

**Die Identifizierung von Girdin als wichtiger Mediator
des Insulinsignalweges und als ein neues
14-3-3-Bindungsprotein**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Angelika Hartung
aus Neuruppin

Tübingen

2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

27.06.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Reiner Lammers

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Reiner Lammers gilt mein großer Dank für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe die vorliegende Arbeit anfertigen zu dürfen. Insbesondere danke ich ihm für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, für die Möglichkeit interessante Kongresse zu besuchen und viele neue Erfahrungen während meines Auslandsaufenthaltes in Schottland zu sammeln.

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Häring danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die Unterstützung und sein Interesse an meiner Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. Carol MacKintosh möchte ich mich ganz herzlich dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, einen Teil meiner Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe am MRC in Dundee (UK) durchführen zu können sowie für die sehr gute Betreuung. Ebenfalls bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Carol MacKintosh für die Beratung bei der praktischen Durchführung der Arbeit, die Bereitstellung von Daten, die vielen konstruktiven Diskussionen und die Bewältigung der alltäglichen kleinen Probleme.

Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff danke ich dafür, dass er es mir ermöglicht hat, an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen zu promovieren und für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ganz besonders möchte ich mich bei Anna-Maria Ordelleide, Benedikt Podhorny, Gabriele Kaiser, Martina Melzer, Mary-Ann Schneider und Norbert Krebs für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre bedanken. Sie haben meine „Tübinger Zeit“ zu einer unvergesslichen werden lassen und sind mir zu tollen Freunden geworden, die ich nie wieder missen möchte.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Mutter und meinem Freund für ihre Unterstützung, ihre unendliche Geduld und gutes Zureden in schwierigen Situationen.

-Danke-

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Insulin und der Insulinrezeptor	1
1.2	Die Insulinsignalkaskade	3
1.3	Regulierung von zellulären Prozessen durch Akt	4
1.4	Die Girdin-Proteinfamilie	8
1.5	Die Funktionen von Girdin in der Zelle	10
1.6	14-3-3-Proteine	11
1.6.1	Die Entdeckung von 14-3-3-Proteinen	11
1.6.2	Die Struktur von 14-3-3-Proteinen und ihre Konsensussequenzen	11
1.6.3	Die Funktionen von 14-3-3-Proteinen	13
2	ZIELSETZUNG	16
3	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1	Material	17
3.1.1	Oligonukleotide für quantitative <i>real time</i> PCR	18
3.1.2	<i>E. coli</i> Stämme	18
3.1.3	Expressionsvektoren	18
3.1.4	Zelllinien	20
3.1.5	Antikörper	20
3.1.6	Puffer und Stammlösungen	24
3.1.6.1	Molekularbiologie	24
3.1.6.2	Kultivierungsmedien für Bakterien	24
3.1.6.3	Kultivierungsmedien für Zellen	25
3.1.6.4	Transfektionslösung	26
3.1.6.5	Proteinbiochemie	26
3.1.6.6	Massenspektrometrische Analysen	28
3.1.6.7	FACS (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)-Analysen	29
3.1.6.8	Radiochemische Analysen	29
3.2	Methoden	29
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	29
3.2.1.1	Transformation von Plasmiden in Bakterien	29
3.2.1.2	Präparation von DNA aus Bakterien, Konzentrationsbestimmung und Restriktionsverdau	30
3.2.1.3	Auftrennung der DNA durch Gelelektrophorese	31
3.2.2	Zellkulturtechniken	31
3.2.2.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	31
3.2.2.2	Transfektion von Säugerzellen	32
3.2.2.3	Girdin <i>knockdown</i> durch RNA-Interferenz	33

3.2.2.4	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen	33
3.2.3	Proteinbiochemie	33
3.2.3.1	Stimulierung von Zellen mit Aktivatoren und Inhibitoren	33
3.2.3.2	Zellyse mit Triton X-100	34
3.2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	35
3.2.3.4	Immunpräzipitation	35
3.2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	35
3.2.3.6	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen und anschließende Detektion (Western Blot-Methode)	36
3.2.3.7	Herstellung der DIG-gekoppelten 14-3-3-Probe für den 14-3-3 Far-Western	37
3.2.3.8	14-3-3 Far-Western-Methode	37
3.2.3.9	Massenspektrometrische Analysen	38
3.2.4	RNA- und miRNA-Analysen	38
3.2.4.1	Extraktion von Gesamt-RNA	38
3.2.4.2	Quantitative <i>real time</i> PCR	39
3.2.4.3	Bestimmung und Quantifizierung von miRNAs	40
3.2.5	FACS-Analysen	40
3.2.5.1	FACS-Untersuchungen auf oxidativen Stress	40
3.2.5.2	Zellzyklusanalysen	41
3.2.6	Physiologische Untersuchungen	41
3.2.6.1	Wachstumsanalyse von Zellen (WST-Analyse)	41
3.2.6.2	Messung der Glykogensynthese	42
3.2.6.3	Untersuchungen der Insulinrezeptorinternalisierung	42
3.2.7	Statistische Auswertungen der Daten	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Girdin – ein wichtiger Mediator im Insulinsignalweg	44
4.1.1	Girdin <i>knockdown</i> verringert die Insulinsensitivität von C2C12-Zellen	44
4.1.2	Stabile Überexpression von Girdin führt zu massiven Veränderungen in C2C12-Zellen	45
4.1.3	Zurücksetzung der Veränderungen im Insulinsignalweg in den Girdin-überexprimierenden Zellen durch <i>knockdown</i> von Girdin	49
4.1.4	Verstärkte IRS-1-Degradierung in den Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen	50
4.1.5	Überexpression von Girdin erhöht die Glykogensynthese	51
4.1.6	Girdin-Überexpression reduziert die Insulinrezeptorinternalisierung	52
4.1.7	Girdin-Überexpression führt zu einer konstitutiv aktivierten Abl-Tyrosinkinase	53
4.1.8	Überexpression von Girdin verändert die miRNA-Expression in C2C12-Zellen	56
4.1.9	Girdin – ein Parameter für die Insulinsensitivität im Menschen	57
4.1.10	Veränderungen der Expression und Phosphorylierung verschiedener Proteine durch die Überexpression von Girdin	59
4.1.11	Girdin hat keinen Einfluss auf die Proliferation von C2C12-Zellen	61
4.1.12	Girdin-Überexpression führt zu einer verringerten ROS-Bildung in den C2C12-Zellen	62
4.1.13	Die Akt-Phosphorylierungsstelle Serin 1417 hat keinen Einfluss auf die Effekte von Girdin in C2C12-Zellen	63

4.1.14	Girdin-Überexpression führt zu einer Aktivierung des G1/S-Überganges	65
4.2	Girdin – ein 14-3-3-Bindungsprotein	66
4.2.1	Regulation der 14-3-3-Bindung von Girdin	67
4.2.2	Analyse der 14-3-3-Bindungsstellen von Girdin	69
4.2.3	Die Girdin-Proteinfamilie ist eine 2R-Ohnologfamilie, der ein Ohnolog fehlt	75
4.3	Daple – ein 14-3-3-Bindungsprotein	76
4.3.1	Analyse der 14-3-3-Bindungsstellen von Daple	77
4.4	Ähnlichkeiten in der Regulation der 14-3-3-Bindung in der Girdin-Proteinfamilie	81
5	DISKUSSION	83
5.1	Girdin-Expression reguliert die Insulinsensitivität in Muskelzellen	83
5.2	Girdin-Überexpression in C2C12-Zellen führt zur Modifikation des IRS-1-Proteins	84
5.3	Girdin-Überexpression führt zu einer erhöhten Expression des Insulinrezeptors	86
5.4	Girdin stimuliert den metabolischen Signalweg über die Aktivierung von c-Abl in C2C12-Zellen	87
5.5	Girdin-Überexpression verändert die Energieaufrechterhaltung der C2C12-Zellen	88
5.6	Veränderungen des Insulinsignalweges durch Girdin sind unabhängig von der Akt-Phosphorylierungsstelle Serin 1417	89
5.7	Girdin-Überexpression führt zu Veränderungen im Zellzyklus, ohne dabei die Proliferation von C2C12-Zellen zu beeinflussen	89
5.8	Girdin-Überexpression reduziert die ROS-Produktion und verbessert die ROS-Abwehr der C2C12-Zellen	91
5.9	Die Mitglieder der Girdin-Proteinfamilie sind 14-3-3-Bindungsproteine	92
5.10	Serin 1887 ist die Haupt-14-3-3-Bindungsstelle von Daple	94
5.11	Hypothese zur Regulation der 14-3-3-Bindungsstellen von Girdin	95
6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	ANHANG	99
8	LITERATURVERZEICHNIS	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung des Insulinrezeptors	1
Abbildung 1.2:	Graphische Darstellung des Insulin- und IGF-1-Rezeptors und ihrer Hybridrezeptoren	2
Abbildung 1.3:	Der Insulinsignalweg	4
Abbildung 1.4:	Die Funktion von 10 wichtigen Akt-Substraten	5
Abbildung 1.5:	Die Struktur von Girdin, Daple und Gipi	9
Abbildung 1.6:	Kristallstruktur eines 14-3-3-Dimers	13
Abbildung 4.1:	Girdin <i>knockdown</i> verringert die Insulinsensitivität in C2C12-Zellen	45
Abbildung 4.2:	Girdin-Überexpression in C2C12-Zellen führt zu massiven Veränderungen	46
Abbildung 4.3:	Auswirkungen auf die IR-Signalkaskade nach Überexpression von Girdin in C2C12-Zellen	48
Abbildung 4.4:	Degradierung von IRS-1	50
Abbildung 4.5:	Überexpression von Girdin in C2C12-Zellen führt zu einer Erhöhung der Glykogensynthese	52
Abbildung 4.6:	Girdin-Überexpression reduziert die Internalisierung des IR	53
Abbildung 4.7:	Girdin-Überexpression führt zu einer konstitutiven Phosphorylierung von c-Abl	54
Abbildung 4.8:	c-Abl-Inhibierung durch STI-571	55
Abbildung 4.9:	Erhöhte Expression von Cav-1 führt zu einer Zunahme in der Insulinsensitivität in Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen	57
Abbildung 4.10:	Girdin-Expression im Muskel korreliert mit der Insulinsensitivität	58
Abbildung 4.11:	Girdin hat keinen Einfluss auf das Zellwachstum/Proliferation	62
Abbildung 4.12:	Girdin-Überexpression reduziert die ROS-Produktion und verbessert die ROS-Abwehr	63
Abbildung 4.13:	Mutiertes Girdin (S1417A) bewirkt die gleichen Veränderungen wie Wildtyp-Girdin in C2C12-Zellen	64
Abbildung 4.14:	Veränderungen des Zellzyklus durch Girdin-Überexpression	65
Abbildung 4.15:	Girdin ist ein 14-3-3-Bindungsprotein	66
Abbildung 4.16:	Regulation der 14-3-3-Bindung von Girdin	68
Abbildung 4.17:	Massenspektrometrische Analysen von Girdin	70
Abbildung 4.18:	Identifizierung der 14-3-3-Bindungsregionen in Girdin	72

Abbildung 4.19: Mögliche 14-3-3-Bindungsstellen von Girdin	74
Abbildung 4.20: Syntenieanalysen der Girdin-Proteinfamilie	75
Abbildung 4.21: Regulation der 14-3-3-Bindung von Daple	76
Abbildung 4.22: Massenspektrometrische Analysen von Daple	77
Abbildung 4.23: Girdins Akt-Phosphorylierungsstelle S1417 ist hoch konserviert	79
Abbildung 4.24: Mutationen von möglichen 14-3-3-Bindungsstellen von Daple	80
Abbildung 4.25: Regulation der 14-3-3-Bindung in der Girdin-Proteinfamilie	82
Abbildung 7.1: Densitometrische Auswertung der Girdin-Proteinexpression	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konzentration und Hersteller der Inhibitoren und Aktivatoren	34
Tabelle 2: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	36
Tabelle 3: Zusammenfassung von Western Blot-Analysen einiger Proteine und ihre Expression und Phosphorylierung	60
Tabelle 4: Analyse der Phosphorylierungs- und möglichen 14-3-3-Bindungsstellen von Girdin	71
Tabelle 5: Analyse der Phosphorylierungs- und möglichen 14-3-3-Bindungsstellen von Daple	79

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
A-23187	Kalziumionophor
A-769662	AMP-Analog
ACC	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>
AGC-Kinasen	<i>Protein kinase A, Protein kinase C, Guanosine monophosphate-dependent protein kinase</i>
AK	Antikörper
Akt	<i>Protein kinase B</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AS	Aminosäuren
AS160	<i>Akt substrate of 160 kDa</i>
BAD	<i>B-cell lymphoma 2 associated protein of cell death</i>
BES	N-N-Bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethan-Sulfansäure
BI-D1870	RSK-Inhibitor
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c-Abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
CAMK	Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase
Cav-1	Caveolin-1
cDNA	komplementäre DNA
cpm	<i>counts per minutes</i>
CrkII	<i>avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog</i>
C-Terminus, C-terminal	Carboxyterminus, carboxyterminal
Daple	<i>Dvl-associating protein with a high frequency of leucine residues</i>
DIG	Digoxigenin
DIG-NHS	Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSTT	<i>Division of Signal Transduction Therapy</i>
DTT	Dithiothreitol
Dvl	<i>Dishevelled</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
eNOS, NOS	<i>(Endothelial) nitric oxid synthase</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk1/2	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases 1/2</i>
Exp.	Exposition (Belichtungszeit)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)

FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fötale Kälberserum
FOXO	<i>Forkhead-box O transcription factor</i>
FSK	Forskolin
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Girdin	<i>Girders of actin filament</i>
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
G α i	<i>inhibitory α-subunit of heterotrimeric G proteins</i>
H-89	PKA-Inhibitor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HkRP1/2/3	<i>Hook related protein 1/2/3</i>
HR	Hybridrezeptor
HRP/POD	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IGF-1/ IGF-2	<i>Insulin like growth factor 1 / 2</i>
IGF-1R	<i>Insulin like growth factor 1 receptor</i>
IKK	<i>I-kappa-B kinase</i>
Ins	Insulin
IP	Immunpräzipitation
IR	Insulinrezeptor
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
kb	Kilobasen
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
miRNA/mir	micro RNA
mmu	<i>mus musculus</i>
mRNA	Boten-(messenger-) RNA
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1/2	<i>mammalian target of rapamycin complex 1/2</i>
MWM	<i>Molecular weight marker</i>
Myc	<i>Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>
N-Terminus, N-terminal	Aminoterminus, aminoterminal
OD	Optische Dichte
p-	phospho-
p110	<i>PI3K catalytic subunit</i>
p70/p85 S6K	<i>p70/p85 ribosomal S6 kinase</i>
p85	<i>PI3K regulatory subunit</i>
p90RSK	<i>p90 ribosomal S6 kinase</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	<i>phospho-Akt substrate</i>
PBS	phosphatgepufferte, physiologische Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent-kinase-1</i>
PH-Domäne	<i>Pleckstrin-homology-Domäne</i>
PI-103	PI3K-Inhibitor
PI3K	<i>Phosphatidylinositide 3-kinase</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphat

PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PKA	<i>Protein kinase A/ cAMP-dependent protein kinase</i>
PKB	<i>Protein kinase B (Akt)</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10</i>
PY	Phosphotyrosin
qPCR	quantitative PCR
Raf	<i>Rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RAU	<i>Relative Arbitrary Units</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel
Shc	<i>Src homologous and collagen</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
STI-571	c-Abl-Inhibitor
TSC1/2	<i>Tuberous Sclerosis Complex 1/2</i>
Vasp	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
vsv	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
WT	Wildtyp
X	beliebige Aminosäure
α	anti-

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen eingegangen:

Angelika Hartung, Anna-Maria Ordelleide, Harald Staiger, Martina Melzer, Hans-Ulrich Häring, Reiner Lammers. The Akt substrate Girdin is a regulator of insulin sensitivity in myoblast cells. (Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research *in press*)

Poster:

Angelika Hartung, Hans-Ulrich Häring, Reiner Lammers. The role of the Akt substrate APE (Girdin, GIV) in insulin signaling. Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Denver, CO – 2011

Angelika Hartung, Hans-Ulrich Häring, Reiner Lammers. The role of the Akt substrate APE (Girdin, GIV) in insulin signaling. XI International Symposium on Insulin Receptors and Insulin Action, Neapel, Italien – 2010

1 Einleitung

1.1 Insulin und der Insulinrezeptor

Glukose ist die wichtigste Energiequelle des Körpers. Der Blutglukosespiegel im menschlichen Körper liegt zwischen 4,4 und 6,6 mM und wird hormonell über die Ausschüttung von Insulin und Glukagon gesteuert, die beide zu der Klasse der Polypeptidhormone gehören. Insulin wird von den β -Zellen und Glukagon von den α -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas sekretiert. Eine Erhöhung der Blutglukose führt zur Stimulation der Insulinausschüttung und bewirkt somit eine erhöhte Glukoseaufnahme der Leber-, der Skelettmuskel- und der Fettzellen (Matschinsky et al., 1990). Dieser biologische Effekt wird via Aktivierung des Insulinrezeptors (IR) durch Insulinbindung hervorgerufen: Der IR ist in nahezu allen Geweben von Wirbeltieren exprimiert, wobei die Anzahl je nach Gewebe von 40 bis zu 200.000 Rezeptoren pro Zelle variiert (White, 1997). Der IR ist ein Glykoprotein, das zu der Klasse der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) gehört. Das Rezeptorgen liegt auf dem humanen Chromosom 19 mit einer Länge von 150 kb und 22 Exons (Seino et al., 1990). Der Rezeptor besteht aus zwei extrazellulären α - und zwei transmembranen β -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abbildung 1.1). Das ausgereifte Heterotetramer hat ein Molekulargewicht von ca. 300 bis 400 kDa, wobei eine einzelne Ligand-bindende α -Untereinheit ca. 130 kDa und die β -Untereinheit, welche die Tyrosinkinasedomäne beinhaltet, ca. 97 kDa groß ist.

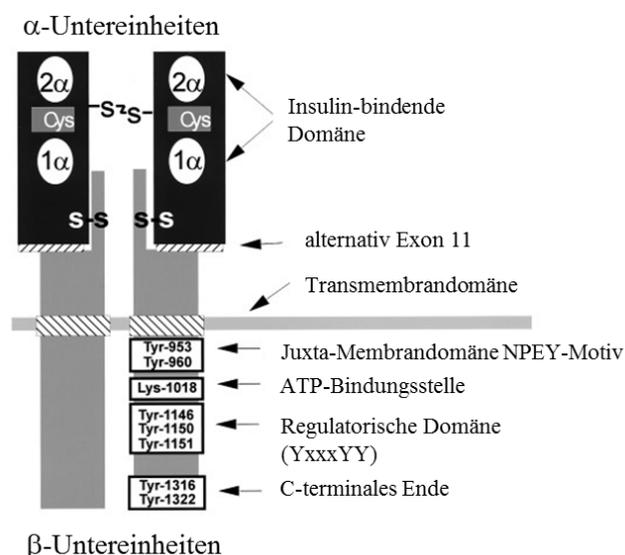


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Insulinrezeptors (angelehnt an White, 1997)

Der IR besteht aus zwei extrazellulären α -Untereinheiten und zwei transmembranen β -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Insulinbindungsstellen befinden sich an den α -Untereinheiten. Die Plasmamembran wird durch eine horizontale Linie dargestellt. Die Autophosphorylierungsstellen der β -Untereinheiten sind gekennzeichnet. Das Exon 11 wird Isoform-spezifisch exprimiert.

Beide Untereinheiten entstehen durch proteolytische Spaltung des Insulinprorezeptors. Zusätzlich führt alternatives Splicing zu zwei verschiedenen Isoformen, die sich durch 12 carboxyterminale (C-terminale) Aminosäuren (AS; Exon 11) der α -Untereinheit unterscheiden. Die Isoform A, welche kein Exon 11 besitzt, zeigt eine erhöhte Expression in fötalem und Krebsgewebe. Diese wird neben Insulin auch durch IGF-2 (*Insulin like growth factor 2*) aktiviert, was zu einem mitogenen Signal in der Zelle führt. Die Isoform B (+ Exon 11) wird hingegen nur durch Insulin aktiviert, das ein mehr metabolisches Signal hervorruft (Frasca et al., 1999; Belfiore et al., 2009). Zu der IR-Familie gehören noch zwei weitere strukturähnliche Proteine, der IGF-1R (*Insulin like growth factor 1 receptor*) und der IRR (*Insulin receptor-related receptor*; Shier und Watt, 1989). Die AS-Sequenzen dieser Proteine sind zu 80 % identisch, wobei die extrazellulären Domänen eine deutlich geringere Homologie aufweisen, was die unterschiedlichen Präferenzen der Liganden erklärt (White, 1997).

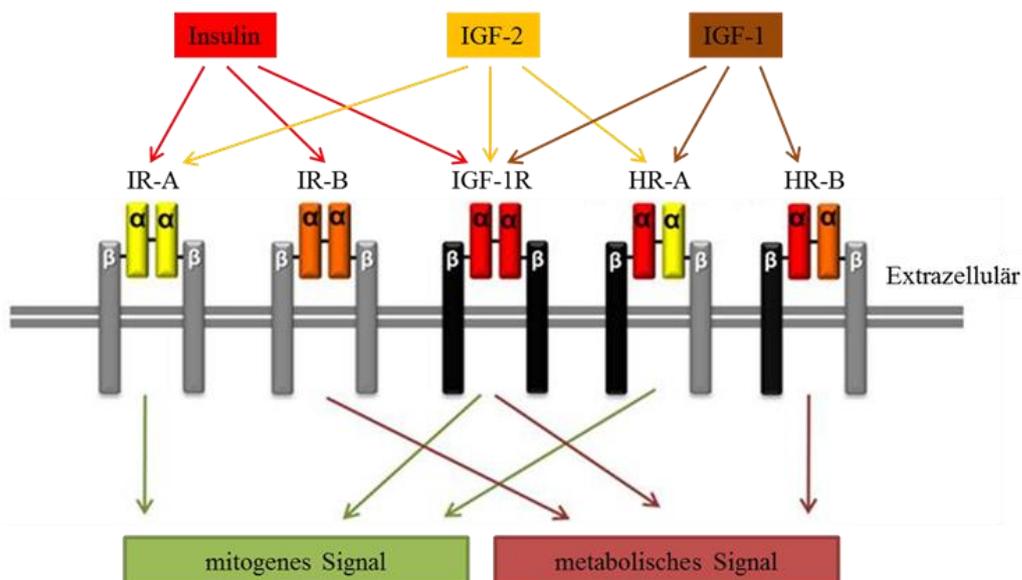


Abbildung 1.2: Graphische Darstellung des Insulin- und IGF-1-Rezeptors und ihrer Hybridrezeptoren (angelehnt an Braun et al., 2011)

Es sind die unterschiedlichen Rezeptoren und ihre Liganden Insulin, IGF-1 bzw. IGF-2 gezeigt. Zusätzlich sind deren weiterführende Signalwege mit Pfeilen gekennzeichnet. HR-A - Hybridrezeptor IGF-1R und IR-A; HR-B - Hybridrezeptor IGF-1R und IR-B

In Zellen, die den IR und den IGF-1R exprimieren, kommt es aufgrund ihrer starken Homologie zur Formation von Hybridrezeptoren (HR). Dabei verbindet sich ein IR-Hemirezeptor mit einem IGF-1-Hemirezeptor, wobei die Isoform des IR zunächst

irrelevant ist (Soos und Siddle, 1989; Moxham et al., 1989; Pandini et al., 2002). Die verschiedenen HR weisen jedoch unterschiedliche Affinitäten zu den Liganden auf. Der HR mit der IR-Isoform A wird neben IGF-1 auch von IGF-2 stimuliert, das zu einem eher mitogenen Signal in der Zelle führt. Der HR mit der IR-Isoform B wird im Gegensatz dazu nur von IGF-1 aktiviert und bewirkt ein mehr metabolisches Signal (Abbildung 1.2; Pandini et al., 2002; Belfiore et al., 2009).

1.2 Die Insulinsignalkaskade

Der Insulinsignalweg gehört mit zu den am intensivsten untersuchten Signalkaskaden und das nicht zuletzt wegen seiner medizinischen Relevanz. Wie schon zuvor erwähnt, ist die Insulinsignalkaskade essentiell für die Aufrechterhaltung des Glukosegleichgewichtes im Körper, aber auch für die Regulation des Kohlenhydrat-, Fettsäure und Proteinstoffwechsels (Saltiel et al., 2001). Die Bindung von Insulin an die α -Untereinheiten ruft eine Konformationsänderung des Rezeptormoleküls hervor, die eine Bindung von ATP und die Autophosphorylierung vieler Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors begünstigt (Chen et al., 1990; Belfiore et al., 2009). Die aktivierte β -Untereinheit führt zur Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung einer Reihe von Substraten, wie z. B. der IRS (*Insulin receptor substrate*)-Proteinfamilie (IRS-1/2/3/4), Shc (*Src homologous and collagen*) und Gab1 (*Growth factor receptor-bound protein 2 [Grb2]-associated binding protein 1*). Wenn diese Proteine durch den aktivierten IR tyrosinphosphoryliert werden, dienen sie als Andockstelle für weitere Phosphotyrosin-bindende Signalproteine, wie z. B. p85, die regulierende Untereinheit der PI3K (*Phosphatidylinositol-3-kinase*), und Grb2, ein kleines Adapterprotein, das bei der Aktivierung des Ras (*Rat sarcoma*)/Erk (*Extracellular signal-regulated kinase*)-Signalweges eine Rolle spielt (Abbildung 1.3). Die aktive PI3K bewirkt eine erhöhte Bildung von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3) und führt zur Aktivierung von PH (*Pleckstrin homology*)-Domänen-beinhaltenen Proteinen, wozu auch die PDK-1 (*Phosphoinositide-dependent Kinase 1*) gehört. Diese phosphoryliert die Serin/Threonin-Kinase Akt und die Proteinkinase C (PKC; Mora et al., 2004). Eine effiziente Aktivierung dieser Proteine ist wichtig für die oben aufgeführten Funktionen der Insulinsignalkaskade in der Zelle (Saltiel et al., 2001). Auf der anderen Seite führt sowohl die Phosphorylierung von Shc als auch die von IRS-Proteinen zur Bindung von Grb2 und somit zur Stimulation des Ras/Erk-Signalweges, der die Zellproliferation und

Differenzierung reguliert (Taniguchi et al., 2006). Es ist bekannt, dass die Dysfunktion von vielen dieser Insulin-sensitiven Signalmoleküle zu einer reduzierten Insulinantwort im Gewebe und somit zur Entwicklung eines Typ2-Diabetes führen kann.

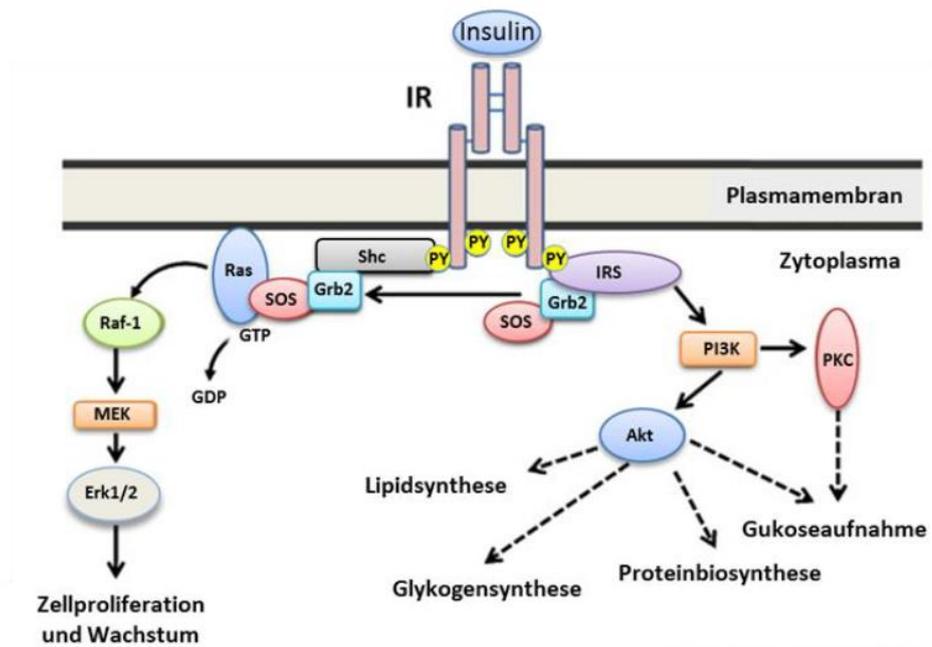


Abbildung 1.3: Der Insulinsignalweg (angelehnt an Olivares-Reyes et al., 2008)

1.3 Regulierung von zellulären Prozessen durch Akt

Die Serin/Threonin-Kinase Akt, auch unter dem Namen Proteinkinase B (PKB) bekannt, ist ein wichtiger Mediator in vielen Signalwegen stromabwärts der PI3K. Der PI3K/Akt-Signalweg spielt im Zellwachstum, in der Proliferation, Differenzierung, Migration und im Stoffwechsel eine bedeutsame Rolle und hat somit großen Einfluss auf die Physiologie des Menschen und viele seiner Erkrankungen (Brazil et al., 2004; Manning und Cantley, 2007).

Die Akt-Familie besteht aus den drei Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3, die eine Sequenzhomologie von ca. 80 % aufweisen, aber von unterschiedlichen Genen kodiert werden (Chan et al., 1999). Aufgrund ihrer hohen Homologie wird vermutet, dass sie alle einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus besitzen, der zur Phosphorylierung von nahezu denselben Proteinen führt. Alle drei Isoformen gehören zu der Familie der AGC-Kinasen, da sie in ihren Kinase-Domänen eine hohe Ähnlichkeit zu den Proteinkinasen A, C (PKA, PKC) und zu der cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-abhängigen

Kinase (PKG) aufweisen (Hanada et al., 2004). Zur Aktivierung werden sie an einem Threoninrest in der Kinase-Domäne durch PDK1 phosphoryliert und an einem Serinrest in der hydrophoben Domäne durch mTORC2 (*Mammalian target of rapamycin complex 2*; Alessi et al., 1996; Sarbassov et al., 2005). Nur wenn Akt an beiden Resten phosphoryliert vorliegt, kann es alle seine Interaktionspartner an Serin- und Threoninresten phosphorylieren (Guertin et al., 2006). Die minimale Substrat-Konsensussequenz ist hierbei RXXXX(S/T) (Obata et al., 2000). Es gibt mehr als 100 nachgewiesene Substrate von Akt, jedoch sind nicht alle Funktionen bekannt. In Abbildung 1.4 sind einige der wichtigsten von ihnen, mit ihren zum Teil überlappenden Funktionen in der Zelle, dargestellt.

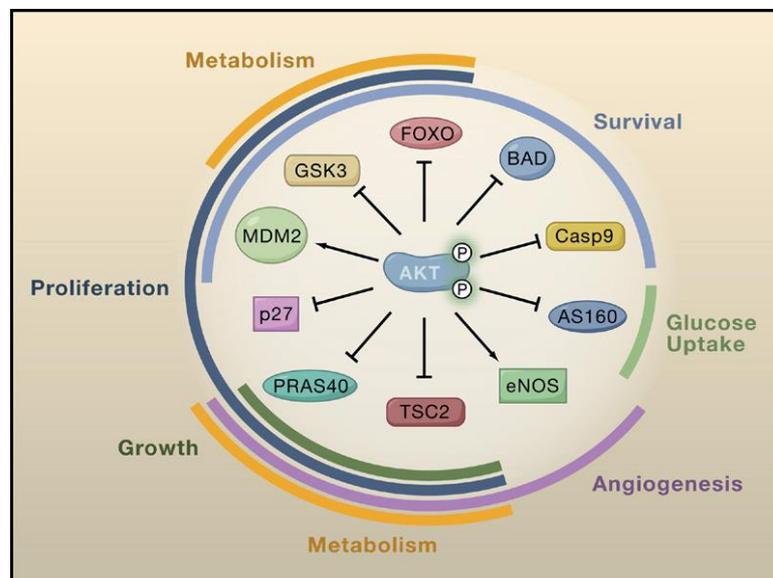


Abbildung 1.4: Die Funktion von 10 wichtigen Akt-Substraten (Manning und Cantley, 2007)

Phosphorylierung dieser Proteine durch Akt führt zur Aktivierung (Pfeile) oder Inhibierung (geblockte Pfeile). Die Regulation dieser Substrate durch Akt aktiviert verschiedene Prozesse in der Zelle (z. B. Überleben, Wachstum, Proliferation, Glukoseaufnahme, Stoffwechsel und Gefäßneubildung).

Wie hier zu sehen ist, hat die Phosphorylierung von Akt einen anti-apoptotischen Effekt in Zellen und fördert somit deren Überleben. Dabei werden die Funktionen von pro-Apoptosefaktoren wie z. B. BAD (*B-cell lymphoma 2 [Bcl2]-associated agonist of cell death*) durch die Phosphorylierung inhibiert. Zusätzlich wird durch Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren wie FOXO (*Forkhead-box protein O*) und p53 deren Expression

reguliert (Manning und Cantley, 2007). Die p53-gesteuerte Expression wird dabei negativ über die Phosphorylierung der E3-Ubiquitin-Proteinligase MDM2 (*Murine double minute 2*) durch Akt reguliert, das zur Degradierung von p53 führt (Brazil et al., 2004). Darüber hinaus inhibiert Akt die proteolytische Prozessierung der pro-Caspase-9 (Cardone et al., 1998).

Eine weitere Hauptfunktion von Akt ist die Steuerung des Zellwachstums. Dies geschieht über indirekte Aktivierung des mTORC1 (*Mammalian target of rapamycin complex 1*), einem Regulator der Translationsinitiierung. Dabei wird TSC2 (*Tuberous sclerosis complex 2, Tuberin*) durch Akt phosphoryliert und inhibiert, was wiederum den Rheb-GTP (*Ras homolog enriched in brain*) erlaubt mTORC1 zu aktivieren. Die Aktivierung führt zu einer erhöhten Proteinsynthese, Ribosomenbiogenese und Transkription (Wullschleger et al., 2006). Auch PRAS40 (*Prolin-rich-Akt substrate of 40 kDa*) wird direkt durch Akt phosphoryliert und stimuliert zusätzlich die mTORC1-Signalkaskade (Kovacina et al., 2003; Sancak et al., 2007). Neben dem Zellwachstum beeinflusst die Phosphorylierung von Akt auch die Proliferation von Zellen. Hierbei phosphoryliert Akt die Zellzyklusinhibitoren p27^{Kip1} und p21^{Cip1} und verhindert ihre Translokation ins Zytosol. Dadurch sind sie nicht in der Lage, ihre anti-proliferativen Funktionen auszuüben (Brazil et al., 2004).

In der Angiogenese spielen sowohl das Zellwachstum als auch die Proliferation von Zellen eine große Rolle. Hierbei wird Akt durch VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) aktiviert, was zur Phosphorylierung der zuvor beschriebenen Substrate führt. Zusätzlich wird eNOS (*Endothelial nitric oxid synthase*) direkt durch Akt-Phosphorylierung aktiviert, welche durch Stickstoffmonoxid-Freisetzung die Gefäßerweiterung und die Gefäßneubildung stimuliert (Morbidelli et al., 2003).

Darüber hinaus ist Akt nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren in der Lage, zellspezifisch die Nährstoffaufnahme und deren Metabolismus zu steuern. Die wichtigste physiologische Funktion ist die Stimulation der Glukoseaufnahme nach Insulinbindung. Akt-Aktivierung führt zur Translokation des Glut4 (Glukosetransporters 4) zur Plasmamembran und somit zur erhöhten Glukoseaufnahme in die Zelle (Kohn et al., 1996). Akt phosphoryliert und inhibiert die Rab-GAP (*Ras-related in brain-GTPase-activating protein*) AS160 (Akt Substrat von 160 kDa) und TBC1D1. Die Rab-Proteine, die mit den *Glut4 storage vesicle* assoziiert sind, können nun GTP binden und führen zur Mobilisierung dieser Vesikel an die Membran (Sakamoto und Holman, 2008). Andere Substrate von Akt wirken direkt auf den Glukosemetabolismus, z. B. die GSK3

(*Glykogensynthase kinase-3*). Deren Phosphorylierung und Inaktivierung führt zu einer erhöhten Glykogensynthese im Zytoplasma, die der Glukosespeicherung in der Zelle dient (Frame und Cohen, 2001).

Um eine effiziente Regulierung der Akt-Kinase zu gewährleisten, gibt es verschiedene Mechanismen in der Zelle. Zum einen kann die Aktivität der Akt-Kinase durch Phosphatasen inhibiert werden. Ein Beispiel dafür ist die PIP3-Phosphatase PTEN (*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*), ein Gegenspieler der PI3K, die PIP3 dephosphoryliert und somit eine Phosphorylierung von Akt verhindert (Maehama und Dixon, 1998). Weitere Beispiele sind Phosphatasen, die über direkte Dephosphorylierung von Akt zur Inaktivierung führen. Hierbei handelt es sich um PP2A (*Protein phosphatase 2A*) und PHLPP (*Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase*; Andjelkovic et al., 1996; Gao et al., 2005). Zusätzlich wird IRS-1 durch die Aktivierung des mTORC1 inhibitorisch phosphoryliert und wirkt somit als eine negative *feedback*-Regulation des PI3K/Akt-Signalweges.

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass es neben den oben genannten Phosphatasen und den Kinasen PDK1 und mTORC2 weitere Proteine gibt, die mit Akt interagieren und dessen Wirkung modulieren. Hierbei handelt es sich z. B. um Grb10, das in der Lage ist, im Komplex mit c-kit die Aktivierung von Akt zu verstärken. Darüber hinaus bildet auch Hsp90 (*Heat shock protein-90*) einen Komplex mit Akt und inhibiert somit ihre Degradierung. Seitdem bekannt ist, dass Hsp90 auch an Tyrosin- und andere Serin/Threonin-Kinasen neben Akt bindet, könnte es möglicherweise zur verbesserten Interaktion von Akt mit ihren Substraten durch Hsp90 führen, wie z. B. die eNOS (Du und Tschlis, 2005). Ein weiteres Protein ist CTMP (*C-terminal modulator protein*), dessen Bindung an Akt zur Inhibierung ihrer Aktivität führt. Der Mechanismus dahinter ist noch nicht geklärt (Du und Tschlis, 2005).

Auf der anderen Seite gibt es noch weitere Kinasen, die Akt phosphorylieren und ihre Aktivität steigern, z. B. die Tyrosin-Kinasen AckI (*Activated CDC42 kinase 1*), Src und PTK6 (*Protein tyrosine kinase 6*). Neben diesen Tyrosin-Kinasen phosphorylieren Akt auch noch verschiedene Serin/Threonin-Kinasen, wie z. B. IKK ϵ (*I-kappa-B kinase epsilon*), TBKI (*TANK-binding kinase 1*) und DNA-PK (DNA-Proteinkinase; Mahajan und Mahajan, 2012). Ein weiteres Akt-interagierendes Protein ist auch Girdin, dessen Rolle im Insulinsignalweg in dieser Arbeit untersucht werden soll. Durch seine C-

terminale Akt-Bindung verstärkt es die Aktivität von Akt und hat somit Einfluss auf alle oben genannten regulatorischen Prozesse in der Zelle.

