellt und getestet werden mussten, wurde neben dem Konstrukt, das das vollständige offene Leseraster von AIP umfasst, noch ein anderes Konstrukt kloniert (AIP-VSV), das am 3'-Ende zusätzlich eine VSV-Sequenz enthält. Die VSV-Sequenz kodiert für 11

Aminosäuren (Y-T-D-I-E-M-N-R-L-G-K) des Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G, die von dem monoklonalen Antikörper P5D4 erkannt werden. Sie kann theoretisch die Bindungseigenschaften des Proteins AIP modifizieren, hat jedoch den Vorteil, dass mit dem Antikörper der Nachweis des Proteins sicher möglich ist. Nach einer PCR mit dem Konstrukt pRK<sub>RS</sub>-AIP mit den Primern AIP4684fwd und AIPVSVrev wurde das ca. 2000 Basenpaare umfassende PCR-Produkt mit XhoI und NcoI verdaut.

pRK<sub>RS</sub>-AIP wurde mit XbaI, NcoI und PvuI verdaut, um das 4300 bp große Fragment, das die Basenpaare 1163 bis 5470 der Sequenz von AIP umfasst, zu erhalten. XbaI und NcoI dienten als Klonierungs-Stellen, PvuI wurde nur eingesetzt, da sonst noch ein weiteres, ähnlich großes Fragment aus dem Vektor entstanden wäre, das so in zwei kleinere Fragmente gespalten werden konnte.

Die zwei vorbereiteten Fragmente wurden in den mit XbaI und XhoI geschnittenen Vektor pRK5 ligiert. Zur Identifikation von Bakterienklonen mit korrekt kloniertem Konstrukt wurde ein Verdau mit EcoRI durchgeführt, wobei neben dem Vektor ein 1700 bp großes Fragment und ein 600 bp großes Fragment erwartet wurden. Diese konnten in der Gelelektrophorese des Verdau nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten).



**Abb 3.14. Karte des Konstrukts AIP-VSV.** Mit dem Konstrukt pRK<sub>RS</sub>-AIP wurde eine PCR mit einem Primer durchgeführt, der zusätzlich eine VSV-Sequenz enthält. Das PCR-Produkt wurde mit XhoI und NcoI verdaut. Zusammen mit dem mit XbaI und NcoI geschnittenen Fragment von pRK<sub>RS</sub>-AIP und dem mit XhoI und XbaI verdauten Vektor pRK5 wurde das Fragment in einer Drei-Faktor-Ligation eingesetzt. Bei dem Verdau des gesamten Konstrukts pRK5-AIP-VSV mit EcoRI wurden ein 1700 bp großes Fragment und ein 600 bp großes Fragment nachgewiesen (nicht gezeigte Daten).

### 3.5 Klonierung von pGEX-Konstrukten

Um erste Experimente mit dem Protein AIP machen zu können und spezifische Antikörper gegen das Protein herzustellen, wurden pGEX-Konstrukte mit Teilen von AIP kloniert. Die pGEX-Vektoren enthalten einen P<sub>tac</sub>-Promotor, der unter dem Einfluss eines lac-Repressors steht. Darauf folgt der Glutathion-bindende Abschnitt von GST (Glutathion-S-Transferase), daran anschließend wird die gewünschte Sequenz im gleichen Leseraster kloniert. Nach Induktion mit IPTG, das den lac-Repressor hemmt, unter dessen Einfluss die Expression steht, wird das Protein exprimiert. Die Aufreinigung des Fusionsproteins wird durch die Bindung des GST-Teils an Glutathion ermöglicht. Durch Säulenchromatographie mit an Sepharose gebundenem Glutathion wird das Fusionsprotein selektiv gebunden, mit gelöstem

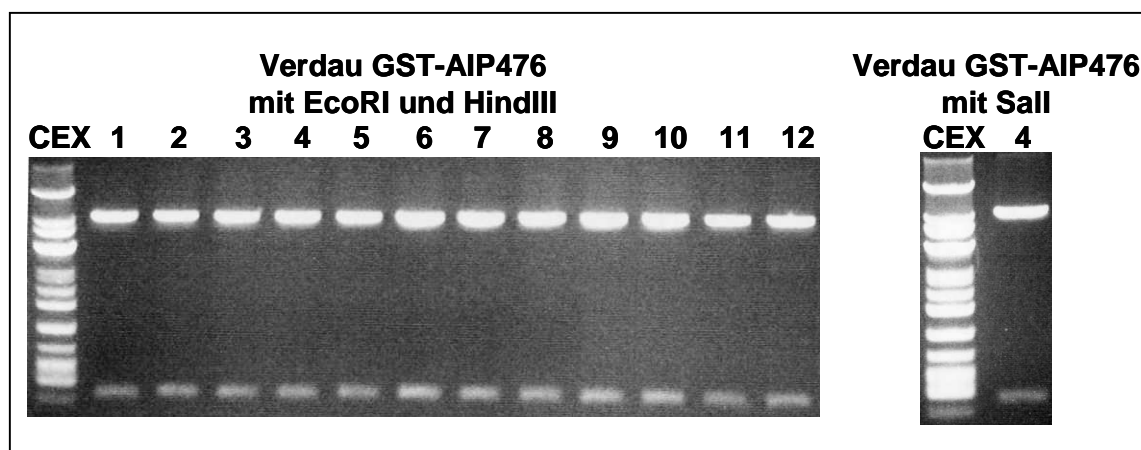


Glutathion kann das Protein eluiert werden. Da bei großen Konstrukten die Gefahr besteht, dass das Protein aufgrund von Protein-Degradation und Ausfällung in den Bakterien nur in geringen Mengen isoliert werden kann, wurden ein Konstrukt mit dem 5'-Ende der cDNA von AIP und ein Konstrukt mit dem 3'-Ende der cDNA kloniert.

### 3.5.1 GST-AIP 476

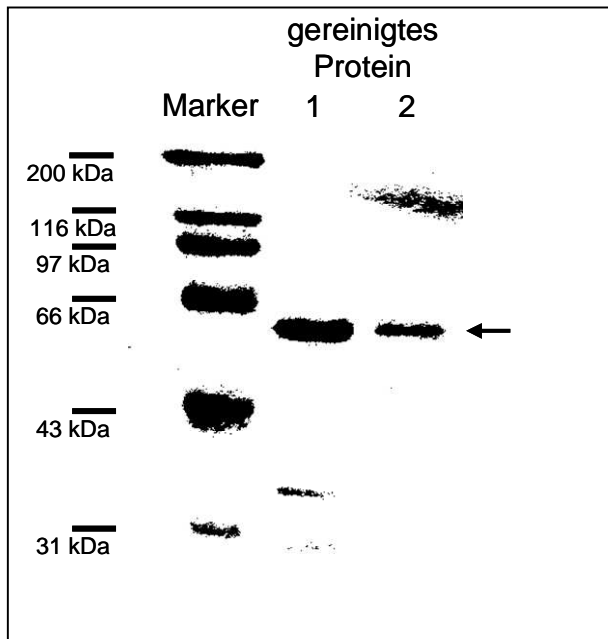
Das 5'-Ende der cDNA wurde durch Restriktions-Verdau aus dem EST-Klon AIP 476 kloniert. Dazu wurde AIP 476 mit EcoRI und EcoRV verdaut, das entstandene Fragment (das die Basenpaare AIP1657 bis AIP2533 umfasst) wurde in den mit EcoRI und SmaI verdauten Vektor pGEX5X2 kloniert. Da EcoRV und SmaI die DNA ohne überhängende Enden schneiden, war diese Ligation möglich. Der Vektor pGEX5X2 wurde verwendet, da hier durch die Klonierung das Leseraster nicht unterbrochen wurde und das Fusionsprotein exprimiert werden konnte.

Bei dem Verdau des neuen Konstrukts mit EcoRI und HindIII wurde laut Datenbanken ein Fragment von 539 bp erwartet, das in der Gelelektrophorese auch nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.15). Ebenso wurde bei dem Verdau mit Sall das laut Datenbanken erwartete Fragment von 576 bp nachgewiesen.



**Abb. 3.15. Verdau des Konstruktes pGEX5X2-AIP476 mit EcoRI und HindIII sowie mit Sall.** Die erwarteten Fragmente in den Verdaus von pGEX5X2-AIP476 mit EcoRI und HindIII (539 bp), sowie mit Sall (576 bp) wurden in der Gelelektrophorese der Restriktionsanalysen nachgewiesen.

Das Konstrukt wurde in *E. coli* (Stamm BL21) transformiert und das Fusionsprotein wurde laut Protokoll exprimiert und isoliert. Das gesamte Protein von ca. 60 kDa (entsprechend GST und 292 Aminosäuren von AIP) konnte isoliert werden, jedoch traten auch degradierte Proteinfragmente auf.



**Abb 3.16. Proteingel zur Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung des Fusionsproteins GST-AIP 476.** Durch Klonierung des Fragments AIP1657 bis AIP2533 in den Vektor pGEX5X2 und Expression in *E. coli* wurde das Fusionsprotein GST-AIP 476 hergestellt. Nach der Aufreinigung zeigte das mit Coomassie gefärbte Gel das Protein ( $\leftarrow$ ), allerdings in einer geringen Konzentration von  $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ . Von 1,4 ml beziehungsweise 0,4 ml Eluat wurden jeweils  $10 \mu\text{l}$  aufgetragen.

Aus dem Gel ist ersichtlich, dass das Protein nur in geringer Menge isoliert werden konnte. Das Aliquot des Eluats, das weiter verwendet wurde (1,4 ml) enthielt 1,4 mg Protein. Im Vergleich dazu kann aus der gleichen Menge Bakterienkultur bis zu 10 mg reines GST gewonnen werden. Das Gel, auf dem auch die Kontrollen aufgetragen waren (nicht gezeigte Daten), zeigte, dass das Protein hauptsächlich in der Fraktion 3 zu sehen war, einem Aliquot des Zell-Detritus nach der Lyse der Zellen. Das Protein war also nicht vollständig löslich, sondern zum Teil präzipitiert unter Bildung so genannter Einschlusskörperchen.

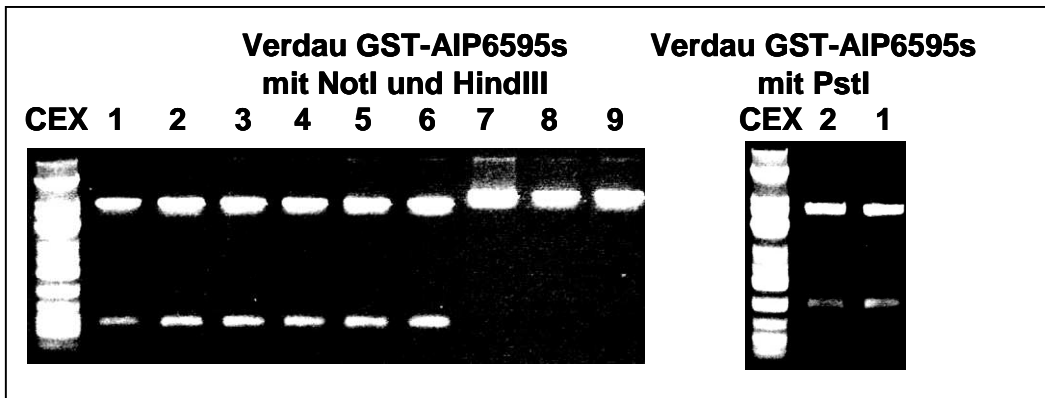
Da die Konzentration des Proteins nur ca. 1 µg / µl betrug (zum Vergleich wurden in nicht gezeigten Daten Standardmengen an BSA aufgetragen, anhand derer die Konzentration des Proteins geschätzt werden konnte), wurden 3 l Bakterienkultur verarbeitet, um eine ausreichende Menge (>2 mg) Protein für die Antikörper-Herstellung durch Immunisierung von Kaninchen zu erhalten.

### **3.5.2 GST-AIP6595s**

Um einen zweiten AIP-spezifischen Antikörper herstellen und erste Experimente durchführen zu können, die die Interaktion von AIP und Akt belegen, wurde auch ein pGEX-Konstrukt des carboxyterminalen Endes von AIP kloniert. Das Konstrukt wurde aus dem EST-Klon AIP 6595rev kloniert. Das 1642 bp große Fragment wurde durch Verdau des EST-Klons mit MfeI (dieses Ende wurde aufgefüllt) und NotI hergestellt und anschließend in pGEX5X2 kloniert. Die Menge an Fusionsprotein, die isoliert werden konnte, reichte jedoch nicht zur Antikörperproduktion oder zur weiteren Analyse des Proteins aus.

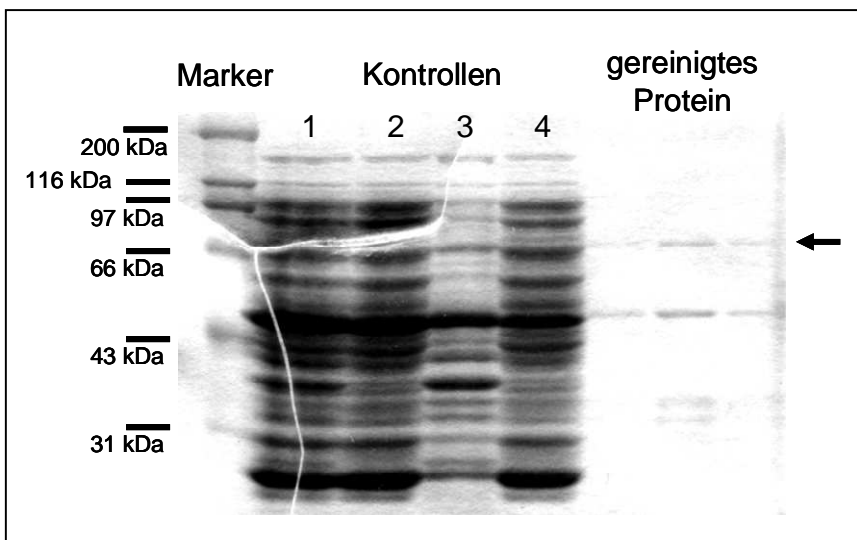
Da kürzere Fusionsproteine meist besser aus den Bakterien isoliert werden können, wurde ein zweites, etwas kleineres GST-Fusionsprotein hergestellt, das den carboxyterminalen Teil von AIP umfasst.