1.4 Die Girdin-Proteinfamilie

Girdin (*Girders of actin filament*), auch bekannt unter den Namen APE (*Akt phosphorylation enhancer*), GIV (*G α -interacting vesicle-associated protein*) oder auch HkRP1 (*Hook related protein 1*) wurde 2005 zum ersten Mal von vier Arbeitsgruppen unabhängig voneinander beschrieben. Girdin wurde zum einen durch Computeranalysen als ein *Hook-related Protein* identifiziert (Simpson et al., 2005) und zum anderen als ein Akt- und G α i-bindendes Protein mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid-Systems entdeckt (Anai et al., Enomoto et al., Le-Niculescu et al., 2005). Das Protein ist mit einer Länge von 1843 Aminosäuren (AS; ca. 220 kDa) ubiquitär in allen Säugetieren exprimiert. In Abbildung 1.5 ist zu erkennen, dass Girdin ein Multidomänenprotein ist. Die aminoterminal (N-terminale) Region mit 253 AS besitzt eine starke Homologie zu der Mikrotubuli-bindenden Domäne der Hook-Protein-Familie, weshalb es zu dem Namen HkRP1 kam (Simpson et al., 2005). Darüber hinaus konnte durch Gelfiltrationsanalysen gezeigt werden, dass der Aminoterminus (N-Terminus) für die Dimerformation von Girdin verantwortlich ist (Enomoto et al., 2005). Girdin enthält zusätzlich eine Myosin-ähnliche zentrale Region mit 1122 AS, die durch Ausbildung einer α -Helix zu einer Homodimerisierung des Proteins beitragen könnte. Weitere Funktionen der α -helicalen coiled-coil-Domäne sind bisher nicht bekannt. Der Carboxyterminus (C-Terminus) von Girdin, bestehend aus 467 AS, wird nochmals in die PS- und die CT-Domäne unterteilt. In der PS-Region befinden sich neben der Akt-Phosphorylierungsstelle (PS) S1417 auch die G α i-Bindungsregion und eine Sequenz, die an Phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphat (PIP2) in der Plasmamembran bindet. Allerdings konnte die Bindung an Phosphoinositole bisher nur *in vitro* gezeigt werden (Enomoto et al., 2005). Die CT-Domäne ist für die Aktinbindung zuständig und verfügt über das GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*)-Motiv (Enomoto et al., 2005; Garcia-Marcos et al., 2009).

Der zweite Vertreter der Proteinfamilie wurde unabhängig von Girdin bei der Identifizierung von *Dishevelled* (Dvl)-Bindungsproteinen entdeckt (Oshita et al., 2003). Dvl ist ein wichtiger Regulator des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges, der für die embryonale Entwicklung und die Progression von Krebs wichtig ist. Die cDNA von Daple (*Dvl-associating protein with a high frequency of leucine residues*), auch HkRP2

genannt, kodiert für ein 2028 AS langes Protein mit einer hohen Sequenzhomologie zu Girdin. Die letzten drei C-terminalen AS von Daple sind für die Bindung an die PDZ (*PSD-95/Dlg [disc large]/ZO-1 [zonula occludens-1]*)-Domäne von Dvl notwendig. Der N-Terminus und die zentrale coiled-coil-Domäne von Daple zeigen eine hohe Ähnlichkeit mit der von Girdin (ca. 54 % AS-Identität). Im Vergleich dazu weisen die C-terminalen Regionen beider Proteine nur eine AS-Identität von 27 % auf, was auf unterschiedliche Bindungspartner schließen lässt.

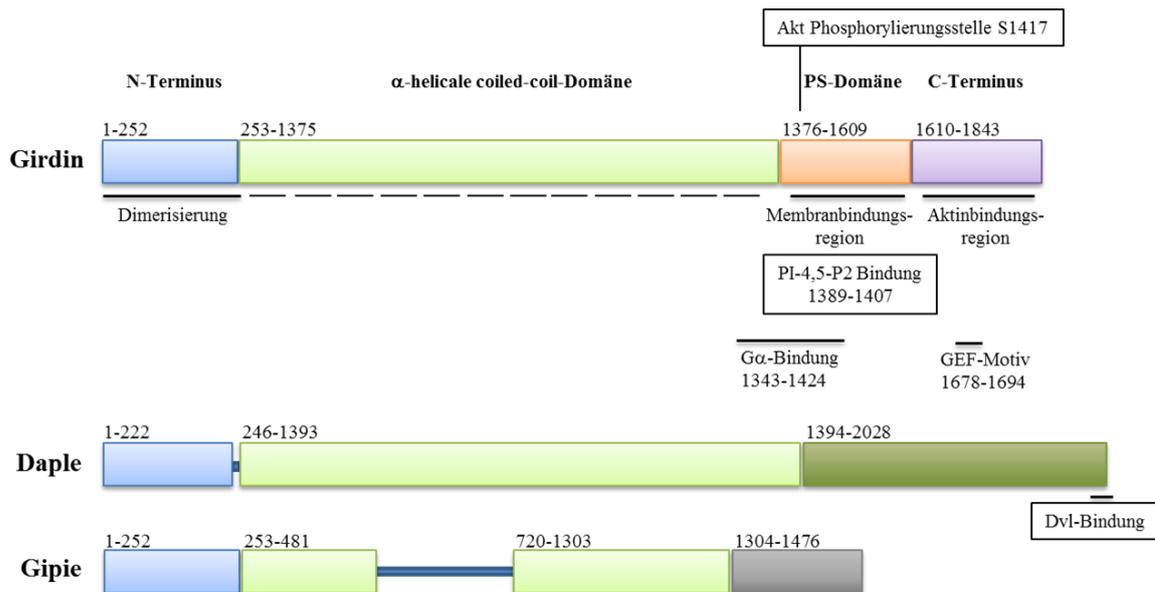


Abbildung 1.5: Die Struktur von Girdin, Daple und Gipie

Die Abbildung ist angelehnt an Enomoto et al. (2006) und Globplot-Analysen. N-Terminus - Aminoterminus; PS - Phosphorylierungsstelle; C-Terminus - Carboxyterminus; G α - α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine; GEF - *Guanine nucleotide exchange factor*; Dvl - *Dishevelled*

Eine Analyse des humanen Genoms auf verwandte Sequenzen von Girdin und Daple führte zur Identifikation eines weiteren Mitglieds mit dem Namen Gipie oder HkRP3 (Simpson et al., 2005). Seine volle Länge beträgt 1476 AS und es ist somit das kürzeste Protein der Familie. Auch hier lassen sich Ähnlichkeiten im strukturellen Aufbau wiederfinden. Der N-Terminus und Teile der coiled-coil-Region von Gipie weisen starke Analogien mit denen von Girdin und Daple auf. Die Funktion von Gipie könnte eine protektive Rolle in der Abwehr von ER (endoplasmatisches Retikulum)-Stress sein. Dabei bindet es an GRP78 (*Endoplasmic reticulum chaperone protein 78*) und stabilisiert dessen Bindung an den ER-Stresssensor IRE1 (*Inositol-requiring protein 1*), was zur

Inhibierung des IRE1/JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)-Signalweges und der ER-Stress-induzierten Apoptose führt (Matsushita et al., 2011).

1.5 Die Funktionen von Girdin in der Zelle

Die Hauptfunktion von Girdin ist die Verstärkung der Akt-Phosphorylierung. Dabei führt die Überexpression von Girdin in Zellen zu einer erhöhten basalen Phosphorylierung von Akt (Anai et al., 2005; Garcia-Marcos et al., 2009). Im Gegensatz dazu bewirkt die Reduktion der Girdin-Expression durch RNA-Interferenz eine Verringerung der Aktivität von Akt, sowohl basal als auch nach Stimulation (Anai et al., 2005; Ghosh et al., 2008). Da Girdin selbst keine Kinaseaktivität besitzt, scheint es, als ob der PI3K-Signalweg aktiviert sein muss, damit Girdin die Phosphorylierung von Akt verstärkt (Anai et al., 2005). Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch ungeklärt. Die Ghosh-Arbeitsgruppe hat in den letzten Jahren zwei verschiedene, aber parallel laufende Signalprozesse vorgeschlagen, die für die vollständige Aktivierung von Akt durch Girdin verantwortlich sind (Garcia-Marco et al., 2009; Lin et al., 2011). Girdin wurde als ein *non-receptor*-GEF für die inhibitorische α -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen identifiziert. Durch die Bindung und Aktivierung der $G_{\alpha i}$ -Proteine induziert Girdin die Dissoziation der $\beta\gamma$ -Untereinheit von der α -Untereinheit. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit bindet dann an die p110 γ - oder p110 β -PI3K und aktiviert diese. Der zweite Signalweg erfolgt über die Aktivierung von RTK: Girdin bindet an aktivierte Rezeptor- und Nicht-Rezeptortyrosinkinasen und aktiviert gleichzeitig p85 der PI3K. Hierbei ist Girdin am C-Terminus tyrosinphosphoryliert, stabilisiert dadurch den Komplex zwischen RTK und PI3K und verstärkt diesen Signalweg. Sie konnten zeigen, dass der EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) in Hela-Zellen, die Girdin stabil überexprimieren, im Vergleich zu Kontrollzellen eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung und eine verringerte Internalisierung nach der Ligandenbindung aufwies (Ghosh et al., 2010).

Für weitere physiologische Untersuchungen etablierte das Labor von Takahashi Girdin-defiziente Mäuse. Diese entwickelten sich bis zu einer Woche nach der Geburt normal. Im Vergleich zu den Kontrollmäusen verloren sie dann zunehmend an Gewicht und starben nach ca. 4 Wochen (Kitamura et al., 2008, Asai et al., 2012). Zusätzlich wiesen sie Defizite in der Angiogenese auf. In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass *Girdin-knockout* zu einer Fehlentwicklung des *Denate Gyrus* führt (Enomoto et al., 2009). Grund dafür könnte Girdins Rolle in der Organisation des

Aktinzytoskeletts sein, die Auswirkung auf die Zellmotilität hat (Enomoto et al., 2005). Girdin ist in einer Reihe von humanen Krebsgeweben überexprimiert, wie z. B. Darm, Brust und Lunge. Die Motilität der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wurde durch IGF-1-Stimulation induziert und konnte durch Girdin-*knockdown* inhibiert werden. Diese Studien lassen darauf schließen, dass Girdin eine wichtige Rolle in der Krebsentwicklung und Metastasierung spielt, wenn der Akt-Signalweg konstitutiv aktiviert ist (Jiang et al., 2008).

1.6 14-3-3-Proteine

1.6.1 Die Entdeckung von 14-3-3-Proteinen

14-3-3-Proteine wurden erstmals im Jahre 1967 von Moore und Perez beschrieben. Sie entdeckten diese, als sie versuchten, Proteine des Gehirns zu identifizieren. Der Name 14-3-3 basiert auf deren Elution in der Fraktion 14 einer DEAE (Diethylenaminoethyl)-Zellulose-Chromatographie, gefolgt von ihrer elektrophoretischen Mobilität als „Spot“ 3-3 im zwei-dimensionalen Stärkegel (Moore und Perez, 1967). 14-3-3-Proteine sind hoch konserviert und werden in allen Organismen und Zellen exprimiert. Die Anzahl der 14-3-3-Isoformen variiert in den einzelnen Spezies. Während *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae* nur 2 Isoformen exprimieren, besitzen Pflanzen 12 verschiedene 14-3-3-Proteine (Rosenquist et al., 2000). Der Mensch hingegen exprimiert 7 Isoformen, kodiert von 7 unterschiedlichen Genen. Diese werden als α/β , γ , ϵ , δ/ζ , η , θ und σ bezeichnet, wobei α und δ die phosphorylierten Formen von β und ζ darstellen (Aitken et al., 1995). Die ersten bekannten 14-3-3-Bindungsproteine waren die Tryptophan- und Tyrosinhydrolasen, die an der Serotonin- und Catecholaminbiosynthese beteiligt sind (Ichimura et al., 1987). Später erst wurde bekannt, dass 14-3-3 nur an die phosphorylierte Form der Hydrolasen bindet und somit die Aktivität des Enzyms stimuliert (Furukawa et al., 1993). Über die Jahre konnten Studien über neue 14-3-3-Interaktionspartner zeigen, dass 14-3-3-Proteine ausschließlich Phosphoproteine binden, die an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert sind.

1.6.2 Die Struktur von 14-3-3-Proteinen und ihre Konsensussequenzen

Durch Dichtegradientenchromatographie konnte gezeigt werden, dass 14-3-3-Proteine als Homo- oder Heterodimere fungieren (Toker et al., 1992). Die ersten Kristallstrukturen

von 14-3-3-Dimeren wurden zeitgleich 1995 von Lui und Xiao veröffentlicht (Liu et al., 1995; Xiao et al., 1995). Aus diesen Arbeiten ging hervor, dass jedes Monomer aus 9 antiparallelen α -Helices besteht, die zusammen eine L-förmige amphipathische Furche bilden (Abbildung 1.6). Ihre Dimerisierung findet über den N-Terminus in entgegengesetzter Richtung statt. Dies führt zu einer W-Form, die im Inneren den amphipathischen Bindungskanal des Dimers, mit einer Breite von ca. 40 Å, bildet (Obsil et al., 2001). Die innere Region ist zwischen den einzelnen 14-3-3-Isoformen am stärksten konserviert und nur an den Außenseiten und an den C-Termini variieren die Sequenzen (Bridges und Moorhead, 2004). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei der 14-3-3-Bindung in der Regel um ähnliche Motive handeln muss.

Alle Isoformen mit einer Ausnahme von 14-3-3 σ sind in der Lage, Heterodimere zu formen (Wilker et al., 2005). Als Dimer kann 14-3-3 zwei Phosphorylierungsstellen auf einem Protein oder auch jeweils eine auf zwei Proteinen erkennen. Dabei fungiert das 14-3-3-Dimer als Brücke. Es gibt jedoch mehr Proteine mit zwei Phosphorylierungsstellen, was generell auch eine stärkere Bindung bedeutet (Yaffe, 2002). Hierbei muss der Mindestabstand 15 AS betragen, um 14-3-3 die Möglichkeit zu geben, beide Stellen zu erreichen. Dabei können die Phosphorylierungsstellen von der gleichen, aber auch von unterschiedlichen Kinasen oder Phosphatasen reguliert werden. Bei unterschiedlicher Regulation der Bindungsstellen kann 14-3-3 als ein Regulator für zwei unterschiedliche Signalwege fungieren.

Für die Identifizierung eines 14-3-3-Bindungsmotivs wurden verschiedene optimal 14-3-3-bindende Phospho-Peptide analysiert. Aus diesen Studien gingen zwei Motive hervor, Mode I RSX(pS/T)XP und Mode II RXXX(pS/T)XP (Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997). In den letzten Jahren kam eine weitere Konsensussequenz dazu, die ein phosphoryliertes Serin beziehungsweise Threonin als vorletzte AS am C-Terminus voraussetzt (Coblitz et al., 2006). In diesem Fall kann 14-3-3 für der Oligomerisierung von Proteinen verantwortlich sein (Ottmann et al., 2007). In der Arbeitsgruppe von Prof. Carol MacKintosh wurden zusätzliche Details von mehr als 200 phosphorylierten 14-3-3-Bindungsproteinen zusammengetragen, um weitere Eigenschaften der Konsensussequenzen zu untersuchen. Die meisten Proteine besitzen dabei eine basische AS zwischen -3 und -5 in Bezug auf das phosphorylierte Serin oder Threonin. In weniger als 50 % der Fälle wurde ein Prolin auf der Position +2 gefunden. Solche 14-3-3-Bindungssequenzen werden von AGC- und CAMK (Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein

kinase)-Proteinkinasen phosphoryliert. Dazu zählen PKA, Akt, SGK (*serum and glucocorticoid S6 kinase*), p90RSK (*90 kDa ribosomal protein S6 kinase*), PKCs und AMPK (*Adenosinmonophosphat [AMP]-activated protein kinase*).

Nicht alle 14-3-3-Bindungen sind phosphorylierungsabhängig. In einigen wenigen Fällen bindet 14-3-3 auch an ein nicht-phosphoryliertes Protein, wie z. B. bei p190RhoGEF (*Ras homolog gene family member A [RhoA] specific GEF of 190 kDa*), dem synthetischen Protein R18 und dem Exoenzym S (Zhai et al., 2001; Wang et al., 1999; Masters et al., 1999).

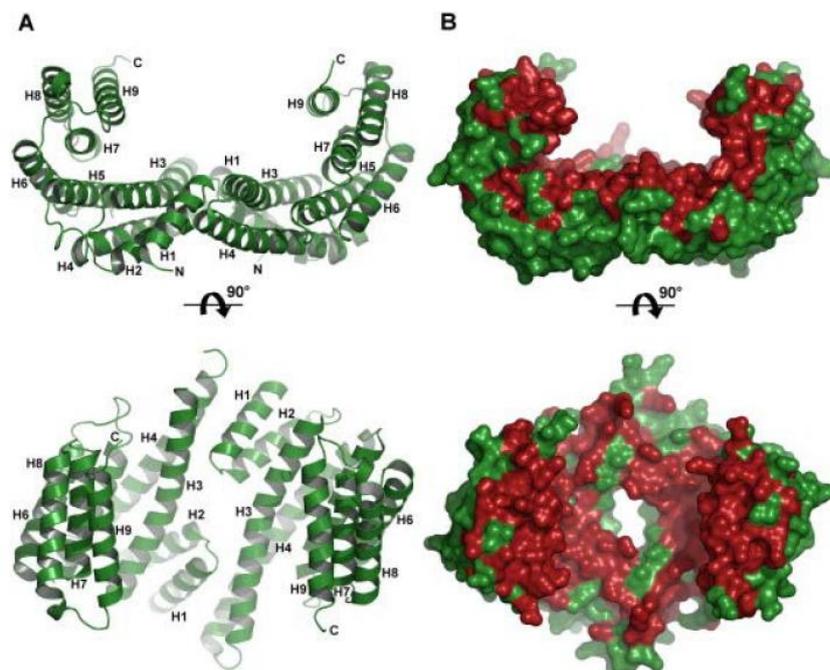


Abbildung 1.6: Kristallstruktur eines 14-3-3-Dimers (Obsil und Obsilova, 2011)
 (A) Ribbon-Darstellung eines 14-3-3-Dimers (humane ζ Isoform). (B) Oberflächendarstellung eines 14-3-3-Dimers, bei dem die in Rot gekennzeichneten Bereiche die in allen Isoformen hoch konservierten Regionen darstellen und die in Grün die variablen Regionen.

1.6.3 Die Funktionen von 14-3-3-Proteinen

Die erste physiologische Funktion von 14-3-3-Proteinen, die nachgewiesen werden konnte, war die Regulation der Serotonin- und Noradrenalinbiosynthese im Gehirn (Ichimura et al., 1987). Kurz danach wurde entdeckt, dass 14-3-3-Proteine an eine PKC binden und diese dadurch inhibieren (Robinson et al., 1994), die Raf-Proteinkinase regulieren (Muslin et al., 1996) und in Pflanzen die Nitratreduktase inhibieren (Moorhead et al., 1996). Heute gibt es mehr als 200 gut untersuchte 14-3-3-bindende Proteine, die an den verschiedensten Prozessen in der Zelle beteiligt sind, wie z. B. Stoffwechsel, DNA-

und RNA-Bindung, Proteinsynthese, Transport in der Zelle, Signaltransduktion und die Kontrolle des Zellzyklus (Pozuelo Rubio et al., 2004).

Wie schon erwähnt, kann 14-3-3 auf Grund seiner Dimerstruktur zwei Proteine wie eine Brücke miteinander verbinden. Ein Beispiel dafür ist die pflanzliche Plasmamembranprotonenpumpe, wobei 14-3-3 für die Oligomerisierung der Untereinheiten verantwortlich ist (Ottmann et al., 2007). Ein weiteres Beispiel für die Adapterfunktion von 14-3-3 ist die Heterodimerisierung von B-Raf- (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) und C-Raf-Kinasen. Die Phosphorylierung von C-Raf durch B-Raf wird für die volle Aktivierung von C-Raf benötigt. Dies ist jedoch nur möglich, wenn beide Proteine durch 14-3-3 verbunden sind (Morrison, 2009). 14-3-3-Proteine können zum Teil kompetitiv mit anderen Proteinen wirken und somit die Lokalisation des Proteins verändern und es dadurch vor der Proteolyse oder Dephosphorylierung bewahren. Erst kürzlich konnten Dobson et al. zeigen, dass die Bindung von 14-3-3 an FOXO-Proteine, neben der Negativregulation, zusätzlich FOXO3 stabilisiert und es vor Dephosphorylierung und Degradierung schützt (2011). Ein weiteres Beispiel dafür ist die Tyrosinhydrolase, deren regulatorische Domäne durch 14-3-3-Bindung nicht mehr dephosphoryliert werden kann. Der Mechanismus dahinter ist jedoch noch unklar (Obsil und Obsilova, 2011).

Weiterhin kann durch 14-3-3-Bindung die Lokalisation eines Proteins reguliert werden. Ein Beispiel dafür ist der Zellzyklusregulator CDK (*cyclin-dependent kinase*)-Inhibitor p27^{Kip1}. Hierbei wird durch Bindung von 14-3-3 sein Transport in den Zellkern geblockt (Sekimoto et al., 2004). Im Fall der FOXO-Transkriptionsfaktoren wird die 14-3-3-Bindung durch den PI3K/Akt-Signalweg induziert. Die Bindung von 14-3-3 verhindert die Translokation von FOXO in den Kern und somit auch dessen Bindung an DNA (Silhan et al., 2009). Ein ähnliches Szenario findet bei der Bindung von 14-3-3 an einen weiteren Regulator des Zellzyklus, Cdc25 (*cell division cycle 25 phosphatases*), statt, das den Eintritt der Zellen in die Mitose begünstigt (Kumagai und Dunphy, 1999).

Eine weitere Funktion der 14-3-3-Proteine wurde als „*molecular anvil hypothesis*“ beschrieben (Yaffe, 2002). Dabei führt die Bindung von 14-3-3 an sein Zielprotein zu dessen Strukturänderung. Die Bindung von 14-3-3 an die AANAT (Arylalkyl-N-Acetyltransferase) moduliert ihre Substratbindungsstelle so, dass es zu einer erhöhten Substrataffinität führt (Obsil et al., 2001). Ein weiteres Beispiel ist Raf-1, das durch Phosphorylierung und Bindung von 14-3-3 seine Konformation so verändert, dass es sich von der Plasmamembran ablöst und weitere Proteine des Erk-Signalweges aktiviert. Der

entgegengesetzte Fall tritt bei der Bindung von 14-3-3 an ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) ein, dabei wird ihre Aktivität inhibiert (Zhang et al., 1999).

14-3-3-Proteine können auch als Stabilisatoren zwischen zwei verschiedenen Proteinen agieren. Der Komplex zwischen Raf-1 und Bcr (*Breakpoint cluster region protein*) wird z. B. durch 14-3-3 verstärkt (Brasemann und McCormick, 1995). Bcr ist nicht das einzige Protein, das über 14-3-3 an Raf-1 gebunden wird, auch A20, ein Zinkfingerprotein, und PKC bilden solche stabilen Komplexe (Vincenz und Dixit, 1996; Van der Hoeven et al., 2000).

2 Zielsetzung

Girdin wurde als ein wichtiger Regulator der Akt-Kinaseaktivität beschrieben. Die erhöhte Phosphorylierung von Akt nach Girdin-Überexpression führt außerdem zu einer verstärkten Remodellierung des Zytoskeletts (Enomoto et al., 2005). Vor allem in Krebszellen weist Girdin eine erhöhte Expression auf und ist in deren Entwicklung und Metastasierung involviert (Jiang et al., 2008). Neben diesen Eigenschaften gibt es bisher keine Erkenntnisse darüber, welchen Einfluss Girdin auf den Insulinsignalweg hat.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der Funktion von Girdin im Insulinsignalweg. Dafür sollte die Girdin-Expression durch RNA-Interferenz oder stabiler Überexpression in insulin sensitiven C2C12-Myoblasten variiert und deren Einfluss auf Proteine im Insulinsignalweg mit Hilfe verschiedener Protein- und Phosphopeptid-spezifischer Antikörper in Western Blot-Analysen untersucht werden. Girdin ist ein Substrat von Akt und wird durch diese an S1417 phosphoryliert (Enomoto et al., 2005). Für die Untersuchung, ob die Akt-Phosphorylierungsstelle einen Einfluss auf das Insulinsignal hat, sollte eine Alanin-Mutante der Akt-Phosphorylierungsstelle von Girdin stabil in C2C12-Zellen überexprimiert und mit dem Wildtypprotein verglichen werden. Zusätzliche Untersuchungen der Girdin-überexprimierenden Zellen, wie Glykogensynthesemessungen und Proliferationsanalysen, könnten Aufschluss auf weitere Funktionen von Girdin in diesen Zellen geben. Darüber hinaus sollen primäre Myotuben aus Probanden auf die Expression von Girdin analysiert und mit deren physiologischen Daten verglichen werden.

Computeranalysen konnten zeigen, dass Girdin ein potentielles 14-3-3-Bindungsprotein darstellt. Aufgrund dieser Tatsache sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die Bindung von 14-3-3 an Girdin und dessen mögliche Regulation in Zusammenarbeit mit Prof. Carol MacKintosh (MRC, Dundee, UK) untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm) und Roche (Mannheim) in p.a.-Qualität bezogen.

Bradford-Reagenz	Bio-Rad (München)
Cex-Marker (DNA-Größenmarker)	Aus eigener Herstellung
CM-H ₂ DCFDA	Invitrogen (Eggenstein)
Coomassie-Färbelösung	Invitrogen (Eggenstein)
Dapi (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-dihydrochlorid)	Roche (Mannheim)
ECL-Reagenz	Thermo-Fisher (Schwerte)
Formaldehyd	Polysciences, Inc. (Warrington, US)
GFP-bindende Sepharose Kügelchen	Chromotek (Hannover)
Insulin (Humulin)	Eli Lilly (Indianapolis, US)
Nitrocellulose Hybond ECL (0,45 mm)	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Parafilm	Pechiney (Chicago, US)
PeqGOLD Universal Agarose	Peqlab (Erlangen)
Permafluor	Immunotech (Marseille, FR)
Protein A/G Sepharose	Pharmacia (Uppsala, SE)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)
STI-571, Gleevec	Biomol (Hamburg)
14-C-Glukose	Perkin Elmer (Waltham, US)
125-I-Insulin	Perkin Elmer (Waltham, US)

3.1.1 Oligonukleotide für quantitative *real time* PCR (*Polymerase chain reaction*)

Die Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Name	Sequenz
IRS-1 sense	GATAGCGAGGCTGAGCAAGA
IRS-1 antisense	CACCACGGAGTCATCCACTT
IR sense	TCTGAAATTCACAAGATGGAAGAA
IR antisense	CCGAATGAAAGAAAATTTAAGCA
Girdin sense	CAAAAGGCTGCAACAAGAGA
Girdin antisense	CTGCTTTCTCTCGAAGTGCAT
RPS13 sense	CCCCACTTGGTTGAAGTTGA
RPS13 antisense	ACACCATGTGAATCTCTCAGGA

3.1.2 *E. coli* Stämme

Name	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> 298 F ⁺	F ⁺ , kanr, lr, recA ⁻ , tonA ⁻ , lacI ⁻ ; aus MM 294	Genentech (San Francisco, US)
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , o80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17, phoA, supE44, l ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)

3.1.3 Expressionsvektoren

Plasmidname	Expressionsvektor für:	Referenz
pRK5rs_Girdin vsv	Girdin mit einem vsv-Epitop versehen	AG Lammers
pRK5rs_Girdin_S1417/T1419A vsv	Girdin (Mutationen von S1417 und T1419 zu A) und vsv-Epitop	AG Lammers
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Girdin	Fusionsprotein aus Girdin und GFP (<i>Green fluorescent protein</i>)	AG Lammers/DSTT, UK

pcDNA5/FRT/TO-GFP_Girdin_S1417/T1419A	Fusionsprotein aus Girdin (Mutationen von S1417 und T1419 zu A) und GFP	AG Lammers/ DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Girdin_S1624A	Fusionsprotein aus Girdin (Mutation von S1624 zu A) und GFP	DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Girdin_S1687A	Fusionsprotein aus Girdin (Mutation von S1687 zu A) und GFP	DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Girdin_S1708A	Fusionsprotein aus Girdin (Mutation von S1708 zu A) und GFP	DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Girdin_S1721A	Fusionsprotein aus Girdin (Mutation von S1721 zu A) und GFP	DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Girdin_S1773A	Fusionsprotein aus Girdin (Mutation von S1773 zu A) und GFP	DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Girdin_S1792A	Fusionsprotein aus Girdin (Mutation von S1792 zu A) und GFP	DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Girdin_T1791/S1792A	Fusionsprotein aus Girdin (Mutationen von T1791 und S1792 zu Ala) und GFP	DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_ΔNT(Δ1-253AS)	Fusionsprotein aus Girdin ohne AS M1-L253 und GFP	AG Lammers/ DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_ΔCT(Δ1377-1843AS)	Fusionsprotein aus Girdin ohne AS S1610-S1843 und GFP	DSTT
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Daple	Fusionsprotein aus Daple und GFP	AG Lammers/ DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Daple_S1428A	Fusionsprotein aus Daple (Mutation von S1428 zu A) und GFP	DSTT, UK

pcDNA5/FRT/TO-GFP_Daple_S1440A	Fusionsprotein aus Daple (Mutation von S1440 zu A) und GFP	DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Daple_S1887A	Fusionsprotein aus Daple (Mutation von S1887 zu A) und GFP	DSTT, UK
pcDNA5/FRT/TO-GFP_Gipie (E661-Q1476)	Fusionsprotein aus Gipie (E661-Q1476) und GFP	DSTT, UK

3.1.4 Zelllinien

Name	Eigenschaften	Referenz
HEK293	Humane embryonale Nierenfibroblasten transfiziert mit den Adenovirus Genen E1A und E1B	ATCC CRL-1573 (Graham et al., 1977)
C2C12	Maus-Myoblasten	ATCC, CRL-1772 (Yaffe et al., 1977)
C2C12+G	Maus-Myoblasten, die Girdin stabil überexprimieren	AG Lammers
C2C12+G_S1417/T1419A	Maus-Myoblasten, die mutiertes Girdin (S1417/T1419A) stabil überexprimieren	AG Lammers
C2C12+IR	Maus-Myoblasten, die stabil den Insulinrezeptor überexprimieren	AG Lammers

3.1.5 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
α -p-ACC (S79)	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen phosphoryliertes S79 der Acetyl-CoA Carboxylase α/β (ACC)	Cell Signaling (Frankfurt)
α -AMPK α	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen AMPK α	Cell Signaling (Frankfurt)

α -p-AMPK α (T172)	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen phosphoryliertes T172 der AMPK α	Cell Signaling (Frankfurt)
α -p-Akt (T308)	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen phosphoryliertes T308 der Akt-Kinase	Cell Signaling (Frankfurt)
α -Akt	Monoklonaler Mausantikörper; IgG gegen Akt1	BD-Transduction (Heidelberg)
α -AS160	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen AS160	Cell Signaling (Frankfurt)
α - β -Catenin	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen α - β -Catenin	Cell Signaling (Frankfurt)
α -c-Abl	Monoklonaler Mausantikörper; IgG gegen den Carboxyterminus von c-Abl	Santa Cruz (US)
α -CrkII	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen die letzten 14 carboxyterminalen Aminosäuren von CrkII	AG Lammers
α -p-Erk1/2 (T202/Y204)	Monoklonaler Mausantikörper; IgG gegen phosphoryliertes T202 und Y204 von Erk1	Cell Signaling (Frankfurt)
α -Erk1/2	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen p44/42 MAPK (Erk1/2)	Cell Signaling (Frankfurt)
α -FAK	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen FAK	Santa Cruz (US)
α -p-FoxO1 (S256)	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen phosphoryliertes S256 der Akt-Kinase	Cell Signaling (Frankfurt)
α -Girdin	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen die Coil-coiled-Domäne (783-988) von Girdin	AG Lammers
α -Glut1	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen Glut1	Diagnostik International (Karlsdorf)

α -p-GSK3 α/β (S21/9)	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen phosphoryliertes S21 der GSK3 α oder S9 der GSK3 β	Cell Signaling (Frankfurt)
α -GSK3 α/β	Monoklonaler Mausantikörper; IgG gegen GSK3 α/β	Santa Cruz (US)
α -p-IR (Y972)	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen phosphoryliertes Y972 des IR	Assay Designs (Ann Arbor, US)
α -IR CT	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen die letzten 15 carboxyterminalen Aminosäuren (1356-1370) des IR	AG Lammers
α -p-IRS-1 (Y989)	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen phosphoryliertes Y989 des IRS-1	Santa Cruz (US)
α -p-IRS-1 (S636/639)	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen phosphoryliertes S636/639 des IRS-1	Cell Signaling (Frankfurt)
α -IRS-1 CT	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen den Carboxyterminus (1221-1235) des IRS-1	AG Lammers
α -IRS-1 CT	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen den Carboxyterminus (1221-1235) des IRS-1	Millipore (Billerica, US)
α -GST-IRS-1 (936-1235)	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen ein GST-Fusionsprotein (936-1235) des IRS-1	AG Lammers
α -KIF5B	Monoklonaler Mausantikörper; IgG gegen KIF5B	Santa Cruz (US)
α -myc	Monoklonaler Mausantikörper; IgG gegen das myc-Peptid EQKLISEEDL (Klon 9E10)	AG Lammers
α -PAS	Monoklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen Phospho-Akt-Substrate (Klone 110B7E)	Cell Signaling (Frankfurt)
α -Phosphotyrosin	Monoklonaler Mausantikörper; IgG gegen Phosphotyrosin (Klon 4G10)	Millipore (Billerica, US)

α -PI3K (p110 β)	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen den C-terminus der PI3K (p110 β)	AG Lammers
α -PTP α	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen GST-Fusionsprotein (intrazelluläre Domäne) der PTP α	AG Lammers
α -PTP-SHP2	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen den C-Terminus der PTP SHP2	AG Lammers
α -RPS25	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen den N-Terminus von RPS25 (1-15)	AG Lammers
α -Shc	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen Shc1	AG Lammers
α -Shc	Monoklonaler Mausantikörper; IgG gegen Shc1	Santa Cruz (US)
α -p-p70/p85-S6K (T389)	Monoklonaler Mausantikörper; IgG gegen phosphoryliertes T398 der p70-S6 Kinase und T412 der p85-S6 Kinase	Cell Signaling (Frankfurt)
α -p70/p85 S6K	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen p70 und p85 S6 Kinase	Cell Signaling (Frankfurt)
α -STAT3	Monoklonaler Mausantikörper; IgG gegen STAT3 (Klon 79D7)	Cell Signaling (Frankfurt)
α -TBC1D1	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen TBC1D1	Cell Signaling (Frankfurt)
α -p-Vasp (S157)	Polyklonaler Kaninchenantikörper; IgG gegen phosphoryliertes S157 in VASP	Cell Signaling (Frankfurt)
α -VSV	Monoklonaler Mausantikörper; IgG gegen das VSV-Peptid YTDIEMNRLGK (Klon P5D4)	AG Lammers

Sekundärantikörper

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
Ziege- α -Maus, HRP konjugiert	Antikörper aus Ziege gegen Maus IgG (Fc-Spec.), konjugiert mit HRP	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Ziege- α -Kaninchen, HRP konjugiert	Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG (Fc-Spec.), konjugiert mit HRP	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Schaf- α -Dig-Antikörperfragment	Fab-Fragment von einem α -Digoxigenin Antikörper aus Schaf; konjugiert mit HRP	Roche (Mannheim)

3.1.6 Puffer und Stammlösungen

3.1.6.1 Molekularbiologie

6x DNA-Ladepuffer

0,05 % (w/v) Bromphenolblau
0,05 % (w/v) Xylencyanol
30 % (v/v) Glycerin
100 mM EDTA (pH 8)

10x TAE

400 mM Tris
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
pH 8 (HAc)

1x TE

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
0,1 mM EDTA

3.1.6.2 Kultivierungsmedien für Bakterien

LB-Medium

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl
pH 7,2 (HCl)

LB-Medium mit Antibiotika

LB-Medium add. 100 μ g/ml Ampicillin oder
50 μ g/ml Kanamycin

LB-Nährmedium mit Antibiotika
(Agarplatten)

LB-Medium add. 100 μ g/ml Ampicillin oder
50 μ g/ml Kanamycin
1,5 % (w/v) Agar

KCM	0,5 M KCl 0,15 M CaCl ₂ 0,25 M MgCl ₂
TSB	LB-Medium 10 % (v/v) PEG 3350 5 % (v/v) DMSO 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄

3.1.6.3 Kultivierungsmedien für Zellen

Zellkulturmedium (HEK293 und C2C12)	<i>Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium</i> (DMEM) 4,5 g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin Lonza (Basel, CH)
Medienzusätze	10 %, 2 % oder 0,5 % (v/v) FCS, Thermo- Fisher (Schwerte) L-Glutamin, Lonza (Basel, CH)
Zellkulturmedium (humane Skelettmuskelzellen)	50 % Modified Eagle's Medium (α -MEM) 50 % Ham's Nutrient Mixture F12
Medienzusätze	25 % FCS 1,25 % Hühnerembryoextrakt (Haywards Heath, UK) L-Glutamin Pen-Strep, Lonza (Basel, CH) Amphotericin B, Lonza (Basel, CH)
Fusionsmedium (humane Skelettmuskelzellen)	α -MEM
Medienzusätze	2 % FCS L-Glutamin Pen-Strep Amphotericin B

Trypsin/EDTA
500 mg/l Trypsin
200 mg/l EDTA
Lonza (Basel, CH)

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
154 mM NaCl
5,5 mM Na₂HPO₄
1 mM KH₂PO₄
(pH 7,5)
Lonza (Basel, CH)

Einfriermedium
FCS
10 % DMSO

3.1.6.4 Transfektionslösung

2x BBS Puffer
50 mM BES (pH 6,96)
280 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄

3.1.6.5 Proteinbiochemie

Lysepuffer
10 % (v/v) Glycerin
1 % (v/v) Triton X-100
50 mM HEPES (pH 7,5)
150 mM NaCl
1,5 mM MgCl₂
1 mM EGTA
100 mM NaF
10 mM Na₄P₂O₇
1 mM Na₃VO₄
1 mM PMSF
10 µg/ml Aprotinin

} frisch hinzufügen

HNTG	20 mM HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Triton X-100 10 % (v/v) Glycerin 10 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄
3x Lämmli-puffer	3 % (w/v) SDS 3 % (v/v) β-Mercaptoethanol 10 mM EDTA (pH 8) 20 % (v/v) Glycerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
10x Tris-Glycin (TG)	248 mM Tris 1918 mM Glycin 35 mM SDS
Upper Tris (4x)	0,5 M Tris Base 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8 (HCl)
Lower Tris (4x)	1,5 M Tris Base 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8 (HCl)
Rotiphorese 30 Gelmix	29,22 % (w/v) Acrylamid 0,78 % (w/v) Bisacrylamid
Transblot	48 mM Tris-HCl (pH 7,5) 39 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol 0,004 % (w/v) SDS

Ponceau-S-Färbelösung	0,2 % Ponceau S 2 % Trichloressigsäure
NET (10x)	1,5 M NaCl 50 mM EDTA (pH 8) 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) 0,5 % (v/v) Triton X-100
Tris-Puffer + Tween	20 mM Tris Base 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween-20 pH 7,5 (HCl)
Tris-Puffer für 14-3-3-Probe	25 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,5 M NaCl 5 % BSA
Blocklösung (NET-G)	1x NET 0,25 % (w/v) Gelatine
Blocklösung (Milch)	Tris-Puffer + Tween 5 % (w/v) Milchpulver

3.1.6.6 Massenspektrometrische Analysen

Methanol-haltige Ammonium-bicarbonat-Lösung	50 mM (NH ₄)HCO ₃ 50 % (v/v) Methanol
Iodoacetamid-Lösung	55 mM Iodoacetamid 100 mM (NH ₄)HCO ₃

Methanol- und Methansäure-haltige	50 mM (NH ₄)HCO ₃
Triethylammoniumbicarbonat-Lösung	50 % (v/v) Methanol
	5 % (v/v) Methansäure
	45 mM Triethylammoniumbicarbonat

3.1.6.7 FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analysen

Propidiumiodidlösung	1 % (w/v) Natriumcitrat
	0,1 % (v/v) Triton X-100
	50 µg/ml Propidiumiodid

Natriumchloridlösung	125 mM NaCl
	32 mM HEPES
	5 mM KCl
	5 mM D-Glukose
	1 mM MgCl ₂
	1 mM CaCl ₂

3.1.6.8 Radiochemische Analysen

HEPES-Puffer	20 mM HEPES
	140 mM NaCl
	5 mM KCl
	2,5 mM MgSO ₄
	1 mM CaCl ₂
	0,1 % (w/v) BSA
	pH 7,4 (NaOH)

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Transformation von Plasmiden in Bakterien

Unter dem Begriff der Transformation versteht man die Einführung von DNA in lebende Bakterien. Hierbei werden Plasmide in kompetente Bakterienstämme (3.1.2) eingebracht,

um sie mit deren Hilfe zu vermehren. Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte nach der Methode von Chung und Miller (1988). Dafür wurden die Bakterien bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,3$ bis $0,5$) bei 37 °C in LB-Medium kultiviert, abzentrifugiert und in eiskaltem TSB resuspendiert. Diese wurden dann aliquotiert ($100\text{ }\mu\text{l}$), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die auf Eis langsam aufgetauten kompetenten Bakterien wurden mit einem Gemisch aus 10 ng Plasmid-DNA, $20\text{ }\mu\text{l}$ KCM und $80\text{ }\mu\text{l}$ Wasser versetzt. Der Ansatz inkubierte für 30 min auf Eis, gefolgt von einem Hitzeschock von 40 s bei 42 °C im Wasserbad und einer Abkühlung auf Eis für 1 min . Die weitere Inkubation von 50 min bei 37 °C erfolgte nach dem Zusetzen von $800\text{ }\mu\text{l}$ LB-Medium. Die Bakterien wurden dann auf Antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von jeder Transformation wurde eine Kolonie in 50 ml bzw. 250 ml LB-Kulturmedium aufgenommen, über Nacht auf dem Schüttler (150 rpm) bei 37 °C kultiviert, die Bakterien lysiert und die DNA aufgereinigt.

3.2.1.2 Präparation von DNA aus Bakterien, Konzentrationsbestimmung und Restriktionsverdau

Für die Präparation von DNA aus Bakterien ist ein Plasmid-Aufreinigungskit (Plasmid plus Midi- oder Maxi-Kit, Qiagen, Hilden) verwendet worden. Die Bakterienkultur aus 3.2.1.1 wurde für 15 min bei 4 °C und 6.000 g abzentrifugiert, nach Anleitung des Herstellers in einem Tris-EDTA-Puffer resuspendiert und anschließend mit Lysepuffer ($0,2\text{ M}$ SDS, 1% NaOH) lysiert. Nach der Neutralisierung der Lösung wurde durch Filtration (Qiafilter Cartidge) die Plasmid-DNA von genomischer DNA und Proteinen getrennt. Durch Bindung der DNA an eine Silikamatrixsäule war es möglich, diese zu waschen und danach mit TE zu eluieren. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm bestimmt. DNA und RNA absorbieren das Licht bei 260 nm , während Kontaminationen, wie Proteine, das Licht bei 280 nm absorbieren. Der Quotient aus beiden Messwerten ($260\text{ nm}/280\text{ nm}$) gibt Aufschluss über die Qualität der DNA und sollte zwischen $1,8$ und 2 liegen. Die Konzentration der DNA wurde aus dem Messwert bei 260 nm errechnet (Messwert \times Verdünnung $\times 50\text{ }\mu\text{g/ml}$ [$1\text{ OD} = 50\text{ }\mu\text{g/ml}$]). Die DNA wurde anschließend mit Hilfe eines Restriktionsverdau kontrolliert.

3.2.1.3 Auftrennung der DNA durch Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über horizontale Gelelektrophorese. Je nach Fragmentgröße wurde ein 0,9- bis 2%iges Agarosegel verwendet. Die Agarose wurde zusammen in 1x TAE-Puffer aufgekocht und danach Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) zugegeben. Darauffolgend wurde das verflüssigte Gel in eine Kammer gegossen und mit einem Kamm versehen, um Probenaschen zu erzeugen. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Durch das Anlegen einer Spannung von 70 bis 80 V wanderte die negativ-geladene DNA im Gel in Richtung des positiven Pols und wurde somit der Größe nach aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße diente ein Längenstandard (Cex-Marker), der zusätzlich zu den Proben aufgetragen wurde. Durch UV-Licht und die Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht.

3.2.2 Zellkulturtechniken

3.2.2.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden im Zellkulturmedium bei 37 °C und 7 % CO₂ in einem Inkubator kultiviert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 80 bis 90 % erreichten, wurden sie mit PBS gewaschen und mit Trypsin inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen von der Oberfläche wurden sie in frischem Kulturmedium aufgenommen und ein Teil der Zellen (1:10 Verdünnung) für die Weiterführung der Kultur verdünnt. Für die einzelnen Versuche wurden die Zellen ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % kultiviert. Für Stimulationsversuche wurden die Zellen ca. 24 h vor der Lyse auf 0,5 % FCS im Zellkulturmedium (Hunger-Medium) gesetzt und danach für 15 min mit den angegebenen Konzentrationen an Insulin stimuliert. Bei der Inhibierung von c-Abl wurden die Zellen für 24 bzw. 48 h mit 50 µM STI-571 inkubiert. Spezifische Zellzahlen für die Untersuchungen der Glykogensynthese, der Rezeptorinternalisierung, des Zellzyklus, des Wachstums und der miRNA sind in den einzelnen Abschnitten angegeben. Die Zellzahl ließ sich dabei mit der Neubauer-Zählkammer bestimmen. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmenkontamination getestet. Dafür wurden Zellen, die nicht kontaminiert waren, auf Glasplättchen ausgesät und mindestens 24 h mit den zu untersuchenden Zellkulturüberständen kultiviert. Für die Fixierung der Zellen auf den Plättchen wurden

diese mit Methanol für 20 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und 60 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit DAPI ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$ in PBS) behandelt. Nach mehrmaligem Waschen der Glasplättchen mit PBS wurden diese mit Permafluor auf einem Objektträger fixiert. Dapi bindet nicht nur an die DNA im Zellkern, sondern auch an die DNA der Mykoplasmen, die dann im Fluoreszenzmikroskop unter UV-Licht durch verstreute Punkte im Zytoplasma der Zellen sichtbar ist.

Die Analysen humaner Primärzellen wurden in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Staiger (Universitätsklinikum Tübingen) durchgeführt. Hierfür wurden die Skelettmuskelzellen aus Biopsien des *vastus lateralis* Muskels von 32 jungen und gesunden Studienteilnehmern verwendet. Diese Zellen wurden wie von Stefan et al. beschrieben kultiviert (2005). Für die Experimente wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 80 bis 90 % für 5 Tage auf Fusionsmedium gesetzt, bis sie komplett zu Myotuben ausdifferenzierten (Krützfeldt et al., 2000).

3.2.2.2 Transfektion von Säugerzellen

Für die Transfektion von Säugerzellen gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die DNA kann über Elektroporation (mechanisch) oder über Phagozytose von Präzipitaten oder Lipidvesikeln in die Zelle eingeschleust werden. In dieser Arbeit wurde für die stabile Transfektion von Zellen die Kalzium-Phosphat-Methode nach Chen und Okayama gewählt (1987). Dafür wurden 6×10^4 Zellen pro 6-Loch in 2 ml ausgesät, nach ca. 24 h mit 200 μl eines Gemisches von 2 bis 4 μg DNA, 0,2 μg pSV2-neo Vektor (für die Selektion), 0,125 M CaCl_2 und BBS-Puffer für weitere 15 bis 18 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 3 % CO_2 inkubiert. Dabei bildete sich ein Kalzium-Phosphat-DNA-Präzipitat, welches von den Zellen phagozytotisch aufgenommen wurde. Danach wurden die Zellen gewaschen und für ca. 30 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 7 % CO_2 inkubiert, in denen die Zellen das transfizierte Protein und das Selektionsgen exprimierten. Die Zellen wurden dann für 2 Wochen mit Zellkulturmedium und 1 mg/ml G418 (Geneticin, Invitrogen, Eggenstein) selektiert. Einzelne Kolonien wurden isoliert, expandiert und auf Expression getestet.

Für die Untersuchung der 14-3-3-Bindungsstellen wurden HEK293-Zellen transient mit Girdin, Daple, ihren Mutanten oder Gipie transfiziert. Hierzu wurden die Zellen mit einem Gemisch aus 1,5 μg DNA, 4,5 μg Polyethylenimin und 1 ml serumfreien Medium für max. 48 h inkubiert. Je nach Expressionseffizienz (Mikroskop) wurden die Zellen mit

serumfreiem Medium für mindestens 6 h gehungert. Danach wurden diese, wie unter 3.2.3.1 beschrieben, mit unterschiedlichen Aktivatoren und Inhibitoren behandelt.

3.2.2.3 Girdin *knockdown* durch RNA-Interferenz

Um den Einfluss von bestimmten Proteinen in der Zelle zu untersuchen, kann mit Hilfe von *small interfering* RNA (siRNA) die Expression dieser Proteine gezielt herunterreguliert werden. SiRNA sind kurze einzel- oder doppelsträngige RNA, die einer Nukleotidsequenz der mRNA des auszuschaltenden Proteins komplementär sind. In dieser Arbeit wurden siRNA „*siGenome SMARTpool*“ von Dharmacon (Lafayette, US), bestehend aus 4 verschiedenen siRNA, verwendet. Für die Transfektion von C2C12-Zellen wurden 1×10^5 Zellen pro 6-Loch in 2 ml Medium ausgesät und am darauffolgenden Tag mit einem Gemisch aus siRNA (Endkonzentration 25 nM) und Dharmafect nach Anleitung des Herstellers transfiziert. Die Zellen wurden nach ca. 24 h für weitere 24 h gehungert, dann mit den angegebenen Konzentrationen an Insulin stimuliert und anschließend lysiert.

3.2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Das Einfrieren von Zelllinien dient der langfristigen Lagerung. Die Zellen wurden dazu mit PBS gewaschen, danach mit Trypsin abgelöst, in Einfriermedium aufgenommen und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und für mindestens 24 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, bevor sie in dann in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Um die Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und in eine Kulturschale mit frischem Medium überführt. Nach 24 h wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um das DMSO aus der Kultur zu entfernen. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

3.2.3 Proteinbiochemie

3.2.3.1 Stimulierung von Zellen mit Aktivatoren und Inhibitoren verschiedener Kinasen bzw. dem Phosphatasehemmer Calyculin A

Zur Untersuchung der Regulation der 14-3-3-Bindungsstellen wurden HEK293-Zellen 24 h nach der Transfektion (3.2.2.2) in Kulturmedium ohne FCS für mindestens 6 h

gehungert. Die Zellen wurden daraufhin mit Aktivatoren und Inhibitoren unterschiedlicher Kinasen inkubiert (Tabelle 1). Vor der Zugabe der Aktivatoren erfolgte, je nach den zu untersuchenden Kriterien, die Inkubation mit den spezifischen Inhibitoren. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert.

Substanz	Konzentration	Inkubationsdauer [min]	Bezugsquelle
IGF-1	50 ng/ml	15	Invitrogen (Eggenstein)
PI-103	1 μ M	30	DSTT (Dundee, UK)
EGF	100 ng/ml	15	Invitrogen (Eggenstein)
PMA	100 ng/ml	30	Sigma-Aldrich (Steinheim)
BI-D1870	10 μ M	30	Böhringer Ingelheim (Ingelheim)
FSK	20 μ M	30	Sigma-Aldrich (Steinheim)
H-89	30 μ M	30	Calbiochem (Darmstadt)
A23187	10 μ M	15	Calbiochem (Darmstadt)
A-769662	50 μ M	60	DSTT (Dundee, UK)
Calyculin A	100 nM	15	Calbiochem (Darmstadt)

Tabelle 1: Konzentration und Hersteller der Inhibitoren und Aktivatoren verschiedener Kinasen

3.2.3.2 Zellyse mit Triton X-100

Zur Analyse der Proteine wurden die Zellen mit dem Detergenz Triton X-100 lysiert. Dabei werden zytoplasmatische und membranständige Proteine in Lösung gebracht, während der Zellkern und Teile des Zytoskeletts unlöslich sind. Für die Lyse wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, mit Lysepuffer versetzt und für 2 min bei RT oder 4 min auf Eis inkubiert. Nach dem Überführen der Lysate in ein Reaktionsgefäß wurden die Proben für 20 min bei 13.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Triton-unlösliche Fraktion wurde mit Lämmli-puffer versetzt und in Lösung gebracht. Beide Fraktionen wurden für weitere Analysen verwendet.

3.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bradford-Methode (Bradford, 1976) dient der Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten. Der Nachweis erfolgt hierbei über die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an die Proteine. Dazu wurden die Lysate 1:1000 in der Bradford-Lösung (1:5) verdünnt und die Absorption in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Durch die Erstellung einer Standardkurve aus unterschiedlichen Rinderserumalbuminkonzentrationen (BSA, 1 bis 10 µg/ml) konnte über lineare Regressionsanalyse die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt werden.

3.2.3.4 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) dient der Anreicherung von bestimmten Proteinen aus Zelllysaten mit Hilfe spezifischer Antikörper. Hierfür wurden die Zellen lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.3.3). Die Lysate wurden mit 1 bis 2 µg Antikörper und Protein G/A-Sepharosekügelchen für 3 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit HNTG wurden die Präzipitate auf 95 °C für 5 min in Lämmli-puffer erhitzt und somit die gebundenen Proteine von dem an die Kügelchen kovalent gebundenen Protein G/A getrennt. Für die Untersuchungen der 14-3-3-Bindungsstellen wurden spezielle GFP-bindende Agarosekügelchen (GFP-Trap®) verwendet. Diese haben ein Fragment eines GFP-bindenden Antikörpers kovalent gebunden.

3.2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). In dieser Arbeit wurden alle Proteinproben unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Das im Lämmli-puffer enthaltene β-Mercaptoethanol diente als Reduktionsmittel, um vorhandene Disulfidbrücken aufzubrechen. Das SDS bindet an die Proteine, denaturiert diese und bildet mit ihnen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe. Dadurch werden die Proteine nur noch anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Laufstrecke der einzelnen Proteine hängt von der Dichte des SDS-Gels ab. Es wurden daher, abhängig von dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine, 8- bzw. 10%ige SDS-Polyacrylamidgele angefertigt. Die Zusammensetzung der Trenngele und des dazugehörigen Sammelgels ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Trenngel	8 %	10 %	4%iges Sammelgel
Acrylamid [ml]	11	13,3	Acrylamid [ml] 2
Wasser [ml]	19	16,7	Wasser [ml] 9,25
Lower Tris (4x) [ml]	10	10	Upper Tris (4x) [ml] 3,75
Temed [μ l]	66	66	Temed [μ l] 25
10%iges APS [μ l]	270	270	10%iges APS [μ l] 150

Tabelle 2: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Das Molekulargewicht der Proteine konnte mit Hilfe eines Standards (MWM) identifiziert werden. Der Standard wurde aus folgenden Proteinen zusammengestellt:

Myosin	200 kDa
β -Galactosidase	116 kDa
Phosphorylase b	97 kDa
Rinderserumalbumin	66 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carboanhydrase	31 kDa
Trypsin-Inhibitor	21 kDa
Lysozym	14 kDa

3.2.3.6 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen und anschließende Detektion (Western Blot-Methode)

Beim Western Blot-Verfahren werden die Proteine elektrophoretisch aus dem Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und auf ihr immobilisiert. In dieser Arbeit wurde hierfür das Halbtrocken-Verfahren angewendet. Es wurden drei Lagen mit Transblot-Puffer getränkte Filterpapiere auf die Anode gelegt und darauf eine ebenfalls in Transblot-Puffer getränkte Nitrozellulosemembran platziert. Das SDS-Gel wurde 5 min in Transblot-Puffer inkubiert, dann blasenfrei auf diese positioniert und zuletzt mit drei Lagen getränktem Filterpapier bedeckt. Der Transfer erfolgte bei 4 °C mit 0,34 mA/cm² für 3 h. Anschließend wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran durch Ponceau S temporär gefärbt, um den Transfer zu überprüfen und die Banden des MWM zu markieren. Die Inkubation der Membran in NET-G für mindestens 1 h verhinderte unspezifische Bindungen der Antikörper an Proteine und Membran. Danach folgte der Nachweis der Proteine durch Bindung spezifischer Antikörper für mindestens

1 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht. Die Membranen wurden anschließend drei Mal für jeweils 15 min bei RT mit NET gewaschen, bevor sie im nächsten Schritt mit dem an Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:15.000 Verdünnung) in NET für 1 h bei RT inkubiert wurden. Danach wurden die Membranen erneut drei Mal mit NET gewaschen. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des Luminols, das in der ECL-Lösung enthalten ist. Die dabei entstehende Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert. Für die Auswertung wurden die Filme eingescannt und bei Bedarf densitometrisch analysiert.

3.2.3.7 Herstellung der DIG-gekoppelten 14-3-3-Probe für den 14-3-3 Far-Western

Die rekombinant hergestellten 14-3-3-Isoformen BMH1 und BMH2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (DSTT, UK; ca. 50 µg) wurden für 2 h bei RT mit 8 µg Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (DIG-NHS; DIG-Protein Labeling-Kit von Roche, Mannheim) in 400 µl PBS (pH 8,5) inkubiert. Die freien Aminogruppen der zu markierenden Proteine reagieren dabei mit DIG-NHS unter Bildung einer stabilen Amidbindung. Danach wurde das überschüssige DIG-NHS durch Dialyse gegen PBS (pH 7,2) entfernt. Die fertige Probe wurde auf 1 µg/ml in Tris-Puffer verdünnt und bei -20 °C in Aliquots aufbewahrt.

3.2.3.8 14-3-3 Far-Western-Methode

Bei einem Far-Western wird die *in vitro*-Bindung zweier Proteine untersucht. Für die Analyse der 14-3-3-Bindung an Girdin, Daple und Gipie wurden GFP-Girdin, GFP-Daple, ihre Mutanten und GFP-Gipie transient in HEK293-Zellen überexprimiert, die Zellen mit verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren behandelt und dann lysiert (3.2.3.1 und 3.2.3.2). Das GFP-Protein wurde mit GFP-Trap® präzipitiert (3.2.3.4), über eine SDS-PAGE (3.2.3.5) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (3.2.3.6). Danach wurde die Membran in Tris-Puffer mit 5 % Milchpulver geblockt und anschließend drei mal 10 min in Tris-Puffer gewaschen. Die DIG-gekoppelte 14-3-3-Probe wurde dann wie ein Primärantikörper (1:1000) verwendet. Die gebundenen 14-3-3-Proteine wurden mit Hilfe eines Meerrettichperoxidase-gekoppelten α-Dig-Antikörperfragmentes im Western Blot-Verfahren mit ECL nachgewiesen (3.2.3.6).

3.2.3.9 Massenspektrometrische Analysen

Die massenspektrometrischen Analysen wurden in dieser Arbeit zur Identifizierung der Phosphorylierungsstellen von Girdin und Daple verwendet. Dafür wurden HEK293-Zellen, wie zuvor beschrieben, transfiziert, lysiert und das zu untersuchende Protein mit Hilfe von GFP-Trap® immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden dann mit Lämmli-Puffer und 55 mM Iodoacetamid-Lösung versetzt und 30 min im Dunkeln inkubiert. Die über eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie (Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen, Eggenstein) angefärbt, die zu untersuchenden Proteine mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten, zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Für die Entfärbung der Gelstücke wurden diese mit 200 µl einer Methanol-haltigen Ammoniumbicarbonatlösung versetzt und alle 30 min so lange gewechselt, bis die Stücke vollständig entfärbt waren. Danach wurde die Methanol-haltige Ammoniumbicarbonatlösung ein letztes Mal abgesaugt und durch 100%iges Methanol ersetzt, das zum Schrumpfen der Gelstücke führte. Das Methanol wurde nach 15 min entfernt und die Gelstücke mit 100 µl Triethylammoniumbicarbonat (TEAB; 100 mM) für 10 min gewaschen. Nach dreimaligem Waschen mit Methanol und TEAB wurden die Gelstücke luftgetrocknet und über Nacht bei 30 °C mit 2,5 ng Trypsin in TEAB inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden anschließend nochmals mit Methanol- und Methansäure-haltiger TEAB-Lösung gewaschen, der Überstand mit dem ersten vereinigt und in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Die weiteren Analysen wurden durch die Abteilung Massenspektroskopie (MRC, Dundee, UK) durchgeführt. Die Phosphopeptide konnten dort mit Hilfe der LC-MS- und MS/MS-Methode identifiziert werden, wofür ein Applied Biosystems 4000 QTrap mit einem Dionex/LC Packings Famos-Switchos-Ultimate HPLC System gekoppelt wurde. Die Daten wurden mit Hilfe der Mascot-Software (www.matrixscience.com) gegen die SwissProt-Datenbank analysiert.

3.2.4 RNA- und miRNA-Analysen

3.2.4.1 Extraktion von Gesamt-RNA

Die Extraktion der RNA erfolgte durch ein RNA-Isolierungskit (RNeasy-Kit, Qiagen). Die Zellen wurden dafür in 10 cm-Schalen kultiviert und nach dem Erreichen von 80 % Konfluenz zunächst mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen sofort mit 350 µl

RLT-Puffer (Qiagen) mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol versetzt und für 3 min bei RT inkubiert. Die Zellysate wurden auf eine QIAshredder Spinsäule überführt und bei 10.000 g 2 min zentrifugiert. Den Homogenisaten wurden dann 350 µl 70%iger Ethanol zugefügt und dieses Gemisch auf die RNeasy Mini-Säule gegeben. Diese aus Silicagel-Membranen bestehende Säule bindet spezifisch RNA. Alle anderen Bestandteile wie etwa DNA und Proteine wurden nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten mit verschiedenen Puffer-Lösungen (siehe Herstellerprotokoll) entfernt. Die DNA wurde durch die Inkubation mit DNase I (27 U/Probe) direkt auf der Säule entfernt. Die gebundene RNA konnte anschließend mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert, aliquotiert und danach bei -80 °C gelagert werden.

3.2.4.2 Quantitative *real time* PCR

Die reverse Transkriptasereaktion wurde mit 1 µg Gesamt-RNA in einem Ansatz von 20 µl mit den Random Hexamerprimern und dem *First strand* cDNA-Synthesekit (Roche, Mannheim) durchgeführt. Aliquots von 2 µl dieser Reaktion wurden für die quantitative PCR (qPCR) mit SYBR® Green mit dem Lightcyclersystem 1.5 von Roche (Mannheim) verwendet. Die dafür verwendeten Primerpaare sind unter 3.1.1 aufgelistet. Die qPCR wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl, welches 2 µl FastStart DNA-MasterSYBR Green I, 4 (IR) bzw. 5 mM (IRS-1) MgCl₂ und 1 µM Primer beinhaltete, durchgeführt. Die mRNA-Expressionen wurden in relativen, nicht normalisierten *Arbitrary Units* angegeben.

PCR-Einstellungen

Denaturierung	95 °C	10 min		
50 Zyklen	IRS-1	95 °C	15 s	
		68 °C	10 s	IR 60 °C 10 s
		72 °C	17 s	72 °C 6 s

Für die quantitative mRNA-Analyse von Girdin in primären Skelettmuskelzellen wurde die mRNA wie oben beschrieben isoliert. Die qPCR wurde in Duplikaten mit Hilfe Fluoreszenz-gekoppelter Sonden (Roche Universal Probe Library) im Roche Lightcycler 480 gemessen. Die Daten wurden auf das Haushaltsgen RPS13 mittels ΔC_t -Methode normalisiert.

3.2.4.3 Bestimmung und Quantifizierung von miRNAs

miRNA sind kurze, aus ca. 21 bis 23 Nukleotiden bestehende, hoch konservierte, nicht kodierende RNA, die spezifisch die Genexpression auf der posttranskriptionalen Ebene regulieren. Zur Aufbereitung und Analyse der miRNA in den Girdin-überexprimierenden und parentalen C2C12-Zellen wurden die Proben der „Microarray Facility Tübingen“ (MFT; Tübingen) übergeben. Dort wurden die RNAs über ein TrueSeq Small RNA Library Präparationskit (Illumina) für die Sequenzierung auf dem Illumina Genome Analyzer Iix (GAIIx) vorbereitet. Jede der zu sequenzierenden Proben wurde im Agilent Bioanalyzer quantifiziert und äquimolare Mengen vereinigt. Dieser Pool wurde auf einer *Lane* einer *Single Read-Flowcell* geladen und im cBot (Illumina) mit dem Cluster Generation Kit die gebundenen DNA-Moleküle über isothermische Amplifikation klonal vermehrt. Anschließend wurde im GAIIx ein Sequenzierlauf mit 32 Zyklen durchgeführt. Die Identifizierung der miRNAs erfolgte anschließend über das Programm miRanalyzer (<http://bioinfo2.ugr.es/miRanalyzer/miRanalyzer.php>). Dabei wurden die Sequenzen mit dem Programm *bowtie4* gegen das Referenzgenom (mm9) abgeglichen und die resultierenden Ergebnisse mit den Genomkoordinaten aller bekannter miRNAs (miRBase v16) verglichen. Es wurden nur Sequenzen gezählt, die eindeutig einer reifen miRNA zugeordnet werden konnten. Die weitere Analyse der Daten erfolgte in Bioconductor 2.14.0 in der statistischen Programmierumgebung R (Version 2.14.0; www.r-project.org).

3.2.5 FACS-Analysen

3.2.5.1 FACS-Untersuchungen auf oxidativen Stress

Die Überschreitung der physiologischen Menge an reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS – *reactive oxygen species*) in einer Zelle wird oxidativer Stress genannt. ROS entstehen bei Stoffwechselfvorgängen der mitochondrialen Elektronentransportkette und Cytochrom-P₄₅₀-Oxidasen. Bei den ROS handelt es sich um das Superoxid-Anionenradikal (O₂⁻), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und das Hydroxylradikal (OH[•]). Um den ROS-Gehalt einer Zelle zu bestimmen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff CM-H₂DCFDA verwendet. Dieser verändert seine Fluoreszenzintensität durch Reaktion mit ROS (Oxidation). Für die Messung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mittels Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst, mit Medium resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Parallel wurde der Farbstoff in DMSO gelöst und mit einer

Natriumchloridlösung auf 10 μM verdünnt. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 g abzentrifugiert, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 250 μl der Farbstofflösung für 30 und 60 min inkubiert und die Intensität des Farbstoffes im BD-FACSCalibur (BD Bioscience, Heidelberg) gemessen. Für die Messung der ROS-Abwehr der Zellen wurden die Proben zusätzlich mit 100 mM tert-Butylhydroperoxid (t-BHP) versetzt und nach 3 und 6 min erneut gemessen. Die Verschiebung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes wurde als Histogramm und Diagramm in RAU (*Relative Arbitrary Units*) ausgegeben.

3.2.5.2 Zellzyklusanalysen

Der Zellzyklus ist in Interphase und Teilungsphase unterteilt. Die Interphase ist durch die Replikation der DNA gekennzeichnet, welche wiederum in fünf weitere Phasen unterteilt ist. Während der Phasen G0 (Ruhephase) und G1 besitzt die Zelle einen diploiden Chromosomensatz. Darauf folgt die Phase der DNA-Verdopplung mit der Synthese-Phase (S) und der postsynthetischen G2-Phase, in der alle Zellen einen reduplizierten Chromosomensatz aufweisen. Die nun folgende Teilungsphase M ist vergleichsweise kurz. Bei der Mitose handelt es sich um die gleichmäßige Aufteilung der Chromosomen auf zwei Tochterzellen, die sich dann wiederum in G0/G1 befinden.

Durch Färbung der DNA mit Propidiumiodid kann der DNA-Gehalt der Einzelzelle durchflusszytometrisch anhand der Fluoreszenzintensität bestimmt und somit die Zellen in die oben genannten Phasen (G0/1, S, G2) eingeteilt werden. Dafür wurden die Zellen mit einer hypotonen Propidiumiodidlösung (Nicoletti et al., 1991) lysiert, anschließend im BD-FACSCalibur die DNA-Gehalte der Zellkerne gemessen und als Histogramm ausgegeben. Die Anzahl der Zellkerne in den unterschiedlichen Phasen wurden in Prozent der Gesamtanzahl der Kerne angegeben.

3.2.6 Physiologische Untersuchungen

3.2.6.1 Wachstumsanalyse von Zellen (WST-Analyse)

Die Anwendung von WST-1-Reagenz von Roche (Mannheim) bietet eine einfache Möglichkeit, kolorimetrisch die Anzahl lebender Zellen zu bestimmen. Hierbei wird ein stabiles Tetrazoliumsalz (WST-1) durch Enzyme lebender Zellen in ein lösliches Formazansalz umgewandelt. Dieser Prozess ist abhängig von der Produktion von

NAD(P)H der zu untersuchenden Zellen. Die dabei gebildete Menge an Formazan korreliert mit der Anzahl der Zellen in der Kultur. Für den WST-1-Versuch wurden 5×10^3 Zellen pro 96-Loch in 100 μ l Medium ausgesät und 1 bis 6 Tage kultiviert. Die Zellen wurde dann mit 10 μ l WST-1-Reagenz versetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die quantitative Analyse erfolgte durch ein Elisa-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Zellkulturmedium ohne Zellen diente als Leerwert.

3.2.6.2 Messung der Glykogensynthese

Glykogen ist die Speicherform von Glukose, bestehend aus langen verzweigten Ketten, die aus einzelnen Glukosemolekülen aufgebaut sind. Die Synthese von Glykogen in Zellen wurde mit einer an Berti et al. angelehnten Methode bestimmt (1997). Dafür wurden 2×10^5 Zellen pro 6-Loch in 2 ml Medium ausgesät, am darauffolgenden Tag für ca. 24 h in Hungermedeium kultiviert, dann dreimal mit HEPES-Puffer gewaschen und mit 1, 3, 10 und 100 nM Insulin für 1 h bei 37 °C inkubiert. Ein Gemisch von D-glucose/D-[14-C]-glucose (5 mM Endkonzentration, 0.3 μ Ci/6-Loch-Schale) wurde hinzugefügt und die Zellen damit für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Überstände verworfen und die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen wurden, konnten diese mit 30%iger (w/v) Kalilauge für 30 min bei RT lysiert werden. Die Proben wurden dann für 30 min auf 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und ein Aliquot für die Proteinbestimmung entnommen. Das Glykogen wurde durch Zusetzen von 900 μ l kaltem Ethanol präzipitiert und anschließend für 5 min bei 9.000 g herunterzentrifugiert. Nach dem Waschen der Pellets mit 1 ml kaltem Ethanol wurden dieses in 500 μ l Wasser aufgenommen. Die Radioaktivität wurde mit einem Scintillationszähler (Hewlett-Packard, Palo Alto, US) gemessen und die Glykogensynthese in cpm pro Proteinmenge angegeben.

3.2.6.3 Untersuchungen der Insulinrezeptorinternalisierung

Nach der Bindung von Insulin an seinen Rezeptor erfolgt die Internalisierung des Rezeptorkomplexes in Endosomen. Hier werden im sauren pH-Wert Insulin und Rezeptor voneinander getrennt. Das Insulin wird abgebaut und der Rezeptor wandert wieder zur Plasmamembran (Rezeptor-, „*recycling*“) oder wird in den Lysosomen degradiert. Für die Untersuchung der Internalisierung wurden 2×10^5 Zellen pro 6-Loch in 2 ml Medium

ausgesät und für ca. 24 h kultiviert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit HEPES-Puffer, wurden sie für 1 h bei 4 °C mit 0,03 µCi 125-I-Insulin inkubiert. Die Inkubation auf Eis führte zum Einfrieren der Membrantätigkeiten und der Internalisierung. Nach dreimaligem Waschen mit kaltem HEPES-Puffer folgte der Internalisierungsschritt, wobei die Zellen für 10 und 30 min bei 37 °C in HEPES-Puffer inkubierten. Direkt nach der Inkubation wurden die Zellen auf Eis mit 0,2 M Essigsäure (Säurewasch) gewaschen. Dieser Waschschrift diente dem Ablösen des noch auf der Oberfläche gebundenen Insulins und wurde für die Messung in einem Reagenzglas gesammelt. Die Zellen wurden danach mit 30%iger (w/v) Natronlauge lysiert und die Radioaktivität der Proben mit einem Gammazähler (Perkin Elmer, Waltham, US) analysiert. Die Rezeptorinternalisierung wurde in Prozent vom Gesamtgehalt des gebundenen Insulins zum Zeitpunkt Null (Lysat und Säurewasch) angegeben.

3.2.7 Statistische Auswertungen der Daten

Die Daten wurden mit Hilfe der Standardabweichung und einem darauffolgendem T-Test analysiert. Für die statistische Auswertung der humanen Daten wurden alle Variablen mit Nicht-Normalverteilung \log_e -transformiert, bevor sie einer linearen Regressionsanalyse unterzogen wurden. Die Methode der kleinsten Fehlerquadrate wurde für die multiple lineare Regressionsanalyse verwendet. Dabei ist die Insulinsensitivität die Ergebnisvariable im Regressionsmodell, die Girdin-mRNA-Expression eine unabhängige Variable und das Geschlecht, das Alter und der *body mass index* (BMI) mögliche Störvariablen. Der Schwellenwert für die Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ gesetzt. Für diese Analysen wurde das Statistikprogramm JMP 8.0 (SAS Institute, Cary, US) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Girdin – ein wichtiger Mediator im Insulinsignalweg

4.1.1 Girdin *knockdown* verringert die Insulinsensitivität von C2C12-Zellen

Um herauszufinden, welchen Einfluss Girdin in C2C12-Zellen hat, wurde die Expression von Girdin mit Hilfe spezifischer siRNA in C2C12-Zellen herunterreguliert. Dafür wurden die Zellen ausgesät und nach 24 h mit einer Kontroll- oder einer spezifisch gegen Maus-Girdin gerichteten siRNA für weitere 48 h inkubiert. Für die Stimulation mit Insulin wurden die Zellen über Nacht gehungert und mit 1 oder 3 nM Insulin stimuliert. Nach der Zelllyse wurden die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot-Verfahren mit Protein- und Phosphopeptid-spezifischen Antikörpern (AK) analysiert. Wie in Abbildung 4.1 gezeigt ist, konnte durch die Transfektion mit Girdin-siRNA die endogene Girdin-Expression um fast 60 % (densitometrische Analyse Abbildung 7.1A) reduziert werden, im Vergleich zu Zellen, die nicht oder nur mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Die reduzierte Girdin-Expression hatte eine verminderte IRS-1-Proteinmenge und Tyrosinphosphorylierung nach Insulinstimulation zur Folge. Eine Phosphorylierung an dem Tyrosinrest 989 kann durch den IR erfolgen und dient als SH2-Andockstelle für p85, die regulatorische Untereinheit der PI3K (Sun et al., 1993). Infolgedessen nahm auch die Akt (T308)- und GSK3 α (S21)-Phosphorylierung ab, ohne dabei deren Proteinmenge zu beeinträchtigen. Girdin ist nicht nur für den PI3K-Signalweg von Bedeutung, sondern auch der Ras/Erk-Signalweg wurde durch die veränderte Girdin-Expression beeinflusst. Die Phosphorylierung von Erk1 nach Insulinstimulation war stark reduziert im Vergleich zu den C2C12-Zellen, die nicht oder mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Die Phosphorylierung von Erk2 verringerte sich hierbei nur gering, und auch die Expression beider Proteine wurde kaum beeinflusst. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Girdin-Expression ein wichtiger Regulationsmechanismus für zelluläre Signalprozesse in C2C12-Zellen ist.

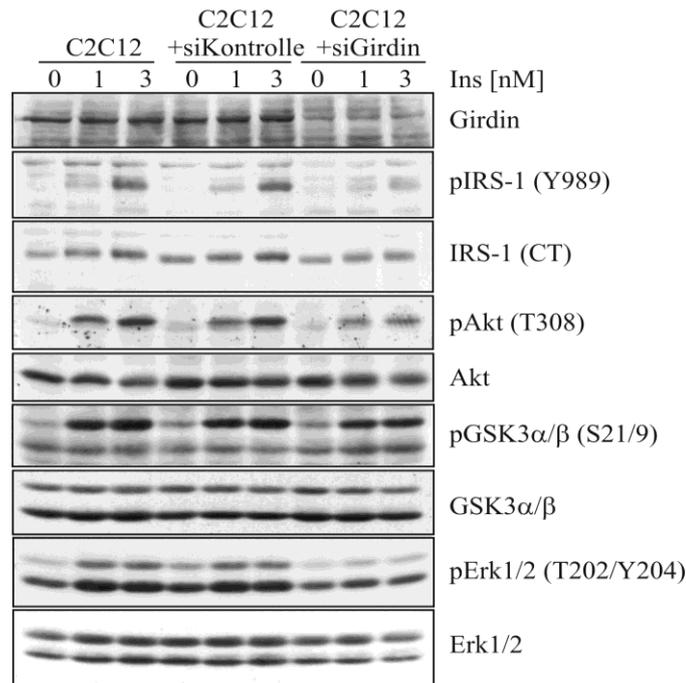


Abbildung 4.1: Girdin knockdown verringert die Insulinsensitivität in C2C12-Zellen
 C2C12-Zellen wurden mit Kontroll- oder Maus-Girdin siRNA transfiziert oder unbehandelt für dieses Experiment verwendet. Nach dem Hungern der Zellen in DMEM mit 0,5 % FCS über Nacht, wurden diese mit den angegebenen Konzentrationen an Insulin stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot-Verfahren mit Protein- und Phosphopeptid (p)-spezifischer AK analysiert.