Zur Klonierung wurde der Vektor pGEX5X3 verwendet und mit NotI und SmaI verdaut. Der EST-Klon AIP 6595rev wurde mit AatII und NotI verdaut (entspricht den Basenpaaren 5165 bis 6595 der cDNA von AIP). Da AatII DNA so schneidet, dass überhängende Enden bleiben, wurde erst dieser Verdau durchgeführt, die überhängenden Enden wurden aufgefüllt, und anschließend wurde die DNA mit NotI verdaut. So konnte dieses Fragment in den vorbereiteten Vektor kloniert werden. Bei Verdau dieses Konstrukts mit HindIII und NotI, sowie mit PstI wurden Fragmente von ca. 600 bp beziehungsweise ca. 1100 bp erwartet, die in der Gelelektrophorese dieser Verdau auch nachgewiesen werden konnten.



**Abb 3.17. Verdau des Konstruktes pGEX5X3-AIP6595s mit HindIII und NotI sowie mit PstI.** Die spezifischen Fragmente in den Verdaus von pGEX5X3-AIP6595s mit HindIII und NotI (ca. 600 bp), sowie mit PstI (ca. 1100 bp) wurden in der Gelelektrophorese der Restriktionsanalysen nachgewiesen.

Das Konstrukt pGEX5X3-AIP6595s wurde in *E. coli* transformiert und exprimiert, anschließend wurde das Fusionsprotein aufgereinigt. Es hat eine Größe von 475 Aminosäuren zusätzlich zum GST, das entspricht einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa.



**Abb. 3.18. Protein-Gel des Fusionsproteins GST-AIP 6595s.** Durch Klonierung des Fragments AIP5165 bis AIP6595 in den Vektor pGEX5X3 und Expression in *E. coli* wurde das Fusionsprotein GST-AIP 6595s hergestellt. Nach der Aufreinigung zeigte das mit Coomassie gefärbte Gel das Protein (←) und verschieden große Degradierungs-Produkte auch in den Fraktionen mit dem gereinigten Protein. Diese Banden konnten auch in den anderen Fraktionen identifiziert werden.

Aus dem Gel ist ersichtlich, dass das Fusionsprotein nur zum Teil isoliert werden konnte. Die Kontroll-Fraktion mit der größten Menge an Fusionsprotein war die Fraktion 4 der Kontrollen, ein Aliquot der Proteinlösung, die nach der Inkubation mit der Glutathion-Sepharose verworfen wurde. Das Fusionsprotein hatte demnach nicht vollständig an das Glutathion gebunden. Eventuell wird diese Bindung durch den AIP-Teil des Fusionsproteins behindert.

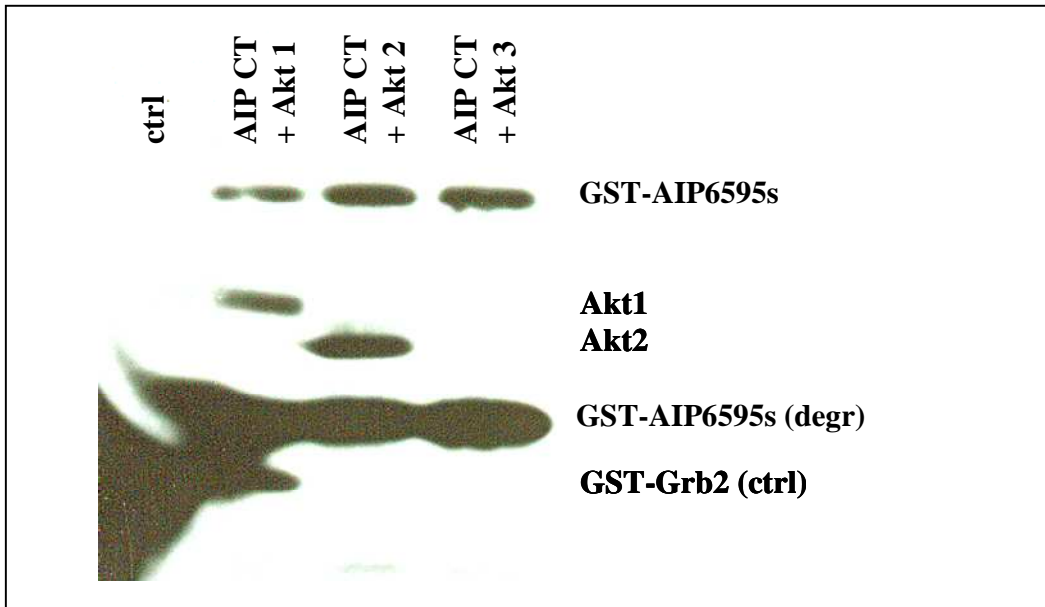
Auf Grund der geringen Konzentration des Fusionsproteins (ca. 0,5 µg / µl) wurden hier 4 l Bakterienkultur verarbeitet, um eine ausreichende Menge des Fusionsproteins für die Antikörper-Herstellung durch Immunisierung von Kaninchen und weitere Experimente herzustellen.

### **3.6 Protein-Assoziation zwischen GST-AIP 6595s und Akt**

Das Fusionsprotein GST-AIP 6595s enthält den Teil des Proteins AIP, der im Hefe-2-Hybrid-System an Akt gebunden hatte. Der Nachweis eines Protein-Protein-Komplexes von Akt mit GST-AIP 6595s wäre demnach ein weiterer Hinweis auf die tatsächliche physiologische Assoziation der Proteine.

Zum Nachweis der Interaktion wurde das Fusionsprotein GST-AIP 6595s mit Glutathion-Sepharose und in drei verschiedenen Ansätzen mit Lysaten aus Akt1, Akt2 oder Akt3 transient überexprimierenden Zellen inkubiert. Als Kontrolle wurde Akt1 mit einem anderen GST-Fusionsprotein inkubiert. Ein negatives Ergebnis in diesem Ansatz schließt eine unspezifische Bindung von Akt aus. Die nicht an die Sepharose gebundenen Proteine wurden abgewaschen und im nächsten Schritt die gebundenen Proteine eluiert. Eine Interaktion mit den Akt-Isoformen ist nachgewiesen, wenn im Eluat neben dem Fusionsprotein auch Akt nachgewiesen werden kann. Dazu wurde das Eluat mit Laemmli-Puffer gekocht, auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Die Proteine wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen ein GST-Fusionsprotein mit Akt detektiert, dadurch konnten Akt und auch das GST-Fusionsprotein GST-

AIP6595s nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.19). Die Expression von Akt in den transfizierten Zellen wurde ebenfalls nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).



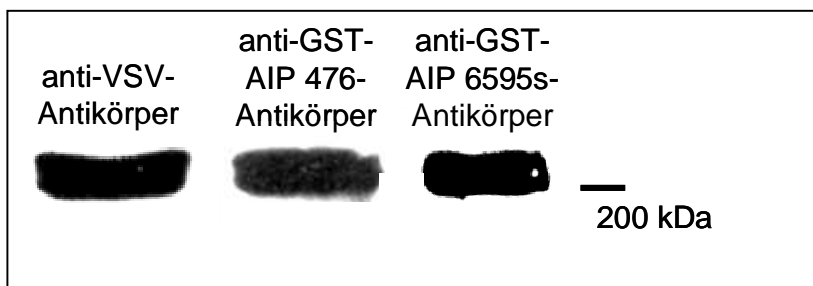
**Abb 3.19. Protein-Assoziation zwischen Akt und GST-AIP 6595s.** Das Fusionsprotein GST-AIP 6595s wurde mit den drei Akt-Isoformen inkubiert. Das Eluat wurde in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für den Western Blot wurden polyklonale Antikörper gegen ein GST-Fusionsprotein mit Akt verwendet, dadurch konnten beide Proteine nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde Akt mit einem anderen GST-Fusionsprotein (GST-Grb2) inkubiert, um eine unspezifische Bindung auszuschließen.

Das Experiment zeigte eine spezifische Interaktion des Fusionsproteins GST-AIP6595s mit Akt1 und Akt2. Eine Interaktion mit Akt3 wurde nicht nachgewiesen. Der Nachweis der Interaktion in diesem Experiment lieferte einen starken Hinweis auf eine physiologische Interaktion der Proteine Akt und AIP. Da das Bindungsverhalten des Fusionsproteins jedoch durch den GST-Anteil modifiziert werden kann und auch der Einfluss des nicht exprimierten aminoterminalen Teils von AIP nicht berücksichtigt wurde, musste die Interaktion noch durch weitere Experimente gezeigt werden.

### 3.7 Transiente Expression des AIP-VSV-Konstrukts

Die transiente Expression des Konstruktes AIP-VSV in HEK-293 (humane embryonale Nierenfibroblasten) diente der Bestätigung des Konstrukts und der ersten Abschätzung der Expression.

Das Konstrukt wurde nach dem Standardprotokoll in die Zellen transfiziert. Nachdem die Präzipitate aus Calcium, Phosphat und DNA in das Medium gegeben worden waren, wurden die Zellen eine Nacht inkubiert, anschließend wurde das Medium gewechselt. Nach einem weiteren Tag wurden die Zellen geerntet. Das Lysat der Zellen wurde mit Laemmli-Puffer gekocht, auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. In drei Western Blots mit unterschiedlichen Antikörpern wurde die Expression des Konstrukts mit VSV-Antikörpern nachgewiesen, sowie die Antikörper, die durch Immunisierung von Kaninchen mit den GST-Fusionsproteinen GST-AIP 476 und GST-AIP 6595s gewonnen wurden, getestet. Der Western Blot mit dem VSV-Antikörper zeigte eine deutliche Bande in der erwarteten Höhe von 200 kDa und bestätigte damit die Expression des Konstrukts pRK5-AIP-VSV. Die Western Blots mit den Antikörpern gegen GST-AIP 476 und GST-AIP 6595s zeigen ebenfalls die Expression des Konstrukts pRK5-AIP-VSV, sowie die Nachweisbarkeit des Proteins mit den gewonnen Antikörpern.



**Abb 3.20. Transiente Expression des Konstrukts pRK5-AIP-VSV in HEK-293-Zellen.** Lysate von AIP-VSV transient exprimierenden HEK-293-Zellen wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Mit einem anti-VSV-Antikörper wurde die Expression des Konstrukts nachgewiesen, die Western Blots mit dem anti-GST-AIP 476-Antikörper und dem anti-GST-AIP 6595s-Antikörper bestätigten die Expression des Konstrukts und zeigten, dass das Protein mit den genannten Antikörpern nachgewiesen werden kann.

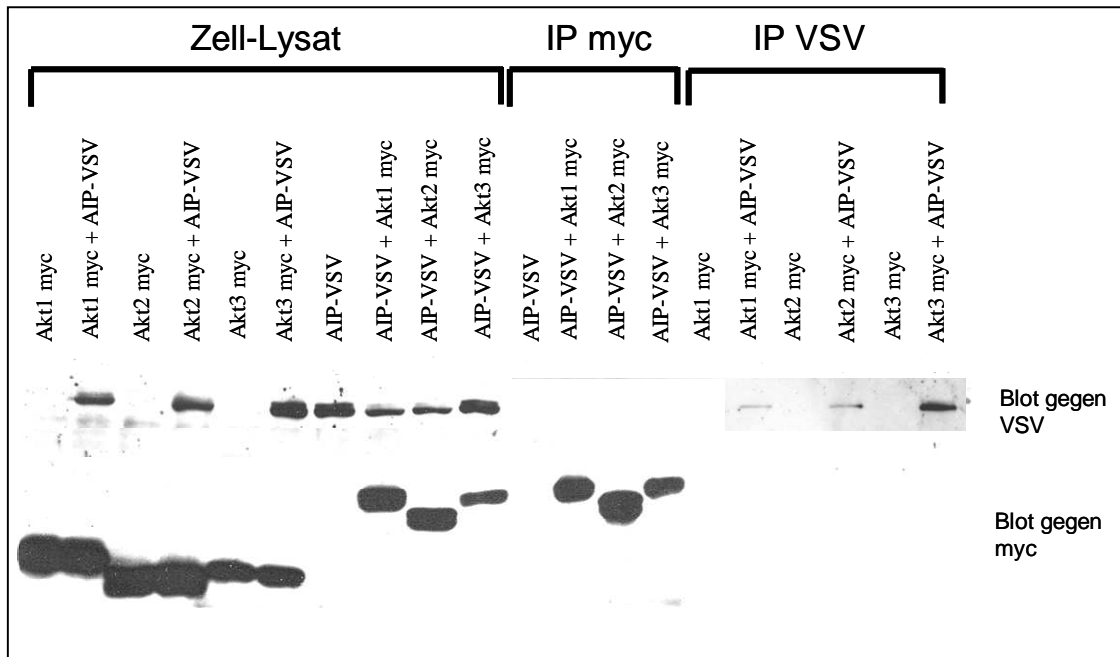
### **3.8 Co-Immunopräzipitation von Akt und AIP**

Nachdem der Nachweis der Interaktion des Fusionsproteins GST-AIP 6595s mit Akt1 und Akt2 schon einen Hinweis auf eine physiologische Assoziation der Proteine gegeben hatte (siehe 3.6), sollte dieses Ergebnis durch eine Co-Immunopräzipitation bestätigt werden.