4.1.2 Stabile Überexpression von Girdin führt zu massiven Veränderungen in C2C12-Zellen

Um Transfektionsartefakte, die bei transienten Transfektionen auftreten können, zu vermeiden und eine stetig gleichmäßige Expression sicherzustellen, wurde humanes Girdin in C2C12-Zellen stabil überexprimiert. Die Überexpression erwies sich jedoch als schwierig und es konnten nur zwei Zelllinien mit ähnlichen Girdin-Überexpressionen kultiviert werden. Diese dienten in der vorliegenden Arbeit der Untersuchung des Einflusses einer erhöhten Girdin-Expression auf das Insulinsignal. Dafür wurden die Zellen über Nacht gehungert und mit den in Abbildung 4.2 angegebenen Konzentrationen an Insulin stimuliert. Anhand der Western Blot-Analysen der Gesamtzelllysate war zu erkennen, dass beide Zelllinien eine stabile ca. vierfach erhöhte Expression von Girdin aufwiesen (Abbildung 4.2A; densitometrische Analyse Abbildung 7.1B). Die Überexpression führte zu einer massiven Erhöhung der IR-Expression und dessen Phosphorylierung, die mit einem Phosphopeptid-spezifischen AK an der

Phosphorylierungsstelle Y972 bestimmt wurde. Die Phosphorylierung des IR war nur zum Teil insulinunabhängig, was möglicherweise durch die starke Rezeptorüberexpression erklärt werden kann. Die IR-Proteinmenge in den Wildtyp-C2C12-Zellen war zu gering, um mit der Western Blot-Methode unter diesen Bedingungen detektiert zu werden. Um eine Idee zu bekommen, warum der IR so massiv erhöht in den überexprimierenden Zellen vorlag, wurde zuerst die Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Dafür wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der quantitativen *real time* PCR-Methode analysiert (Abbildung 4.2B). Die Untersuchungen zeigten eine ca. dreifach erhöhte mRNA-Expression, die nur teilweise die IR-Proteinmenge in den Girdin-überexprimierenden Zellen erklärte.

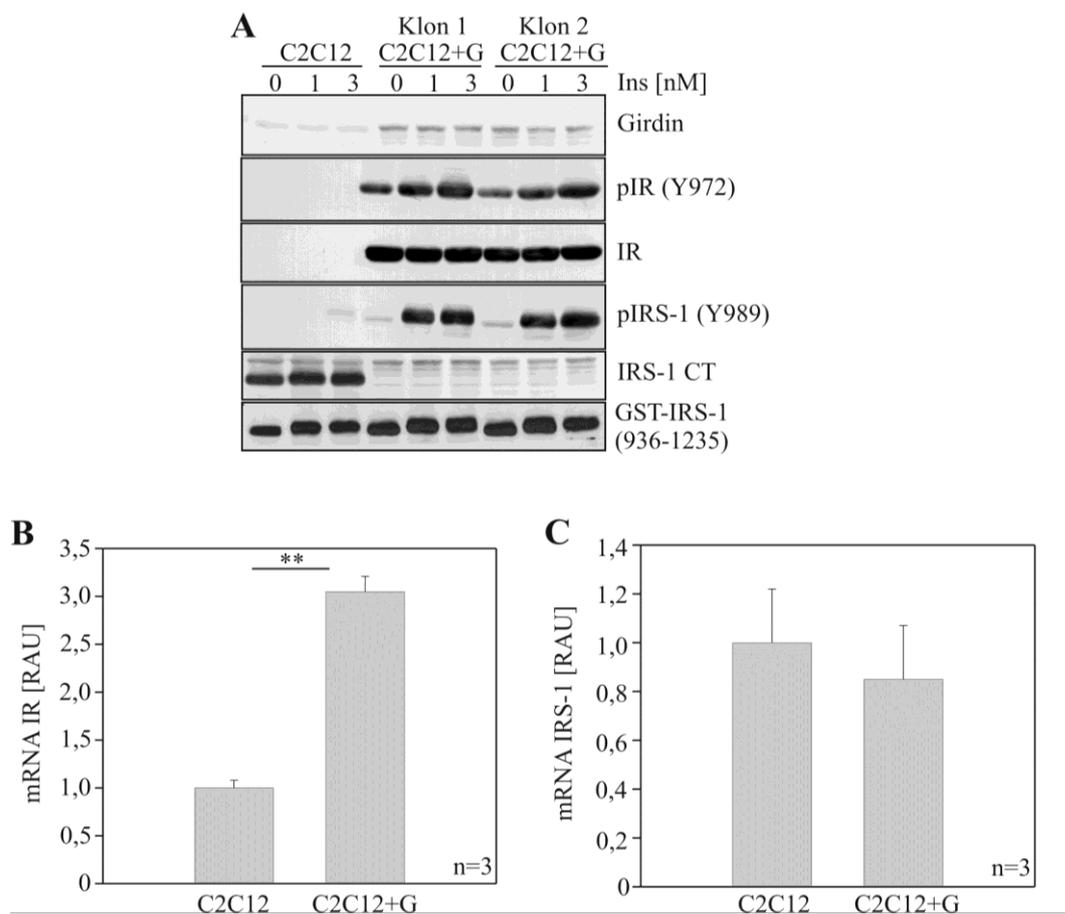


Abbildung 4.2: Girdin-Überexpression in C2C12-Zellen führt zu massiven Veränderungen

(A) Parentale und stabil Girdin überexprimierende C2C12-Zellen wurden über Nacht gehungert und für 15 min mit den angegebenen Konzentrationen an Insulin inkubiert. Die Zellen wurden danach lysiert und die Proteine und deren Phosphorylierung mit Hilfe von SDS-PAGE und der Western Blot-Analyse detektiert. (B und C) mRNA Untersuchungen des IR und IRS-1 mit der quantitativen *real time* PCR-Methode. CT - Carboxyterminus; RAU - *Relative Arbitrary Units*; G – Girdin; ** - $p < 0,005$

Darüber hinaus wurde eine starke IRS-1-Phosphorylierung (Y989) in den Girdin-überexprimierenden Zellen festgestellt (Abbildung 4.2A). Für die Detektion der IRS-1-Proteinmenge in allen drei Zelllinien, wurde ein IRS-1-AK verwendet, der die letzten 12 C-terminalen AS erkennt. Überraschenderweise konnten nur sehr geringe Mengen an IRS-1 in den Girdin-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den parentalen C2C12-Zellen nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde zusätzlich die mRNA-Expression von IRS-1 in beiden Zelllinien bestimmt, bei deren Analysen jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten (Abbildung 4.2C). Zur erneuten Quantifizierung des IRS-1-Proteins mit der Western Blot-Methode wurde ein weiterer IRS-1-AK verwendet, der gegen die letzten 300 C-terminalen AS (936-1235) gerichtet ist. Damit war es möglich, neben den gleichen IRS-1-Proteinexpressionen in den Zelllinien auch einen Unterschied im Molekulargewicht zwischen IRS-1 aus unstimulierten und insulinstimulierten Zellen zu detektieren (Abbildung 4.2A). Ein solcher Effekt wird durch eine Erhöhung der Gesamttyrosinphosphorylierung des Proteins hervorgerufen (Miralpeix et al., 1992). Diese Ergebnisse lassen auf eine C-terminale Modifikation des endogenen IRS-1 nach Girdin-Überexpression schließen.

Als nächstes wurde mit der Akt-Kinase der distale IR-Signalweg untersucht, der eine zentrale Rolle im Insulinsignalweg spielt. Die Phosphorylierung am T308 war in den Girdin-überexprimierenden Zelllinien erhöht und zum Teil insulinunabhängig. Für die Bestimmung der Proteinmenge wurde ein weiteres Aliquot des gleichen Lysats mit einem AK gegen das Akt-Protein geblottet und keine Veränderungen der Akt-Proteinmenge festgestellt (Abbildung 4.3A). Die Aktivierung von Akt wurde anhand konstitutiver Phosphorylierung von Substraten wie z. B. GSK3 α am S21 in den Girdin-überexprimierenden Zellen bestätigt. Auffällig war, dass GSK3 α ein niedrigeres Molekulargewicht in den überexprimierenden Zelllinien aufwies. Zwei Formen der GSK3 α in Muskelzellen mit einem Molekulargewicht von 53 und 51 kDa wurden erstmalig von Nikoulina et al. (2002) beschrieben. Es wurde als mögliches Phänomen einer posttranslationalen Prozessierung, z. B. durch massive Phosphorylierung, gedeutet. In den Western Blot-Analysen wurde zusätzlich eine dritte Bande mit einem Molekulargewicht zwischen den beiden Isoformen mit dem Phosphopeptid-spezifischen AK gegen GSK3 α/β detektiert. Sie trat in beiden überexprimierenden Zelllinien konstitutiv phosphoryliert auf und war mit dem Protein-AK gegen GSK3 α/β nicht nachweisbar. Ob es sich hierbei um ein Hintergrundsignal des AK handelte oder doch um

eine modifizierte Form der GSK3 α oder β , wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Phosphorylierung von GSK3 β blieb im Gegensatz zur GSK3 α unverändert und GSK3 β war in den Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen nur in der Expression ein wenig reduziert.

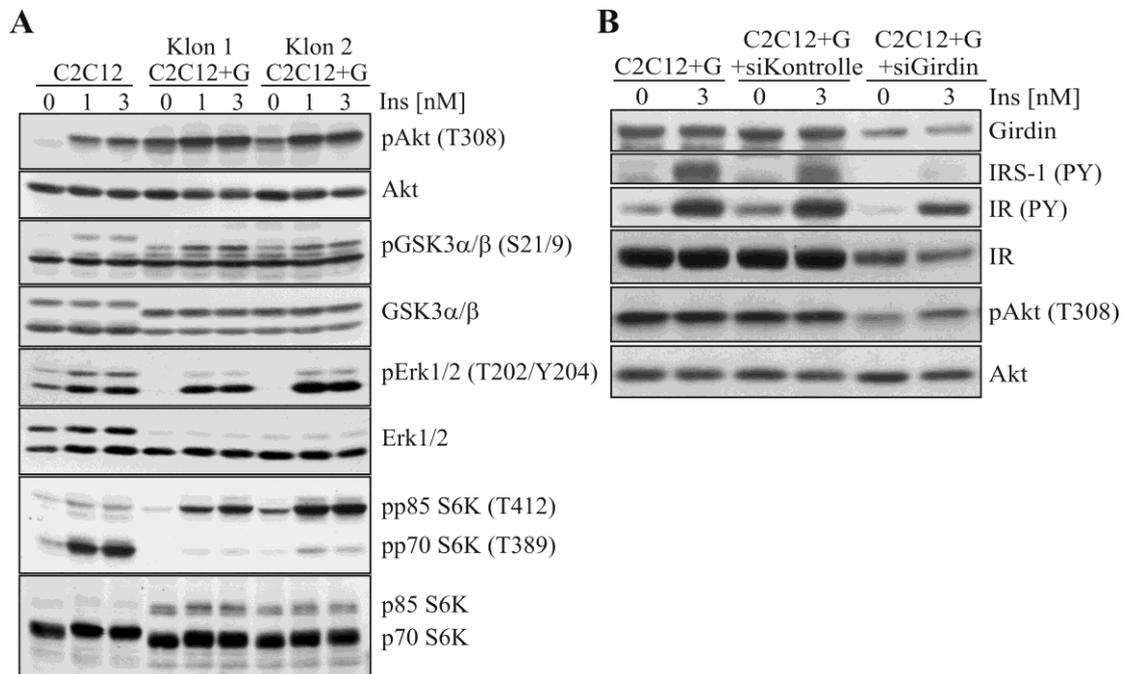


Abbildung 4.3: (A) Auswirkungen auf die IR-Signalkaskade nach Überexpression von Girdin in C2C12-Zellen

Die Zellen wurden über Nacht gehungert, dann mit den angegebenen Konzentrationen an Insulin stimuliert und lysiert. Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit Protein- und Phospho (p)-spezifischen AK analysiert.

(B) Effekte der Girdin-Überexpression sind reversibel

Die Zellen wurden unbehandelt und mit Kontroll-siRNA oder spezifischer siRNA transfiziert, danach mit Insulin stimuliert und die Lysate wie zuvor analysiert.

Neben dem PI3K-Signalweg wurden auch Vertreter des Ras/Erk-Signalweges untersucht. Die Expression und die durch Insulin stimulierte Phosphorylierung von Erk1 waren in den Girdin-überexprimierenden Zellen reduziert, während die Proteinmenge von Erk2 nicht beeinflusst wurde. Zusätzlich führte die Überexpression zu einer geringeren basalen Erk2-Phosphorylierung, die allerdings nach Insulinstimulation teilweise stärker als in den nicht transfizierten Zellen vorlag.

Zuletzt wurde durch einen Phosphopeptid-spezifischen AK gegen die p70-S6 Kinase (p70-S6K) die Aktivität der mTOR-Kinase untersucht. mTOR ist eine weitere

insulinstimulierbare Kinase, die Transkription, Translation und weitere Signale in der Zelle reguliert. Die Phosphorylierung am T389 der p70-S6K, welche die Kinaseaktivität widerspiegelt und durch mTOR vermittelt wird, zeigte eine deutliche Reduktion in Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Es existiert noch eine weitere Isoform der S6K mit einem Molekulargewicht von 85 kDa, auch p85-S6K genannt, deren Funktion bis jetzt noch nicht im Detail geklärt ist. Diese zeigte eine erhöhte Expression und insulinabhängige Phosphorylierung in den Girdin-überexprimierenden Zellen. Die Lokalisierung der p70-S6K ist durch mTOR-Phosphorylierung reguliert (Rosner und Hengstschläger, 2011). Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Triton-unlösliche Fraktion getestet, die sich in ihrem Proteinexpressionsmuster jedoch nicht von der Triton-löslichen Fraktion unterschied (Daten nicht gezeigt). Diese komplexen Ergebnisse legen nahe, dass eine Girdin-Überexpression viele Veränderungen für den proximalen und distalen Insulinsignalweg in C2C12-Zellen mit sich bringt.

4.1.3 Zurücksetzung der Veränderungen im Insulinsignalweg in den Girdin-überexprimierenden Zellen durch *knockdown* von Girdin

Einen Beweis dafür, dass die drastischen Effekte auf die C2C12-Zellphysiologie tatsächlich durch eine Überexpression von Girdin entstanden sind, liefern die Ergebnisse von siRNA-Experimenten. Hierfür wurden die Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen ausgesät, für 48 h mit spezifischer siRNA gegen humanes Girdin inkubiert und auf Insulinstimulierbarkeit getestet. Wie in Abbildung 4.3B gezeigt ist, wurde 48 h nach der siRNA Transfektion eine verringerte Girdin-Expression nachgewiesen. Gleichzeitig reduzierten sich auch die Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 und des IR, wie auch die IR-Proteinexpression. Zusätzlich zeigte Akt eine deutlich verminderte Phosphorylierung und wies wieder Insulinstimulierbarkeit auf. Daraus lässt sich ableiten, dass die extremen Veränderungen in der Zelle durch die Girdin-Überexpression direkte Effekte von Girdin sind.

4.1.4 Verstärkte IRS-1-Degradierung in den Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen

Die Phosphorylierung von IRS-1 ist ein wichtiger Regulationsmechanismus im Insulinsignalweg. IRS-1 wird durch Insulinstimulation tyrosinphosphoryliert und führt somit zur Aktivierung des PI3K-Signalweges. Dadurch wird auch die p70-S6K phosphoryliert, die dann über Serinphosphorylierung von IRS-1 in der Lage ist, dessen Degradierung zu initiieren. Ob die Unterschiede in der Expression und der Phosphorylierung der S6K-Isoformen einen Einfluss auf die Degradierung von IRS-1 haben, wurde in diesem Abschnitt untersucht. Parentale C2C12-Zellen und die, die Girdin bzw. den IR stabil überexprimieren, wurden für unterschiedliche Zeiten mit Insulin stimuliert und anschließend lysiert. Wie in den Western Blot-Analysen der Zelllysate zu erkennen ist, wurde in den Girdin- und in den IR-überexprimierenden Zellen das IRS-1 wesentlich schneller degradiert als in den parental Zellen, die fast keine IRS-1-Degradierung nach 6 h Insulinstimulation aufwiesen (Abbildung 4.4). Für die Detektion der IRS-1-Serinphosphorylierung wurde ein Phosphopeptid-spezifischer AK gegen S636/639 verwendet. Diese Phosphorylierungsstellen werden durch den mTOR-Signalweg phosphoryliert (Ozes et al., 2001). Alle drei Zelllinien zeigten dabei eine gleichstarke IRS-1-Serinphosphorylierung nach 15-minütiger Insulinstimulation, die dann mit zunehmender Degradierung des Proteins in den überexprimierenden Zelllinien rapide abnahm. In den Wildtyp-Zellen hingegen veränderte sich diese Phosphorylierung kaum.

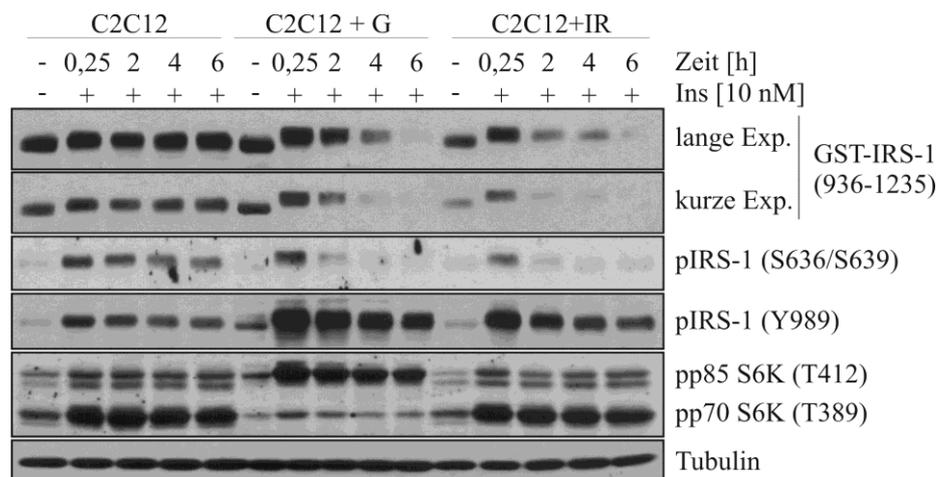


Abbildung 4.4: Degradierung von IRS-1

Parentale und Girdin- bzw. IR-überexprimierende C2C12-Zellen wurden ausgesät, über Nacht gehungert und mit 10 nM Insulin für die angegebenen Zeiten inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert und die Proteine durch SDS-PAGE und Western Blot-Analysen mit Protein- und phospho-spezifischen AK detektiert. Exp. – Expositionszeit

Parallel wurde auch die Tyrosinphosphorylierung des IRS-1-Proteins detektiert, die, wie schon zuvor erwähnt, in den überexprimierenden Zellen nach Insulinstimulation stark erhöht vorlag im Vergleich zu den parentalen Zellen. Dennoch zeigten alle drei Zelllinien im Laufe der Inkubationszeit eine gleichmäßige Reduktion dieser Tyrosinphosphorylierung. Die Phosphorylierungen beider S6K-Isoformen verhielten sich nach Insulinzugabe in Wildtyp- und den IR-überexprimierenden C2C12-Zellen annähernd gleich. Hierbei wurde im Gegensatz zu den Girdin-überexprimierenden Zellen die p85-S6K nur gering und die p70-Isoform stark durch Insulin phosphoryliert. Diese Daten zeigen, dass ein verstärktes Insulinsignal zu einer schnelleren IRS-1-Degradierung führt. Zusätzlich legen diese nahe, dass die p85-Isoform wie die p70-S6K in der Lage ist, IRS-1 zu phosphorylieren.

4.1.5 Überexpression von Girdin erhöht die Glykogensynthese

Die Glykogensynthese wird wie auch die Glukoseaufnahme durch die Phosphorylierung von Akt reguliert. Die Aktivierung von Akt führt zur Phosphorylierung und Inhibierung der GSK3. Somit ist die GS (Glykogensynthase) aktiv, die zur Glykogensynthese benötigt wird. Die Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen wiesen eine konstitutiv aktivierte Akt-Kinase auf, das zu einer erhöhten Glukoseaufnahme und Glykogensynthese führen sollte. Um diesen Effekt und die Veränderungen nach länger andauernder Insulinstimulation zu untersuchen, wurde ein Glykogensynthese-Versuch durchgeführt. Hierbei wurde die Aufnahme von ¹⁴C-markierter Glukose und deren Einbau in Glykogen nach Insulinstimulation gemessen. Zusätzlich kann mit diesem Experiment auch eine Aussage über die Insulinsensitivität getroffen werden. Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, zeigten die Girdin-überexprimierenden Zellen eine signifikant erhöhte Glykogensynthese schon ohne Insulinstimulation. Zusätzlich ist auch die Insulinsensitivität dieser Zellen erhöht. Die Glykogensynthese erreichte ihr Maximum schon bei 1 nM Insulin. Mit höheren, nicht physiologischen Insulinkonzentrationen sank diese wieder ab. Bei den parentalen C2C12-Zellen stieg der Glukoseeinbau bis zu einer Insulinkonzentration von 100 nM. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Girdin-Überexpression in Myoblasten zu einer erhöhten Glykogensynthese und verbesserten Insulinsensitivität führt.

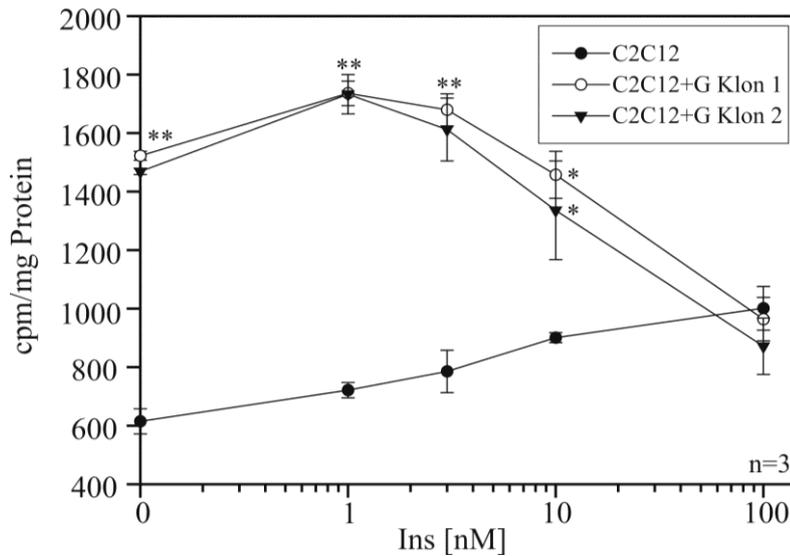


Abbildung 4.5: Überexpression von Girdin in C2C12-Zellen führt zu einer Erhöhung der Glykogensynthese

Der Einbau von ^{14}C -Glukose in Glykogen wurde in C2C12-Wildtyp (●) und Girdin-überexprimierenden Zellen (○: Girdin-überexprimierender Klon 1/ ▼: Girdin-überexprimierender Klon 2) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde für jede Probe bestimmt. Die Ergebnisse sind in Zerfälle pro Minute (*counts per minutes* = cpm) pro mg an Protein angegeben und gegen die eingesetzten Insulinkonzentrationen aufgetragen. ** - $p < 0,005$; * - $p < 0,05$

4.1.6 Girdin-Überexpression reduziert die Insulinrezeptorinternalisierung

Eine Girdin-Überexpression führt zu einer erhöhten Expression der IR-mRNA, die jedoch nur zum Teil den massiven Anstieg des IR-Proteins erklärt (Abbildung 4.2). Ghosh et al. (2010) zeigten eine reduzierte EGFR-Internalisierung in Girdin-überexprimierenden HeLa-Zellen. Daher wurden Girdin-überexprimierende Zellen und C2C12-Zellen, die den IR im gleichen Maße überexprimieren, einem Internalisierungs-Versuch unterzogen. Die IR-überexprimierenden Zellen wurden als Vergleichszelllinie verwendet, da eine Rezeptorüberexpression zu einer Verlangsamung der Internalisierung führen kann (Benveniste et al., 1988). Die Ergebnisse in Abbildung 4.6 zeigen, dass die Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen eine signifikant reduzierte ^{125}I -Insulin-Inkorporation aufwiesen. Die Rezeptorinternalisierung erreichte nur die Hälfte der Internalisierungsrate der Kontrollzellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ähnlich wie die EGFR- auch die IR-Internalisierung von Girdin beeinflusst wird.

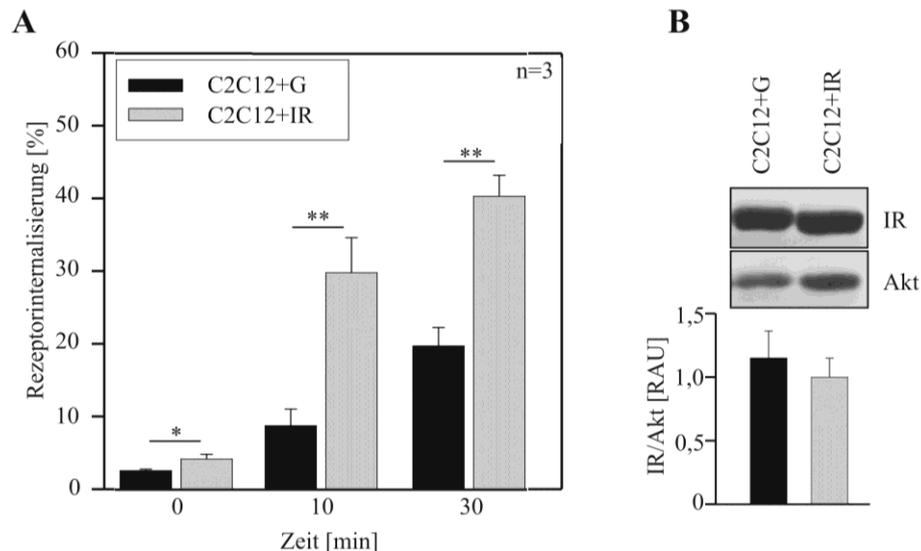


Abbildung 4.6: Girdin-Überexpression reduziert die Internalisierung des IR

(A) Die IR-Internalisierung wurde in C2C12-Zellen, die stabil den humanen IR oder Girdin überexprimieren, gemessen. Dabei wurden die Zellen mit ^{125}I -Insulin inkubiert und der internalisierte IR versus den an der Zelloberfläche befindlichen IR bestimmt. (B) Parallel dazu wurden die Zellen lysiert, die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit AK gegen IR und Akt nachgewiesen. Die Ergebnisse wurden densitometrisch ausgewertet und der IR in Relation zur Akt-Proteinmenge angegeben. ** - $p < 0,005$; * - $p < 0,05$

4.1.7 Girdin-Überexpression führt zu einer konstitutiv aktivierten Abl-Tyrosinkinase

Die Hochregulierung des IR in den Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen hatte eine insgesamt erhöhte Tyrosinphosphorylierung von vielen Signalproteinen zur Folge. In Abbildung 4.7A wurden parentale und überexprimierende Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an Insulin stimuliert und in den Zelllysaten das Gesamtphosphotyrosin (PY) detektiert. Ein Protein von ca. 120 kDa zeigte eine starke Phosphorylierung in den parentalen, aber nicht in den Girdin-überexprimierenden Zellen. Durch Immunpräzipitation (IP) konnte dieses Protein als FAK (*Focal adhesion kinase*) identifiziert werden, die als ein durch das Insulinsignal beeinflusstes Protein bekannt ist (Abbildung 4.7D; Genua et al., 2009). Im Gegensatz dazu zeigte in den C2C12-Girdin-Zellen der IR bei 97 kDa eine starke und zum Teil Insulin-unabhängige Phosphorylierung, wie es auch bei IRS-1 bei ca. 180 kDa der Fall war. Zusätzlich lagen Proteine bei ca. 140, 66 und 50 kDa stark tyrosinphosphoryliert in den überexprimierenden Zellen vor. Die letzten beiden Proteine wurden durch IP als Mitglieder der Shc-Familie identifiziert (Abbildung 4.7C). Hierbei wurden gleiche

Proteinmengen mit einem Kaninchen-Shc-AK immunpräzipitiert und deren Tyrosinphosphorylierung mit einem Phosphotyrosin-AK detektiert. Um die Proteinexpression der einzelnen Isoformen zu bestimmen, wurden die gleichen IP parallel auf eine SDS-PAGE aufgetragen und im Western Blot-Verfahren mit einem Maus-AK gegen Shc-Protein geblottet. Auffällig dabei war, dass alle Isoformen von Shc konstitutiv tyrosinphosphoryliert vorlagen, wobei alle drei eine verringerte Protein-Expression in den Girdin-überexprimierenden im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen aufwiesen. Die Bande bei ca. 140 kDa wurde als Tyrosinkinase c-Abl verifiziert (Abbildung 4.7B). In beiden Zelllinien wurde eine vergleichbare Expression der Abl-Kinase gefunden, die in den C2C12-Girdin-Zellen jedoch konstitutiv phosphoryliert vorlag. Es ist bekannt, dass c-Abl durch den IR aktiviert wird (Frasca et al., 2007).

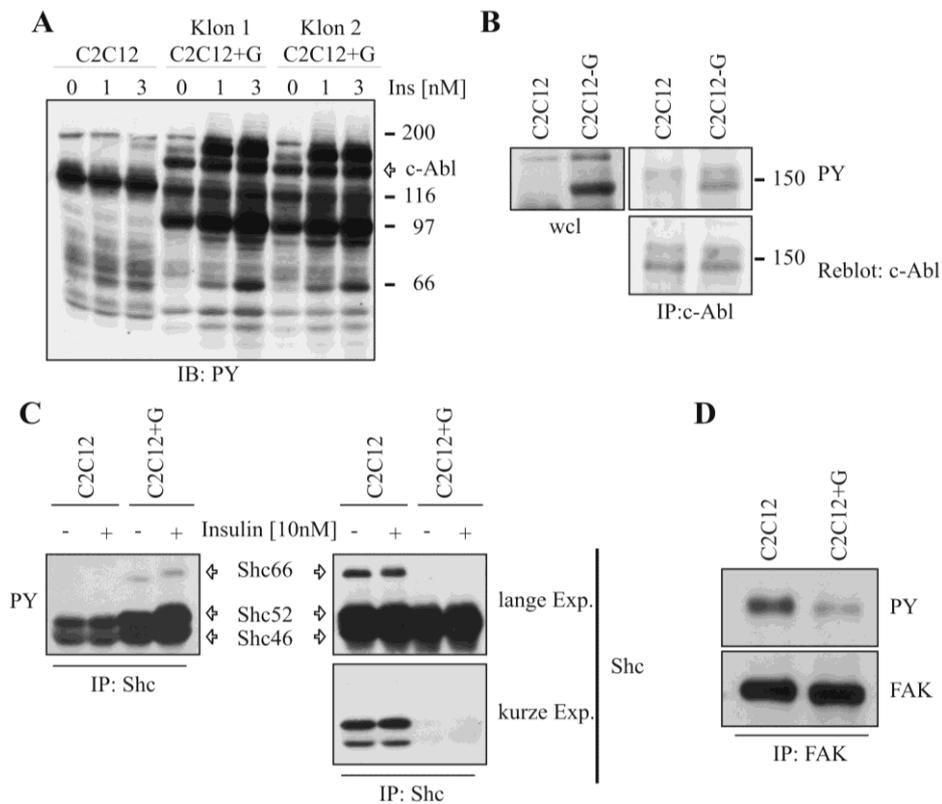


Abbildung 4.7: Girdin-Überexpression führt zu einer konstitutiven Phosphorylierung von c-Abl

(A) Parentale C2C12- und Girdin-überexprimierende Zellen wurden über Nacht gehungert und mit den angegebenen Konzentrationen an Insulin stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mit einem Phosphotyrosin-AK (PY) nachgewiesen. (B, C und D) c-Abl, Shc und FAK wurde jeweils aus den Zelllysaten mit spezifischen AK immunpräzipitiert. Nach der Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE wurden diese mit Protein-AK und PY im Western Blot nachgewiesen. wcl - Gesamtzelllysate

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde versucht, c-Abl mit dem Inhibitor STI-571, auch unter den Namen Gleevec oder Imatinib bekannt, in den überexprimierenden Zellen zu inhibieren. Die Hemmung der Kinase durch STI-571 wurde zuerst an Hand eines ihrer Substrate nachgewiesen. Hierbei wurde CrkII (*avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog*) nach Inkubation mit dem Inhibitor immunpräzipitiert und mit einem Phosphotyrosin-AK analysiert. Wie erwartet, wies CrkII eine starke basale Phosphorylierung auf, die aber durch eine vierstündige Inkubation mit STI-571 reduziert wurde (Abbildung 4.8A). Zusätzlich wurden die Girdin-überexprimierenden Zellen für jeweils 24 und 48 h mit STI-571 inkubiert und anschließend mit Insulin stimuliert. Durch Western Blot-Analysen der Zelllysate konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinphosphorylierung des 140 kDa großen Proteins nahezu aufgehoben wurde. Zusätzlich ging auch die Expression des IR, der bei ca. 97 kDa liegt, zurück (Abbildung 4.8B). Das Molekulargewicht schien durch die Inkubation von STI-571 ein wenig reduziert zu sein, was darauf schließen lässt, dass sich die posttranslationale Modifikation des IR auch verändert hatte.

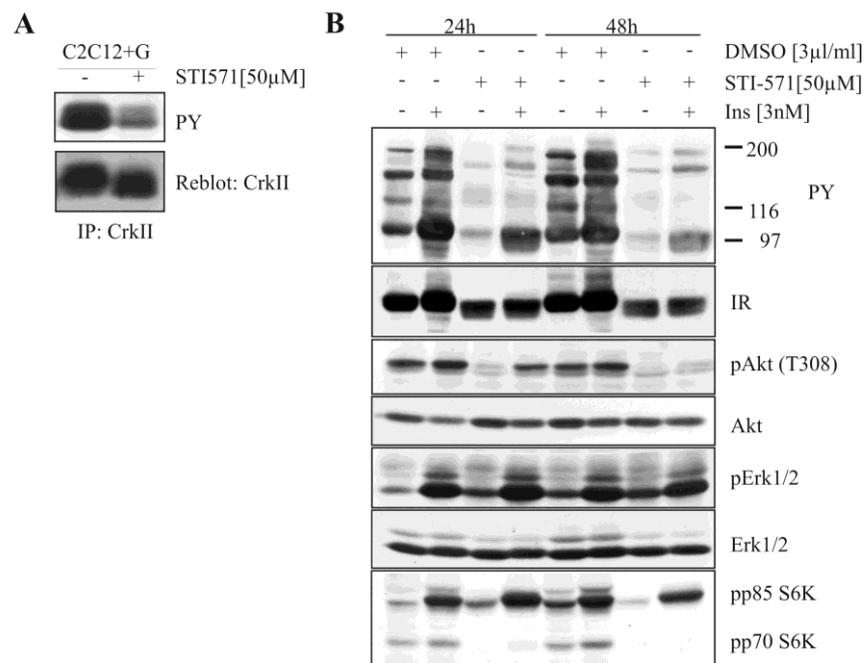


Abbildung 4.8: c-Abl-Inhibierung durch STI-571

(A) Girdin-überexprimierende C2C12-Zellen wurden für 4 h mit STI-571 (50 μM) inkubiert und dann lysiert. CrkII wurde mit einem spezifischen AK immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren analysiert. (B) Inkubation von C2C12-Zellen, die stabil Girdin überexprimieren, mit STI-571 (50 μM) oder DMSO für 24 und 48 h. Die Zellen wurden für die Analyse über Nacht gehungert, mit Insulin stimuliert, lysiert und die Proteine durch SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren mit spezifischen AK analysiert.

Durch den Inhibitor wurde zusätzlich die Akt-Phosphorylierung verändert. Akt erlangte durch die Inkubation mit STI-571 für 24 h seine Insulinstimulierbarkeit zurück, die nach 48 h noch weiter reduziert wurde. Die Expression des Akt-Proteins blieb durch die Inkubation mit dem Inhibitor unverändert. Nur kleine Effekte konnten bei der Aktivierung von Erk1/2 und der p85-S6 Kinase detektiert werden. Die T398-Phosphorylierung der p70-S6 Kinase wurde im Vergleich dazu deutlich reduziert, wie es schon zuvor von Parmar et al. (2005) gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Aktivierung der Abl-Kinase eine wichtige Rolle in den Girdin-überexprimierenden Zellen spielt.

4.1.8 Überexpression von Girdin verändert die miRNA-Expression in C2C12-Zellen

Zur Klärung des erhöhten IR-Proteins in den Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen wurden bisher zwei Ursachen genannt, die erhöhte Expression der IR-mRNA und die reduzierte Internalisierung des Rezeptors. Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung von Trajkovski et al. (2011) identifizierte die Rolle von miRNAs (miR-103, miR-107) im Zusammenhang mit der Insulinsensitivität. Eine reduzierte Expression von miR-103 in HEK293-Zellen erhöhte die Caveolin-1 (Cav-1)-Proteinexpression und stabilisierte das IR-Protein. In dieser Arbeit wurde in den Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen nach einer miRNA-Untersuchung eine signifikante Reduktion der miR-103 nachgewiesen. Zusätzlich konnte in den gleichen Zellen durch Western Blot-Analysen ein Anstieg von Cav-1 und dessen Tyrosinphosphorylierung gezeigt werden (Abbildung 4.9B und C). Wenn das überexprimierte Girdin in den C2C12-Zellen mit Hilfe von spezifischer siRNA gegen humanes Girdin herunterreguliert wurde, konnte gleichzeitig auch eine reduzierte Cav-1-Proteinexpression verzeichnet werden (Abbildung 4.9D). Es scheint, als ob Girdin über die Expression von Cav-1, möglicherweise via Reduktion der miR-103, zusätzlich die Insulinsensitivität in C2C12-Zellen verbessert.

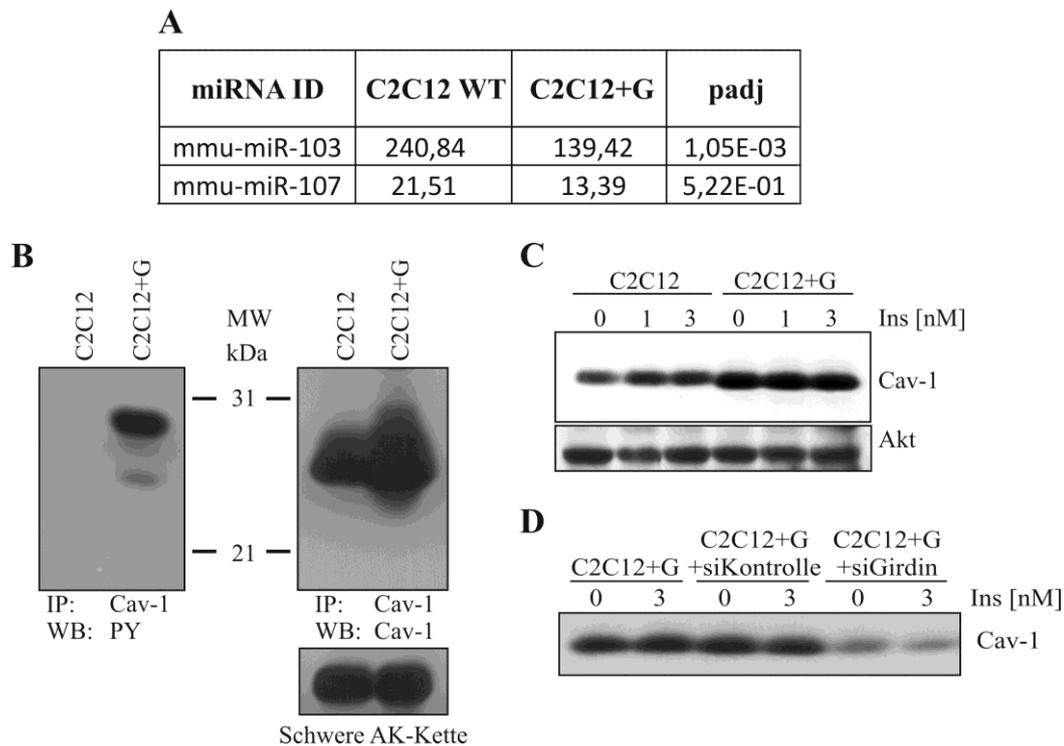


Abbildung 4.9: Erhöhte Expression von Cav-1 führt zu einer Zunahme in der Insulinsensitivität in Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen

(A) Die Expressionslevel von miRNA-103 und -107 in den parentalen und Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen. (B) Die Zellen wurden lysiert und Cav-1 wurde aus den Lysaten mit einem spezifischen Cav-1-AK (Cav-1) immunpräzipitiert. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot-Verfahren mit einem Phosphotyrosin (PY)- und Cav-1-AK analysiert. (C) Die Zellen wurden über Nacht gehungert und dann mit den angegebenen Konzentrationen von Insulin stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mit einem Cav-1-AK nachgewiesen. (D) Zellysate nach siRNA Transfektion gegen humanes Girdin (siehe Abbildung 4.3B) wurden zur Analyse der Cav-1-Expression verwendet.

4.1.9 Girdin – ein Parameter für die Insulinsensitivität im Menschen

Im Laufe dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Girdin einen starken Einfluss auf den Insulinsignalweg in Mausmyoblasten hat. Wenn die Girdin-Expression herunterreguliert wurde, zeigten die Zellen eine reduzierte Insulinsensitivität. Ein verbessertes Insulinsignal wiesen hingegen die Zellen auf, die Girdin stabil überexprimierten. Für die Untersuchung, ob Girdin auch ein Parameter für die Insulinsensitivität im Menschen ist, konnte in Zusammenarbeit mit der AG Staiger (Universitätsklinikum Tübingen) eine humane Studie durchgeführt werden. Hierfür wurde ein hyperinsulinämischer-euglykämischer Clamp an jungen und gesunden Freiwilligen nach Stefan et al.

durchgeführt (2005). Zusätzlich wurde der *vastus lateralis* Muskel von den Teilnehmern biopsiert. Die primären humanen Skelettmuskelzellen aus den Biopsien wurden kultiviert und zu Myotuben ausdifferenziert. Die Girdin-mRNA wurde mit Hilfe der quantitativen *real time* PCR gemessen und gegen das Haushaltsgen RPS13 normalisiert. Die Abbildung 4.10 zeigt den Einfluss der Girdin-Expression auf die Insulinsensitivität, angepasst an das Geschlecht, das Alter und den BMI (*body mass index*) der jeweiligen Teilnehmer. Dabei korrelierte eine verbesserte Insulinsensitivität mit der Erhöhung der mRNA von Girdin im humanen Skelettmuskel ($p = 0,0378$). Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Girdin-Expression ein wichtiger Parameter der Insulinsensitivität in Maus-Myoblasten und im humanen Skelettmuskel ist.

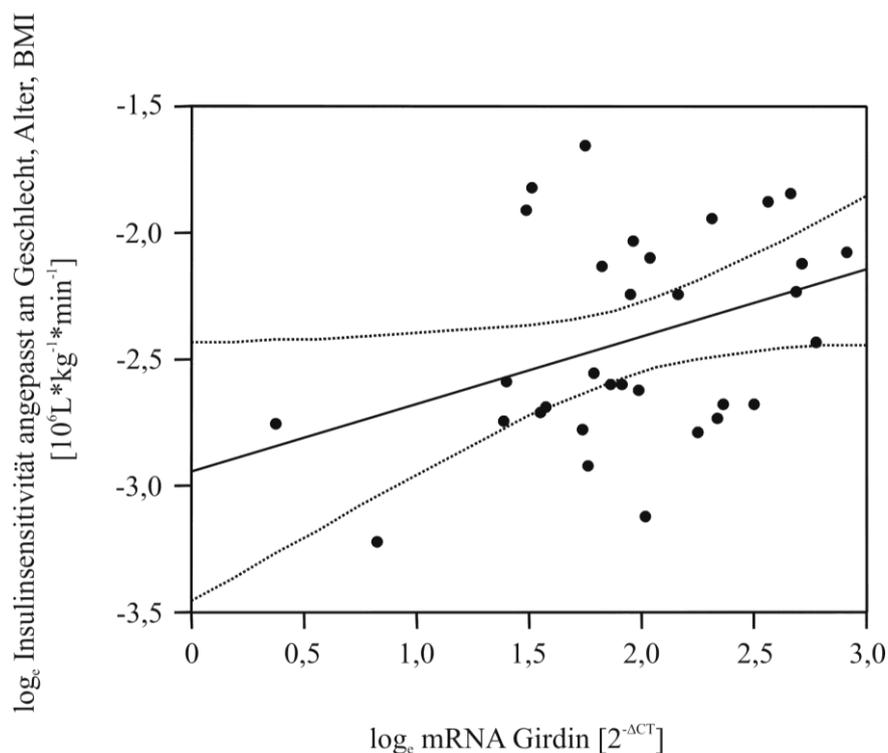


Abbildung 4.10: Girdin-Expression im Muskel korreliert mit der Insulinsensitivität

Die mRNA von Girdin in primären humanen Myotuben wurde mit der quantitativen *real time* PCR Methode bestimmt. Die Insulinsensitivität von freiwilligen Studienteilnehmern ($n = 32$; männlich 20/weiblich 12) wurde mit Hilfe eines hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamps bestimmt und an das Geschlecht, Alter (Median = 25 Jahre) und BMI (Median = $22,88 \text{ kg/m}^2$) angepasst. Alle Parameter wurden \log_e -transformiert, bevor sie einer linearen Regressionsanalyse unterzogen wurden. ($r = 0,369$; $p = 0,0378$)

4.1.10 Veränderungen der Expression und Phosphorylierung verschiedener Proteine durch die Überexpression von Girdin

Um weitere Ursachen zu finden, die diesen Phänotyp der Girdin-überexprimierenden Zellen erklären könnten, wurden verschiedene Proteine auf ihre Expression in den parentalen und den C2C12-Girdin-Zellen untersucht (Tabelle 3). Dabei ist zu erkennen, dass Proteine, die der Glukoseaufnahme und deren Transport dienen, in den Girdin-überexprimierenden Zellen deutlich herunterreguliert waren. Dazu gehören z. B. die Rab-GTPasen aktivierenden Proteine AS160 und TBC1D1, deren Phosphorylierung zur Translokation von Glut4-Vesikeln an die Membran führt. Zusätzlich waren die Expression der AMPK und ihre Phosphorylierung stark reduziert. AMPK, die als Gegenspieler des PI3K/Akt-Signalweges fungiert, ist in der Lage, die Expression des Glut1 zu regulieren (Fryer et al., 2002). Auch dieser wies in den überexprimierenden Zellen eine deutlich verringerte Proteinexpression auf. Darüber hinaus ist auch ein Familienmitglied der Kinesine, KIF5B (*Kinesin family member 5B*), welches an der Translokation von Glut4 beteiligt ist, vermindert exprimiert. Interessanterweise ist im Gegensatz dazu die PI3K-Untereinheit p110 β in den überexprimierenden C2C12-Zellen erhöht exprimiert. Es scheint, als ob die Glukoseaufnahme-Mechanismen in den Girdin-überexprimierenden Zellen herunterreguliert werden, aber im Gegensatz dazu Proteine, die den Insulinsignalweg verstärken, vermehrt exprimiert sind.

Darüber hinaus wurde auch die Expression von Protein-Tyrosin-Phosphatasen untersucht, denen ein regulatorischer Einfluss auf den Insulinsignalweg nachgewiesen wurde. Eine veränderte Expression dieser Phosphatasen, könnte möglicherweise die erhöhte Gesamttyrosinphosphorylierung erklären. In Western Blot-Analysen wurde jedoch weder in der Proteinexpression der PTP α (Protein-Tyrosin-Phosphatase α) noch in der der PTP-SHP2 (*PTP that contains two tandem SH2 domains*) ein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien gefunden.

Weitergehend wurden die Lysate auf die Expression von Proteinen, die an der Transkription und Translation beteiligt sind, getestet. Hierbei zeigte sich, dass FoxO1 durch die erhöhte Akt-Aktivität stark phosphoryliert vorlag. Ein weiteres Protein ist STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), das die Expression von Girdin und Girdin wiederum die Expression von STAT3 regulieren soll (Dunkel et al., 2012). Es wurde jedoch keine Veränderung von STAT3 in den stabil überexprimierenden

C2C12-Zellen im Vergleich zu den parentalen Zellen festgestellt. Möglicherweise ist dieser Regulationsmechanismus zelltypabhängig.

Proteinname	C2C12-G versus parentalen C2C12
1. Glukose-Transport	
AMPK / p-AMPK	↓
AS160	↓
Glut1	↓
KIF5B	↓
TBC1D1	↓
PI3K (p110 β)	↑
2. Protein-Tyrosin-Phosphatasen	
PTP α	=
PTP-SHP-2	=
3. Transkriptions- und Translationsregulation	
pFOXO1	↑
RPS25	↑
STAT3	=
4. Wnt-Signalweg	
β -Catenin	↓

Tabelle 3: Zusammenfassung von Western Blot-Analysen einiger Proteine und ihre Expression und Phosphorylierung

Parentale C2C12- und Girdin-überexprimierende Zellen wurden ausgesät, über Nacht gehungert und teilweise, für die Untersuchung der Phosphorylierung, mit 3 nM Insulin stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mit spezifischen Protein- und Phosphopeptid (p)-AK nachgewiesen. Das Verhalten der Proteine der Girdin-überexprimierenden zu den Wildtyp-Zellen wurde in Zeichen ausgedrückt. ↑ - erhöhte Expression; ↓ - verringerte Expression; = - gleiche Expression

Des Weiteren ist bekannt, dass die mRNA des IR eine IRES (*Internal ribosome entry site*)-Struktur besitzt, die Cap-unabhängig translatiert werden kann. Zu den Proteinen, die an der Cap-unabhängigen Translation beteiligt sind, gehört auch RPS25 (*Ribosomal protein S25*). Neben der reduzierten Internalisierung, der miRNA-Regulation und der Stabilisierung des IR durch Cav-1, könnte möglicherweise auch eine vermehrt Cap-unabhängige Translation des IR die erhöhte Proteinmenge in den Girdin-überexprimierenden Zellen erklären. Eine weitere Untersuchung dieser Translationsregulation war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Daple, ein weiteres Mitglied der Girdin-Proteinfamilie, reguliert den Wnt-Signalweg. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen Girdin und Daple wurde in Ansätzen auch der Einfluss von Girdin auf den Wnt-Signalweg untersucht. Ein Vertreter dieses Signalweges ist β -Catenin, das über die Bindung von Wnt an seinen Rezeptor die

Transkription von bestimmten Genen reguliert. Im Fall der Girdin-überexprimierenden Zellen lag die GSK3 konstitutiv phosphoryliert vor, was zu einer Akkumulation von β -Catenin und Aktivierung der TCF (*T-cell factor*)-Transkriptionsaktivität im Kern führen kann. Die Western Blot-Analysen zeigten jedoch eine verringerte zytosolische β -Catenin-Proteinmenge im Vergleich zu den parentalen Zellen. Für die Untersuchung der β -Catenin-Expression im Kern wurde zusätzlich auch die Triton-unlösliche Fraktion über eine SDS-Page aufgetrennt. Auch hier wurde eine reduzierte Expression detektiert. Diese Daten zeigen, dass ein Einfluss von Girdin auf den kanonischen Wnt-Signalweg vorerst vernachlässigt werden kann.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Überexpression von Girdin viele und zum Teil zelltypabhängige Veränderungen für die Zelle mit sich bringt. Interessant wäre nun, ob sich ähnliche Proteinexpressionsmuster auch in Krebszelllinien, die eine erhöhte Girdin-Proteinmenge aufweisen, wiederfinden lassen. Leider stand eine solche Zelllinie nicht zur Verfügung.

4.1.11 Girdin hat keinen Einfluss auf die Proliferation von C2C12-Zellen

Girdin ist als ein Akt-Signalverstärker bekannt und führt durch Interaktion mit Aktin zur Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts. Zusätzlich wurde der Beweis erbracht, dass Girdin durch diese Eigenschaft die Zellmigration erhöht und somit eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Metastasierung von Krebs hat (Enomoto et al., 2005; Jiang et al., 2008).

Zur Untersuchung, ob Girdin einen Einfluss auf die Proliferation der C2C12-Zellen hat, wurde eine WST-1-Proliferationsanalyse angewendet. Dafür wurden Girdin-überexprimierende und parentale C2C12-Zellen für unterschiedliche Zeiten kultiviert, dann mit WST-1-Lösung inkubiert und anschließend spektralphotometrisch analysiert. Wie in Abbildung 4.11 zu sehen ist, zeigten die transfizierten Zellen keinen signifikanten Wachstumsunterschied im Vergleich zu den parentalen Zellen. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen lief die logarithmische Wachstumskurve beider Zelllinien langsam in die stationäre Phase über. Es scheint, als ob die Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen ein wenig länger in dieser verharrten und erst verzögert in die Absterbe-Phase übergehen. Dies veränderte den Verlauf der Wachstumskurve jedoch nur gering. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Überexpression von Girdin keinen Einfluss auf das Zellwachstum von C2C12-Zellen hat.

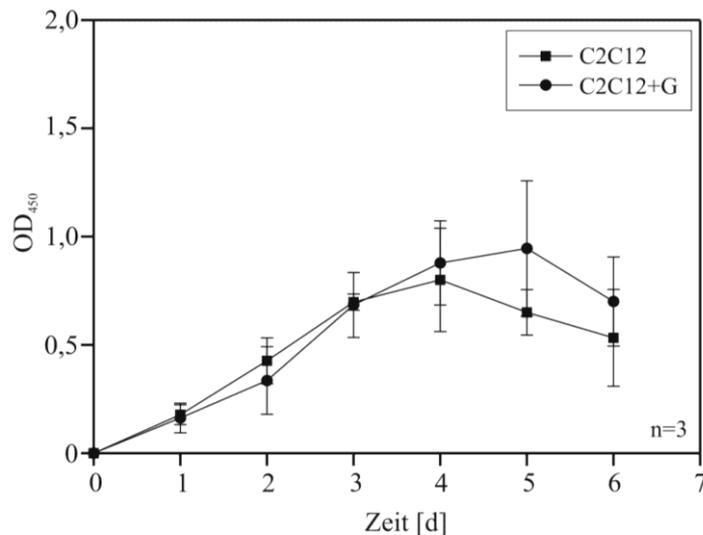


Abbildung 4.11: Girdin hat keinen Einfluss auf das Zellwachstum/Proliferation

Parentale C2C12 (■) und Girdin-überexprimierende (●) Zellen wurden in einer 96-Lochplatte ausgesät und für maximal 6 Tage kultiviert. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurde das Wachstum der Zellen durch einen WST-Versuch bei einer Wellenlänge von 450 nm analysiert.

4.1.12 Girdin-Überexpression führt zu einer verringerten ROS-Bildung in den C2C12-Zellen

Einige Proteine, die durch die Überexpression von Girdin phosphoryliert vorliegen, können auch durch oxidativen Stress in der Zelle aktiviert werden. Dazu gehören z. B. die Abl-Tyrosinkinase, Cav-1 und auch die Akt-Kinase (Sun et al., 2000; Volonté et al., 2001; Blair et al., 1999). Zur Untersuchung, ob eine Girdin-Überexpression in Muskelzellen eine Veränderung der Konzentration an ROS (*Reactive oxygen species*) mit sich bringt, wurden beide Zelllinien mit einem Farbstoff inkubiert, der erst durch eine Reaktion mit ROS zu einem fluoreszierenden Farbstoff oxidiert wird. In FACS-Analysen, deren Histogramme und Auswertung in Abbildung 4.12A und B dargestellt sind, konnte gezeigt werden, dass die Oxidation des Farbstoffes, die durch eine erhöhte Fluoreszenzintensität zu erkennen ist, in den Wildtyp-Zellen im Vergleich zu den Girdin-überexprimierenden Zellen nach 30 min deutlich fortgeschritten war. Zusätzlich wiesen die C2C12-Girdin-Zellen eine verbesserte ROS-Abwehr nach Inkubation mit tert-Butylhydroperoxid (t-BHP; synthetisches ROS) auf, welches wie Wasserstoffperoxid eine erhöhte ROS-Konzentration nachahmt. Hierbei ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes nur ca. die Hälfte von der der parentalen Zelllinie (Abbildung 4.12D).

Interessanterweise ist im Histogramm zu erkennen, dass die Girdin-überexprimierenden Zellen eine Heterogenität (siehe Doppelpeak in Abbildung 4.12C) in der Kultur aufwiesen, die für eine mögliche unterschiedliche Expressionsmenge von Girdin in den einzelnen Zellen spricht. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Girdin-Expression die Produktion von ROS vermindert und die Abwehr gegen diese verbessert.

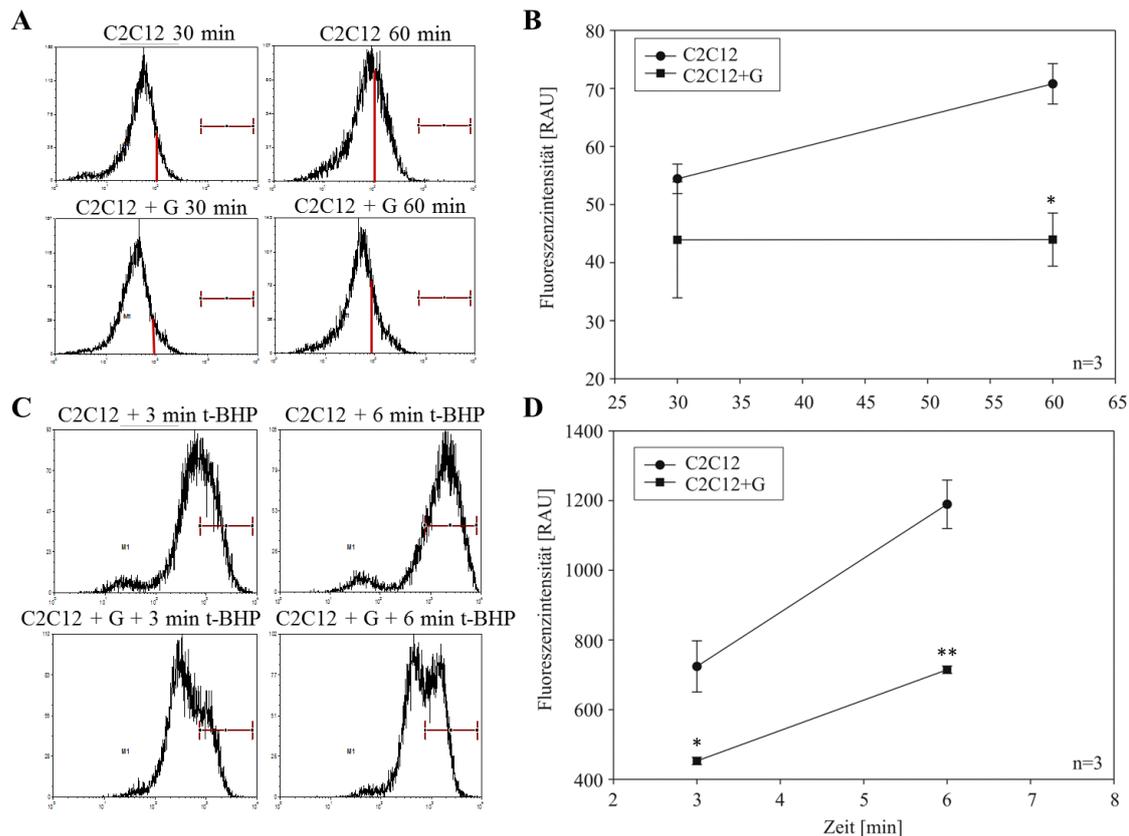


Abbildung 4.12: Girdin-Überexpression reduziert die ROS-Produktion und verbessert die ROS-Abwehr

Wildtyp und stabil Girdin-überexprimierende C2C12-Zellen wurden ausgesät und für ca. 24 h kultiviert. (A und B) Die Zellen wurden mit CM-H₂DCFDA inkubiert und die Oxidation des Farbstoffs nach 30 und 60 min mit einem FACS detektiert. (C und D) Zu den mit dem Farbstoff inkubierten Zellen wurde 100 mM t-BHP zugeführt. Nach 3 und 6 min wurde die ROS-Abwehr anhand der Oxidation des Farbstoffes gemessen.

4.1.13 Die Akt-Phosphorylierungsstelle Serin 1417 hat keinen Einfluss auf die Effekte von Girdin in C2C12-Zellen

Girdin ist ein Akt-Substrat und wird in Folge der Stimulation des PI3K-Signalweges durch Akt phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Girdin durch Akt an S1417 ist ein

kritischer Regulator für die Girdin-abhängige Migration (Enomoto et al., 2005). Um den Einfluss der Akt-Phosphorylierungsstelle auf den Insulinsignalweg zu untersuchen, wurde das Codon für Serin zu Alanin mutiert und das veränderte Protein stabil in C2C12-Zellen überexprimiert.

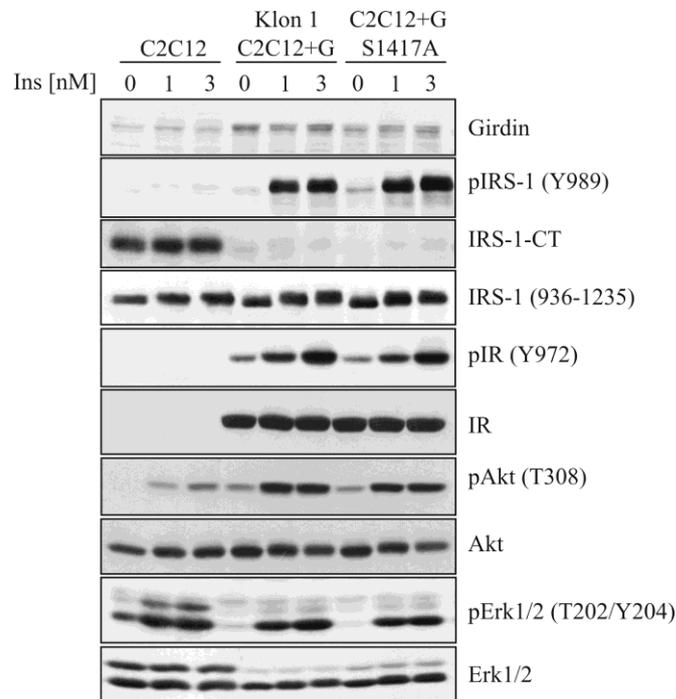


Abbildung 4.13: Mutiertes Girdin (S1417A) bewirkt die gleichen Veränderungen wie Wildtyp-Girdin in C2C12-Zellen.

Die Zellen wurden über Nacht gehungert, dann mit den angegebenen Konzentrationen an Insulin stimuliert und lysiert. Die Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit spezifischen Protein- und Phosphoprotein (p)-AK detektiert.

Wie in Abbildung 4.13 zu erkennen ist, zeigte die Mutante eine ähnliche Expression und das gleiche auffällige Protein- und Phosphorylierungsmuster wie der Wildtyp von Girdin. Auch die Modifikation des IRS-1 und dessen erhöhte Phosphorylierung, gegenüber der parentalen Zelllinie, schienen unbeeinflusst von der Mutation der Akt-Phosphorylierungsstelle zu sein. Die Überexpression von Girdin und auch seiner Mutante führten zur massiven Hochregulierung des IR und zur konstitutiven Phosphorylierung von Akt. Die Phosphorylierung von Erk1/2 nach Insulinstimulation verhält sich ähnlich dem Wildtyp-Girdin, wohingegen die Proteinmenge von Erk1 ein wenig erhöht war, aber immer noch geringer als in den parentalen C2C12-Zellen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass

die Akt-Phosphorylierungsstelle S1417 keinen Einfluss auf die massiven Effekte einer Girdin-Überexpression hat.

4.1.14 Girdin-Überexpression führt zu einer Aktivierung des G1/S-Überganges

Es ist bekannt, dass eine transiente Überexpression von Girdin keinen Einfluss auf den Zellzyklus hat (Anai et al., 2005). Es gibt aber bisher noch keine Untersuchungen darüber in stabil Girdin-überexprimierenden Zellen. Um Veränderungen des Zellzyklus in den transfizierten Zellen zu untersuchen, wurde der DNA-Gehalt der Zellkerne durchflusszytometrisch analysiert und in die einzelnen Zellzyklusphasen eingeteilt. Zusätzlich wurde der Zyklus der Girdin-Wildtyp-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Zellen, die mutiertes Girdin stabil überexprimieren, analysiert (Zellen aus 4.1.13).

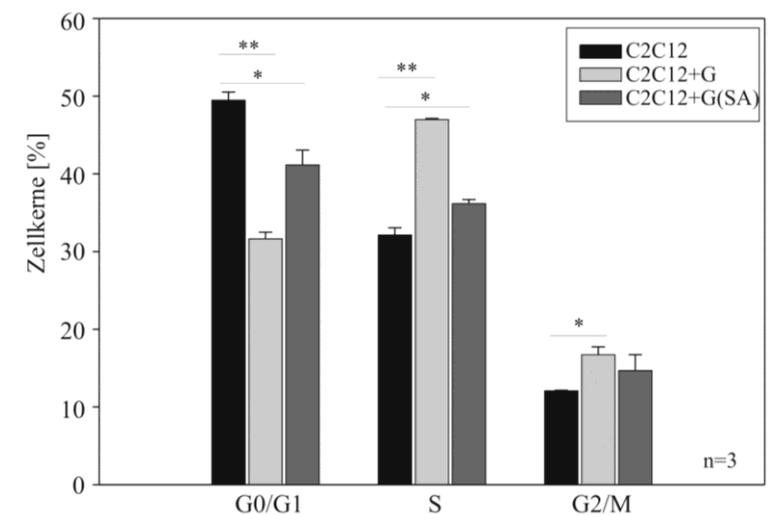


Abbildung 4.14: Veränderungen des Zellzyklus durch Girdin-Überexpression

Wildtyp C2C12-Zellen und stabil Girdin- bzw. Girdin-S1417A-überexprimierende Zellen wurden ausgesät, für ca. 24 h kultiviert, danach mit einer hypotonen Propidiumiodid-Lösung lysiert und die DNA in den Kernen angefärbt. Der DNA-Gehalt wurde durch durchflusszytometrische Analysen bestimmt und in die einzelnen Phasen des Zellzyklus eingeteilt. Die Angaben sind in Zellkerne in Prozent der Gesamtzellkernzahl angegeben. ** - $p < 0,005$; * - $p < 0,05$

In Abbildung 4.14 ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen, die Wildtyp-Girdin stabil überexprimieren, sich vermehrt in der Synthesephase des Zellzyklus aufhielten. Im Vergleich dazu zeigten die parentalen C2C12-Zellen eine Ansammlung in der G1-Phase,

in der die Zelle wächst. In der G2-Phase gab es nur einen leicht signifikanten Unterschied zwischen beiden Ziellinien, wobei die transfizierten Zellen hier überwogen. Interessant ist, dass der Effekt der Anhäufung der Zellen in der S-Phase durch die Mutation der Akt-Phosphorylierungsstelle S1417 leicht abgeschwächt wurde. Hier befanden sich deutlich mehr Zellen in der G1-Phase und weniger in der S-Phase. Diese Ergebnisse deuten auf eine Girdin-abhängige Veränderung des Zellzyklus in C2C12-Zellen hin, für die die Akt-Phosphorylierungsstelle wichtig zu sein scheint.

4.2 Girdin – ein 14-3-3-Bindungsprotein

14-3-3-Proteine spielen eine wichtige Rolle in vielen Signalwegen, darunter auch im Insulinsignalweg. Die Phosphorylierung und anschließende Bindung von 14-3-3 hat einen großen Einfluss auf die Struktur von Proteinen und ihre Regulierung. In Abbildung 4.15A ist zu erkennen, dass durch eine Scansite-Analyse der Girdin-Sequenz auf 14-3-3-Bindungsmotive potentielle Bindungsstellen entdeckt wurden. Einer eindeutigen Identifikation von Girdin als ein 14-3-3-Bindungsprotein diene eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) von endogenem Girdin in C2C12-Zellen mit einem 14-3-3 γ -AK. Um sicherzustellen, dass es sich hierbei nicht um eine unspezifische Bindung handelte, wurde mit dem gleichen Lysat eine Kontroll-IP mit einem Myc-AK durchgeführt (Abbildung 4.15B).



Abbildung 4.15: Girdin ist ein 14-3-3-Bindungsprotein

(A) Die Girdin-Sequenz wurde einer 14-3-3-Bindungsmotiv-Analyse mit der Datenbank http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml unterzogen. (B) C2C12-Zellen wurden lysiert und endogenes Girdin mit Hilfe eines spezifischen 14-3-3 γ -AK co-immunpräzipitiert. Zusätzlich wurde mit dem gleichen Lysat eine Kontroll-IP mit einem Myc-AK durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine über eine SDS-PAGE wurde Girdin durch Western Blot-Verfahren mit einem spezifischen AK detektiert.

4.2.1 Regulation der 14-3-3-Bindung von Girdin

Die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindungsstellen wird hauptsächlich durch die Aktivierung von unterschiedlichen AGC- oder CAMK-Kinasen reguliert. Um die Regulation der Bindung von 14-3-3-Proteinen im Fall von Girdin zu untersuchen, wurde eine Gruppe extrazellulärer Stimuli, die verschiedene Aktivatoren und Inhibitoren von Proteinkinasen beinhaltet, von der Arbeitsgruppe Prof. Carol MacKintosh (MRC, Dundee, UK) zusammengestellt.

Bei diesen Aktivatoren und Inhibitoren handelt es sich um: **IGF-1**, das die PI3K und somit auch Akt aktiviert und **PI-103**, das diese inhibiert. PI-103 gilt auch als ein kompetenter Inhibitor für mTORC1 (Park et al., 2008); **EGF** (*Epidermal growth factor*), welcher zur Aktivierung von Ras/Raf/Erk1/2, gefolgt von p90-RSK, führt (Anjum und Blenis, 2008); der Phorbolster **PMA** (*Phorbol-12-Myristat-13-Acetat*), der die Effekte von Diacylglycerol nachahmt und somit die PKC aktiviert. Dies führt wiederum zur Aktivierung von Erk1/2 und nachgeschalteten Signalmolekülen wie z.B. p90-RSK (Anjum und Blenis, 2008); **BI-D1870** ist ein Inhibitor für p90-RSK (Sapkota et al., 2007). Forskolin (**FSK**), das die Adenylatzyklase aktiviert, den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht und die PKA aktiviert (Namkoong et al., 2009); den PKA-Inhibitor **H-89** (Chijiwa et al., 1990); **A-23187**, das als Kalziumionophor eingesetzt wird und somit die intrazelluläre Konzentration an Ca^{2+} -Ionen erhöht (Reed und Lardy, 1972); den AMPK-Aktivator **A-769662**, der zur Phosphorylierung und somit Inaktivierung der ACC (*Acetyl-CoA Carboxylase*) führt (Cool et al., 2006); **Calyculin A**, das alle Serin/Threonin-Phosphatasen wie z. B. PP1 (*Protein Phosphatase 1*) und PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) inhibiert und somit zur Erhöhung der allgemeinen Phosphorylierung führt (Ishihara et al., 1989).

Für die Untersuchung der 14-3-3-Bindung wurden transient Girdin-GFP-überexprimierende HEK293-Zellen mit den oben genannten Stimuli behandelt. Die Phosphorylierung an einer möglichen 14-3-3-Bindungsstelle des präzipitierten und durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Girdins wurde anschließend *in vitro* mit der Far-Western-Methode nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Gesamtzelllysate mit Phosphopeptid-spezifischen AK auf die Aktivierung der einzelnen Kinasen getestet. Wie in Abbildung 4.16 zu erkennen ist, wurde die Bindung von 14-3-3 an Girdin durch verschiedene Signalwege reguliert. Der 14-3-3-Far-Western zeigte schon im nicht stimulierten Zustand ein Signal, das auch durch Aktivierung des PI3K-Signalweges

unverändert blieb. Die Co-IP von 14-3-3 war jedoch nach IGF-1-Stimulation verstärkt. Die Unterschiede zwischen Co-IP und Far-Western sind nicht immer eindeutig zu erklären. Diese können direkte Effekte sein, aber auch durch die IP eines weiteren 14-3-3-bindenden Girdin-Interaktionspartners entstanden sein. Auch ein erhöhtes Signal-Rauschverhältnis kann zu einem Falsch-Positiv-Signal führen. Interessanterweise zeigten die Co-IP wie auch die Far-Western-Analyse eine erhöhte 14-3-3-Bindung nach der Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor PI-103. Die Behandlung mit FSK und dem AMPK-Aktivator A-769662 führte zur Verstärkung des Signals im Far-Western und in der Co-IP. Darüber hinaus wurde auch bei der Inhibierung der PKA durch H-89 ein erhöhtes Signal in der Co-IP festgestellt. Die vermehrte 14-3-3-Bindung nach Behandlung mit den Inhibitoren H-89 und PI-103 wurde durch eine Aktivierung der AMPK verursacht. Dies war deutlich an der Phosphorylierung der ACC im Zelllysate zu erkennen.

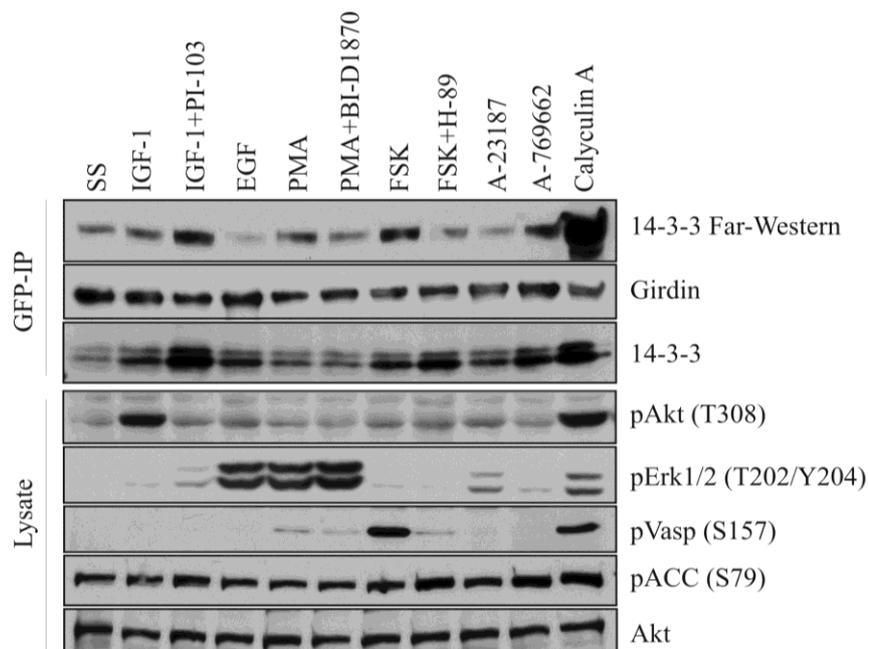


Abbildung 4.16: Regulation der 14-3-3-Bindung von Girdin

HEK293-Zellen wurden transient mit Girdin-GFP transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen gehungert und wie angezeigt stimuliert: unstimuliert (serum starved – SS); 50 ng/ml IGF-1 (15 min); 1 μ M PI-103 (1 h); 100 ng/ml EGF (15 min); 100 ng/ml PMA (30 min); 10 μ M BI-D1870 (1 h); 20 μ M FSK (30 min); 30 μ M H-89 (1 h); 10 μ M A-23187 (15 min); 50 μ M A-769662 (1 h); 50 nM Calyculin A (15 min). Danach wurden die Zellen lysiert, Girdin-GFP mit GFP-Trap® immunpräzipitiert und die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Mit der Far-Western-Methode wurde die Phosphorylierung von Girdin nachgewiesen, die eine 14-3-3-Bindung erlaubt. Zusätzlich wurde durch Western Blot-Analysen mit einem 14-3-3-AK die Co-IP detektiert und mit Phosphopeptid-spezifischen AK die jeweilige Stimulation kontrolliert. Die Detektion von Girdin- bzw. Akt diente als Ladekontrolle für die IP bzw. die Lysate.

Die EGF-Stimulation und die Inkubation mit A-23187 führten zu einer Reduzierung des 14-3-3-Signals im Far-Western. Im Gegensatz dazu schien die Bindung in der Co-IP bei beiden Stimuli verstärkt zu sein. Wie schon zuvor erwähnt, sind diese Differenzen zwischen Far-Western und Co-IP noch ungeklärt. Eine Behandlung mit dem PKA-Inhibitor BI-D1870 hatte keinen Einfluss auf die 14-3-3-Bindung. Die starke Aktivierung der Bindung durch Calyculin A wurde auf Grund der unspezifisch erhöhten Phosphorylierung als Positivkontrolle gewertet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von 14-3-3 an Girdin vorrangig von der Aktivierung von PKA und AMPK abhängig ist.