In einem ersten Experiment wurde AIP-VSV transient in HEK-293-Zellen überexprimiert. Ein Ansatz wurde als Kontrolle verwendet, in drei weiteren Ansätzen wurde je eine der Akt-Isoformen (gekoppelt an myc) zusätzlich in den Zellen überexprimiert. Das Zell-Lysat wurde mit Anti-myc-Antikörpern und Protein G-Sepharose inkubiert. Nachdem alle nicht gebundenen Proteine entfernt worden waren, wurden die an die Sepharose gebundenen Proteine mit Laemmli-Puffer gekocht, auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Danach wurde ein Western Blot mit einem Anti-VSV-Antikörper durchgeführt. Bei einem positiven Ergebnis müsste im Blot gegen VSV eine Bande in der Höhe der anderen AIP-Banden zu sehen sein. Da das nicht der Fall ist (Abbildung 3.21), kann mit der Co-Immunopräzipitation hier die direkte Interaktion von Akt mit AIP nicht nachgewiesen werden.

Ein zweites Experiment wurde mit HEK-293 Zellen durchgeführt, die je eine myc-gekoppelte Isoform von Akt überexprimierten. Es wurden jeweils zwei Ansätze vorbereitet, eine Zell-Linie, die nur Akt überexprimierte, sowie eine Zell-Linie, die zusätzlich AIP-VSV überexprimierte. Die Zell-Lysate wurden mit Anti-VSV-Antikörpern und Protein G-Sepharose inkubiert, mit Laemmli-Puffer gekocht, auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Wieder wurde ein Western Blot durchgeführt. Bei einer mit dieser Technik nachweisbaren Protein-Protein-Interaktion von AIP und Akt müsste im Blot gegen myc eine Bande der Größe von Akt zu sehen sein. Auch hier sieht man keine Interaktion der beiden Proteine.





**Abb. 3.21. Western Blot der Co-Immuno-Präzipitation von AIP-VSV und Akt.** Das Konstrukt AIP-VSV und die drei myc-gekoppelten Isoformen von Akt wurden in verschiedenen Kombinationen transient in HEK 293 Zellen exprimiert. Je Ansatz wurde ein Zell-Lysat und die Immunopräzipitation auf einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot nachgewiesen. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf die Interaktion von AIP-VSV mit den drei Akt-Isoformen.

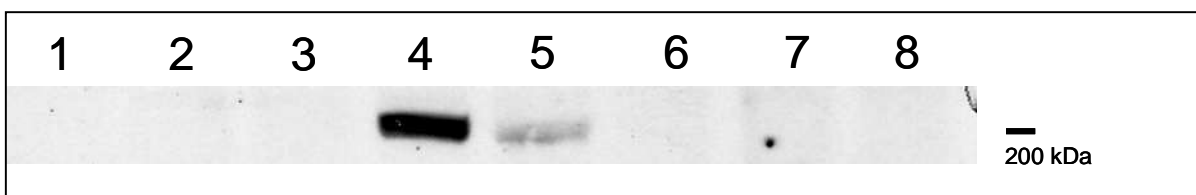
Trotz der fehlenden Hinweise auf eine Interaktion in diesen Experimenten wurde an der These einer Protein-Protein-Interaktion zwischen Akt und AIP festgehalten, da aufgrund der relativ geringen Sensitivität dieser Methode auch bei einem negativen Ergebnis eine direkte Interaktion nicht ausgeschlossen ist.

### **3.9 Konstante Expression des Konstrukts AIP-VSV in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen**

Da die transiente Expression des Konstruktes AIP-VSV in HEK-293 zu einer starken Überexpression führt und die Zellen nur für kurze Zeit für Experimente zur Verfügung stehen, wurden C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zell-Linien etabliert, die das Konstrukt stabil und konstant exprimieren. C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen sind myoblastische Zellen, die unter bestimmten Medien-Bedingungen auch zu Myotuben ausdifferenzieren. Sie sind

insulinsensitiv und deshalb sehr gut für Experimente zur Insulin-Signal-Transduktion geeignet.

Nach der Transfektion der Zellen mit AIP-VSV und einem Neomycin-Resistenz-Vektor wurden sie zwei Wochen mit G418, einem Aminoglykosid, inkubiert. Von den so selektierten Klonen wurden Kulturen angelegt, ein Teil der Zellen wurde geerntet und mittels Western Blot auf Expression des Proteins AIP-VSV getestet. Zwei Klone, die AIP-VSV stabil exprimierten, wurden etabliert.



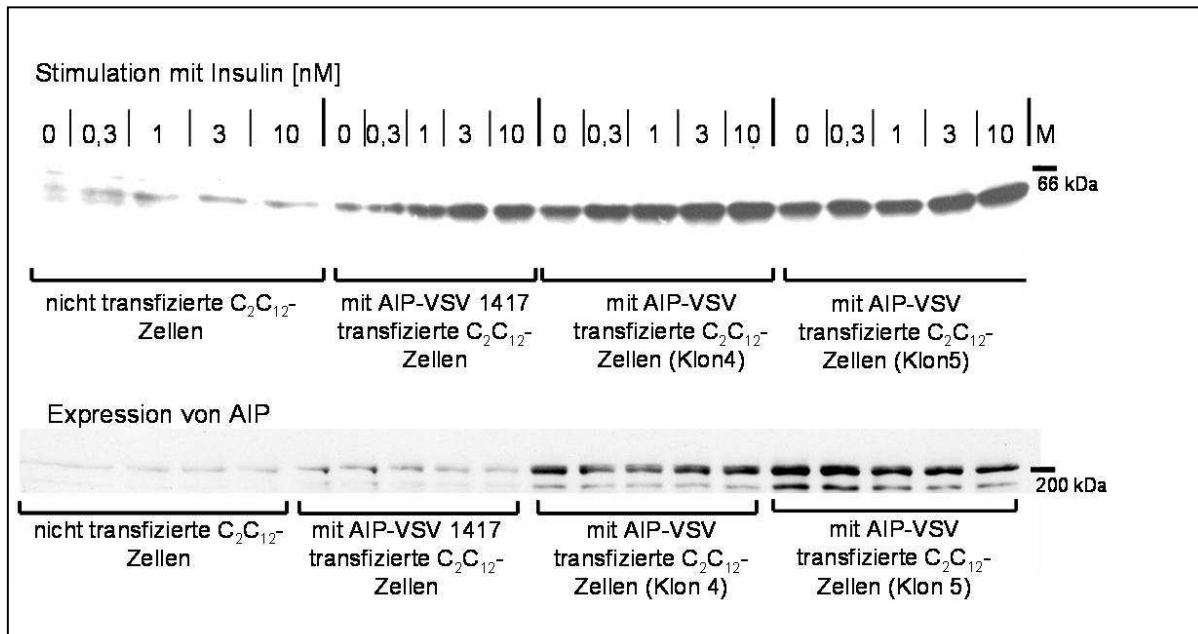
**Abb. 3.22. Konstante Expression von AIP-VSV in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen.** Nach Transfektion von C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen mit dem Konstrukt AIP-VSV und einem Neomycin-Resistenz-Vektor wurden die positiven Klone durch Selektion mit dem Aminoglykosid G418 und Analyse der Klone mittels Western Blot identifiziert. In den Spuren 4 und 5 sieht man das Protein AIP (Größe ca. 200 kDa), geblottet mit einem VSV-spezifischen Antikörper.

### ***3.10 Akt-Phosphorylierung nach Insulin-Stimulation AIP-überexprimierender Zell-Linien***

Um die Auswirkung der Insulin-Stimulation auf die Akt-Phosphorylierung in AIP-überexprimierenden Zellen zu untersuchen, wurden nicht-transfizierte C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen, sowie Zellen der beiden AIP-VSV stabil exprimierenden Zell-Linien AIP 4 und AIP 5 mit unterschiedlichen Konzentrationen Insulin stimuliert. Zusätzlich wurden Zellen getestet, die AIP-VSV 1417 stabil überexprimierten, ein Konstrukt, bei dem die putativen Akt-Phosphorylierungs-Stellen Serin 1417 und Threonin 1419 (entsprechend Serin 1362 und Threonin 1364 in den Datenbankergebnissen, da eine andere Spleiß-Variante dargestellt wurde) durch Alanin ersetzt wurden. Somit wurde ein dephosphorylierter Zustand simuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen lysiert, das Lysat wurde mit Laemmli-Puffer gekocht und in einer

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose wurde ein Western Blot mit einem phosphospezifischen Antikörper, der gegen den phosphorylierten Threonin-Rest 308 von Akt gerichtet ist, durchgeführt. Die Expression von AIP-VSV in den Klonen wurde mit einem weiteren Western Blot verifiziert. Als Antikörper wurde der affinitätsgereinigte Antikörper gegen das GST-Fusionsprotein GST-AIP476 verwendet. Die Abbildung 3.24 zeigt die Expression von AIP sowie die Phosphorylierung von Akt in Abhängigkeit von der Insulin-Stimulation der Zellen. In den nicht-transfizierten C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen sowie den mit AIP-VSV 1417 transfizierten Zellen sieht man die Abhängigkeit der Akt-Phosphorylierung von der Insulin-Stimulation. In den AIP-überexprimierenden Zellen ist die Akt-Phosphorylierung schon ohne Insulin-Stimulation sehr stark gesteigert. Die Insulin-Stimulation selbst bewirkte kaum noch eine Steigerung der Akt-Phosphorylierung.

Die geringere Akt-Phosphorylierung in den mit AIP-VSV 1417 transfizierten Zellen weist auf eine geringere Aktivität von AIP in dephosphoryliertem Zustand hin.



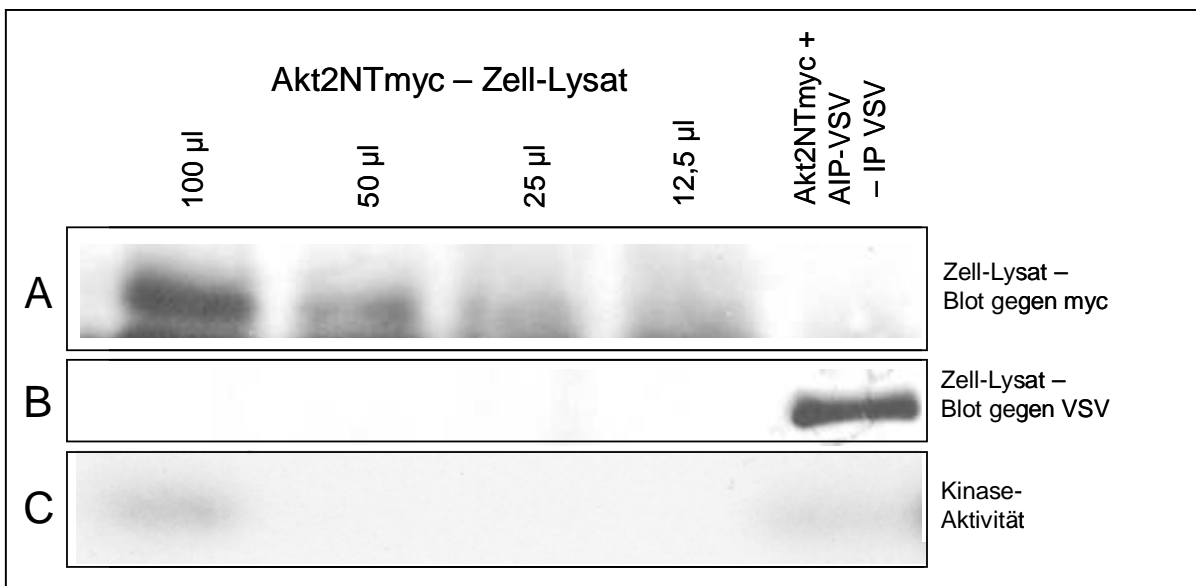
**Abb. 3.24. Auswirkung der AIP-Expression auf die Stärke der Akt-Phosphorylierung in Insulin-stimulierten Zellen.** Nicht transfizierte C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen, sowie AIP-VSV überexprimierende Zellen wurden auf die Stärke der Akt-Phosphorylierung nach Insulin-Stimulation untersucht. Je höher die AIP-VSV-Expression (siehe Expressionskontrolle), desto stärker ist die Akt-Phosphorylierung (siehe Blot mit Antikörpern gegen den phosphorylierten Threonin-Rest 308 von Akt). Die Variante AIP-VSV 1417 bewirkte eine wesentlich geringere Akt-Phosphorylierung.

### **3.11 In-vitro-Kinase-Aktivität von Akt in Abhängigkeit von AIP-Koexpression**

Der Einfluss von AIP auf die Aktivität von Akt wurde durch die Änderung der in-vitro-Kinase-Aktivität von Akt durch die gemeinsame Überexpression von Akt und AIP bestimmt.