4.2.2 Analyse der 14-3-3-Bindungsstellen von Girdin

Bisher ist nur eine Serin-Phosphorylierungsstelle von Girdin bekannt. Dabei handelt es sich um S1417, das durch die Akt-Kinase phosphoryliert wird (Enomoto et al., 2005). Die 14-3-3-Bindung von Girdin war nicht vorrangig durch IGF-1-Stimulation reguliert. Aus diesem Grund wurde versucht, mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen weitere Phosphorylierungsstellen zu lokalisieren. Hierzu wurden die transient Girdin-GFP überexprimierenden HEK293-Zellen mit FSK, dem Inhibitor H-89 oder A-769662 inkubiert. Diese Aktivatoren hatten zuvor eine verstärkte 14-3-3-Bindung im Far-Western und in der Co-IP gezeigt. Nach der GFP-Trap®-IP wurden die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die einzelnen Banden für massenspektrometrische Analysen verwendet. Die Banden 1-4 dienten der Lokalisierung möglicher Phosphorylierungsstellen und die Proben 5-34 wurden für *mass finger print* (MFP)-Analysen verwendet, um mögliche Bindungspartner zu identifizieren (Abbildung 4.17A). Für diese Untersuchungen konnten leider keine offensichtlichen Unterschiede im Bandenmuster zwischen den einzelnen Stimuli auf dem Coomassie-Gel beobachtet werden, deshalb wurden nur die Banden im unstimulierten Zustand ausgeschnitten und analysiert. Bindungspartner waren in diesen Analysen nicht offensichtlich und wurden daher nicht weiter untersucht. Aliquots der Präzipitate und der Lysate dienten zusätzlich der Bindungs- und Stimulationskontrolle, die auf einer separaten SDS-PAGE aufgetrennt und durch das Far-Western- und Western Blot-Verfahren auf Aktivierung der einzelnen Kinasen und auf Phosphorylierung einer möglichen 14-3-3-Bindungsstelle getestet wurden (Abbildung 4.17B).

Nach der massenspektrometrischen Untersuchung wurden die analysierten Phosphopeptide mit Hilfe eines Programmes von M. Tinti (MRC, Dundee, UK) mit der Sequenz von humanem Girdin verglichen (Tabelle 4). Um herauszufinden, ob es sich bei den Phosphorylierungsstellen auch um 14-3-3-Bindungsstellen handelte, wurden diese einer 14-3-3-Bindungsmotiv-Analyse unterzogen. Bei den mit Gelb markierten Phosphorylierungsstellen handelt es sich um die AS, die in dieser Arbeit weiter untersucht wurden. Diese AS befanden sich vorrangig im N-Terminus und im C-Terminus von Girdin. Zur weiteren Identifizierung, welche dieser beiden Regionen für die 14-3-3-Bindung relevant ist, wurden Deletionsmutanten (Δ CT = Δ 1610-1843; Δ NT = Δ 1-253) verwendet.

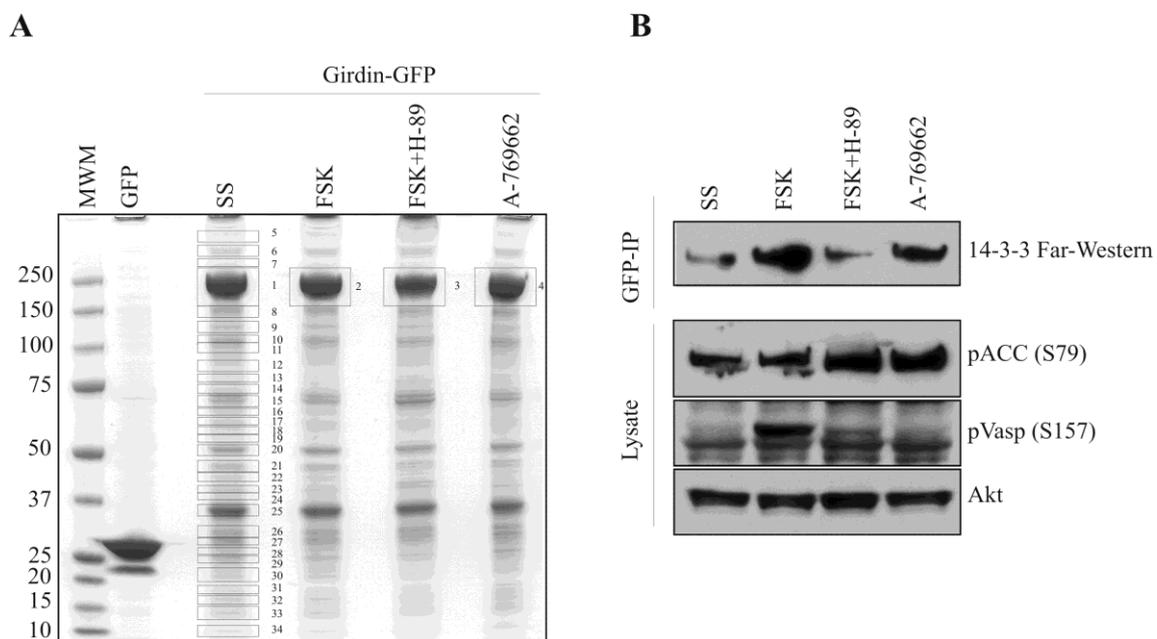


Abbildung 4.17: Massenspektrometrische Analysen von Girdin

HEK293-Zellen wurden transient mit Girdin-GFP transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen gehungert und wie angezeigt stimuliert: unstimuliert (serum starved – SS); 20 μ M FSK (30 min); 30 μ M H-89 (1 h); 50 μ M A-769662 (1 h). Danach wurden die Zellen lysiert, Girdin-GFP durch GFP-Trap® immunpräzipitiert und die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Mit Coomassie wurden die aufgetrennten Proteine angefärbt, der Nummerierung nach ausgeschnitten und für die MS-Analyse vorbereitet. (B) Aliquots der IP wurden separat auf eine SDS-PAGE aufgetragen und aufgetrennt. Mit der Far-Western-Methode wurde die Phosphorylierung von Girdin nachgewiesen, die eine 14-3-3-Bindung zulässt. Zusätzlich wurde durch Western Blot-Analysen mit Phosphopeptid-spezifischen AK die jeweilige Stimulation und mit einem Akt-AK die Proteinmenge der einzelnen Proben kontrolliert.

Girdin-GFP serum staved

exp_id_1	exp_id_2	sprot_id	peptide_seq	mod_aminocid	mod_aminocid_pos	pep_score	pep_pvalue	mass	digestion_product
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	VQIKSSSQENLLD	S	1674	62.94	1.5e-06	7.803.365	SSSQENLLDEVMMK
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	ASSSAQSPCGSPG	S	233	61.39	6.8e-06	8.166.879	DGLHFLPHASSSAQSPCGSPGMK
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	SVQIKSSSQENLL	S	1673	59.02	4.6e-06	7.883.343	SSSQENLLDEVMMK
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	MKLSLVSSDFLGK	S	1687	56.67	6.1e-06	6.102.838	SLSVSSDFLGK
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	DSNPYATLPRASS	T	1773	50.31	3.4e-05	6.072.661	DSNPYATLPR
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	ERMVQSSPPISGE	S	1020	36.91	0.00098	6.806.346	MVQSSPPISGEDNKWER
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	TSFEDISPGQVSD	S	1538	36.33	0.003	10.221.174	QLVNNKDTTSFEDISPGQVSDSSTGSR
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	YKFYDPPSPRRRG	S	1387	35.01	0.00032	5.297.203	FYDPSPPR
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	GLARVSVGKTPGD	S	1708	30.78	0.0029	7.548.237	SVSGKTPGDFYDR
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	GMRKRTESRQHLV	S	245	28.62	0.007	5.886.154	TESRQHLVVELADAK
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	HASRPASLDSGRT	S	1559	26.77	0.0085	4.782.272	VHASRPASLDSGR
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	QKSLTLTPRSDS	T	1417/1421	25.62	0.009	4.847.434	SLTLTPTR
20120403	F163020.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	GSRVHASRPASLD	S	1555	19.48	0.034	5.048.827	VHASRPASLDSGR

Girdin-GFP + FSK

exp_id_1	exp_id_2	sprot_id	peptide_seq	mod_aminocid	mod_aminocid_pos	pep_score	pep_pvalue	mass	digestion_product
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	DSNPYATLPRASS	T	1773	69.45	4.1e-07	6.072.661	DSNPYATLPR
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	VQIKSSSQENLLD	S	1674	64.43	1.1e-06	7.803.366	SSSQENLLDEVMMK
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	ASSSAQSPCGSPG	S	233	62.5	5.3e-06	8.166.883	DGLHFLPHASSSAQSPCGSPGMK
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	NNKDTTSFEDISP	S	1533	61.98	7.8e-06	10.221.248	QLVNNKDTTSFEDISPGQVSDSSTGSR
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	SVQIKSSSQENLL	S	1673	57.77	6.1e-06	7.883.343	SSSQENLLDEVMMK
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	LVNNDKDTTSFEDI	T	1531	53.83	5.1e-05	10.221.248	QLVNNKDTTSFEDISPGQVSDSSTGSR
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	MKLSLVSSDFLGK	S	1687	47.25	5.4e-05	6.102.837	SLSVSSDFLGK
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	SPGMRKRTESRQHL	T	243	40.41	0.00046	5.886.150	TESRQHLVVELADAK
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	ERMVQSSPPISGE	S	1020	32.36	0.0029	6.859.652	MVQSSPPISGEDNKWER
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	GTRRTSIHDFLT	S	1792	31.85	0.0012	6.493.176	RTSIHDFLT
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	GMRKRTESRQHLV	S	245	31.22	0.0039	5.886.150	TESRQHLVVELADAK
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	NRERQKSLTLPT	S	1417/1421	25.65	0.009	6.128.209	QKSLTLTPTR
20120403	F163021.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	YKFYDPPSPRRRG	S	1387	20.92	0.0081	5.297.207	FYDPSPPR

Girdin-GFP + FSK + H-89

exp_id_1	exp_id_2	sprot_id	peptide_seq	mod_aminocid	mod_aminocid_pos	pep_score	pep_pvalue	mass	digestion_product
20120403	F163018.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	VQIKSSSQENLLD	S	1674	64.29	1.1e-06	7.803.360	SSSQENLLDEVMMK
20120403	F163018.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	SVQIKSSSQENLL	S	1673	56.58	7.9e-06	7.883.341	SSSQENLLDEVMMK
20120403	F163018.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	GMRKRTESRQHLV	S	245	42.37	0.0003	5.886.150	TESRQHLVVELADAK
20120403	F163018.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	MKLSLVSSDFLGK	S	1687	32.63	0.0014	6.102.839	SLSVSSDFLGK
20120403	F163018.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	ERMVQSSPPISGE	S	1020	30.71	0.004	6.859.648	MVQSSPPISGEDNKWER
20120403	F163018.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	YKFYDPPSPRRRG	S	1387	27.82	0.0017	5.297.202	FYDPSPPR
20120403	F163018.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	SPGMRKRTESRQHL	T	243	25.27	0.03	4.807.835	TESRQHLVVELADAK
20120403	F163018.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	GLARVSVGKTPGD	S	1708	22.44	0.02	7.548.241	SVSGKTPGDFYDR
20120403	F163018.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	HASRPASLDSGRT	S	1559	22.27	0.025	4.782.271	VHASRPASLDSGR
20120403	F163018.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	FKESMLTLGKESK	T	422	19.14	0.038	6.518.086	ESMLTLGKESK

Girdin-GFP + A-769662

exp_id_1	exp_id_2	sprot_id	peptide_seq	mod_aminocid	mod_aminocid_pos	pep_score	pep_pvalue	mass	digestion_product
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	VQIKSSSQENLLD	S	1674	75.23	9.00E-08	7.803.364	SSSQENLLDEVMMK
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	LVNNDKDTTSFEDI	T	1531	72.5	7.8e-07	10.221.187	QLVNNKDTTSFEDISPGQVSDSSTGSR
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	SVQIKSSSQENLL	S	1673	59.04	4.6e-06	7.883.342	SSSQENLLDEVMMK
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	GMRKRTESRQHLV	S	245	55.87	1.3e-05	5.886.149	TESRQHLVVELADAK
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	NNKDTTSFEDISP	S	1533	51.53	9.7e-05	10.221.187	QLVNNKDTTSFEDISPGQVSDSSTGSR
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	ASSSAQSPCGSPG	S	233	48.8	0.00012	8.166.877	DGLHFLPHASSSAQSPCGSPGMK
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	MKLSLVSSDFLGK	S	1687	48.21	4.3e-05	6.102.836	SLSVSSDFLGK
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	HASRPASLDSGRT	S	1559	35.62	0.0011	4.782.272	VHASRPASLDSGR
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	QYLRQTRRSPVL	T	1622	30.48	0.0038	4.542.290	QTRRSPVLQHK
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	KRQTRRSPVLQHK	S	1624	28.13	0.0067	4.542.290	QTRRSPVLQHK
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	SCGLARVSVGKTP	S	1706	25.13	0.009	7.548.233	SVSGKTPGDFYDR
20120403	F163019.dat	Q3V6T2-2 GRDN_HUMAN	YKFYDPPSPRRRG	S	1387	21.85	0.0065	5.297.201	FYDPSPPR

Tabelle 4: Analyse der Phosphorylierungs- und möglichen 14-3-3-Bindungsstellen von Girdin

Nach massenspektrometrischer Analyse der Proben 1-4 aus Abbildung 4.17, wurden die Daten mit Hilfe eines Programms von M. Tinti (MRC, Dundee, UK) mit Girdin (*Homo sapiens*) verglichen und die Phosphorylierungsstellen für die unterschiedlichen Stimuli ausgegeben. Die mit Gelb unterlegten AS wurden zu Alanin mutiert und für weitere Untersuchungen verwendet.

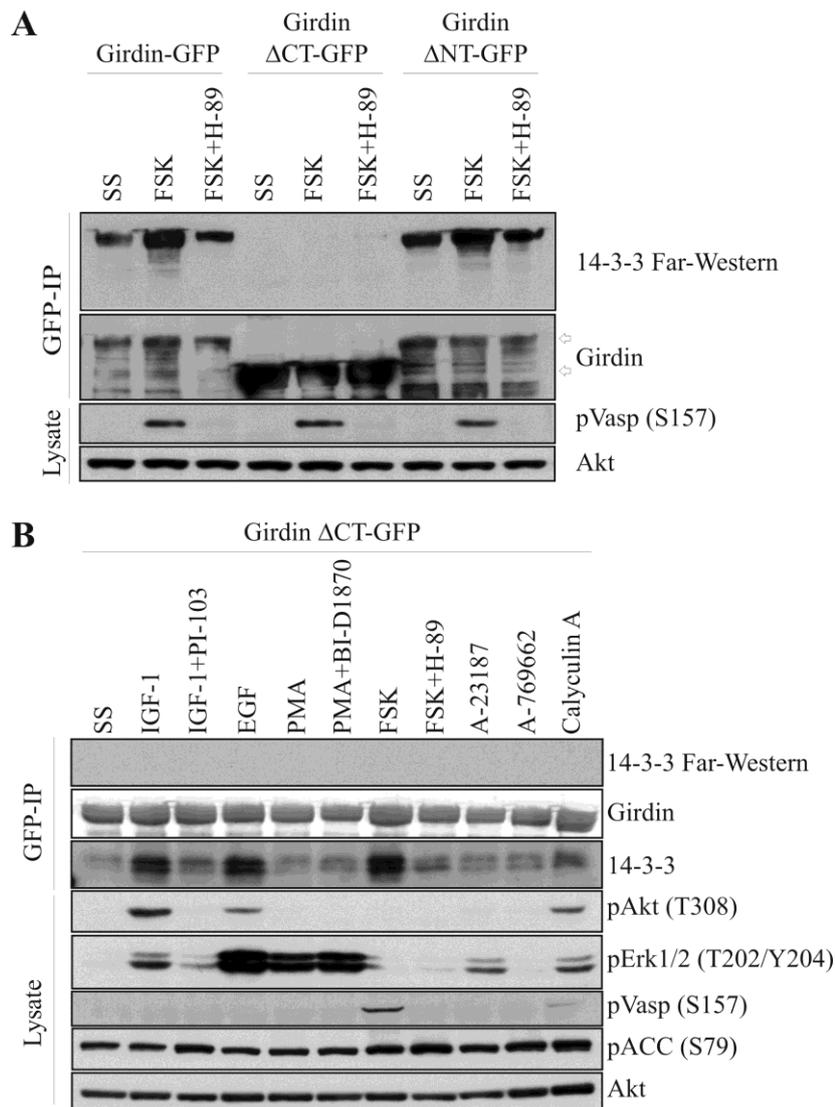


Abbildung 4.18: Identifizierung der 14-3-3-Bindungsregionen in Girdin

HEK293-Zellen wurden transient mit Girdin-GFP und den Deletionsmutanten transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen gehungert und wie in Abbildung 4.16 stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert, Girdin-GFP mit GFP-Trap® immunpräzipitiert und die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Mit der Far-Western-Methode wurde eine Phosphorylierung von Girdin nachgewiesen, die eine 14-3-3-Bindung erlaubt. Zusätzlich wurde durch Western Blot-Analysen mit einem 14-3-3-AK die Co-IP detektiert (nur in B) und mit Phosphopeptid-spezifischen AK die jeweilige Stimulation kontrolliert. Die Detektion mit einem Girdin- bzw. Akt-AK diente als Ladekontrolle für die IP bzw. die Lysate.

In Abbildung 4.18A wurden der Wildtyp und die jeweiligen Deletionsmutanten im Far-Western unter PKA-Stimulation und deren Inhibierung auf 14-3-3-Bindung untersucht. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Deletion der C-terminalen Domäne das 14-3-3-Signal komplett verschwinden ließ, wobei der N-Terminus keinen offensichtlichen

Einfluss auf die Bindung hatte. Zur Klärung, ob es sich dabei um nur eine oder sogar beide 14-3-3-Bindungsstellen handelte, wurde die C-terminale Deletionsmutante mit dem kompletten Sortiment an Aktivatoren und Inhibitoren behandelt (Abbildung 4.18B). Im Far-Western konnte keine 14-3-3-Bindung mehr festgestellt werden. In der Co-IP zeigte sich jedoch noch ein verstärktes Signal nach IGF-1-, EGF- und FSK- Stimulation. Es kann sich hierbei, wie schon zuvor beschrieben, um die Interaktion eines weiteren 14-3-3-bindenden Proteins handeln, dass mit Girdin interagiert, oder um eine weitere 14-3-3-Bindungsstelle. Diese würde wiederum nur als ein schwaches 14-3-3-bindendes Motiv fungieren.

Nachdem der C-Terminus als Hauptbindungsregion für 14-3-3-Proteine identifiziert werden konnte, wurden vorerst die AS S1708, S1721, S1792 und S1417 zu Alanin (A) mutiert. Wenn es sich bei den AS um eine 14-3-3-Bindungsstelle handelt, sollte das mutierte Girdin nach Stimulation kein oder ein vermindertes 14-3-3-Signal im Far-Western zeigen. Für die 14-3-3-Bindungsanalyse der Mutanten wurden diese parallel zum Wildtyp in HEK293-Zellen transient überexprimiert und mit IGF-1, PI-103, FSK, H-89 und A-769662 inkubiert. Die Mutante S1417A wurde aufgrund der Tatsache, dass sie eine Akt-Phosphorylierungsstelle darstellt, nur mit IGF-1 und PI-103 behandelt.

Einige der markierten AS, wie S1708 und S1417, lagen im unstimulierten sowie im stimulierten Zustand phosphoryliert vor. Da Wildtyp-Girdin in den Far-Western-Analysen auch unstimuliert an 14-3-3 bindet, stellen auch diese potentielle 14-3-3-Bindungsstellen dar. Bei S1792 handelte es sich nicht um ein eindeutiges 14-3-3-Motiv, doch es ist die einzige AS, die nur nach FSK-Stimulation phosphoryliert vorlag. Wie in Abbildung 4.19 zu erkennen ist, wurde bei keiner der drei Mutanten eine Veränderung der 14-3-3-Bindung verzeichnet. Bei der Mutation S1708A ist die Bindung ein wenig reduziert, jedoch bleibt das Stimulationsmuster das gleiche. Die Mutation der Akt-Phosphorylierungsstelle weist im Vergleich zum Wildtyp eine Verstärkung der 14-3-3-Bindung auf. Die erfolgreiche Stimulation der Zellen wurde anhand der Lysate im Western Blot-Verfahren mit entsprechenden Phosphopeptid-spezifischen AK nachgewiesen. Zusätzlich zu den in Abbildung 4.19 gezeigten AS wurden auch noch S1624, S1687, T1721, S1773 und T1791/S1792 (Doppelmutante) zu Alanin mutiert und deren 14-3-3-Bindung im Far-Western analysiert. Diese Untersuchungen gaben jedoch keinen Aufschluss über eine mögliche 14-3-3-Bindungsstelle (Daten nicht gezeigt).

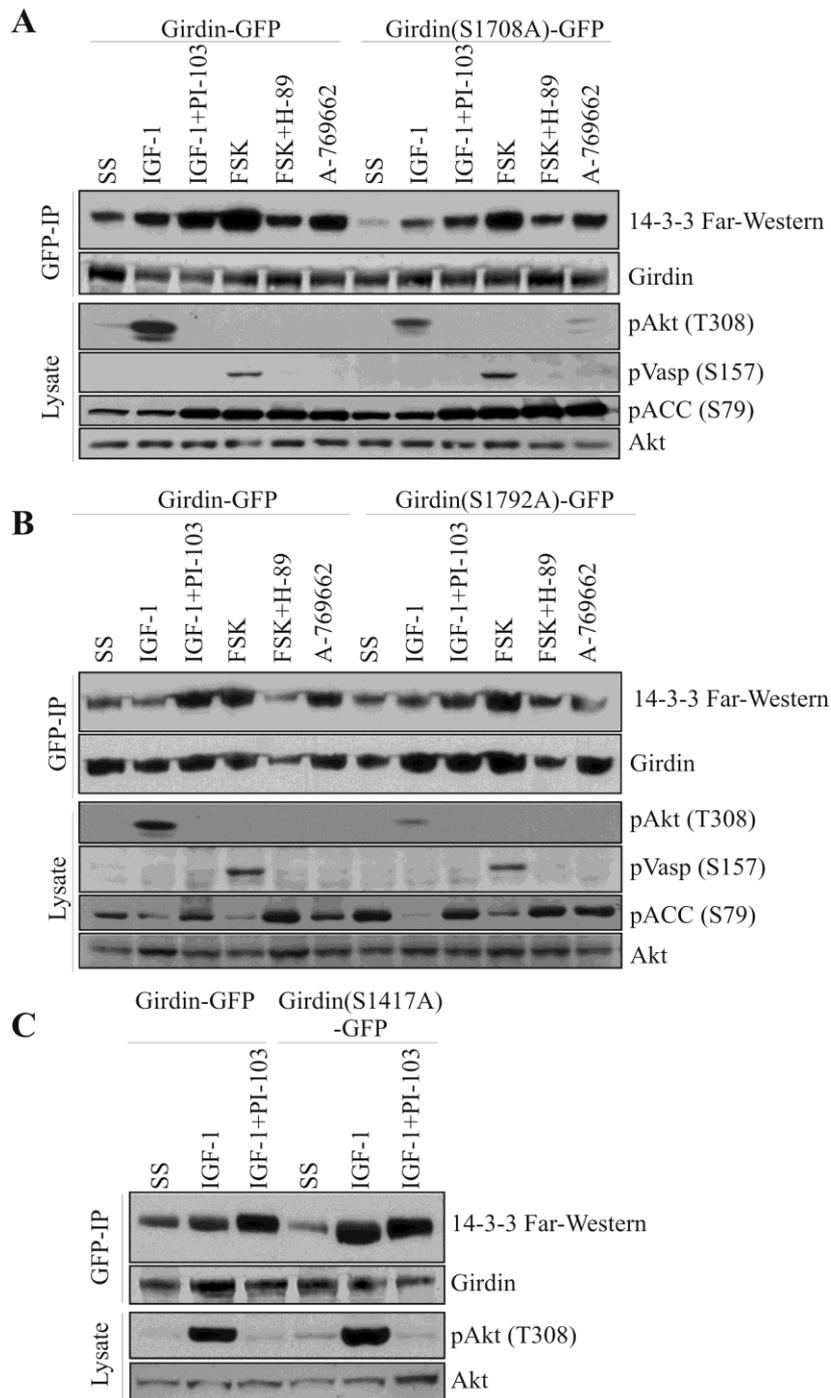


Abbildung 4.19: Mögliche 14-3-3-Bindungsstellen von Girdin

HEK293-Zellen wurden transient mit Girdin-GFP Wildtyp und Mutanten transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen gehungert und wie angezeigt stimuliert: unstimuliert (serum starved – SS); 50 ng/ml IGF-1 (15 min); 1 μ M PI-103 (1 h); 20 μ M FSK (30 min); 30 μ M H-89 (1 h); 50 μ M A-769662 (1 h). Danach wurden die Zellen lysiert, Girdin-GFP mittels GFP-Trap® immunpräzipitiert und die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Mit der Far-Western-Methode wurde die Phosphorylierung von Girdin nachgewiesen, die eine 14-3-3-Bindung zulässt. Zusätzlich wurde durch Western Blot-Analysen mit Phosphopeptid-spezifischen AK die jeweilige Stimulation kontrolliert. Die Detektion mit einem Girdin- bzw. Akt-AK diente als Ladekontrolle für die IP bzw. die Lysate.

4.2.3 Die Girdin-Proteinfamilie ist eine 2R-Ohnologfamilie, der ein Ohnolog fehlt

Wie schon in der Einleitung erwähnt, besteht die Girdin-Proteinfamilie aus den drei Mitgliedern Girdin, Daple und Gipie. Diese Proteine werden von unterschiedlichen Genen kodiert, die ebenfalls auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind (Girdin: 2p16.1; Daple: 14q32.11; Gipie: 11q12.3). Durch Syntenieanalysen mit einer Datenbank (Abbildung 4.20) war zu erkennen, dass die drei Gene chromosomale Segmente miteinander und auch mit anderen Abschnitten auf den Chromosomen teilen. Das ließ darauf schließen, dass diese Proteinfamilie aus *two rounds of whole genome duplication* (2R-WDG) entstanden ist. Da es sich hierbei nicht um vier Familienmitglieder handelt, spricht man von einer 2R-Ohnologfamilie mit einem fehlenden Mitglied (Postlethwait, 2007). Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung von Tinti et al. zeigt, dass viele „2R-Ohnolog-Proteinfamilien“ 14-3-3-bindende Proteine darstellen (2012). Anhand der REEP (*Receptor accessory protein*)-Proteinfamilie konnte gezeigt werden, dass alle vier REEP-Mitglieder 14-3-3-Bindungsproteine sind und zumindest eine gleiche 14-3-3-Bindungsstelle aufweisen (*Lynchpin*-Stelle). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Analyse der 14-3-3-Bindungen der gesamten Girdin-Familie von Interesse ist, um mögliche Rückschlüsse auf einzelne 14-3-3-Bindungsstellen ziehen zu können.

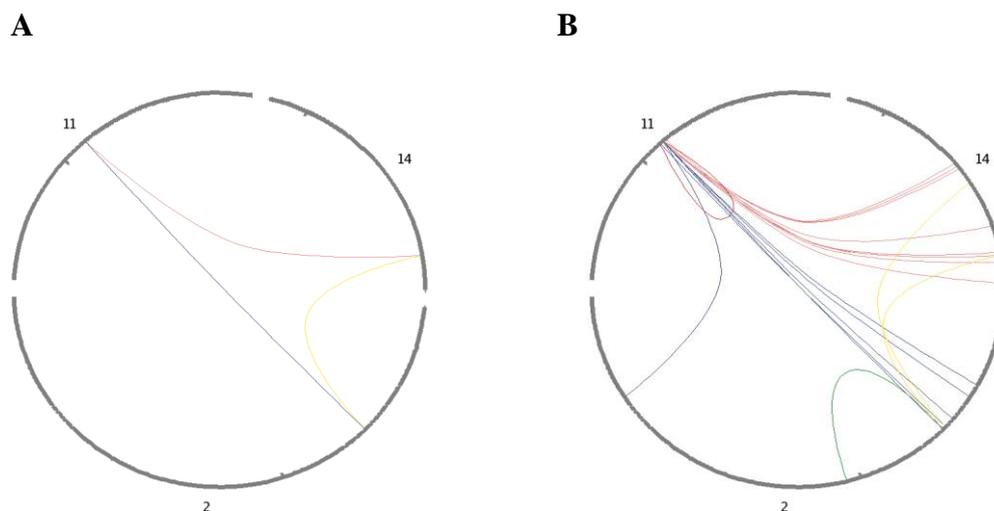


Abbildung 4.20: Syntenieanalysen der Girdin-Proteinfamilie

(A) Identifizierung der Gensyntenie (Paraloge) von Girdin, Daple und Gipie im humanen Genom mit Hilfe einer Syntenie-Datenbank (http://teleost.cs.uoregon.edu/syteny_db/).
(B) Die zu analysierende Genregion wurde auf Gene innerhalb 500 kb erweitert. Jede Linie entspricht einem Gen.

4.3 Daple – ein 14-3-3-Bindungsprotein

Zusätzlich zu Girdin wurde auch Daple einer Untersuchung der 14-3-3-Bindung unterzogen. Hierbei wurde Daple-GFP in HEK293-Zellen transient überexprimiert und mit den unter 4.2.1 beschriebenen Stimuli behandelt. Nach der Zellyse und der IP von Daple wurde die Phosphorylierung, die eine 14-3-3-Bindung ermöglicht, mit Hilfe der Far-Western-Methode nachgewiesen. Die Western Blot-Analyse der Zelllysate mit Phosphopeptid-spezifischen AK diente der Kontrolle der Aktivierung und Inhibierung der einzelnen Kinasen. Wie in Abbildung 4.21 zu sehen ist, band Daple im unstimulierten Zustand nicht oder nur sehr gering an 14-3-3. Die Bindung wurde hauptsächlich durch FSK aktiviert. Interessanterweise trat hier in abgeschwächter Form annähernd das gleiche Aktivierungsmuster wie bei Girdin auf. Auch Daple wurde neben FSK durch die Aktivierung der AMPK verstärkt von 14-3-3-Proteinen gebunden. Die Calyculin A-Stimulierung aktivierte die 14-3-3-Bindung massiv und diente hier wie auch bei Girdin als Positivkontrolle.

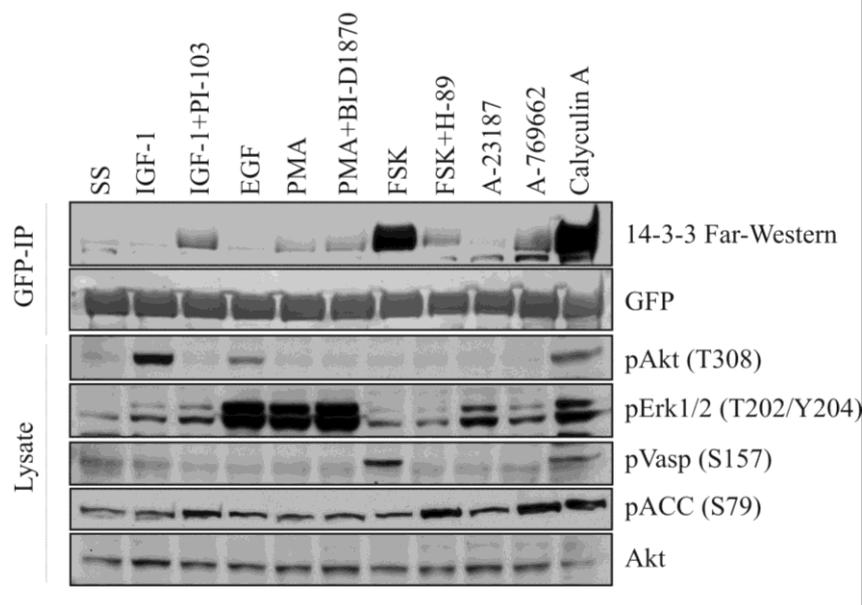


Abbildung 4.21: Regulation der 14-3-3-Bindung von Daple

HEK293-Zellen wurden transient mit Daple-GFP transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen gehungert und wie in Abbildung 4.16 stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert, Daple-GFP durch GFP-Trap® immunpräzipitiert und die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Mit der Far-Western-Methode wurde die Phosphorylierung von Girdin nachgewiesen, die eine 14-3-3-Bindung ermöglicht. Zusätzlich wurde durch Western Blot-Analysen mit Phosphopeptid-spezifischen AK die jeweilige Stimulation kontrolliert. Die Detektion mit einem GFP- bzw. Akt-AK diente als Ladekontrolle für die IP bzw. die Lysate.

4.3.1 Analyse der 14-3-3-Bindungsstellen von Daple

Für Daple gibt es bisher noch keine veröffentlichten Phosphorylierungsstellen. Um herauszufinden, welche AS nach AMPK- und PKA-Aktivierung phosphoryliert wird, wurde Daple nach FSK und A-769662-Stimulation massenspektrometrisch analysiert. Wie in Abbildung 4.22 zu erkennen ist, wurden auch hier mit den Banden 1-4 die Phosphorylierungsstellen lokalisiert und mit den restlichen Banden MFP-Analysen durchgeführt, um Daple-Interaktionspartner zu identifizieren. Diese sind jedoch in dieser Arbeit nicht weiter untersucht worden. Die aus der Massenspektrometrie erhaltenen Daten sind in Tabelle 5 aufgeführt. Nach der Analyse der einzelnen Phosphopeptide wurden die mit Gelb markierten AS in der cDNA von Daple zu Alanin mutiert.

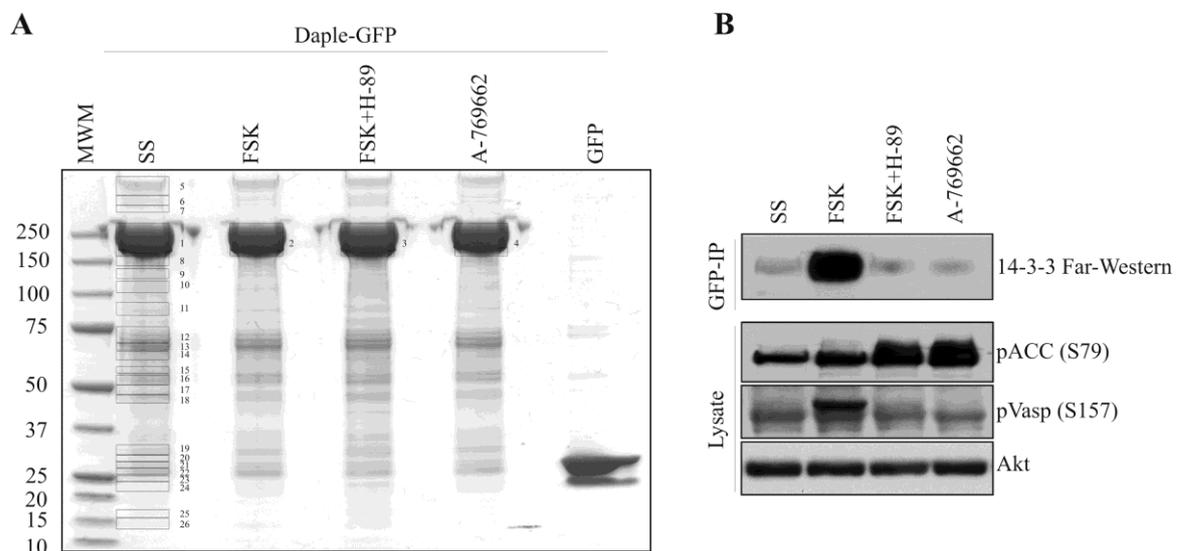


Abbildung 4.22: Massenspektrometrische Analysen von Daple

HEK293 Zellen wurden transient mit Daple-GFP transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen gehungert und wie in Abbildung 4.17 stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert, Daple-GFP durch GFP-Trap® immunpräzipitiert, und die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Mit Coomassie wurden die aufgetrennten Proteine angefärbt, der Nummerierung nach ausgeschnitten und für die MS-Analyse vorbereitet. (B) Aliquots der Immunpräzipitationen wurden separat auf eine SDS-PAGE aufgetragen und aufgetrennt. Mit der Far-Western Methode wurde die Phosphorylierung von Daple, die eine 14-3-3 Bindung ermöglicht, nachgewiesen. Zusätzlich wurde durch Western Blot-Analysen mit Phosphopeptid-spezifischen AK die jeweilige Stimulation und mit einem Akt-AK die Proteinmenge der einzelnen Proben kontrolliert.