Dazu wurden 293-Zellen mit Akt2NTmyc (einem Akt2-Konstrukt, das am aminoterminalen Ende ein myc-Epitop enthält) beziehungsweise mit Akt2NTmyc und AIP-VSV transfiziert. Für die Analyse wurden verschiedene Mengen Lysat von Akt2NTmyc-überexprimierenden Zellen für die Immunopräzipitation mit myc-

Antikörpern eingesetzt, sowie Lysat der Akt2NTmyc und AIP-VSV überexprimierenden Zellen nach Immunopräzipitation mit VSV-Antikörpern (diese Immunopräzipitation entspricht einer Co-Immunopräzipitation für Akt). Bestimmt wurde die Menge an Akt2NTmyc und AIP-VSV, sowie die Kinase-Aktivität von Akt in den verschiedenen Ansätzen (siehe Abbildung 3.25). Die Bestimmung der Kinase-Aktivität wurde über den Einbau von radioaktivem Phosphat in Polypeptide bestimmt, die spezifisch von Akt phosphoryliert werden. Dazu wurde das Polypeptid mit absteigenden Mengen Zell-Lysat Akt2NTmyc-überexprimierender Zellen inkubiert, mit Laemmli-Puffer gekocht, auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Anschließend wurde in einer Autoradiographie die Menge an Radioaktivität in den verschiedenen Ansätzen bestimmt.



**Abb. 3.25. In-vitro-Kinase-Aktivität von Akt.** Die in-vitro-Kinase-Aktivität von Akt wurde in Abhängigkeit der Akt-Konzentration sowie der Ko-Überexpression von Akt und AIP bestimmt. In A wird gezeigt, dass der Einsatz abnehmender Mengen Lysat für die Immunopräzipitation eine abnehmende Menge Akt2NTmyc zur Folge hatte. Im Blot mit anti-myc-Antikörpern war kein Akt2NTmyc in der Immunopräzipitation mit VSV-Antikörpern nachweisbar. Das Protein VSV-AIP war im Blot mit anti-VSV-Antikörpern nachweisbar (siehe B). In der Bestimmung der Kinase-Aktivität (siehe C) wurde im Zell-Lysat von Akt2NTmyc und VSV-AIP überexprimierenden Zellen eine höhere Kinase-Aktivität nachgewiesen als im Ansatz mit 50 µl Zell-Lysat Akt2NTmyc-exprimierender Zellen (trotz wesentlich geringerer Menge an Akt2NTmyc).

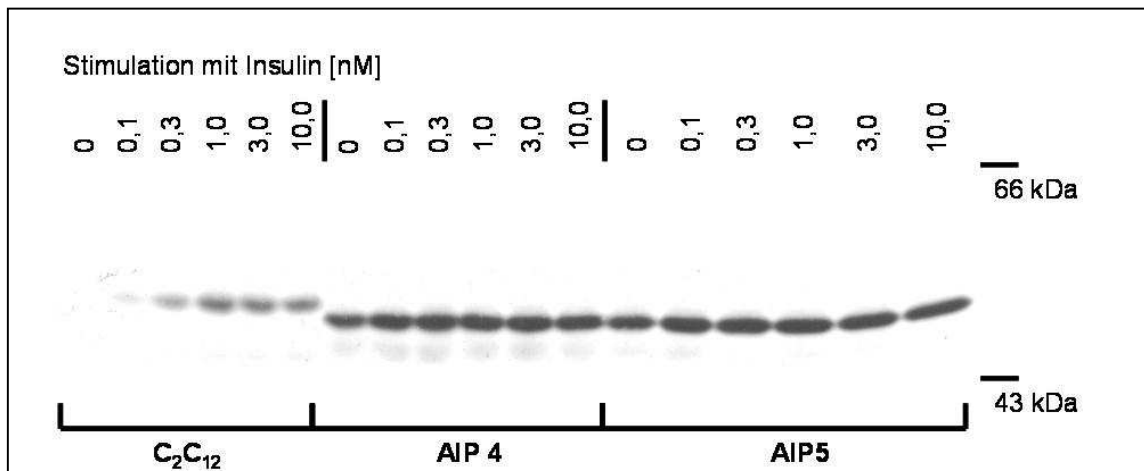
Die Analyse der Zell-Lysate nach Immunopräzipitation mit myc-Antikörpern zeigte, dass Akt2NTmyc in den Immunopräzipitaten mit der Menge des eingesetzten Lysats abnimmt. In den Zellen, die Akt2NTmyc und AIP-VSV überexprimierten, war nach der Immunopräzipitation mit VSV-Antikörpern AIP-VSV gut nachzuweisen, während Akt im Western Blot nicht nachweisbar war.

Die Akt-Kinase-Aktivität nimmt in den Akt2NT-überexprimierenden Zellen analog zur Abnahme der Akt-Menge ab (siehe Abbildung 3.25 A). Vergleicht man die Akt-Kinase-Aktivität in den Akt2NTmyc und AIP-VSV überexprimierenden Zellen, sieht man, dass trotz einer geringeren Akt-Menge als im Ansatz mit 50 µl Lysat Akt2NTmyc exprimierender Zellen, die Kinase-Aktivität größer ist (siehe Abbildung 3.25 C). AIP erhöhte demnach die in-vitro-Kinase-Aktivität von Akt signifikant.

Das Experiment zeigte außerdem die Co-Immunopräzipitation von AIP und Akt2, da in den Akt2NTmyc und AIP-VSV überexprimierenden Zellen nach Immunopräzipitation mit VSV-Antikörpern eindeutig eine Akt-Kinase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die Tatsache, dass in der Co-Immunopräzipitation mit VSV-Antikörpern Akt2NTmyc nicht direkt nachgewiesen werden kann, unterstützt die obige Aussage (siehe 3.8), dass die Assoziation von Akt und AIP relativ schwach ist.

### ***3.12 GSK3-Phosphorylierung in AIP-überexprimierenden Zellen***

GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) ist eines der bekanntesten Substrate von Akt. Der Effekt von AIP auf die GSK3-Phosphorylierung ist somit ein Maß für den Einfluss von AIP auf die Aktivität von Akt. AIP-VSV-überexprimierende Zellen sowie zum Vergleich nicht-transfizierte C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Insulin stimuliert und in einem Blot mit spezifischen Antikörpern gegen phospho-GSK3 getestet.



**Abb. 3.26. GSK3-Phosphorylierung in AIP-exprimierenden Zellen.** Die beiden AIP stabil überexprimierenden Zell-Linien AIP 4 und AIP 5, sowie nicht transfizierte C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Insulin stimuliert. In einem Blot mit spezifischen Antikörpern gegen phosphorylierte GSK3 wurde eine Steigerung der GSK3-Phosphorylierung in AIP-überexprimierenden Zellen als Maß einer gesteigerten Akt-Aktivität nachgewiesen.

Die Abbildung 3.26 zeigt die GSK3-Phosphorylierung in den verschiedenen Zellen. Die Position der GSK3 im Blot unterscheidet sich in den AIP-überexprimierenden Zellen von den nicht-transfizierten Zellen. In den nicht-transfizierten C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen erkennt man die Insulin-Abhängigkeit der Akt-Aktivierung. Die AIP-überexprimierenden Zell-Linien zeigten eine deutlich höhere GSK3-Phosphorylierung, die Abhängigkeit der Reaktion von Insulin war nahezu aufgehoben. AIP ist demnach allein (auch ohne Insulinstimulation) ausreichend, um eine sehr hohe GSK3-Phosphorylierung zu bewirken.

### 3.13 Glykogensynthese-Bestimmung

Die Glykogen-Synthase ist ein Enzym, dessen Aktivität durch Phosphorylierung an neun verschiedenen Stellen reguliert wird. Eines der phosphorylierenden Enzyme ist GSK3, welche wiederum ein Akt-Substrat ist. Wie in 3.12 gezeigt wurde, hat die Überexpression von AIP einen Einfluss auf die Phosphorylierung der GSK3. Der

Einfluss der Überexpression auf den physiologischen Effekt der Glykogensynthese wurde hier untersucht.

Die Glykogensynthese-Rate wurde über den Einbau radioaktiver  $^{14}\text{C}$ -Glukose gemessen. Dazu wurden nicht-transfizierte  $\text{C}_2\text{C}_{12}$ -Zellen als Kontrolle, so wie die Zelllinie AIP 4 (AIP-VSV stabil überexprimierende Zelllinie) mit Insulin stimuliert. Die daraufhin ins Medium gegebene  $^{14}\text{C}$ -Glukose wurde in die Zellen aufgenommen und je nach Aktivität der Glykogen-Synthase in Glykogen eingebaut. Nach Waschen der Zellen (zur Entfernung noch im Medium vorhandener radioaktiver Glukose), Lyse und Präzipitation des Glykogens konnte dieses in Szintillationslösung aufgenommen und die Radioaktivität als Maß der Glykogensynthese bestimmt werden.

### **3.13.1 Vorversuche**

Als erstes wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für das Experiment zu bestimmen. Bei nicht-transfizierten  $\text{C}_2\text{C}_{12}$ -Zellen erhöhte sich in anderen Experimenten (Weyrich et al., 2004) nach Insulin-Stimulation die Glukose-Aufnahme um ca. den Faktor 2. Die Experimente mit der Zell-Linie AIP 4 wurden durchgeführt, um eine erste Einschätzung der Auswirkung von AIP auf die Glykogensynthese machen zu können. Drei verschiedene Bedingungen wurden gewählt: ein Standard-Protokoll mit einstündiger Insulin-Stimulation von Zellen, die über Nacht in Serum mit 0,5 % FCS inkubiert worden waren; ein Protokoll mit einstündiger Insulin-Stimulation von Zellen, die über vier Tage in 0,5 % FCS inkubiert worden waren; und ein Protokoll mit halbstündiger Insulin-Stimulation von Zellen, die über Nacht in 0,5 % FCS-Serum inkubiert worden waren. Um die Genauigkeit der Daten zu erhöhen, wurde jeder Ansatz dreifach durchgeführt.

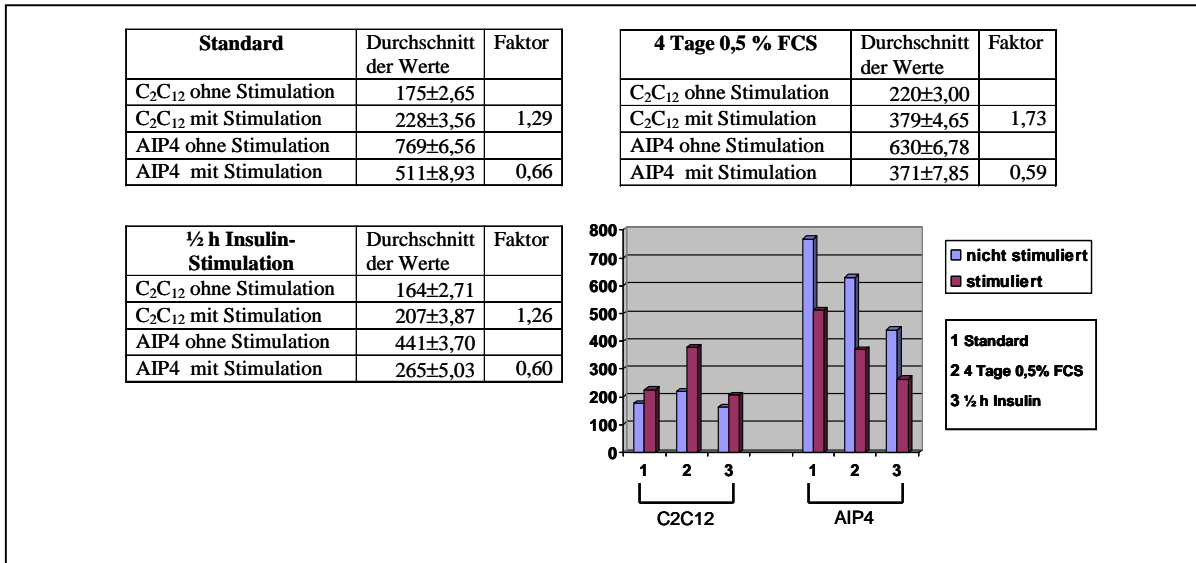
Die einstündige Stimulation mit 10 nM Insulin nach Inkubation in 0,5 % FCS-Medium über Nacht ergab für die  $\text{C}_2\text{C}_{12}$ -Zellen eine Steigerung der Glykogensynthese um den Faktor 1,29. In den mit AIP transfizierten Zellen ergab sich überraschenderweise ein Abfall der Glykogensynthese (Faktor 0,66) von sehr



hohen Ausgangswerten ohne Stimulation (769 im Vergleich zu 175 bei nicht-transfizierten Zellen), siehe Abbildung 3.27. Möglicherweise ist die Glykogensynthese allein durch die starke Überexpression von AIP maximal erhöht und die Stimulation mit Insulin führt über andere Mechanismen zu einem Rückgang der Glykogensynthese.

Die einstündige Stimulation mit 10 nM Insulin nach viertägiger Kultur in 0,5 % FCS-Medium ergab bessere Ergebnisse für die Glykogensynthese-Steigerung der nicht-transfizierten C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen (Faktor 1,73), auch hier wurde ein Abfall der Glykogensynthese in den AIP überexprimierenden Zellen festgestellt, der ebenfalls größer war als beim Standardprotokoll. Die Versuchsbedingungen hier sind also zur Messung der Effekte einer Insulin-Stimulation besser geeignet.

Die halbstündige Stimulation mit 10 nM Insulin ergab ähnliche Ergebnisse wie die einstündige. Die Glykogensynthese-Steigerung in den nicht-transfizierten C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen war mit den Effekten beim Standardprotokoll vergleichbar, der Glykogen-Synthese-Abfall in den AIP-überexprimierenden war jedoch ähnlich ausgeprägt wie im Ansatz mit viertägigem Wachstum in 0,5 % FCS-Medium.

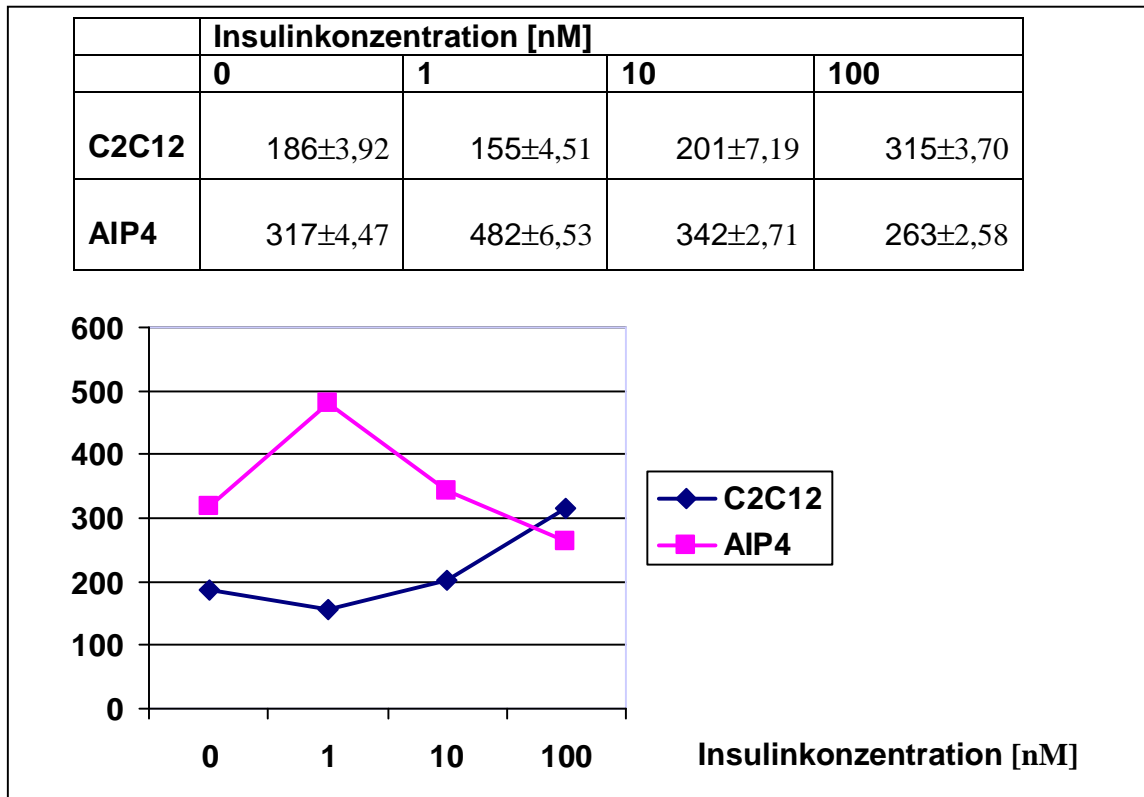


**Abb. 3.27. Glykogensynthese-Bestimmung Vorversuche.** Die Glykogensynthese-Bestimmung wurde mit drei unterschiedlichen Protokollen durchgeführt. Das Standardprotokoll wurde in der Dauer der Inkubation in 0,5% FCS-Medium und in der Dauer der Insulin-Stimulation verändert und die Ergebnisse in nicht-transfizierten und AIP-überexprimierenden Zellen verglichen.

### 3.13.2 Glykogensynthese in Abhängigkeit von der Insulin-Konzentration

Um den Zusammenhang zwischen der Insulin-Stimulation und der verminderten Glykogensynthese in AIP-exprimierenden Zellen zu belegen, wurde die Änderung der Glykogensynthese bei Insulin-Stimulation nachgewiesen. Als Kontrolle wurden wieder nicht-transfizierte C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen eingesetzt.

Die Zellen wurden über Nacht in 0,5 % FCS-Medium kultiviert, dann 1 h mit der angegebenen Insulin-Konzentration (siehe Abbildung 3.28) stimuliert. Anschließend wurde radioaktive Glukose zugegeben und die Radioaktivität im aufgereinigten Glykogen bestimmt.



**Abb. 3.28. Abhängigkeit der Glykogensynthese von der Insulinkonzentration.** Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen stimuliert. Für jede Konzentration und die zwei Zelllinien (nicht-transfizierte und AIP-exprimierende) wurden drei Werte bestimmt. Für die Auswertung wurde der Mittelwert verwendet.

Für nicht-transfizierte C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen ergab sich ein Anstieg der Glykogensynthese. Für die AIP-überexprimierenden Zellen ergab sich kein linearer Zusammenhang. Im niedrigen, physiologischen Bereich stieg die Glykogensynthese an, was den Erwartungen entsprach, da eine Stimulation mit Insulin die GSK3-Aktivität über den Insulin-Signal-Weg erhöht. Bei Stimulation mit höheren Konzentrationen Insulin kam es aus ungeklärter Ursache zum Absinken der Glykogensynthese. Das Niveau der Glykogensynthese war in den AIP-überexprimierenden Zellen sehr viel höher als in den nicht-transfizierten C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen. Eine Erklärung für den Abfall der Glykogensynthese könnte sein, dass die schon durch die AIP-Überexpression

nahezu maximal gesteigerte Glykogensynthese bei stärkerer Insulin-Stimulation über andere Signalwege wieder reduziert wird.

## 4 Diskussion

### 4.1 Datenbankergebnisse

Die Datenbankanalyse ergab für das Protein AIP eine Sequenz mit 9697 bp, das entsprechende Gen wurde auf Chromosom 2 lokalisiert. Die Proteingröße, entsprechend dem offenen Leseraster (Basenpaare 1227 bis 6591), beträgt 1788 AS. Das entspricht einem Molekulargewicht von 206 kDa. Diese Spleiß-Variante entspricht der in Simpson et al. (2005) beschriebenen embryonalen Isoform. Die EST-Klone, die zur Rekonstruktion der Sequenz verwendet wurden, wurden aus Testis, Hypothalamus und Amygdala isoliert, bei einem EST-Klon ist das Ursprungsgewebe nicht bekannt. Auch Anai et al. beschrieben aber 2005, dass die 206 kDa große Variante nicht ausschließlich in embryonalem Gewebe, sondern auch in Lunge und Milz von Erwachsenen exprimiert wird. Die Klonierung und weitere Charakterisierung des Proteins wurde jedoch mit der 1843 Aminosäuren langen Spleiß-Variante durchgeführt, die der in höchster Konzentration in adultem Gewebe vorliegenden Form entspricht.

In der Analyse mit Prosite und Scansite wurden Homologien zu bekannten Protein-Domänen ermittelt.

AIP weist Homologien zu CH-Domänen auf, die in anderen Proteinen eine Bindung an Aktin-Filamente vermittelt. Die Homologie zur HOOK-Domäne macht eine Bindung an Mikrotubuli wahrscheinlich. Diese Interaktion wurde auch experimentell von Simpson et al. (2005) bestätigt, die AIP als neues Mikrotubuli-assoziiertes Protein beschrieben, das eine Rolle in der Embryonalentwicklung zu spielen scheint. Im Lauf der Entwicklung von Maus-Embryonen ist die örtliche Verteilung von AIP unterschiedlich. Auch ein Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von

Vesikeln wurde von Simpson et al. (2005) beschrieben. AIP-bindende Membranen waren vor allem in der Zell-Peripherie lokalisiert. Diese Membranen waren von einer elektronendichten Hülle umgeben und konnten nicht durch Antikörper gegen bekannte Vesikel-Proteine angefärbt werden.

Des Weiteren weist AIP eine Homologie zur v-SNARE-Domäne auf, die in anderen Proteinen den Transport von Vesikeln vermittelt. Auch für diese Interaktion gibt es experimentelle Nachweise. So zeigten Le Niculesco et al. (2005) die Beteiligung von AIP am Vesikeltransport im Golgi-Apparat sowie vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat in Abhängigkeit von  $G\alpha_{i3}$ -Protein-assoziierten Prozessen.

Neben Homologien zu diesen Protein-bindenden Domänen gab es auch eine Homologie zu einer ATP/GTP-bindenden Domäne.

Enomoto et al. beschrieben 2005 AIP als Akt-assoziiertes Protein mit Einfluss auf Aktin-Filamente. AIP zeigt in der Immunfluoreszenz eine Co-Lokalisation mit Aktin und spielt eine entscheidende Rolle in der Formierung von Stress-Fasern (lange Aktin-Polymere, die an der Zellmembran ansetzen und für Zell-Migration und Invasion entscheidend sind) und Lamellipodien (netzförmige Aktin-Strukturen am führenden Ende von Zellen in Migration). AIP wird von Akt an Serin 1417 phosphoryliert. Wurde dieser Serin-Rest durch Alanin ersetzt und dadurch ein dauerhaft dephosphorylierter Zustand simuliert, zeigten die Zellen eine abnorm lange Form, die Bildung von Lamellipodien und die Zell-Migration waren eingeschränkt.

Die Gewebeverteilung wurde aus der Homologie anderer EST-Klone zum EST-Klon BX648138, der aus menschlicher Amygdala, also neuronalem Gewebe, isoliert wurde, abgeschätzt. Am häufigsten fanden sich als Ursprungsgewebe in absteigender Reihenfolge Keimzellen, B-Zellen, neuronales sowie muskuläres Gewebe. Das entspricht in etwa den Ergebnissen von Anai et al. (2005), Simpson et al. (2005) und Le Niculesco et al. (2005), die eine Expression vorwiegend in Testis, Gehirn, Milz, Lunge sowie Muskel und Herz beschrieben.

## **4.2 Klonierung des gesamten offenen Leserasters**

Das offene Leseraster der 213 kDa großen Isoform von AIP wurde ausgehend von fünf EST-Klonen kloniert. Da bis zu ca. 2900 bp lange DNA-Fragmente in PCRs amplifiziert wurden, bestand hier die Gefahr von fehlerhafter Amplifikation mit Punktmutationen im endgültigen PCR-Produkt. Um diese Gefahr zu verringern wurden Polymerasen mit Reparaturfunktion verwendet (Pfx und Pwo), bei denen die Rate an Mutationen wesentlich geringer ist als bei der ursprünglich verwendeten Taq-Polymerase. Zum Ausschluss von Punktmutationen im klonierten Konstrukt von AIP wurde eine Sequenzierung der gesamten DNA durchgeführt, die eine korrekte Klonierung des Konstrukts ohne Punktmutationen zeigte.

Zusätzlich zu einem Expressionskonstrukt für AIP wurde ein Konstrukt mit einem carboxyterminalen VSV-Epitop hergestellt, das mit einem verfügbaren monoklonalen Antikörper sicher nachgewiesen werden kann. Die zusätzliche Sequenz kann die Eigenschaften des Proteins verändern, eine derartige angefügte Sequenz hat jedoch den Vorteil, dass ein Protein zum Beispiel im Western Blot detektiert werden kann, auch wenn noch keine spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen. Die funktionelle Charakterisierung von AIP wurde mit diesem Konstrukt durchgeführt.

Die Expression von AIP-VSV wurde in HEK-293-Zellen nachgewiesen. Mit dieser Nachweismöglichkeit des Proteins waren die Voraussetzungen für den Nachweis der Interaktion von Akt und AIP sowie die funktionelle Charakterisierung des Proteins geschaffen.

## **4.3 GST-Konstrukte**

Um die Produktion von polyklonalen AIP-spezifischen Antikörpern zu ermöglichen und einen ersten Hinweis auf die direkte Protein-Protein-Interaktion von Akt und AIP zu erhalten, wurden GST-Konstrukte hergestellt. GST-Fusionsproteine sollten eine bestimmte Länge nicht überschreiten, da das Protein sonst in

Einschlusskörperchen in den Bakterien ausfällt und nicht vom Detritus getrennt werden kann. Daher wurde kein Konstrukt mit dem gesamten offenen Leseraster von AIP, sondern ein Fusionsprotein mit dem aminoterminalen Anteil von AIP und ein Fusionsprotein mit dem carboxyterminalen Anteil hergestellt. Gegen beide Proteine wurden durch Immunisierung von Kaninchen polyklonale Antikörper hergestellt. Das Fusionsprotein mit dem carboxyterminalen Anteil wurde auch zum Nachweis der Interaktion zwischen Akt und AIP verwendet.

#### ***4.4 Nachweis der Interaktion zwischen Akt und AIP***

In den Vorarbeiten war die Interaktion zwischen Akt und AIP im Hefe-2-Hybrid-System nachgewiesen worden. Da in diesem System falsch-positive Ergebnisse relativ häufig sind, war es jedoch notwendig, die Interaktion von AIP und Akt mit anderen Methoden zu bestätigen. Der Gold-Standard zum Nachweis direkter Protein-Protein-Interaktionen ist die Co-Immunopräzipitation.

##### **4.4.1 Protein-Assoziation Akt mit GST-AIP 6595s**

Im Hefe-2-Hybrid-System war eine Assoziation des carboxyterminalen Anteils von AIP mit Akt nachgewiesen worden. Durch den Nachweis einer direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen Akt und GST-AIP 6595s sollte diese Interaktion bestätigt werden. Dieser Nachweis einer direkten Protein-Protein-Interaktion mit GST-Fusionsproteinen kann noch nicht als Nachweis einer physiologischen Protein-Assoziation gelten, da der GST-Anteil des Proteins die Bindungseigenschaften beeinflussen kann und auch unspezifische Bindungen der beteiligten Proteine auftreten könnten. Da wie im Hefe-2-Hybrid-System auch nur der carboxyterminale Teil des Proteins exprimiert wurde, konnte auch der Einfluss des aminoterminalen Teils von AIP nicht berücksichtigt werden. Dieses Experiment ersetzt den Nachweis der Protein-Interaktion mit dem gesamten Protein AIP somit

nicht, liefert aber einen weiteren Hinweis auf die tatsächliche Protein-Protein-Interaktion.