Daple-GFP serum starved

exp_id_1	exp_id_2	sprot_id	peptide_seq	mod_aminocid	mod_aminocid_po	pep_score	pep_pvalue	mass	digestion_product
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	ESSDPASPAASQP	S	1444	110.5	8.9e-11	9.017.485	STVDSPPPWQLLESSDPASPAASQPLR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	EGLPAKSPGRSPD	S	1981	65.73	2.7e-06	8.884.099	AGLSLSEGDGVPVGGQGCSEGLPAKSPGR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	QAQHPPSPPIKSSS	S	227	65.35	1.5e-06	7.873.740	DYLQAQHPPSPIK
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LNLLKGSSEQLHGR	S	1592	64.07	2,00E-06	7.650.236	NTSSNSPPLNLKGSSEQLHGR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SKSSPASPEPGGD	S	2011	63.72	9,00E-06	10.010.724	GSVSKSSPASPEPGGDPTVWVEYGCV
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	GSVSKSSPASPEP	S	2008	63.72	9,00E-06	10.010.724	GSVSKSSPASPEPGGDPTVWVEYGCV
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SLSRFASLASADL	S	1806	63.59	1.6e-06	6.223.079	AFSLASADLLR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	RTKGYNSDDNLCE	S	1547	61.21	6.5e-06	8.580.213	GYNSDDNLCEPSELEFVFNHR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	PLNLKGSSEQLHG	S	1591	60.0	5,00E-06	7.650.236	NTSSNSPPLNLKGSSEQLHGR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LKSTVDSPPWQLE	S	1432	56.68	9.4e-05	9.821.418	LKSTVDSPPWQLESDDPASPAAASQPLR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SRELRKSTVDSPP	S	1428	55.22	0.00013	9.821.418	LKSTVDSPPWQLESDDPASPAAASQPLR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LHGRSEFSSEDL	S	1601	54.82	1.2e-05	7.673.271	SEFSSEDLIPSR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	RERKSTVDSPPW	T	1429	51.18	0.00033	9.821.418	LKSTVDSPPWQLESDDPASPAAASQPLR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	EACKQESPKLGA	S	1825	49.52	0.0001	8.400.632	ASGPEACKQESPKLGAPEALGGR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	NTSSNSPPLNLK	S	1584	47.89	4.9e-05	6.713.053	NTSSNSPPLNLK
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	VRPCASPSSEMMV	S	1664	46.25	0.00035	11.928.703	GTAPPYVGVRPCASPSSEMMVLEEFLSESNR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	AKSPGRSPDLAPH	S	1985	42.17	0.00019	5.085.745	SPGRSPDLAPHGR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	GSHTLQSPAPSS	S	1847	36.0	0.0018	7.139.979	FTGSHTLQSPAPSSSLAR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	RGSVSKSSPASPE	S	2007	35.21	0.0029	15.010.951	GSVSKSSPASPEPGGDPTVWVEYGCV
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	VPGQGCSEGLPAK	S	1974	34.98	0.0033	12.575.723	AGLSLSEGDGVPVGGQGCSEGLPAKSPGRSPDLAPHGR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SADSTPSPSSLS	S	239	34.41	0.0058	10.524.820	SSADSTPSPSSLSSEDKQLHVELADTK
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	EESNRSSPTHDT	S	1683	30.92	0.0093	8.170.096	SSPTHDTSPCRDLLSDYFR
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	DSTPSPSSLSSE	T	241	28.13	0.022	10.791.368	SSADSTPSPSSLSSEDKQLHVELADTK
20120321	F161740.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	ADLRLASGPEACK	S	1816	26.13	0.02	8.400.632	ASGPEACKQESPKLGAPEALGGR

Daple-GFP + FSK

exp_id_1	exp_id_2	sprot_id	peptide_seq	mod_aminocid	mod_aminocid_po	pep_score	pep_pvalue	mass	digestion_product
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	ESSDPASPAASQP	S	1444	88.07	1.6e-08	9.017.489	STVDSPPPWQLLESSDPASPAASQPLR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	RERKSTVDSPPW	T	1429	79.81	4.5e-07	9.821.416	LKSTVDSPPWQLESDDPASPAAASQPLR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SLSRFASLASADL	S	1806	70.63	3.2e-07	6.223.080	AFSLASADLLR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	ARHPGRTKGYNSD	T	1542	67.34	1.4e-06	9.344.003	TKGYNSDDNLCEPSELEFVFNHR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LAPLHQSATAPAI	S	1902	66.96	1.3e-06	10.012.555	LAPLHQSATAPAIATAGAGAAAAGSGSNSQLLHFSAPAAAPAR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	RTKGYNSDDNLCE	S	1547	61.98	5.5e-06	8.580.212	GYNSDDNLCEPSELEFVFNHR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LHGRSEFSSEDL	S	1601	60.09	3.6e-06	7.673.275	SEFSSEDLIPSR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	QAQHPPSPPIKSSS	S	227	58.13	7.9e-06	7.873.736	DYLQAQHPPSPIK
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	GSHTLQSPAPSS	S	1847	57.04	1.4e-05	7.139.983	FTGSHTLQSPAPSSSLAR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	EGLPAKSPGRSPD	S	1981	54.67	3.5e-05	8.884.094	AGLSLSEGDGVPVGGQGCSEGLPAKSPGR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	PWQLESDDPASP	S	1440	54.32	4,00E-05	13.521.173	STVDSPPPWQLESDDPASPAAASQPLR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	PGDPTVWVEYGT	T	2020	53.05	3.2e-05	8.216.656	SSPASPEPGGDPTVWVEYGCV
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	TAPAIATAGAGAA	T	1910	52.1	3.9e-05	10.012.555	LAPLHQSATAPAIATAGAGAAAAGSGSNSQLLHFSAPAAAPAR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SKSSPASPEPGGD	S	2011	51.42	0.00014	10.010.716	GSVSKSSPASPEPGGDPTVWVEYGCV
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	GSVSKSSPASPEP	S	2008	51.42	0.00014	10.010.716	GSVSKSSPASPEPGGDPTVWVEYGCV
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	RGSVSKSSPASPE	S	2007	50.35	0.00018	10.010.716	GSVSKSSPASPEPGGDPTVWVEYGCV
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	RGLDRDASTDL	T	1500	48.66	9.1e-05	5.635.813	GLDRDASTDLAMR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LDRRFLSAPPKKE	S	1887	46.15	7,3e-05	7.053.447	RFLSAPPKKEER
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	PLNLKGSSEQLHG	S	1591	44.29	0.00018	7.650.232	NTSSNSPPLNLKGSSEQLHGR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LKPRGRSPHRGSL	S	1491	42.14	0.00053	5.565.039	GSPHRGRSLDRDASTDLAMR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	AKSPGRSPDLAPH	S	1985	39.45	0.0012	12.575.722	AGLSLSEGDGVPVGGQGCSEGLPAKSPGRSPDLAPHGR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	EACKQESPKLGA	S	1825	38.65	0.0005	5.328.951	ASGPEACKQESPK
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SADSTPSPSSLS	S	239	36.6	0.0035	10.524.822	SSADSTPSPSSLSSEDKQLHVELADTK
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LEESNRSSPTHDT	S	1682	29.52	0.019	10.084.446	RTGAPPYVGVRPCASPSSEMMVLEEFLSESNRSPSSPTHDTPSCR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	RTGAPPYVGVRPC	Y	1655	29.52	0.019	10.084.446	RTGAPPYVGVRPCASPSSEMMVLEEFLSESNRSPSSPTHDTPSCR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	GSPHRGLDRDAST	S	1496	27.98	0.011	8.448.688	GLDRDASTDLAMR
20120321	F161743.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SDASRSKSFVFLN	S	452	24.46	0.034	8.950.662	NADLSDASRSKSFVFLNECASSR

Daple-GFP + FSK + H-89

exp_id_1	exp_id_2	sprot_id	peptide_seq	mod_aminocid	mod_aminocid_po	pep_score	pep_pvalue	mass	digestion_product
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	ESSDPASPAASQP	S	1444	80.65	8.7e-08	9.017.488	STVDSPPPWQLLESSDPASPAASQPLR
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	RTKGYNSDDNLCE	S	1547	76.56	1.5e-07	9.344.008	TKGYNSDDNLCEPSELEFVFNHR
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	EGLPAKSPGRSPD	S	1981	73.72	4.2e-07	8.884.085	AGLSLSEGDGVPVGGQGCSEGLPAKSPGR
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	QAQHPPSPPIKSSS	S	227	60.21	4.9e-06	7.873.736	DYLQAQHPPSPIK
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SKSSPASPEPGGD	S	2011	58.62	1.1e-05	8.216.677	SSPASPEPGGDPTVWVEYGCV
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SLSRFASLASADL	S	1806	58.51	5.1e-06	6.223.074	AFSLASADLLR
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	PLNLKGSSEQLHG	S	1591	57.29	9.5e-06	7.650.230	NTSSNSPPLNLKGSSEQLHGR
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	RGSVSKSSPASPE	S	2007	51.63	0.00014	10.010.720	GSVSKSSPASPEPGGDPTVWVEYGCV
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	GSVSKSSPASPEP	S	2008	47.6	0.00034	10.010.720	GSVSKSSPASPEPGGDPTVWVEYGCV
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SADSTPSPSSLS	S	239	46.61	0.00033	10.524.819	SSADSTPSPSSLSSEDKQLHVELADTK
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	AKSPGRSPDLAPH	S	1985	41.39	0.00078	12.575.711	AGLSLSEGDGVPVGGQGCSEGLPAKSPGRSPDLAPHGR
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	EACKQESPKLGA	S	1825	41.28	0.00028	7.988.395	ASGPEACKQESPK
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LHGRSEFSSEDL	S	1601	37.7	0.00061	7.673.273	SEFSSEDLIPSR
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	DSTPSPSSLSSE	T	241	30.97	0.011	10.791.366	SSADSTPSPSSLSSEDKQLHVELADTK
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SSPAMETRGRGTS	T	1001	24.93	0.0056	4.024.865	SSGSSPAMETR
20120321	F161745.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	TAPAIATAGAGAA	T	1910	23.72	0.027	10.012.565	LAPLHQSATAPAIATAGAGAAAAGSGSNSQLLHFSAPAAAPAR

Daple-GFP + A-769662

exp_id_1	exp_id_2	sprot_id	peptide_seq	mod_aminoacid	mod_aminoacid_pos	pep_score	pep_pvalue	mass	digestion_product
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	ESSDPASPAASQP	S	1444	115.06	3.1e-11	9.017.488	STVDSPPWQLSESDPASPAASQPLR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	ARHPGRTKGYNSD	T	1542	70.29	6.5e-07	9.344.010	TKGYNSDDNLCEPSLEFEVFNHR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	RTKGYNSDDNLCE	S	1547	61.27	5.2e-06	9.344.010	TKGYNSDDNLCEPSLEFEVFNHR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	EGLPAKSPGRSPD	S	1981	59.85	1.00E-05	8.884.095	AGLSLSEGDGVPQGQCGELPAKSPGR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LHGRSEFSSEDL	S	1601	57.18	7.1e-06	7.673.274	SEFSSEDLIPSR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LNLKGSSEQLHGR	S	1592	54.87	1.7e-05	7.650.228	NTSSNSPLNLKGSSEQLHGR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	QAQHPPSPHKSSS	S	227	54.84	1.7e-05	7.873.739	DYLQAQHPPSPIK
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SLSRAFSLASADL	S	1806	54.47	1.3e-05	6.223.074	AFSLASADLLR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	GSHTLQSPAPPSS	S	1847	53.83	2.9e-05	7.139.983	ETGSHTLQSPAPPSSHSLAR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	PLNLKGSSEQLHGR	S	1591	48.6	7.2e-05	7.650.228	NTSSNSPLNLKGSSEQLHGR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	AKSPGRSPDLAPH	S	1985	41.16	0.00021	5.085.746	SPGRSPDLAPHPGR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	SADSTPSPSSLS	S	239	39.2	0.0018	10.524.819	SSSADSTPSPSSLSSEDKQLAVELADTK
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	EACKQESPKLGA	S	1825	37.38	0.00067	5.328.952	ASGPEACKQESPKQ
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	TAPAIATAGAGAA	T	1910	31.54	0.0044	10.012.562	LAPLHQSATAPAIATAGAGAAAAGSGSNSQLLHFSAAAAPAAAR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	EESNRSPTHDTP	S	1683	28.75	0.016	8.170.090	SSPTHDTSPCRDLDLSDYFR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	GAAAAGSGSNSQL	S	1920	28.59	0.0086	10.012.562	LAPLHQSATAPAIATAGAGAAAAGSGSNSQLLHFSAAAAPAAAR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	DSTPSPSSLSSE	T	241	27.28	0.029	10.791.373	SSSADSTPSPSSLSSEDKQLAVELADTK
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	LAPLHQSATAPAI	S	1902	24.54	0.022	10.012.562	LAPLHQSATAPAIATAGAGAAAAGSGSNSQLLHFSAAAAPAAAR
20120321	F161747.dat	Q9P219 DAPLE_HUMAN	VGKQLASQKILQL	S	677	16.14	0.025	3.776.817	QLASQK

Tabelle 5: Analyse der Phosphorylierungs- und möglichen 14-3-3-Bindungsstellen von Daple

Nach massenspektrometrischer Analyse der Banden 1-4 (Abbildung 4.22) wurden die Daten mit Hilfe des Programms von M. Tinti mit Daple (*Homo sapiens*) verglichen und die Phosphorylierungsstellen ausgegeben.

Bei den zu mutierenden AS handelte es sich um S1440 und S1887, die nur nach Stimulation mit FSK phosphoryliert waren. Durch Sequenzanalysen wurde gezeigt, dass die Akt-Phosphorylierungsstelle von Girdin auch in Daple wiederzufinden ist (Abbildung 4.23). Auch diese wurde wie S1440 und S1887 zu Alanin mutiert und die jeweiligen Mutanten parallel zum Wildtyp einzeln in HEK293-Zellen transient überexprimiert. Die Zellen wurden wie beschrieben mit IGF-1, FSK, A-769662 und den dazugehörigen Inhibitoren behandelt und lysiert (Abbildung 4.24). Die Far-Western-Methode diente dabei der Untersuchung der 14-3-3-Bindung und die Western Blot-Analyse der Gesamtzelllysate der Stimulations-Kontrolle.

```

Q3V6T2-2|GRDN_HUMAN/1-1843  RQKSLTLTPTRS
Q5SNZ0|GRDN_MOUSE/1-1873   RQKSLTLTPTRS
Q9P219|DAPLE_HUMAN/1-2028   RLKSTVDSPPWQ
Q6VGS5|DAPLE_MOUSE/1-2009   RLKSTTDSPPWQ
A6NC98|CC88B_HUMAN/1-1476   GG.....
Q4QRL3|CC88B_MOUSE/1-1481   GG.....

```

Abbildung 4.23: Girdins Akt-Phosphorylierungsstelle S1417 ist hoch konserviert
Sequenzanalyse der Girdin Proteinfamilie mit Jalview 2.7. GRDN – Girdin; CC88B - Gipie

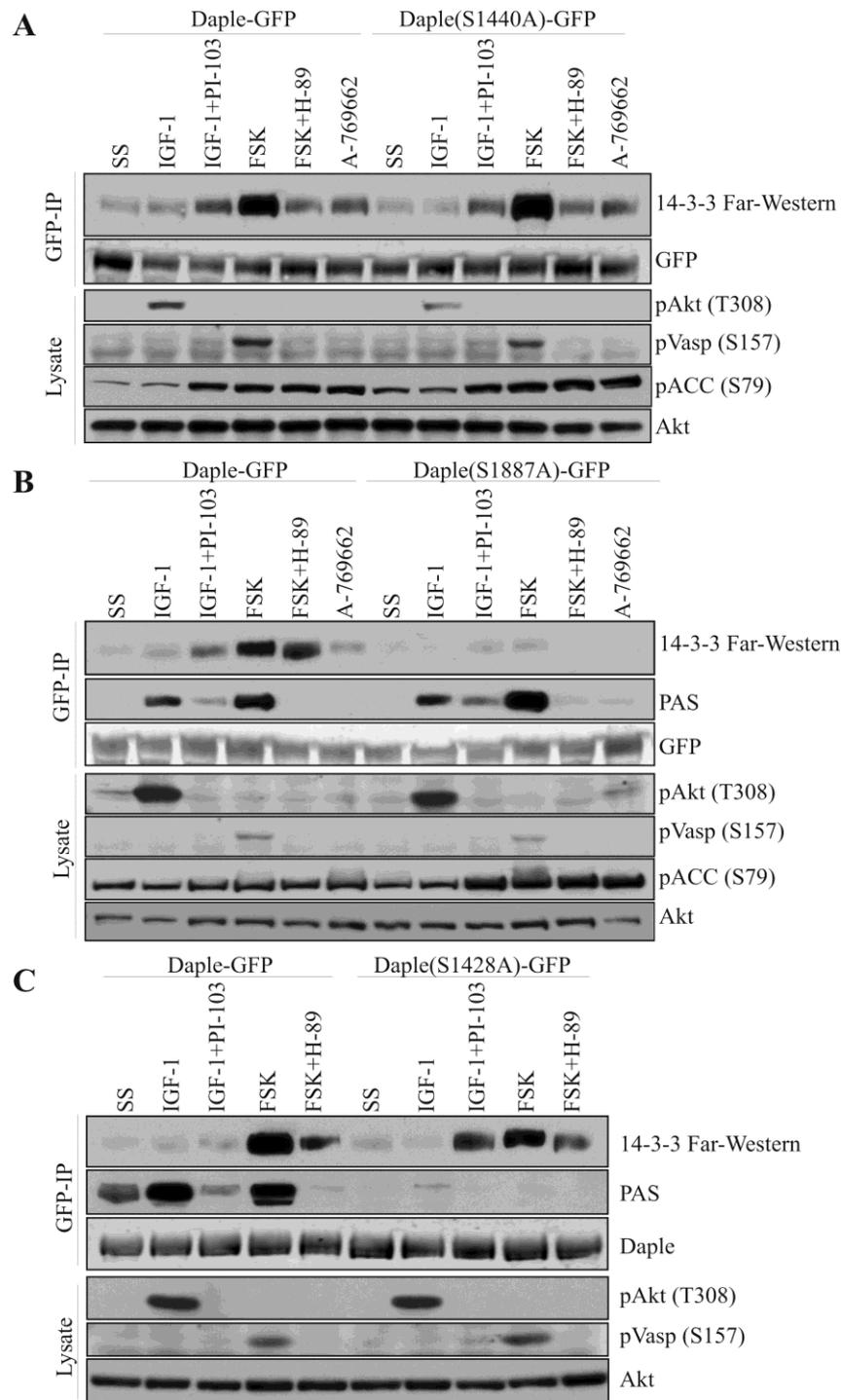


Abbildung 4.24: Mutationen von möglichen 14-3-3-Bindungsstellen von Daple

HEK293-Zellen wurden transient mit Daple-GFP Wildtyp und Mutanten transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen gehungert und wie in Abbildung 4.19 stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert, Daple-GFP mittels GFP-Trap® immunpräzipitiert und die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Mit der Far-Western-Methode wurde die Phosphorylierung von Daple, die eine 14-3-3-Bindung erlaubt, nachgewiesen. Zusätzlich wurde durch Western Blot-Analysen mit dem PAS und weiteren Phosphopeptid-spezifischen AK die jeweilige Stimulation kontrolliert. Die Detektion mit einem Girdin- bzw. Akt-AK diente als Ladekontrolle für die IP bzw. die Lysate.

In Abbildung 4.24 ist zu erkennen, dass die Mutation von S1440 zu Alanin im Vergleich zum Wildtyp von Daple keine Veränderung der 14-3-3-Bindung aufwies. Die Mutation S1887 zu Alanin hingegen bewirkte eine deutliche Abschwächung des 14-3-3-Signals im Far-Western. Dies lässt darauf schließen, dass diese AS nach Phosphorylierung eine der 14-3-3-Bindungsstellen in Daple darstellt. Die starke Abschwächung des 14-3-3-Signals im Far-Western für diese Mutante deutet auf eine sogenannte „gatekeeper“-Funktion für diese AS hin. Die mögliche Akt-Phosphorylierungsstelle S1428 zeigte nach Mutation keine Veränderung der 14-3-3-Bindung. Zur Kontrolle der Aktivierung der Akt-Phosphorylierungsstelle durch die Stimuli wurde ein PAS (*Phospho-Akt substrate*)-AK verwendet. Dafür wurde, wie für den Far-Western, Daple-GFP immunpräzipitiert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem PAS-AK geblottet. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei Mutation von S1428 zu Alanin das Signal der Phosphorylierung durch Akt erlosch. Bei der Mutation S1887 zu Alanin war die 14-3-3-Bindung reduziert, jedoch veränderte sich dabei die Akt-Phosphorylierung von Daple nicht. Um herauszufinden, ob es sich bei der Akt-Phosphorylierungsstelle um die zweite 14-3-3-Bindungsstelle handelt, wurde eine Doppelmutante hergestellt, in der S1428 und S1887 zu Alanin mutiert wurden. Aufgrund der starken Reduktion der 14-3-3-Bindung von S1887 war leider kein Unterschied zwischen der Doppel- und der Einzelmutante festzustellen (Daten nicht gezeigt).

4.4 Ähnlichkeiten in der Regulation der 14-3-3-Bindung in der Girdin-Proteinfamilie

In Abbildung 4.25 ist zu erkennen, dass Daple und Girdin ähnliche Aktivierungsmuster in der 14-3-3-Bindung aufweisen. Daher wurde versucht auch für das dritte Mitglied der Girdin-Familie die 14-3-3-Bindung zu charakterisieren. Leider gelang es nur die cDNA für die C-terminalen 815 AS von Gipie zu klonieren. Dieser Teil beinhaltet sowohl die homologen Sequenzen als auch den hoch variablen Bereich der Mitglieder in der Familie. HEK293-Zellen, die dieses Konstrukt transient überexprimierten, wurden wie auch bei Girdin und Daple mit den unterschiedlichen Aktivatoren und Inhibitoren inkubiert. Im Far-Western konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Gipie, die eine 14-3-3-Bindung ermöglicht, durch EGF-, BI-D1870- und AMPK-Stimulation verstärkt wurde. Des Weiteren ist zu erkennen, dass Gipie, wie auch Girdin, im unstimulierten Zustand an 14-3-3-Proteine band. Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch AMPK

aktivierte Phosphorylierung eine mögliche *Lynchpin*-Bindungsstelle in der Girdin-Proteinfamilie darstellt. Um welche es sich dabei handelt, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

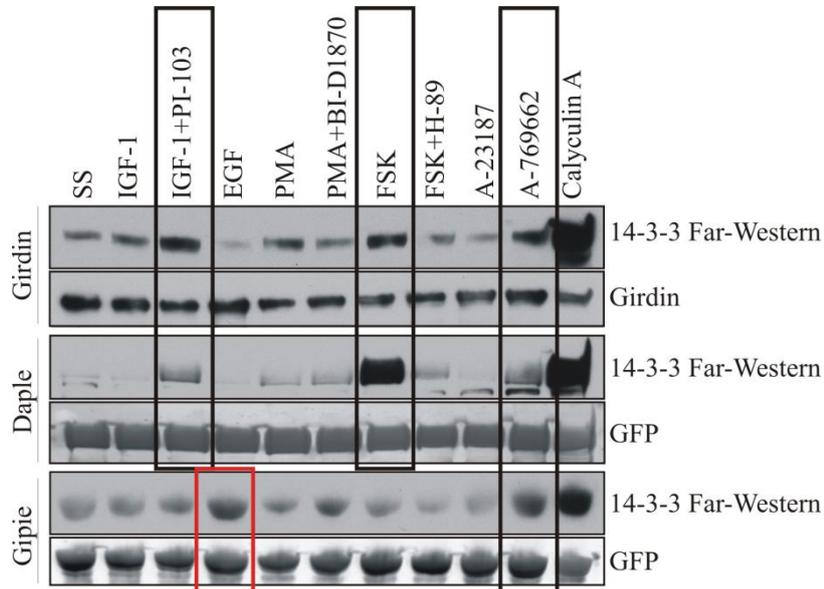


Abbildung 4.25: Regulation der 14-3-3 Bindung in der Girdin-Proteinfamilie

HEK293-Zellen wurden transient mit Girdin-GFP, Daple-GFP und Gipie-GFP (EST Klon D886A) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen gehungert und wie in Abbildung 4.16 stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert, die GFP-Fusionsproteine durch GFP-Trap® immunpräzipitiert und die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Mit der Far-Western-Methode wurden die Phosphorylierungen, die eine 14-3-3-Bindung erlauben, nachgewiesen. Zusätzlich wurden durch Western Blot-Analysen mit einem Girdin- oder GFP-AK die Proteinmengen detektiert.

5 Diskussion

Girdin wurden als ein wichtiger Regulator der Akt-Kinaseaktivität und des Zytoskeletts beschrieben (Enomoto et al., 2005). Insbesondere ist die Expression von Girdin in Krebszellen erhöht und beeinflusst somit den Verlauf der Krebserkrankung und Metastasierung (Jiang et al., 2008). Außer der Tatsache, dass durch eine Girdin-Überexpression die Phosphorylierung von Akt und somit auch der Akt-Signalweg verstärkt werden, gibt es noch keine Erkenntnisse über den Einfluss von Girdin auf den Insulinsignalweg. Daher wurde die Funktion von Girdin im Skelettmuskel untersucht, der eines der wichtigsten Zielgewebe des Insulins darstellt.

5.1 Girdin-Expression reguliert die Insulinsensitivität in Muskelzellen

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal mit einer humanen Studie gezeigt werden, dass eine erhöhte Girdin-Expression mit einer verbesserten Ganzkörper-Insulinsensitivität im Menschen einhergeht. Darüber hinaus führte die Senkung der Expression von endogenem Girdin in C2C12-Zellen zu einer Reduktion der Insulinsensitivität. Hierbei wiesen die Zellen eine leicht verringerte IRS-1-Proteinmenge und eine stark reduzierte IRS-1-Tyrosinphosphorylierung nach Insulinstimulation auf. Weiterhin reduzierte der Girdin-*knockdown* in diesen Zellen die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung, wie es zuvor auch in anderen siRNA-Experimenten von HepG2- und Hela-Zellen nachgewiesen werden konnte (Anai et al., 2005; Ghosh et al., 2008). Im Gegensatz dazu zeigten C2C12-Zellen, die stabil Girdin überexprimieren, eine erhöhte Insulinsensitivität. Der IR war stark hochreguliert und konstitutiv phosphoryliert. Eine stetige Phosphorylierung des IR ist möglicherweise eine Folge der erhöhten Expression des Rezeptors. Auch in BHK (*Baby hamster kidney*)-Zellen, die 5 Millionen IR (Møller et al., 1995) und C2C12-Zellen, die stabil den humanen IR überexprimieren, konnte ein solches Phänomen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wurde trotz konstitutiver Aktivierung des IR eine erhöhte IRS-1-Tyrosinphosphorylierung erst nach Insulinstimulation in den Girdin-überexprimierenden Zellen verzeichnet. C2C12-Zellen, die den humanen IR in gleichem Maße wie die C2C12-Girdin-Zellen stabil überexprimieren, zeigten ein ähnliches IR- und IRS-1-Phosphorylierungsmuster. In diesen Zellen war wie bei IRS-1 auch die Phosphorylierung von Akt Insulin-abhängig (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise eine basale IR-

Tyrosinphosphorylierung nicht ausreicht, um die Kinase vollständig zu aktivieren. Erst die Bindung von Insulin führt zu einem vollständigen Insulinsignal.

In den Girdin-überexprimierenden Zellen wurde eine konstitutive Phosphorylierung der Akt-Kinase gefunden, die wiederum zu einer stetigen Phosphorylierung und Inhibierung des Akt-Substrates GSK3 führte. Dieser Effekt konnte ebenfalls in transientser Girdin-Überexpression in HepG2- und COS7-Zellen nachgewiesen werden (Anai et al., 2005; Garcia-Marcos et al., 2009). Diese Daten zeigen, dass Girdin zum einen direkt die Akt-Phosphorylierung verstärkt und zum anderen in den C2C12-Zellen parallel den Insulinsignalweg intensiviert.

Der Mechanismus, der einer Aktivierung von Akt durch Girdin zugrunde liegt, ist noch ungeklärt. Lin et al. (2011) zeigten, dass tyrosinphosphoryliertes Girdin direkt an die p85-Untereinheit der PI3K und an den EGFR binden kann, um dann diesen Signalweg zu verstärken. Eine mögliche Verstärkung des Insulinsignals durch Bindung von Girdin an den IR konnte durch eigene Co-Immunpräzipitationsversuche ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren zeigten die Girdin-überexprimierenden Zellen neben der konstitutiven Aktivierung der GSK3 auch Unterschiede im Molekulargewicht der α -Isoform im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Eine solche Molekulargewichtsverschiebung der GSK3 α wurde auch in Muskelzellen von Nicht-Diabetikern und Diabetikern gefunden. Es wurde postuliert, dass dieses Phänomen ein Ergebnis unterschiedlicher posttranskriptionaler Modifikation sein kann, z. B. durch Phosphorylierung (Nikoulina et al., 2002). Bisher gibt es noch keine Funktion dieser Variante der GSK3 α .

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Girdin als ein wichtiger Regulator der Insulinsensitivität im Menschen und in Mausmuskelzellen agiert und möglicherweise auch eine Rolle in der Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus spielt.

5.2 Girdin-Überexpression in C2C12-Zellen führt zur Modifikation des IRS-1-Proteins

Wie zuvor schon erwähnt, zeigten die Girdin-überexprimierenden C2C12-Zellen eine erhöhte IRS-1-Tyrosinphosphorylierung. Interessanterweise war es anfangs nicht möglich, das IRS-1-Protein mit einem kommerziellen oder einem selbst hergestellten Antikörper gegen das C-terminale Ende zu detektieren. Erst mit einem Antikörper gegen

ein GST-Fusionsprotein von 300 AS des IRS-1 (963-1235) konnte das Protein detektiert werden. Es ist bekannt, dass IRS-1 posttranskriptional moduliert werden kann, z. B. durch Acetylierung und Ubiquitinierung (Kaiser und James, 2004; Shi et al., 2011). Eine solche Modifikation könnte möglicherweise die Bindung von Antikörpern negativ beeinflussen.

Die Degradierung des IRS-1-Proteins nach Insulinstimulation wird über Serin- und Threoninphosphorylierung des Proteins gesteuert und ist ein wichtiger Weg, das Insulinsignal zu regulieren. Sowohl in den C2C12-Girdin als auch in den IR-überexprimierenden Zellen war diese Degradierung stärker als in der parentalen Zelllinie. Die p70-S6K, ein wichtiger Negativregulator des PI3K-Signalweges, ist in der Lage, über direkte Phosphorylierung von S636/639 des IRS-1 dessen Degradierung zu regulieren (Zhang et al., 2008). Bis jetzt gibt es nur wenige Untersuchungen über die funktionellen Unterschiede der einzelnen Isoformen der S6K. Anfangs wurde vermutet, dass die p85-S6K aufgrund ihrer 23 AS langen Kernlokalisationssequenz die nukleare Isoform ist (Reinhard et al., 1994; Laser et al., 1998). Weitere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass sich p85 nur im Zytosol (Rosner und Hengstschläger, 2011) oder beide Isoformen im Nukleus und im Zytoplasma aufhalten (Kim et al., 2009; Jia et al., 2013). In den Girdin-überexprimierenden Zellen war im Vergleich zu den parentalen und IR-überexprimierenden Zellen die Phosphorylierung der p70-S6K stark reduziert und die der p85-S6K und deren Proteinmenge erhöht. Es wurden keine Unterschiede in der Proteinexpression der Isoformen in Triton-löslicher und -unlöslicher Fraktion verzeichnet. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die Phosphorylierung der p70-S6K, aber nicht der p85-S6K, Rapamycin-sensitiv war (Daten nicht gezeigt). Resistenz gegenüber einer Rapamycin-Behandlung wies auch eine C- und N-terminal-verkürzte Mutante der S6K auf (Dennis et al., 1996; Ali und Sabatini, 2005). Die Ergebnisse von Ali und Sabatini deuten darauf hin, dass der fehlende C-Terminus der S6K eine Phosphorylierung an T389 durch den mTORC2 begünstigt. Hierbei handelte es sich jedoch nicht um natürlich vorkommende Mutationen. Jia et al. konnten zeigen, dass die hauptsächlich im Zytoplasma vorliegende p85, aber nicht die p70-S6K durch TNF- α und H₂O₂ über einen mTORC1-unabhängigen Mechanismus phosphoryliert wird (2012). Ihre Ergebnisse weisen darauf hin, dass IKK β für eine Rapamycin-resistente Phosphorylierung der p85-S6K aktiv sein muss, um möglicherweise als Gerüst-Protein die Bindung einer weiteren, noch unbekanntem Kinase zu begünstigen. Diese Daten deuten an, dass strukturelle Veränderungen der S6K eine Phosphorylierung durch

unterschiedliche Kinasen begünstigen. Da sich die Degradierung von IRS-1 trotz reduzierter Phosphorylierung der p70-S6K ähnlich der in IR-überexprimierenden Zellen verhielt, scheint die p85-Isoform eine äquivalente Serinphosphorylierungsaktivität wie die p70 zu besitzen. Weitere noch unbekannt Funktionen der p85-S6K und einer oder mehrerer unbekannter Rapamycin-resistenter Kinasen im Insulinsignalweg und Zusammenhänge mit der Modifizierung von IRS-1 sind nicht auszuschließen.

5.3 Girdin-Überexpression führt zu einer erhöhten Expression des Insulinrezeptors

C2C12-Zellen, die Girdin stabil überexprimieren, zeigten eine massive Hochregulierung der IR-Expression, die zu einem verstärkten Signal nach Insulinstimulation führte. Mögliche Gründe für die IR-Überexpression könnten die ca. dreifache Erhöhung des IR-mRNA-Gehaltes und die reduzierte Rezeptorinternalisierung sein. Ghosh et al. (2010) konnten zeigen, dass Girdin direkt mit dem EGFR interagiert und negativ auf dessen Internalisierung in Girdin-überexprimierenden Hela-Zellen wirkte. Obwohl der Internalisierungsmechanismus des EGFR und des IR nur am Anfang ähnlich verlaufen und in Co-Immunpräzipitationen keine Interaktion zwischen Girdin und dem IR gefunden wurden, zeigen diese Ergebnisse, dass Girdin einen generellen Effekt auf die Internalisierung von Rezeptoren hat (Wiley und Burke, 2001). Bis jetzt noch nicht untersucht ist die 3'-untranslatierte Region der IR-mRNA. Diese könnte möglicherweise zwischen den Girdin-überexprimierenden und den parentalen C2C12-Zellen Unterschiede aufweisen, die dann wiederum die mRNA-Stabilität und Translationseffizienz beeinflusst (Lee und Gorospe, 2010).

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Caveolin-1, ein wichtiges Strukturprotein der Caveolae, in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, z. B. im Insulinsignalweg, eine wichtige Rolle spielt. Caveolin-1-defiziente Mäuse, die auf eine fetthaltige Diät gesetzt wurden, und Caveolin-1-*knockout* Adipozyten weisen einen insulinresistenten Phänotyp auf (Cohen et al., 2003; González-Muñoz et al., 2009). Diese und andere Daten (Oh et al., 2006) zeigen, dass Caveolin-1 die IR-Expression reguliert und das wiederum eine große Rolle für die Insulinsensitivität von Zellen spielt. Die Caveolin-1-Expression ist über die Expression von miRNA-103 und -107 negativ reguliert. Die Überexpression von Caveolin-1 und die Behandlung mit *Antagomirs* 103 und 107 stabilisierten das IR-Protein und verbesserten das Insulinsignal in Mäusen und Adipozyten (Trajkovski et al., 2011).

Durch miRNA-Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Girdin-überexprimierenden Zellen eine reduzierte Expression der miRNA-103 und -107 und gleichzeitig eine erhöhte Caveolin-1-Proteinmenge aufwiesen. Zusätzlich wurden die IR- und gleichzeitig die Caveolin-1-Expression durch Girdin-*knockdown* in den überexprimierenden C2C12-Zellen herunterreguliert. Möglicherweise kann Girdin die Insulinsensitivität in C2C12-Zellen auch über die Caveolin-1-Expression regulieren.

5.4 Girdin stimuliert den metabolischen Signalweg über die Aktivierung von c-Abl in C2C12-Zellen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass c-Abl konstitutiv aktiv in den Girdin-überexprimierenden Zellen vorliegt. Zusätzlich waren die Phosphorylierung von Erk1/2 und FAK reduziert. Eine Inhibierung von c-Abl verringerte die IR-Expression und die Akt-Aktivität. Diese Beobachtung legt nahe, dass ein Teil des Girdin-Effektes via c-Abl vermittelt wird. Die Rolle von c-Abl im Insulinsignalweg wurde kürzlich von Frasca et al. (2007) untersucht. Die Autoren konnten zeigen, dass die Behandlung von unterschiedlichen Zelllinien mit dem Inhibitor STI-571 eine Senkung der Akt-Aktivierung und der Glykogensynthese hervorruft. Die Phosphorylierung von Erk1/2 hingegen wurde hierbei erhöht. Frasca und ihre Kollegen schlussfolgerten, dass der c-Abl-Signalweg für die Reduzierung des mitogenen und die Verstärkung des metabolischen Signals von Insulin wichtig ist. In den Girdin-überexprimierenden Zellen blieb der mitogene Signalweg durch die Behandlung mit STI-571 unverändert. Möglicherweise ist die reduzierte Erk1/2-Phosphorylierung und Erk1-Expression direkt durch die Girdin-Überexpression hervorgerufen worden und kein c-Abl-abhängiger Effekt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Girdin-Überexpression zu einer konstitutiven Phosphorylierung von c-Abl führt und so eine Verschiebung des zellulären Gleichgewichtes zu einem stark metabolischen Insulinsignal reguliert. Es wäre interessant, ob auch in Krebszelllinien mit einem erhöhten metastatischen Potential und einer Überexpression von Girdin die c-Abl-Aktivität erhöht ist.

5.5 Girdin-Überexpression führt zur Veränderung in der Energieaufrechterhaltung der C2C12-Zellen

Die Girdin-überexprimierenden Zellen wiesen ein verstärktes Insulinsignal mit einer konstitutiv phosphorylierten Akt-Kinase und einer fast dreifach erhöhten Glykogensynthese auf. Im Gegensatz dazu zeigten die überexprimierenden Zellen eine verringerte Glukoseaufnahme und Expression verschiedener Glukosetransport-regulierender Proteine im Vergleich zu den parentalen Zellen (Daten nicht gezeigt). Bei diesen Proteinen handelte es sich um die Rab-GTPasen aktivierenden Proteine AS160 und TBC1D1, deren Phosphorylierung durch Akt zur Translokation von Glut4-Vesikeln an die Membran führt. Lansey et al. (2012) und Chen et al. (2011) zeigten, dass ein *knockout* oder eine Mutation der Akt-Phosphorylierungsstelle von AS160 zu einer reduzierten Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme in die Zellen führt. In diesem Fall wiesen Muskelzellen eine deutlich reduzierte Glut4-Expression an der Zelloberfläche auf (Chen et al., 2011). Zusätzlich ist bekannt, dass die Expression der Glukosetransporter Glut4 und auch Glut1 im Skelettmuskel positiv über die Aktivierung der AMPK reguliert wird (Fryer et al., 2002). Neben AS160 und TBC1D1 wurde auch für die AMPK eine reduzierte Proteinexpression und basale Phosphorylierung in den Girdin-überexprimierenden Zellen festgestellt. Dies könnte möglicherweise die verringerte Proteinmenge des Glut1 in diesen Zellen erklären. Eine eindeutige Aussage über die Expression des Insulin-stimulierbaren Glukosetransporters Glut4 konnte mit den bisher verwendeten AK nicht getroffen werden. Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Girdin-Überexpression in C2C12-Zellen dazu führt, dass die Zellen die aufgenommene Glukose vermehrt einlagern und nicht verstoffwechseln, wie die parentalen C2C12-Zellen. Da sich das Wachstum der beiden Zelllinien nicht voneinander unterschieden hat, verwenden die C1C12-Girdin-Zellen möglicherweise andere Substrate, wie z. B. Aminosäuren, für die Aufrechterhaltung ihres Energiehaushaltes. Die reduzierte Glukoseaufnahme durch die verminderte Expression Glukosetransport-regulierender Proteine in diesen Zellen wirkt scheinbar einer extremen Glykogen-Einlagerung entgegen. Die Bedeutung und der Mechanismus hinter dieser physiologischen Veränderung des Glukosemetabolismus sind noch unklar.

5.6 Veränderungen des Insulinsignalweges durch Girdin sind unabhängig von der Akt-Phosphorylierungsstelle Serin 1417

Girdin ist ein Akt-Substrat und wird durch diese an S1417 phosphoryliert. Nur Wildtyp-Girdin und nicht eine Girdin-Mutante, bei der die Akt-Phosphorylierungsstelle S1417 zu Alanin mutiert wurde, konnte von Akt phosphoryliert werden und fördert die Migration von Zellen (Enomoto et al., 2005). In wie weit diese Phosphorylierungsstelle andere Funktionen von Girdin beeinflusst, ist bisher noch unbekannt. Eine stabile Überexpression einer solchen Girdin-Mutante in C2C12-Zellen zeigte den gleichen Phänotyp wie Wildtyp-Girdin. Für beide Zelllinien wurde eine erhöhte Insulinsensitivität festgestellt, die durch eine hochregulierte IR-Expression und konstitutiv aktive Akt gekennzeichnet war.