Jedoch sind andere jetzt anerkannte Protein-Protein-Interaktionen, wie die Assoziation von PDK1 und SGK zu Beginn auch als Assoziation in Experimenten mit GST-Fusionsproteinen beschrieben worden (Park et al., 1999). Das positive Ergebnis in diesem Experiment ergibt also neben den Ergebnissen des Hefe-2-Hybrid-Systems einen weiteren Hinweis auf die tatsächliche Interaktion von Akt und AIP.

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von GST-AIP 6595s mit Akt1 und Akt2 nachgewiesen, dagegen konnte keine Interaktion mit Akt3 gezeigt werden. Die Akt-Isoformen weisen eine redundante Funktion auf, jedoch konnten in Akt1-, Akt2- und Akt3-defizienten Mäusen unterschiedliche Phänotypen beobachtet werden. Wie in Tabelle 4.1 gezeigt, kann Akt1 als Isoform charakterisiert werden, die hauptsächlich Wachstum vermittelt, Akt2 ist vor allem für die metabolischen Akt-Funktionen verantwortlich, Akt3 für spezielle Aufgaben. Eine Interaktion von AIP mit Akt1 und Akt2 kann demnach ein Hinweis auf die Funktion von AIP sowohl im Zellwachstum als auch im Glukosemetabolismus sein (Yang et al., 2004).



Akt1	Plazenta-Entwicklung und Wachstum
	Adipositasentwicklung
Akt2	Glukosemetabolismus
	Adipositasentwicklung und -aufrechterhaltung
	Wachstum
Akt3	Postnatale Gehirnentwicklung

**Tab. 4.1. Funktion der Akt-Isoformen.** Die Untersuchung Akt-defizienter Mäuse ergab einen unterschiedlichen Phänotyp für die drei Akt-Isoformen. So ist beim Fehlen von Akt1 vor allem das Wachstum beeinträchtigt. Fehlt Akt2, hat dies vor allem Auswirkungen auf Metabolismus und Körpergewicht. Akt3 ist für die postnatale Gehirnentwicklung mitverantwortlich. Quelle: Yang et al., 2004.

#### 4.4.2 Co-Immunopräzipitation

Für die Co-Immunopräzipitation müssen Konstrukte der beteiligten Proteine vorhanden sein, die mit verschiedenen Antikörpern gebunden und nachgewiesen werden können. Mit dem spezifischen Antikörper gegen einen der Bindungspartner wird die Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Um den Bindungspartner im Eluat nachweisen zu können, muss dieser mit einem anderen spezifischen Antikörper nachweisbar sein.

In der Co-Immunopräzipitation von AIP mit den drei Akt-Isoformen wurden myc-gekoppelte Akt-Konstrukte verwendet, die alle mit dem gleichen Antikörper nachweisbar sind. Das VSV-gekoppelte AIP-Konstrukt konnte mit dem monoklonalen VSV-Antikörper nachgewiesen werden. Von VSV- und myc-Antikörpern ist bekannt, dass keine Kreuz-Reaktivität besteht.

In der durchgeführten Co-Immunopräzipitation wurde keine Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen. Ein Nachteil dieser Methode ist die geringe Sensitivität des Protein-Nachweises. Selbst bei einer physiologischen Protein-Protein-Interaktion enthält das Eluat der Co-Immunopräzipitation häufig nur geringe Mengen des indirekt gebundenen Proteins. Bei einem Nachweis der

Proteinbindung in der Co-Immunopräzipitation ist dieses Ergebnis sehr valide, ein fehlender Nachweis kann jedoch nicht als Ausschluss einer Interaktion gedeutet werden.

Insbesondere muss berücksichtigt werden, dass auch in der vorhandenen Literatur keine einheitlichen Ergebnisse beschrieben wurden. Während Anai et al. (2005) eine eindeutige Co-Immunopräzipitation nach Überexpression beider Proteine in HepG2- und Sf9-Insektenzellen beschrieben, konnten Enomoto et al. (2005) in der Co-Immunopräzipitation mit verschiedenen Fragmenten von AIP keine direkte Protein-Protein-Interaktion zeigen. Enomoto et al. (2005) diskutierten eine nur transiente Bindung der Proteine, die mit der Methode der Co-Immunopräzipitation nicht immer nachgewiesen werden kann. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich wahrscheinlich auch auf methodische Unterschiede zurückführen. Während Enomoto et al. (2005) den Nachweis von Akt im Eluat der Co-Immunopräzipitation direkt mit Akt-spezifischen Antikörpern versuchten, wiesen Anai et al. (2005) nicht Akt als Protein, sondern die Akt-Kinase-Aktivität im Eluat nach. Sie bestätigten das Ergebnis auch durch den Nachweis von AIP in der Co-Immunopräzipitation mit Anti-Akt-Antikörpern in nicht-transfizierten HELA-Zellen und Maus-Testis-Zellen. Eine Protein-Protein-Assoziation besteht laut diesen Experimenten auch in Zellen, die Akt und AIP nicht überexprimieren, sondern die Proteine in physiologischer Konzentration enthalten (Anai et al., 2005).

Unsere Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Enomoto et al. (2005) überein, eine Co-Immunopräzipitation konnte für AIP und Akt nicht nachgewiesen werden.

Auch bei anderen Akt-assoziierten Proteinen war es nicht möglich, die Assoziation der Proteine in einer Co-Immunopräzipitation nachzuweisen. So wurde für das Protein CTMP nur eine Co-Immunopräzipitation mit einem GST-Konstrukt des carboxyterminalen Teils von Akt gezeigt, nicht jedoch mit einem Konstrukt des gesamten Proteins Akt. Eine mögliche Erklärung dafür lieferten weiterführende Experimente, die eine Co-Immunopräzipitation von Akt in Abhängigkeit von der intrazellulären Lokalisation der Proteine untersuchten. Wurden die Zellen nach

Lyse in eine zytosolische und eine Membran-Fraktion aufgetrennt, konnte in der Membranfraktion eine Co-Immunopräzipitation der Proteine nachgewiesen werden, in der zytosolischen Fraktion war keine Protein-Protein-Assoziation nachweisbar (Maira et al., 2001).

So ist der fehlende Nachweis der direkten Protein-Protein-Interaktion in der Co-Immunopräzipitation nicht ausreichend, um eine direkte Assoziation von Akt und AIP auszuschließen. Eine Abhängigkeit der Interaktion von der intrazellulären Lokalisation der Proteine könnte auch bei AIP und Akt eine Rolle spielen.

#### **4.4.3 Nachweis der Interaktion**

Der Nachweis der direkten Protein-Protein-Interaktion von AIP mit Akt2 gelang in den in 3.11 beschriebenen Experimenten.

HEK 293-Zellen wurden mit Akt2NTmyc und AIP-VSV transfiziert. Das Lysat dieser Zellen wurde in einer Immunopräzipitation mit VSV-Antikörpern eingesetzt. Ähnlich wie in der Co-Immunopräzipitation war Akt2NTmyc mit myc-Antikörpern nicht nachweisbar, da die Sensitivität des direkten Protein-Nachweises zu gering ist. Jedoch wurde eine spezifische Akt-Kinase-Aktivität im Eluat der Immunopräzipitation nachgewiesen. Der Nachweis der Kinase-Aktivität gelingt auch bei Protein-Mengen, die im direkten Nachweis mit Antikörpern nicht detektiert werden können.

Das Eluat der Immunopräzipitation mit VSV-Antikörpern enthielt also auch Akt in einer Menge, die den Nachweis der Kinase-Aktivität zulässt, die aber für einen direkten Protein-Nachweis nicht ausreicht. Das Ergebnis entsprach also einer positiven Co-Immunopräzipitation von AIP und Akt2.

Die Interaktion zwischen Akt und AIP war demnach nachweisbar, jedoch sehr schwach ausgeprägt. Wie schon bei Enomoto et al. (2005) diskutiert, liegt der Grund dafür wahrscheinlich nicht in einer schwachen Interaktion, die die physiologische Relevanz der Interaktion in Frage stellen würde. Viel mehr kann

man von einer transienten Assoziation ausgehen, die in der Co-Immunopräzipitation nur unzureichend erfasst werden kann.

#### ***4.5 Funktionelle Charakterisierung von AIP***

Nachdem die Struktur des neuen Proteins AIP durch Datenbankanalysen beschrieben werden konnte, und die Protein-Protein-Interaktion zwischen AIP und Akt nachgewiesen war, sollte das neue Protein auf seine funktionellen Auswirkungen auf die Akt-vermittelte Signaltransduktion untersucht werden.

Anai et al. (2005) hatten AIP ebenfalls als Akt-interagierendes Protein beschrieben und den Einfluss von AIP auf Akt-vermittelte Signaltransduktion untersucht insbesondere auf DNA-Synthese und Apoptose. Die in AIP-überexprimierenden Zellen gesteigerte DNA-Synthese führte zu mehr als diploiden Chromosomensätzen. Die Apoptose-Induktion durch eine auf diese Weise gesteigerte DNA-Synthese wird auf dem Signalweg über p53 und Chk2 ausgelöst. Tatsächlich fanden sich eine Phosphorylierung von Chk2 und eine erhöhte Apoptose-Rate in AIP-überexprimierenden Zellen. Trotz eingeschränkter Validität der Ergebnisse, da die Experimente in transient überexprimierenden Zellen durchgeführt wurden, stellte sich AIP in dieser Arbeit als ein starker Induktor für die DNA-Synthese dar. Über die gesteigerte DNA-Synthese wird auf dem Signalweg über Chk2 Apoptose induziert.

Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von AIP auf den Glukose-Metabolismus als Akt-abhängigen Prozess untersucht. Neben dem Einfluss von AIP auf die Phosphorylierung und die Kinase-Aktivität von Akt selbst wurde auch der Einfluss auf die Phosphorylierung von GSK3 als Akt-Substrat sowie die Glykogensynthese als Akt-abhängiger zellulärer Prozess beschrieben.

#### **4.5.1 Einfluss von AIP auf die Akt-Phosphorylierung**

Durch Vergleich der Akt-Phosphorylierung an Threonin 308 in nicht-transfizierten Zellen und in AIP-stabil-überexprimierenden Zellen ist eine Abschätzung des Einflusses von AIP auf die Akt-Phosphorylierung möglich.

In den nicht-transfizierten Zellen ergab sich bei den verwendeten Insulin-Konzentrationen eine Steigerung der Akt-Phosphorylierung bei höheren Konzentrationen. In den AIP-überexprimierenden Zellen war die Akt-Phosphorylierung selbst ohne Insulin-Stimulation sehr viel stärker ausgeprägt als in den stimulierten nicht-transfizierten Zellen. Bei Insulin-Stimulation war nahezu keine Steigerung der Akt-Phosphorylierung mehr nachweisbar. Als Grund dafür muss eine nahezu maximale Steigerung der Akt-Phosphorylierung allein durch die Überexpression von AIP angenommen werden. AIP zeigt sich demnach als ein sehr starker Stimulator der Akt-Phosphorylierung an Threonin 308.

Auch Anai et al. (2005) beschrieben eine maximale Stimulation der Akt-Phosphorylierung durch AIP. Dieser Effekt war so ausgeprägt, dass sie das Protein APE („Akt phosphorylation enhancer“) nannten. Anai et al. (2005) verwendeten ein transientes Überexpressions-System mit Adenovirus-Infektion der Zellen. Die Experimente in AIP stabil überexprimierenden Zellen, wie sie hier beschrieben sind, sind den physiologischen Gegebenheiten ähnlicher und somit valider als die Ergebnisse in der transienten Überexpression. Die starke Stimulation der Akt-Phosphorylierung wurde in unseren Experimenten bestätigt.

Auch hFt1 wurde 2004 als Akt-interagierendes Protein beschrieben, das die Akt-Phosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 steigert (Remy und Michnick, 2004). Hier war jedoch durch Stimulation mit Serum noch eine deutliche Steigerung der Akt-Phosphorylierung zu erreichen, die basale Stimulation der Akt-Phosphorylierung war demnach nicht so stark wie durch AIP. Ein Vergleich der Experimente wird jedoch dadurch erschwert, dass Remy und Michnick (2004) ein transientes Expressions-System mit Adenoviren verwendeten, während in unseren Experimenten eine AIP-stabil-überexprimierende Zell-Linie untersucht wurde.

CTMP als inhibitorisches Akt-interagierendes Protein verringert die Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 und insbesondere Serin 473 (Maira et al., 2001). Für TRB3 wurde gezeigt, dass eine Überexpression die IGF-1-induzierte Phosphorylierung von Serin 473 hemmt, ohne die in den Zellen enthaltenen Akt-Mengen zu verändern. Es handelt sich um einen konzentrationsabhängigen Effekt, mit steigenden Mengen an transfiziertem TRB3 nimmt die Hemmung der Akt-Phosphorylierung zu (Du et al., 2003).

Die geringere Akt-Phosphorylierung in den mit AIP-VSV 1417 transfizierten Zellen weist auf eine geringere AIP-Aktivität im dephosphorylierten Zustand hin, der durch die Mutation von Serin und Threonin zu Alanin (einer hydrophoben Aminosäure), simuliert wird (Decker und Kovarik, 2000). Die Phosphorylierung von AIP an Serin 1417 wurde von Enomoto et al. (2005) nachgewiesen, die verantwortliche Kinase war Akt. Somit wären hier mit einer Phosphorylierung von AIP durch Akt und einer Aktivitäts-Steigerung von Akt durch AIP die Voraussetzungen für eine positive Rückkopplung geschaffen, die die extreme Steigerung der Akt-Effekte durch AIP-Überexpression erklären könnte.

#### **4.5.2 Einfluss von AIP auf die in-vitro-Kinase-Aktivität von Akt**

Da eine Phosphorylierung an Threonin 308 allein nicht zwingend eine Aktivierung der Akt-Kinase auslöst, wurde als nächstes untersucht, ob die Überexpression von AIP auch einen Einfluss auf die Akt-Kinase-Aktivität hat.

Verglichen wurden die Akt-Kinase-Aktivitäten in Ansätzen mit verschiedenen Mengen von Akt ohne und mit AIP-Überexpression. In den nicht-transfizierten Zellen nahm die Akt-Kinase-Aktivität erwartungsgemäß mit steigenden Akt-Mengen, die in einem Western Blot gegen das Akt-Konstrukt semiquantitativ nachgewiesen wurden, zu. Das Lysat der AIP-überexprimierenden Zellen wurde in einer Immunopräzipitation gegen das AIP-Konstrukt eingesetzt. Im Eluat wurden die Mengen an Akt und die Akt-Kinase-Aktivität semiquantitativ nachgewiesen. Wäre AIP ohne Einfluss auf die Akt-Kinase-Aktivität müsste die Kinase-Aktivität in

etwa der Aktivität entsprechen, die ohne AIP bei gleicher Akt-Menge nachgewiesen wurde. Das Experiment zeigte jedoch bei einer sehr geringen Akt-Menge eine deutliche Akt-Kinase-Aktivität. AIP erhöhte demnach nicht nur die Akt-Phosphorylierung, sondern hatte auch einen positiven Einfluss auf die Akt-Kinase-Aktivität.

Auch Anai et al. (2005) beschrieben eine maximal gesteigerte Akt-Kinase-Aktivität in AIP und Akt transient überexprimierenden COS7-Zellen (fibroblastenähnliche Nierenepithelzellen). Sie zeigten die Kinase-Aktivität von Akt am physiologischen Akt-Substrat GSK3 und nicht an einem GSK3-Peptid.

Anai et al. (2005) zeigten auch, dass durch Unterdrückung der AIP-Expression mit siRNA die Phosphorylierung und die Kinase-Aktivität von Akt deutlich gesenkt wurden. Die siRNA wurde in HepG2-Zellen (hepatoblastischen Zellen) transfiziert. Nach Insulin-Stimulation war, verglichen mit nicht transfizierten Zellen, eine signifikant verringerte in-vivo Kinase-Aktivität von Akt messbar. Auch endogenes AIP steigert nach diesen Ergebnissen die Kinase-Aktivität von Akt (Anai et al., 2005).

In Arbeiten über andere Akt-interagierende Proteine wurden ebenfalls die Akt-Kinase-Aktivität und die Phosphorylierung von Akt in Abhängigkeit der Überexpression der Proteine bestimmt. Für hFt1 wurde die in-vitro-Kinase-Aktivität von Akt in Abhängigkeit der Überexpression von hFt1 und Stimulation durch Serum bestimmt. Ein Vergleich der Ergebnisse wurde auch hier durch die methodischen Unterschiede erschwert (Remy und Michnick, 2004).

Die Akt-bindenden Proteine CTMP und TRB3 wurden als inhibitorische Modulatoren von Akt beschrieben. Für CTMP wurde bei der Messung der Akt-Kinase-Aktivität bei Überexpression des Proteins eine verringerte Aktivität nachgewiesen. Die Verringerung der Aktivität nahm mit steigender Menge an transfiziertem CTMP zu (Maira et al., 2001). Für TRB3 wurde ebenfalls eine Verringerung der Akt-Kinase-Aktivität bei Überexpression des Proteins gezeigt. Ein TRB3-Konstrukt, das aufgrund einer Deletion von 78 Basenpaaren nicht mit Akt

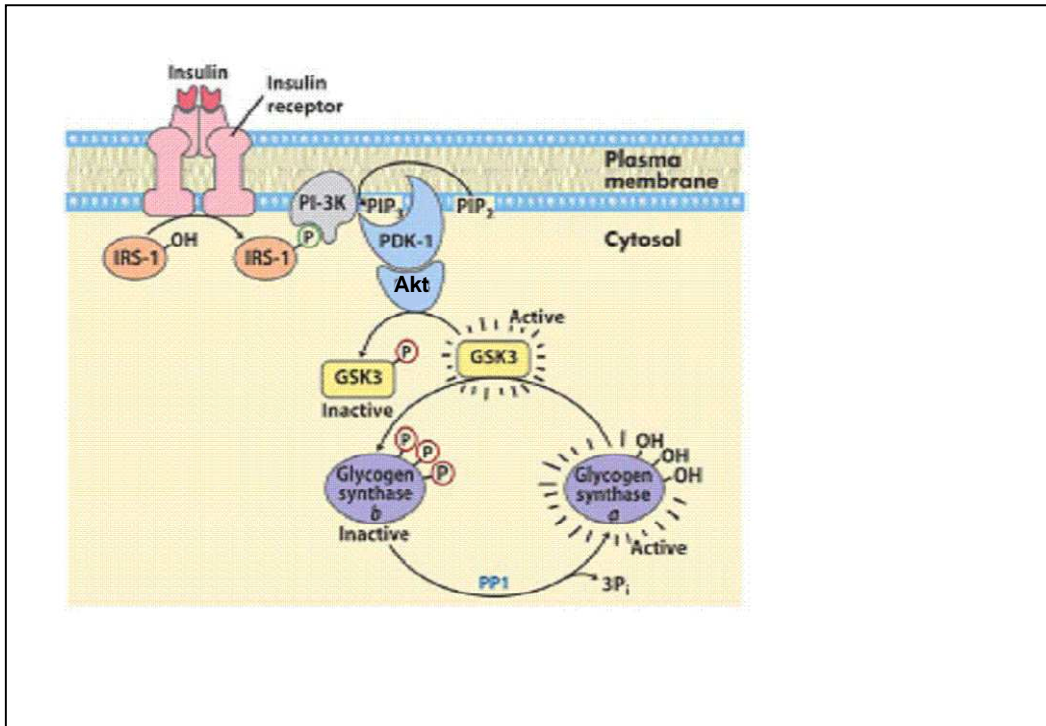
interagieren kann, hatte auch keinen Einfluss auf die Akt-Kinase-Aktivität (Du et al., 2003).

AIP stellt sich demnach als sehr starker Stimulator für die Akt-Kinase-Aktivität dar, da selbst ohne Insulin-Stimulation die Kinase-Aktivität bei Überexpression von AIP maximal gesteigert war.

#### **4.5.3 Einfluss von AIP auf die GSK3-Phosphorylierung durch Akt**

Um die physiologischen Auswirkungen einer erhöhten Akt-Kinase-Aktivität zu belegen, wurde der Einfluss der AIP-Überexpression auf die Phosphorylierung des Akt-Substrats GSK3 untersucht. GSK3 ist im Signalweg distal von Akt bei der Transduktion des Insulin-Signals beteiligt. Wie der volle Name „Glykogen-Synthase-Kinase“ zeigt, handelt es sich um eine Kinase, die die Glykogensynthese beeinflusst. Die Glykogen-Synthase ist in phosphoryliertem Zustand weniger aktiv. Eine erhöhte Kinase-Aktivität der GSK3 führt demnach zu einer geringeren Glykogensynthese. Da auch GSK3 im nicht-phosphorylierten Zustand eine höhere Aktivität zeigt, führt eine erhöhte GSK3-Phosphorylierung über eine geringere Phosphorylierung der Glykogen-Synthase zu einer erhöhten Glykogensynthese (siehe Abbildung 4.1).





**Abb. 4.1. Aktivierung der Glykogen-Synthase.** Die Kaskade vom Insulin-Signal an der Zelloberfläche zur Glykogen-Synthase wird durch die schon beschriebene Aktivierung von Akt vermittelt. Akt phosphoryliert GSK3 und inaktiviert es so. Dadurch wird weniger Glykogensynthase phosphoryliert. Da die Glykogensynthase im dephosphorylierten Zustand aktiv ist, steigt die Glykogensynthase. Quelle: [http://homepage.smc.edu/schwyster\\_deborah/glycogen%20synthase\\_files/image002.gif](http://homepage.smc.edu/schwyster_deborah/glycogen%20synthase_files/image002.gif)

Die Phosphorylierung von GSK3 wurde mit phosphospezifischen Antikörpern in nicht-transfizierten sowie in AIP stabil überexprimierenden Zellen mit Insulinstimulation in verschiedenen Konzentrationen nachgewiesen. In den nicht-transfizierten Zellen war die Abhängigkeit der GSK3-Phosphorylierung von der Insulin-Stimulation deutlich ausgeprägt. In den AIP-überexprimierenden Zellen war GSK3 schon ohne Insulin-Stimulation nahezu maximal phosphoryliert, eine Steigerung durch Insulin-Stimulation konnte nicht nachgewiesen werden. AIP führte demnach nicht nur zu einer maximalen Steigerung der Akt-Phosphorylierung, sondern auch der GSK3-Phosphorylierung. Durch eine Inaktivierung der GSK3 kommt es somit zu einer Dephosphorylierung der

Glykogensynthese durch Proteinphosphatase 1 und einer gesteigerten Glykogensynthese.

Bemerkenswert ist auch, dass sich das Molekulargewicht von GSK3 bei Überexpression von AIP verändert. In beiden getesteten AIP-überexprimierenden Zell-Linien stellte sich phospho-GSK3 kleiner dar als in den nicht-transfizierten Kontroll-Zellen. Die Ursache dieses Phänomens und seine Bedeutung sind noch nicht geklärt und müssen noch weiter untersucht werden.

Der Einfluss von AIP auf die Phosphorylierung von GSK3 wurde auch von Anai et al. (2005) untersucht. Wurde AIP mittels eines Adenovirus-Systems in HepG2-Zellen transient überexprimiert, war auch hier eine deutliche Erhöhung der GSK3-Phosphorylierung nachweisbar. Allein die Überexpression von AIP erhöhte die phospho-GSK3-Level in ähnlicher Weise wie eine Insulin-Stimulation nicht-transfizierter Zellen. Bezüglich der Validität der Ergebnisse müssen Einschränkungen gemacht werden, da es sich um AIP transient überexprimierende Zellen handelt.

Auch für andere Akt-interagierende Proteine wurde die Phosphorylierung von GSK3 als einem der wichtigsten Substrate für Akt untersucht. Bei Überexpression von hFt1, das ebenfalls als Akt-aktivierendes Protein beschrieben wurde, war sowohl die basale GSK3-Phosphorylierung als auch die Phosphorylierung nach Stimulation mit Serum erhöht (Remy und Michnick, 2004).

Für CTMP wurde eine Erhöhung der GSK3-Phosphorylierung bei Transfektion der Zellen mit siRNA für das entsprechende Protein beschrieben. Das Protein selbst verringert also die GSK3-Phosphorylierung. Zusätzlich wurde noch nachgewiesen, dass die PI3K-Aktivität in den mit siRNA für CTMP transfizierten Zellen unverändert war. Die Steigerung der GSK3-Phosphorylierung muss demnach durch Veränderung der Signaltransduktion distal von PI3K ausgelöst werden. Eine Änderung der Akt-Aktivität könnte diesen Ergebnissen entsprechen (Maira et al., 2001).

In einem System für transiente Überexpression von TRB3 mit Adenoviren, wurde eine verminderte GSK3-Phosphorylierung nachgewiesen. In Kontroll-Zellen und in

Zellen, die die Defekt-Mutante des Proteins überexprimierten, wurde keine Veränderung der GSK3-Phosphorylierung beobachtet. TRB3 hemmt somit die GSK3-Phosphorylierung (Du et al., 2003).

#### **4.5.4 Einfluss von AIP auf die Glykogensynthese**

Da AIP einen positiven Einfluss auf Akt hat, und zu einer erhöhten GSK3-Phosphorylierung und damit zu einer GSK3-Inhibition führt, erwartete man einen positiven Einfluss von AIP auf die Glykogensynthese. Für die AIP stabil überexprimierenden Zellen ergab sich insgesamt eine höhere Glykogensynthese als in den nicht-transfizierten Zellen. Es bestand jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen der Insulin-Stimulation und der Glykogensynthese in AIP überexprimierenden Zellen. Während es bei einer Stimulation mit 1 nmol / l Insulin zu einer Steigerung kam, führte eine Stimulation mit höheren Konzentrationen zur Abnahme der Glykogensynthese. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die maximale Effizienz der Stimulation bei 1 nmol / l Insulin erreicht war, eine Stimulation mit höheren Konzentrationen führt wahrscheinlich zu einer Selbstlimitierung der Stimulation. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für die Akt-Aktivierung bei Insulin-Stimulation beschrieben (Kohn et al., 1995). Diskutiert wurde unter anderem eine negative Rückkopplung mit der Phosphorylierung des Insulin-Rezeptors, die zu einer Verminderung der Insulin-Signaltransduktion führt (Tian, 2005).

Bei der Interpretation muss auch berücksichtigt werden, dass ähnlich wie bei der Akt- und der GSK3-Phosphorylierung verglichen mit den nicht-transfizierten Zellen schon ohne Insulin-Stimulation sehr hohe Raten an Glykogensynthese gemessen wurden. Auch die unphysiologisch hohe Insulin-Stimulation (normale Basalwerte im Serum 18 – 30 pmol / l) und die unphysiologisch erhöhte AIP-Konzentration in den überexprimierenden Zellen kann eine Ursache der unerwarteten Abnahme der Glykogensynthese bei Insulin-Stimulation AIP überexprimierender Zellen sein.

Als physiologische Endstrecke des Insulinsignalwegs ist die Glykogensynthese ein Prozess, der durch AIP ebenso stark beeinflusst wird wie die Akt-Aktivität und die GSK3-Phosphorylierung.

Die direkte Auswirkung einer AIP-Überexpression auf die Glykogensynthese zeigt den Einfluss von AIP auf den Glukosemetabolismus der Zellen und bringt AIP mit dem Krankheitsbild der Insulin-Resistenz und des Diabetes mellitus Typ 2 in Verbindung. Fehlt AIP oder ist die Konzentration vermindert, wird das Insulin-Signal nicht in voller Höhe weitergegeben, Insulin-Wirkungen wie die Glykogensynthese werden nur in geringerem Maß aktiviert. Das könnte einer Insulin-Resistenz entsprechen.

Der hier aufgezeigte Signalweg von der Akt-Phosphorylierung über Akt-Kinase-Aktivität, GSK3-Phosphorylierung und Glykogensynthese ist einer der Hauptsignalwege, der für die Entstehung der Insulin-Resistenz und des Diabetes mellitus Typ 2 verantwortlich gemacht werden (Tian, 2005). Der starke Einfluss, den AIP auf diesen Signalweg hat, macht es wahrscheinlich, dass dieses neue Akt-interagierende Protein auch einen Einfluss auf die Entstehung der Insulin-Resistenz hat.

Weitere Hinweise auf einen Einfluss von AIP auf die Insulinsensitivität von Muskelzellen könnte die Bestimmung der Expression von AIP in primären Muskelzellkulturen von Patienten mit Insulinresistenz und gesunden Kontroll-Personen ergeben.

## **5. Zusammenfassung**

Die gestörte Insulin-Signaltransduktion bei Diabetes mellitus Typ 2, einer der häufigsten und schwerwiegendsten Krankheiten in der westlichen Welt, ist bis heute nur in den Grundzügen verstanden. Ein genaueres Verständnis dieser Mechanismen könnte zu einem kausalen Therapie-Ansatz führen.

AIP wurde im Hefe-2-Hybrid-System als Interaktionspartner von Akt, einer entscheidenden Kinase im Insulin-Signalweg, gefunden. In der Datenbankanalyse

ergab sich ein Offenes Leseraster von 5364 Basenpaaren, das Protein ist entsprechend 1788 Aminosäuren lang (206 kDa). Hinweise auf Homologien zu einer ATP-bindenden Domäne, einer HOOK-Domäne und einer v-SNARE-Domäne ergaben eine mögliche Assoziation des Proteins mit Mikrotubuli und Aktin-Filamenten, sowie eine Funktion im Vesikeltransport. Das Protein wird ubiquitär exprimiert.

Nach Klonierung eines vollständigen Konstrukts und eines Konstrukts mit VSV-Sequenz wurde die Interaktion von AIP und Akt nachgewiesen.

Die funktionelle Charakterisierung des neuen Proteins AIP ergab einen positiven Einfluss von AIP auf die Signaltransduktion von Akt zur Glykogensynthese. AIP steigert die Akt-Phosphorylierung und Akt-Kinase-Aktivität, die GSK3-Phosphorylierung wird verstärkt und es kommt zu einer gesteigerten Glykogensynthese. AIP hat demnach einen stark positiven Einfluss auf die Insulin-Signaltransduktion und könnte ein weiterer Schritt zu einem genaueren Verständnis dieses Signalwegs und einem kausalen Therapie-Ansatz für Diabetes mellitus Typ 2 sein.

In anderen Arbeiten, die AIP als neues Protein charakterisierten, wurden weitere Funktionen des Proteins beschrieben, unter anderem eine Beteiligung von AIP an Apoptose-Induktion durch DNA-Synthese-Induktion, Mikrotubuli- und Aktin-assoziierten Prozessen sowie dem Vesikeltransport.

## Literaturverzeichnis

**Acuto O, Mise-Omata S, Mangino G, Michel F.** Molecular modifiers of T cell antigen receptor triggering threshold: the mechanism of CD28 costimulatory receptor. *Immunol Rev* **192**, 21-31 (2003)

**Biggs WH 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC.** Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96(13)**, 7421-6 (1999)

**Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **24;7(6)**, 1513-23 (1979)

**Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA.** Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* **29(5)**, 233-42 (2004)

**Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME.** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96(6)**, 857-68 (1999)

**Cenni V, Sirri A, Riccio M, Lattanzi G, Santi S, de Pol A, Maraldi NM, Marmiroli S.** Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton. *Cell Mol Life Sci* **60(12)**, 2710-20 (2003)

**Chen C, Okayama H.** High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7(8)**, 2745-52 (1987)

**Chen HK, Fernandez-Funez P, Acevedo SF, Lam YC, Kaytor MD, Fernandez MH, Aitken A, Skoulakis EM, Orr HT, Botas J, Zoghbi HY.** Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* **113(4)**, 457-68 (2003)

**Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN, Testa JR.** AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89(19)**, 9267-71 (1992)

**Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR.** Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93(8)**, 3636-41 (1996)

**Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378(6559)**, 785-9 (1995)

**Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME.** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91(2)**, 231-41 (1997)

**Decker T, Kovarik P.** Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19(21)**, 2628-37 (2000)

**Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S.** Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95(19)**, 11211-6 (1998)

**Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH.** Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem* **272(28)**, 17269-75 (1997)

**Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M.** TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* **300(5625)**, 1574-7 (2003)

**Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA.** Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **279(39)**, 41189-96 (2004)

**Figuroa C, Tarras S, Taylor J, Vojtek AB.** Akt2 negatively regulates assembly of the POSH-MLK-JNK signaling complex. *J Biol Chem* **278(48)**, 47922-7 (2003)

**Hjelm K, Mufunda E, Nambozi G, Kemp J.** Preparing nurses to face the pandemic of diabetes mellitus: a literature review. *J Adv Nurs* **41(5)**, 424-34 (2003)

**Humbert S, Bryson EA, Cordelieres FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S, Greenberg ME, Saudou F.** The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* **2(6)**, 831-7 (2002)

**Ishiki M, Klip A.** Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology* **146(12)**, 5071-8 (2005)

**Jones PF, Jakubowicz T, Hemmings BA.** Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul* **2(12)**, 1001-9 (1991)

**Kane LP, Weiss A.** The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3. *Immunol Rev* **192**, 7-20 (2003)

**Kawakami Y, Nishimoto H, Kitaura J, Maeda-Yamamoto M, Kato RM, Littman DR, Leitges M, Rawlings DJ, Kawakami T.** Protein kinase C beta1 regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J Biol Chem* **279(46)**, 47720-5 (2004) Erratum in: *J Biol Chem* **280(9)**, 8628 (2005)

**Kim AH, Sasaki T, Chao MV.** Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron* **35(4)**, 697-709 (2002)

**Kohn AD, Kovacina KS, Roth RA.** Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *EMBO J* **14(17)**, 4288-95 (1995)

**Kops GJ, Burgering BM.** Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med* **77(9)**, 656-65 (1999)

**Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G.** A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* **47(1)**, 69-85 (1970)

**Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seeböhm G, Strutz-Seeböhm N, Vallon V.** (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev* **86(4)**, 1151-78 (2006)

**Leevers SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD.** Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* **11(2)**, 219-25 (1999)

**Maehama T, Dixon JE.** PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* **9(4)**, 125-8 (1999)

**Maira SM, Galetic I, Brazil DP, Kaech S, Ingley E, Thelen M, Hemmings BA.** Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science* **294(5541)**, 374-80 (2001)

**McClarín JA, Frederick CA, Wang BC, Greene P, Boyer HW, Grable J, Rosenberg JM.** Structure of the DNA-Eco RI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science* **234(4783)**, 1526-41 (1986)

**Mirza AM, Kohn AD, Roth RA, McMahon M.** Oncogenic transformation of cells by a conditionally active form of the protein kinase Akt/PKB. *Cell Growth Differ* **11(6)**, 279-92 (2000)



**Mullis KB.** Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* **48(8)**, 579-82 (1990)

**Na SY, Patra A, Scheuring Y, Marx A, Tolaini M, Kioussis D, Hemmings BA, Hunig T, Bommhardt U.** Constitutively active protein kinase B enhances Lck and Erk activities and influences thymocyte selection and activation. *J Immunol* **171(3)**, 1285-96 (2003)

**Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, Priddle H, Sancho S, Peskett E, Pearce W, Meek SE, Salpekar A, Waterfield MD, Smith AJ, Vanhaesebroeck B.** Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* **297(5583)**, 1031-4 (2002)

**Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB.** NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401(6748)**, 82-5 (1999)

**Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA.** Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signalling pathway. *EMBO J* **18(11)**, 3024-33 (1999)

**Partovian C, Simons M.** Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase C $\alpha$  in endothelial cells. *Cell Signal* **16(8)**, 951-7 (2004)

**Rangone H, Pardo R, Colin E, Girault JA, Saudou F, Humbert S.** Phosphorylation of arfaptin 2 at Ser260 by Akt Inhibits PolyQ-huntingtin-induced toxicity by rescuing proteasome impairment. *J Biol Chem* **280(23)**, 22021-8 (2005)

**Remy I, Michnick SW.** Regulation of apoptosis by the Ft1 protein, a new modulator of protein kinase B/Akt. *Mol Cell Biol* 1493-504 (2004)

**Righetti PG.** Recent developments in electrophoretic methods. *J Chromatogr*, **516(1)**, 3-22 (1990)

**Romashkova JA, Makarov SS.** NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401(6748)**, 86-90 (1999)

**Saltiel AR, Kahn CR.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414(6865)**, 799-806 (2001)

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74(12)**, 5463-7 (1977)

**Scheid MP, Woodgett JR.** PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2(10)**, 760-8 (2001)

**Simpson F, Martin S, Evans TM, Kerr M, James DE, Parton RG, Teasdale RD, Wicking C.** A novel hook-related protein family and the characterization of hook-related protein 1. *Traffic* **6(6)**, 442-58 (2005)

**Sinha D, Bannerjee S, Schwartz JH, Lieberthal W, Levine JS.** Inhibition of ligand-independent ERK1/2 activity in kidney proximal tubular cells deprived of soluble survival factors up-regulates Akt and prevents apoptosis. *J Biol Chem* **279(12)**, 10962-72 (2004)

**Staal SP, Huebner K, Croce CM, Parsa NZ, Testa JR.** The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics* **2(1)**, 96-8 (1988)

**Staal SP.** Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84(14)**, 5034-7 (1987)

**Tian R.** Another role for the celebrity: Akt and insulin resistance. *Circ Res* **96(2)**, 139-40 (2005)

**Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* **24**, 145-9 (1992)

**Van den Heuvel AP, de Vries-Smits AM, van Weeren PC, Dijkers PF, de Bruyn KM, Riedl JA, Burgering BM.** Binding of protein kinase B to the plakin family member periplakin. *J Cell Sci* **115(Pt 20)**, 3957-66 (2002)

**Wang Q, Liu L, Pei L, Ju W, Ahmadian G, Lu J, Wang Y, Liu F, Wang YT.** Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron* **38(6)**, 915-28 (2003)

**Ward SG, Reif K, Ley S, Fry MJ, Waterfield MD, Cantrell DA.** Regulation of phosphoinositide kinases in T cells. Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase is not a substrate for T cell antigen receptor-regulated tyrosine kinases. *J Biol Chem* **267(33)**, 23862-9 (1992)

**Weyrich P, Kapp K, Niederfellner G, Melzer M, Lehmann R, Haring HU, Lammers R.** Partitioning-defective protein 6 regulates insulin-dependent glycogen synthesis via atypical protein kinase C. *Mol Endocrinol* **18(5)**, 1287-300 (2004)

**Wu LX, La Rose J, Chen L, Neale C, Mak T, Okkenhaug K, Wange R, Rottapel R.** CD28 regulates the translation of Bcl-xL via the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway. *J Immunol* **174(1)**, 180-94 (2005)

**Yale JF.** Prevention of type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl* **(113)**, 35-9 (2000)

**Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dummler B, Hynx D, Hemmings BA.** Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem Soc Trans* **32(Pt 2)**, 350-4 (2004)

**Zimmermann S, Moelling K.** Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* **286(5445)**, 1741-4 (1999)

## Lebenslauf:

**Name:** Franziska Eckert

**Geburtsdatum:** 05. 09. 1980

**Geburtsort:** Traunstein

**Familienstand:** ledig

**Schulbildung:** 1987 – 1991 Ludwig-Thoma-Schule in Traunstein  
1991 – 1999 Chiemgau-Gymnasium Traunstein

**Studium:** seit 2000 Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen  
August 2002 Physikum  
August 2003 1. Staatsexamen  
April 2006 2. Staatsexamen  
05. Juni 2007 3. Staatsexamen  
Freisemester WS 2003/2004 für wissenschaftliche Arbeiten

**Stipendien:** Förderung nach dem BayBFG 2000 – 2003, 2004 – 2007  
e-fellows-Internet-Stipendium seit 2000  
Förderung durch die DFG (Graduiertenkolleg „Zelluläre  
Mechanismen immunassoziierter Prozesse“) 2003 - 2004