Um zusätzlich herauszufinden welche Region von Girdin für die massiven Veränderungen in den C2C12-Zellen verantwortlich ist, wurden cDNA-Konstrukte angefertigt, die für unterschiedliche Abschnitte von Girdin kodieren. Nach stabiler Überexpression in C2C12-Zellen zeigten diese weder Auffälligkeiten im Insulinsignalweg noch in der Akt-Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen legen nahe, dass nur das gesamte Protein eine Akt-Phosphorylierungsverstärkung und eine erhöhte Insulinsensitivität in C2C12-Zellen hervorrufen kann, eine Phosphorylierung von Girdin durch Akt aber nicht essentiell ist.

5.7 Girdin-Überexpression führt zu Veränderungen im Zellzyklus, ohne dabei die Proliferation von C2C12-Zellen zu beeinflussen

Der PI3K/Akt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation. Aufgrund seiner konstitutiven Aktivierung in den Girdin-überexprimierenden Zellen wurde der Einfluss von Girdin auf die Proliferation und den Zellzyklus untersucht. Eine stabile Girdin-Überexpression in C2C12-Zellen brachte keine Veränderung der Proliferation im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen mit sich. Anders als in Brustkrebs- und vaskulären glatten Muskelzellen, in denen Girdin die Proliferation eher fördert (Jiang et al., 2008) oder in Hela-Zellen, in denen eine transiente Veränderung der Girdin-Expression (Überexpression und siRNA-Interferenz) das Wachstum sogar inhibiert (Mao et al., 2012), scheint die Girdin-Expression für die Proliferation von

Myoblasten keine große Rolle zu spielen. Dies lässt darauf schließen, dass der Effekt von Girdin und der Akt-Kinase auf das Zellwachstum Zelltyp-abhängig ist.

Der Zellzyklus der stabil überexprimierenden Zellen hingegen zeigte im Gegensatz zur Proliferation eine deutliche Veränderung. Im Vergleich zu den parentalen Zellen wiesen die Girdin-überexprimierenden Zellen ohne Synchronisation eine signifikant erhöhte Anzahl der Zellen in der Synthesephase auf. Hierbei kann es sich entweder um einen durch die Girdin-Überexpression beschleunigten G1/S-Phasenübergang oder um einen Defekt des Zellzyklus handeln, wobei die Zellen in der S-Phase für eine längere Zeit verharren müssen. Einen Hinweis auf den beschleunigten G1/S-Phasenübergang gibt die unterschiedliche Expression und Phosphorylierung der p70/p85-S6K in den Girdin-überexprimierenden Zellen. Die p85-S6K Isoform war sowohl im Zytosol als auch in der Triton-unlöslichen Fraktion der Zellen hochreguliert im Vergleich zu den parentalen Zellen. Es ist bekannt, dass die p85-S6K im Nukleus benötigt wird, um einen G1/S-Phasen-Übergang in REF-52-Zellen (*Rat embryo fibroblast cell line*) zu ermöglichen (Reinhard et al., 1994). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine erhöhte p85-S6K-Expression auch zu einem beschleunigten G1/S-Übergang führen könnte und somit die Verschiebung des Zellzyklus erklärt.

Auf der anderen Seite führt eine erhöhte Akt-Phosphorylierung zur Phosphorylierung verschiedener Zellzyklus-regulierender Proteine, wie z. B. p21^{Cip}, p27^{Kip} und GSK3, die dann wiederum den Verlauf des Zellzyklus fördern (Manning und Cantley, 2007). Ein beschleunigter Zellzyklus kann in einer erhöhten Proliferation resultieren, wenn die Zellen nicht aufgrund eines Defektes während einer der Phasen stoppen. Da sich das Zellwachstum zwischen den parentalen und den Girdin-überexprimierenden Zellen trotz konstitutiv aktiver Akt-Kinase nicht unterschied, kann vermutet werden, dass es sich hierbei um einen Defekt in der Synthesephase handelt. Schon Anai et al. (2005) und Enomoto et al. (2006) konnten zeigen, dass eine transiente Überexpression oder ein *knockdown* von Girdin Einfluss auf die DNA-Replikation haben. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass eine stabile Überexpression der S1417A-Mutante von Girdin trotz gleicher Auswirkungen auf den Insulinsignalweg eine im Vergleich zum Wildtyp-Girdin deutlich reduzierte Zellzahl in der Synthesephase aufwies. Es scheint, als ob die Akt-Phosphorylierungsstelle den Einfluss von Girdin auf den Zellzyklus variiert. Es ist jedoch noch unklar, ob es sich beim Wildtyp-Girdin um einen Defekt oder einen beschleunigten G1/S-Phasenübergang handelt. Um eine eindeutige Aussage über den

Einfluss von Girdin und der Akt-Phosphorylierungsstelle auf den Zellzyklus zu treffen, sind weitere Untersuchungen von z. B. Zellzyklus-regulierenden Proteinen notwendig.

5.8 Girdin-Überexpression reduziert die ROS-Produktion und verbessert die ROS-Abwehr der C2C12-Zellen

Eine gesteigerte intrazelluläre ROS-Produktion ist in der Lage, Phosphatasen zu inhibieren, was wiederum zur Aktivierung unterschiedlicher Proteine und deren Signalwege führen kann (Meng et al., 2002). Da die Girdin-überexprimierenden Zellen eine stark erhöhte Gesamttyrosinphosphorylierung zeigten, könnte eine erhöhte ROS-Produktion und die dadurch resultierende Phosphataseinhibierung diese erklären. In durchflusszytometrischen Analysen wurde jedoch in den parentalen C2C12-Zellen im Vergleich zu den stabil überexprimierenden Zellen mehr ROS detektiert.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte die erhöhte Caveolin-1-Expression in den Girdin-überexprimierenden Zellen sein. Neben der Stabilisierung des IR scheint Caveolin-1 auch die Mitochondrienfunktion zu regulieren. Caveolin-1 defiziente Zellen zeigen eine mitochondriale Dysfunktion und eine gesteigerte Expression von Genen, die an der ROS-Produktion beteiligt sind, gefolgt von einer erhöhten ROS und NO-Produktion (Bosch et al., 2011; Pavlides et al., 2010; Zhao et al., 2009). Zu den Proteinen, deren Expression durch Caveolin-1 reguliert wird, gehört auch die eNOS. Sowohl diese also auch nNOS sind an der Steuerung der NO-Produktion in Säugetierzellen beteiligt und werden in Endothel- und Nichtendothelzellen wie z. B. Skelettmuskelzellen exprimiert. Durch die Bindung von Caveolin-1 und Caveolin-3 wird ihre Aktivität inhibiert. Die Caveolin-1-Phosphorylierung an Y14 führt hierbei zu einer verstärkten Inaktivierung der eNOS (García-Cardena et al., 1997; Chen et al., 2012). Diese Daten lassen vermuten, dass die massive Caveolin-1-Expression und Tyrosinphosphorylierung in den C2C12-Girdin-Zellen zu einer reduzierten Expression und Aktivität von ROS- und NO-produzierenden Proteinen wie z. B. Stickstoffmonoxid-Synthasen führt und es deshalb zu einer verringerten ROS-Produktion in diesen Zellen kam.

Darüber hinaus konnte in den überexprimierenden Zellen eine verringerte Expression der AMPK im Vergleich zu den parentalen Zellen festgestellt werden, was zusätzlich auf eine reduzierte ROS-Produktion hinweisen könnte. Daten von Irrcher et al. (2009) und Wu et al. (2012) zeigten, dass die Expression und Aktivität der AMPK positiv über eine erhöhte ROS-Produktion reguliert werden. Die verbesserte Abwehr kann nur durch die

Expression verschiedener antioxidativ wirkender Proteine erklärt werden, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

5.9 Die Mitglieder der Girdin-Proteinfamilie sind 14-3-3-Bindungsproteine

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass sowohl Girdin, als auch seine Familienmitglieder Daple und Gipie, 14-3-3-bindende Protein sind. Eine Bindung von 14-3-3-Proteinen kann zu einer Vielzahl von Veränderungen für das Zielprotein führen. Dabei handelt es sich häufig um Struktur-, Funktions- und Lokalisationsänderungen. Die Identifizierung der 14-3-3-Bindungsstellen und deren Regulation könnte eine Möglichkeit sein, die Funktionen von diesen Proteinen in bestimmten Signalwegen besser zu erklären.

In der Regel binden 14-3-3-Proteine an phosphorylierte Serine beziehungsweise Threonine in den Bindungsmotiven RSX(pS/T)XP oder RXXX(pS/T)XP. Durch zusätzliche Analysen der Arbeitsgruppe von Prof. Carol MacKintosh konnten weitere Charakteristika eines 14-3-3-Bindungsmotivs aufgedeckt werden. Hierbei wurde festgestellt, dass es sich nicht immer um ein Arginin auf den Positionen -3 und -5 in Bezug auf das phosphorylierte Serin oder Threonin handeln muss, auch andere basische AS wie Lysin treten häufig auf diesen Positionen auf. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass auch die Lage des Prolins keineswegs starr ist. In weniger als 50 % der Fälle wurde ein Prolin auf der Position +2 gefunden. Das Prolin verursacht hierbei einen „Knick“ in der AS-Kette, der für die Bindung von 14-3-3 mit seinen Bindungspartnern wichtig ist (Rittinger et al., 1999). Die basischen Reste begünstigen eine Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen der AGC- bzw. CAMK-Kinasefamilien (Pearson und Kemp, 1991). Um einen Überblick über die Regulation der 14-3-3-Bindung von Girdin, Daple und Gipie zu bekommen, wurden die Proteine nach Inkubation der transient überexprimierenden Zellen mit Aktivatoren und Inhibitoren unterschiedlicher Kinasen auf 14-3-3-Bindung untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass Girdin und Daple ein ähnliches Regulationsmuster der 14-3-3-Bindungen aufwiesen. Der Unterschied bestand darin, dass Daple nur unter PKA- und AMPK-Aktivierung mit 14-3-3 assoziierte und Girdin schon im unstimulierten Zustand ein 14-3-3-Bindungssignal zeigte, welches sich durch PKA- und AMPK-Aktivierung verstärkte. Für die 14-3-3-Bindungsanalysen von Gipie war es leider nur möglich, die C-terminalen 815 AS des Proteins zu untersuchen. Da bei Girdin und Daple hauptsächlich der C-Terminus für die 14-3-3-Bindung

verantwortlich war, wurde vermutet und bestätigt, dass Gipiie auch im C-terminalen Rest 14-3-3-Proteine bindet. Die Regulation der Bindung unterschied sich bei Gipiie von den anderen Proteinen der Familie. Gipiie wurde nicht nach PKA-Aktivierung, sondern durch Aktivierung einer Kinase des MAPK-Signalweges und der AMPK verstärkt von 14-3-3 gebunden. Diese Aktivierung der 14-3-3-Bindung ähnelte der des mutierten Girdin mit einem deletierten C-Terminus. Hierbei konnte in der Co-Immunpräzipitation eine verstärkte Bindung von 14-3-3-Proteinen unter EGF-Stimulation aufgezeigt werden.

Ähnlichkeiten in der Regulation der 14-3-3-Bindung treten häufig in 2R-Ohnologfamilien, wie es auch die Girdin-Proteinfamilie ist, auf. Studien konnten nachweisen, dass die Genome des Menschen und anderer Vertebraten über 2R-WGD von den Invertebraten abstammen (Putnam et al., 2008; Makino und McLysaght, 2010). Das heißt, *Brachiostoma*, ein Invertebrat und die älteste noch existierende Verwandte der Vertebraten, besitzt ein Protein für jede 2R-Ohnologproteinfamilie des Menschen (Tinti et al., 2012). Zusätzlich konnten Tinti et al. zeigen, dass viele der publizierten 14-3-3-Bindungsstellen in der humanen 2R-Proteinfamilie konserviert vorliegen und sich dazu auch ein Pendant in der Sequenz der Invertebraten finden lässt. Man spricht hier von einer sogenannten *Lynchpin*-Stelle. Diese Theorie wurde anhand der REEP-Proteinfamilie erläutert, aus deren Analyse ein Modell entstand. Hierbei werden alle Familienmitglieder an einer konservierten *Lynchpin*-Stelle von einer Kinase oder möglicherweise mehreren Kinasen mit ähnlichem Aktivierungsmechanismus phosphoryliert. Die zweite nicht homologe 14-3-3-Bindungsstelle wird hingegen durch eine für jedes Protein individuelle Kinase phosphoryliert (Tinti et al., 2012).

Eine mögliche *Lynchpin*-Stelle in der Girdin-Proteinfamilie bietet Girdins Akt-Phosphorylierungsstelle S1417. Durch Sequenzanalysen konnte festgestellt werden, dass diese Konsensussequenz von Girdin in vielen Spezies hochkonserviert vorliegt. Auch Daple weist um S1428 ein solches Sequenzmotiv mit hoher Homologie zu Girdin auf. Mit Hilfe eines PAS-AK wurden gezeigt, dass diese Phosphorylierungsstelle durch IGF-1- und FSK-Stimulation phosphoryliert wird. Eine Mutante von Daple, bei der S1428 zu Alanin mutiert wurde, zeigte nach IGF-1- und FSK-Stimulation keine detektierbare Phosphorylierung. Die 14-3-3-Bindung von Daple wurde durch diese Mutation jedoch nicht verändert. Auch eine Mutation der Akt-Phosphorylierungsstelle in Girdin (S1417A) veränderte dessen 14-3-3-Bindungsverhalten nicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass S1428 in Daple eine Phosphorylierungsstelle ist, die je nach Stimulus von PKA oder Akt phosphoryliert werden kann. Welchen Einfluss diese auf eine Funktion von Daple hat und

ob es sich hierbei und auch bei S1417 in Girdin tatsächlich um ein schwaches 14-3-3-Bindungsmotiv handelt, ist noch ungeklärt. Eine ähnliche Konsensussequenz konnte in Gipie nicht gefunden werden, was auf mögliche Veränderungen im Laufe der Evolution hinweist. Aufschluss über eine tatsächlich vorhandene *Lynchpin*-Stelle in dieser Proteinfamilie kann nur die Identifizierung der 14-3-3-Bindungsstellen in Girdin und Gipie geben.

5.10 Serin 1887 ist die Haupt-14-3-3-Bindungsstelle von Daple

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bindet Daple verstärkt nach FSK-Stimulation an 14-3-3-Proteine. Mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen von Daple-Phosphopeptiden nach FSK-Inkubation und Untersuchungen von Punktmutationen zu Alanin konnte die Haupt-14-3-3-Bindungsstelle S1887 identifiziert werden. Diese entspricht mit zwei Argininresten auf Position -2 und -3 und einem Prolin auf +2 einem klassischen 14-3-3-Bindungsmotiv. Nach der Mutation von S1887 zu Alanin erlosch das 14-3-3-Bindungssignal komplett, was die Identifizierung einer zweiten schwächeren Bindungsstelle schwierig gestaltete. Für Proteine, die zwei 14-3-3-Bindungsstellen besitzen, wurde postuliert, dass die stärkere Bindungsstelle, auch als *gatekeeper* bezeichnet, das 14-3-3-Protein rekrutiert, während die zweite, schwächere Bindungsstelle für eine stabile Bindung zwischen den beiden Proteinen sorgt (Yaffe, 2002). Wie im vorherigen Absatz beschrieben, wird vermutet, dass die Phosphorylierungsstelle S1428 in Daple auch als mögliche zweite 14-3-3-Bindungsstelle fungiert. Da diese Sequenz durch Akt und PKA phosphoryliert wurde, scheint es, dass je nach Stimulus diese beiden Kinasen um die Phosphorylierungsstelle konkurrieren. Einige Mitglieder der AGC- und CAMK-Kinasefamilien besitzen zum Teil überlappende Substratspezifitäten und phosphorylieren Serine bzw. Threonine, die nach einer bestimmten Abfolge basischer Aminosäuren liegen. Mitglieder dieser Familie, wie Akt, SGK, RSK und S6K, phosphorylieren vorzugsweise das Motiv RXXRXX(S/T) (Alessi et al., 1996; Kobayashi und Cohen, 1999). Substrate, die diese oder ähnliche Minimalerkennungssequenzen besitzen, können durch verschiedene Signale reguliert werden. Ein Beispiel dafür ist die eNOS, deren Aktivität durch Phosphorylierung an S1177 durch Akt, PKA, PKG, AMPK und CAMKII reguliert ist (Mount et al., 2007).

Bisher sind für Daple nur wenige Funktionen bekannt. Eine davon ist seine Rolle in der Regulation des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs. Hierbei bindet es

zum einen an Dvl und inhibiert somit die Akkumulation von β -Catenin und die Aktivierung der TCF (*T-cell factor*)-Transkriptionsaktivität (Oshita et al., 2003). Zum anderen aktiviert Daple den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg, in dem es über die Bindung von Dvl zur Formation eines Dvl/PKC λ -Proteinkomplexes an den migrierenden Enden der Zelle kommt. Dies führt zu einer Rac-Aktivierung und erhöhter Zellmotilität (Ishida-Takagishi et al., 2012). Zusätzlich ist bekannt, dass der cAMP/PKA-Signalweg den kanonischen Wnt-Signalweg über die Inaktivierung der GSK3 fördert (Suzuki et al., 2008). Auf der anderen Seite inhibiert PKA den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg, indem es mit RhoA interagiert und die Rho-Aktivität inhibiert (Park et al., 2006). Es scheint, als würden PKA und Daple den Wnt-Signalweg gegenläufig steuern. Wenn jetzt sowohl die mögliche schwache 14-3-3-Bindungsstelle S1428 als auch die *gatekeeper*-Stelle S1887 von PKA phosphoryliert werden, kommt es zur Bindung von 14-3-3-Proteinen, die möglicherweise eine Strukturänderung von Daple hervorrufen kann. Dies könnte die Bindung von Dvl verhindern und somit zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges führen. Kommt es aber zur Inhibierung des PKA-Signalweges, bindet 14-3-3 nicht an Daple, das nun mit Dvl interagieren und den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren kann.

Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass Daple nur eine 14-3-3-Bindungsstelle besitzt und darüber seine Funktion reguliert wird. Die 14-3-3-Proteine können somit als Brücke zwischen zwei Proteinen fungieren. Da Daple in der Regulation des Wnt-Signalweges vermehrt in Komplexen auftritt, könnte diese Funktion auch von Bedeutung sein. Um eine eindeutige physiologische Rolle der 14-3-3-Bindung für Daple weiter zu untersuchen, sind stabile Zelllinien von Wildtyp-Daple und S1887A- oder S1887/S1428A-Mutanten notwendig.

5.11 Hypothese zur Regulation der 14-3-3-Bindungsstellen von Girdin

Durch massenspektrometrische Analysen der Phosphopeptide von Girdin nach FSK- und A-769662-Inkubation und zusätzlicher Untersuchung von Deletionsmutanten wurde festgestellt, dass sich die Haupt-14-3-3-Bindungsstelle im C-Terminus von Girdin befinden muss. Trotz einer großen Anzahl von untersuchten Punktmutationen, wurden keine 14-3-3-Bindungsstellen in Girdin gefunden. Es wurde außer der Sequenzhomologie zwischen Daple (S1428) und Girdin (S1417) bisher noch kein Beweis erbracht, dass es sich dabei tatsächlich um 14-3-3-Bindungsstellen handelt. Die Regulation der

Phosphorylierung dieses Serinrestes ist noch nicht eindeutig geklärt. Enomoto (2005) konnte zeigen, dass S1417 durch Akt phosphoryliert wird, doch wie schon bei Daple gezeigt wurde, können Konsensussequenzen von mehreren Kinasen erkannt und phosphoryliert werden. Auch Girdin wurde unter IGF-1- und FKS-Stimulation mit dem PAS-AK getestet, jedoch war es unter diesen Bedingungen nicht möglich, phosphoryliertes Girdin zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Die im C-Terminus befindliche Haupt-14-3-3-Bindungsstelle wird vermehrt durch PKA und AMPK reguliert. Da in Daple die Haupt-14-3-3-Bindungsstelle auch durch PKA aktiviert wird, wurde nach Sequenzhomologien zwischen Daple (S1887) und Girdin geschaut. Es konnte jedoch keine ähnlichen Serin- oder Threoninreste in Girdin gefunden werden. Bei der PKA und AMPK handelt es sich um Kinasen, die zum Teil miteinander, aber auch entgegengesetzt wirken können. Physiologische Stimuli wie z. B. Sport und Hunger, aber auch Hormonstimulation können zur gleichzeitigen Stimulation der PKA und der AMPK führen. Hierbei sind beide an der Regulation von Enzymen des Glukosemetabolismus, der Cholesterinsynthese und des Fettsäuremetabolismus beteiligt (Hurley et al., 2006). Auf der anderen Seite wirken sie antagonistisch in der Regulation der hormonsensitiven Lipase, welche die Lipolyse in Fett- und Muskelgewebe reguliert (Watt et al., 2006). Unter welchen physiologischen Situationen eine solche zum Teil divergente Phosphorylierung von Girdin stattfindet kann, ist nicht klar.

Garcia-Marcos und Kollegen konnten zeigen, dass eine Veränderung der GEF-Aktivität von Girdin eine Art Regulationsmechanismus zwischen verschiedenen Funktionen von Girdin darstellt (2011). Da dieses GEF-Motiv (AS 1678-1694) genau zwischen den beiden putativen 14-3-3-Bindungsstellen liegt, ist auch eine Veränderung der Aktivität des GEF-Motivs durch die 14-3-3-Bindung möglich.

6 Zusammenfassung

Die Akt-Kinase ist ein wichtiger Mediator des Insulinsignals. Einige ihrer Substrate sind direkt in die Regulation der Glukosehomeostase involviert, wie z. B. GSK3 und AS160. Girdin wurde als ein neues Akt-Substrat beschrieben, das ubiquitär in Säugetieren und erhöht in einer Vielzahl von Krebszelllinien exprimiert ist. Seine Funktion in der Krebsentwicklung und in der Angiogenese basiert auf seinem Einfluss auf das Aktinzytoskelett und die Zellmotilität. Zusätzlich zeigen Zellen, die eine erhöhte Girdin-Expression aufweisen, eine verstärkte Akt-Phosphorylierung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von Girdins Einfluss im Insulinsignalweg. Hierfür wurde die Proteinexpression von Girdin in C2C12-Mausmyoblasten durch RNA-Interferenz und Überexpression verändert. Eine Reduktion von Girdin führte zu einer verringerten Insulin-abhängigen Akt- und IRS-1-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu verbesserte die stabile Überexpression von Girdin die Insulinsensitivität in C2C12-Zellen. Dabei kam es zu einer massiven Hochregulierung des Insulinrezeptors und einer verstärkten IRS-1-Tyrosinphosphorylierung. Des Weiteren sind die Akt- und die c-Abl-Kinase konstitutiv aktiviert, was zu einem stark metabolischen Insulinsignal in diesen Zellen führt. So ist die Glykogensynthese schon im unstimulierten Zustand um mehr als das Doppelte erhöht im Vergleich zu den parentalen Zellen. Die überexprimierenden Zellen weisen darüber hinaus eine verringerte Insulinrezeptorinternalisierung und vermutlich eine erhöhte Stabilisierung des Rezeptors durch die verstärkte Expression von Caveolin-1 auf. Zusätzlich wurde in einer humanen Studie festgestellt, dass die Girdin-Expression in primären humanen Skelettmuskelzellen mit der Insulinsensitivität der Donoren positiv korreliert. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Girdin-Expression ein wichtiger Parameter der Insulinsensitivität im Skelettmuskel ist und möglicherweise Einfluss auf die Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes Mellitus hat.

Bei der Analyse der 14-3-3-Bindung stellte sich heraus, dass alle Mitglieder der Girdin-Proteinfamilie 14-3-3-bindende Proteine sind. Diese Bindungsstellen sind in Girdin und Daple hauptsächlich durch PKA und AMPK phosphoryliert. In Daple konnte S1887 als Haupt-14-3-3-Bindungsstelle identifiziert werden. Durch Mutation wurde diese 14-3-3-Bindung komplett unterbunden, was die Suche nach einer zweiten Bindungsstelle unmöglich machte. In Girdin stellte sich der C-Terminus als vorrangige 14-3-3-Bindungsregion heraus, jedoch wurde eine äquivalente 14-3-3-Bindungsstelle nicht

gefunden. Die 14-3-3-Bindungsanalysen der Girdin-Proteinfamilie befinden sich derzeit noch in den Anfängen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Identifizierung der 14-3-3-Bindungsstellen und deren Regulation zur Klärung wichtiger Funktionen dieser Proteine beitragen.

7 Anhang

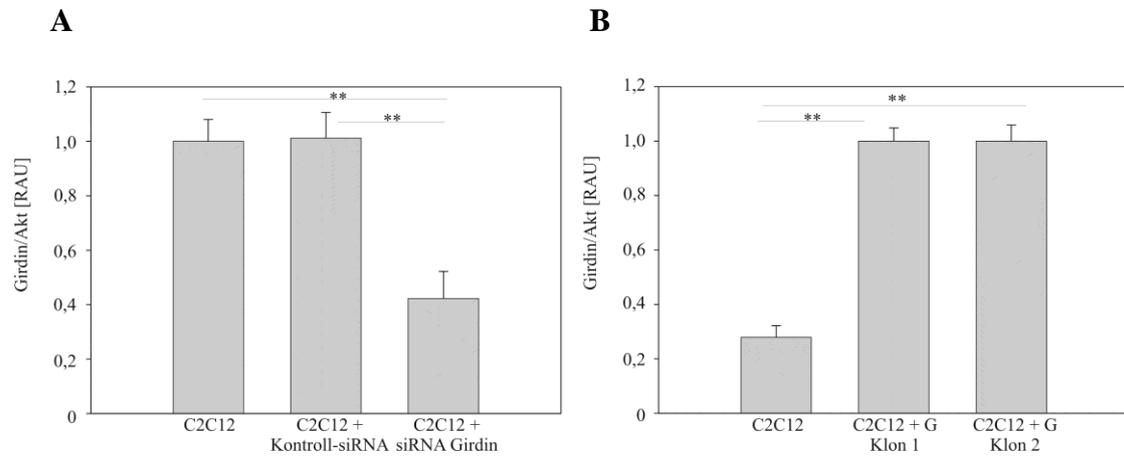


Abbildung 7.1: Densitometrische Auswertung der Girdin-Proteinexpression in den Western Blot-Analysen aus Abbildung 4.1 (A) und Abbildung 4.2 (B). RAU - Relative Arbitrary Units

8 Literaturverzeichnis

Aitken,A., Howell,S., Jones,D., Madrazo,J., and Patel,Y. (1995) 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF. *J.Biol.Chem.* **270**:5706-5709.

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

Ali,S.M. and Sabatini,D.M. (2005) Structure of S6 kinase 1 determines whether raptor-mTOR or rictor-mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site. *J.Biol.Chem.* **280**:19445-19448.

Anai,M., Shojima,N., Katagiri,H., Ogihara,T., Sakoda,H., Onishi,Y., Ono,H., Fujishiro,M., Fukushima,Y., Horike,N., Viana,A., Kikuchi,M., Noguchi,N., Takahashi,S., Takata,K., Oka,Y., Uchijima,Y., Kurihara,H., and Asano,T. (2005) A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J.Biol.Chem.* **280**:18525-18535.

Andjelkovic,M., Jakubowicz,T., Cron,P., Ming,X.F., Han,J.W., and Hemmings,B.A. (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:5699-5704.

Anjum,R. and Blenis,J. (2008) The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **9**:747-758.

Asai,M., Asai,N., Murata,A., Yokota,H., Ohmori,K., Mii,S., Enomoto,A., Murakumo,Y., and Takahashi,M. (2012) Similar phenotypes of Girdin germ-line and conditional knockout mice indicate a crucial role for Girdin in the nestin lineage. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **426**:533-538.

Belfiore,A., Frasca,F., Pandini,G., Sciacca,L., and Vigneri,R. (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr.Rev.* **30**:586-623.

Benveniste,M., Livneh,E., Schlessinger,J., and Kam,Z. (1988) Overexpression of epidermal growth factor receptor in NIH-3T3-transfected cells slows its lateral diffusion and rate of endocytosis. *J.Cell Biol.* **106**:1903-1909.

Berti,L., Kellerer,M., Capp,E., and Haring,H.U. (1997) Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a P13-kinase mediated effect. *Diabetologia* **40**:606-609.

Blair,A.S., Hajdуч,E., Litherland,G.J., and Hundal,H.S. (1999) Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J.Biol.Chem.* **274**:36293-36299.

Bosch,M., Mari,M., Herms,A., Fernandez,A., Fajardo,A., Kassan,A., Giralto,A., Colell,A., Balgoma,D., Barbero,E., Gonzalez-Moreno,E., Matias,N., Tebar,F., Balsinde,J., Camps,M., Enrich,C., Gross,S.P., Garcia-Ruiz,C., Perez-Navarro,E., Fernandez-Checa,J.C., and Pol,A. (2011) Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Curr.Biol.* **21**:681-686.

Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.

Braselmann,S. and McCormick,F. (1995) Bcr and Raf form a complex in vivo via 14-3-3 proteins. *EMBO J.* **14**:4839-4848.

Braun,S., Bitton-Worms,K., and LeRoith,D. (2011) The link between the metabolic syndrome and cancer. *Int.J.Biol.Sci.* **7**:1003-1015.

Brazil,D.P., Yang,Z.Z., and Hemmings,B.A. (2004) Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem.Sci.* **29**:233-242.

Bridges,D. and Moorhead,G.B. (2004) 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci.STKE.* **2004**:re10.

Cardone,M.H., Roy,N., Stennicke,H.R., Salvesen,G.S., Franke,T.F., Stanbridge,E., Frisch,S., and Reed,J.C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**:1318-1321.

Chan,T.O., Rittenhouse,S.E., and Tsichlis,P.N. (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu.Rev.Biochem.* **68**:965-1014.

Chen,C. and Okayama,H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol.Cell Biol.* **7**:2745-2752.

Chen,S., Wasserman,D.H., MacKintosh,C., and Sakamoto,K. (2011) Mice with AS160/TBC1D4-Thr649Ala knockin mutation are glucose intolerant with reduced insulin sensitivity and altered GLUT4 trafficking. *Cell Metab* **13**:68-79.

Chen,W.J., Goldstein,J.L., and Brown,M.S. (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J.Biol.Chem.* **265**:3116-3123.

Chen,Z., Bakhshi,F.R., Shajahan,A.N., Sharma,T., Mao,M., Trane,A., Bernatchez,P., Nieuw Amerongen,G.P., Bonini,M.G., Skidgel,R.A., Malik,A.B., and Minshall,R.D. (2012) Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition. *Mol.Biol.Cell* **23**:1388-1398.

Chijiwa,T., Mishima,A., Hagiwara,M., Sano,M., Hayashi,K., Inoue,T., Naito,K., Toshioka,T., and Hidaka,H. (1990) Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J.Biol.Chem.* **265**:5267-5272.

Chung,C.T. and Miller,R.H. (1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* **16**:3580.

Coblitz,B., Wu,M., Shikano,S., and Li,M. (2006) C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins. *FEBS Lett.* **580**:1531-1535.

Cohen,A.W., Razani,B., Wang,X.B., Combs,T.P., Williams,T.M., Scherer,P.E., and Lisanti,M.P. (2003) Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **285**:C222-C235.

Cool,B., Zinker,B., Chiou,W., Kifle,L., Cao,N., Perham,M., Dickinson,R., Adler,A., Gagne,G., Iyengar,R., Zhao,G., Marsh,K., Kym,P., Jung,P., Camp,H.S., and Frevert,E. (2006) Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* **3**:403-416.

Dennis,P.B., Pullen,N., Kozma,S.C., and Thomas,G. (1996) The principal rapamycin-sensitive p70(s6k) phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases. *Mol.Cell Biol.* **16**:6242-6251.

Dobson,M., Ramakrishnan,G., Ma,S., Kaplun,L., Balan,V., Fridman,R., and Tzivion,G. (2011) Bimodal regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. *Biochim.Biophys.Acta* **1813**:1453-1464.

Du,K. and Tschlis,P.N. (2005) Regulation of the Akt kinase by interacting proteins. *Oncogene* **24**:7401-7409.

Dunkel,Y., Ong,A., Notani,D., Mittal,Y., Lam,M., Mi,X., and Ghosh,P. (2012) STAT3 protein up-regulates Galpha-interacting vesicle-associated protein (GIV)/Girdin expression, and GIV enhances STAT3 activation in a positive feedback loop during wound healing and tumor invasion/metastasis. *J.Biol.Chem.* **287**:41667-41683.

Enomoto,A., Asai,N., Namba,T., Wang,Y., Kato,T., Tanaka,M., Tatsumi,H., Taya,S., Tsuboi,D., Kuroda,K., Kaneko,N., Sawamoto,K., Miyamoto,R., Jijiwa,M., Murakumo,Y., Sokabe,M., Seki,T., Kaibuchi,K., and Takahashi,M. (2009) Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron* **63**:774-787.

Enomoto,A., Murakami,H., Asai,N., Morone,N., Watanabe,T., Kawai,K., Murakumo,Y., Usukura,J., Kaibuchi,K., and Takahashi,M. (2005) Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev.Cell* **9**:389-402.

Enomoto,A., Ping,J., and Takahashi,M. (2006) Girdin, a novel actin-binding protein, and its family of proteins possess versatile functions in the Akt and Wnt signaling pathways. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1086**:169-184.

Frame,S. and Cohen,P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem.J.* **359**:1-16.

Frasca,F., Pandini,G., Malaguarnera,R., Mandarino,A., Messina,R.L., Sciacca,L., Belfiore,A., and Vigneri,R. (2007) Role of c-Abl in directing metabolic versus mitogenic effects in insulin receptor signaling. *J.Biol.Chem.* **282**:26077-26088.

Frasca,F., Pandini,G., Scalia,P., Sciacca,L., Mineo,R., Costantino,A., Goldfine,I.D., Belfiore,A., and Vigneri,R. (1999) Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol.Cell Biol.* **19**:3278-3288.

Fryer,L.G., Fougelle,F., Barnes,K., Baldwin,S.A., Woods,A., and Carling,D. (2002) Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem.J.* **363**:167-174.

Furukawa,Y., Ikuta,N., Omata,S., Yamauchi,T., Isobe,T., and Ichimura,T. (1993) Demonstration of the phosphorylation-dependent interaction of tryptophan hydroxylase with the 14-3-3 protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **194**:144-149.

Gao,T., Furnari,F., and Newton,A.C. (2005) PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol.Cell Biol.* **18**:13-24.

Garcia-Cardena,G., Martasek,P., Masters,B.S., Skidd,P.M., Couet,J., Li,S., Lisanti,M.P., and Sessa,W.C. (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J.Biol.Chem.* **272**:25437-25440.

Garcia-Marcos,M., Ghosh,P., and Farquhar,M.G. (2009) GIV is a nonreceptor GEF for G alpha i with a unique motif that regulates Akt signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**:3178-3183.

Genua,M., Pandini,G., Cassarino,M.F., Messina,R.L., and Frasca,F. (2009) c-Abl and insulin receptor signalling. *Vitam.Horm.* **80**:77-105.

Ghosh,P., Beas,A.O., Bornheimer,S.J., Garcia-Marcos,M., Forry,E.P., Johansson,C., Ear,J., Jung,B.H., Cabrera,B., Carethers,J.M., and Farquhar,M.G. (2010) A G{alpha}i-GIV molecular complex binds epidermal growth factor receptor and determines whether cells migrate or proliferate. *Mol.Biol.Cell* **21**:2338-2354.

Ghosh,P., Garcia-Marcos,M., Bornheimer,S.J., and Farquhar,M.G. (2008) Activation of Galphai3 triggers cell migration via regulation of GIV. *J.Cell Biol.* **182**:381-393.

Gonzalez-Munoz,E., Lopez-Iglesias,C., Calvo,M., Palacin,M., Zorzano,A., and Camps,M. (2009) Caveolin-1 loss of function accelerates glucose transporter 4 and insulin receptor degradation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* **150**:3493-3502.

- Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., and Nairn,R.** (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* **36** (1):59-74.
- Guertin,D.A., Stevens,D.M., Thoreen,C.C., Burds,A.A., Kalaany,N.Y., Moffat,J., Brown,M., Fitzgerald,K.J., and Sabatini,D.M.** (2006) Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev.Cell* **11**:859-871.
- Hanada,M., Feng,J., and Hemmings,B.A.** (2004) Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim.Biophys.Acta* **1697**:3-16.
- Hurley,R.L., Barre,L.K., Wood,S.D., Anderson,K.A., Kemp,B.E., Means,A.R., and Witters,L.A.** (2006) Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J.Biol.Chem.* **281**:36662-36672.
- Ichimura,T., Isobe,T., Okuyama,T., Yamauchi,T., and Fujisawa,H.** (1987) Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca²⁺,calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett.* **219**:79-82.
- Irrecher,I., Ljubcic,V., and Hood,D.A.** (2009) Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 α transcription in skeletal muscle cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **296**:C116-C123.
- Ishida-Takagishi,M., Enomoto,A., Asai,N., Ushida,K., Watanabe,T., Hashimoto,T., Kato,T., Weng,L., Matsumoto,S., Asai,M., Murakumo,Y., Kaibuchi,K., Kikuchi,A., and Takahashi,M.** (2012) The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility. *Nat.Comm.* **3**:859.
- Ishihara,H., Martin,B.L., Brautigan,D.L., Karaki,H., Ozaki,H., Kato,Y., Fusetani,N., Watabe,S., Hashimoto,K., Uemura,D., and .** (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **159**:871-877.
- Jia,C.H., Li,M., Liu,J., Zhao,L., Lin,J., Lai,P.L., Zhou,X., Zhang,Y., Chen,Z.G., Li,H.Y., Liu,A.L., Yang,C.L., Gao,T.M., Jiang,Y., and Bai,X.C.** (2013) IKK-beta mediates hydrogen peroxide induced cell death through p85 S6K1. *Cell Death.Differ.* **20**:248-258.
- Jiang,P., Enomoto,A., Jijiwa,M., Kato,T., Hasegawa,T., Ishida,M., Sato,T., Asai,N., Murakumo,Y., and Takahashi,M.** (2008) An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells. *Cancer Res.* **68**:1310-1318.
- Kaiser,C. and James,S.R.** (2004) Acetylation of insulin receptor substrate-1 is permissive for tyrosine phosphorylation. *BMC.Biol.* **2**:23.
- Kim,D., Akcakanat,A., Singh,G., Sharma,C., and Meric-Bernstam,F.** (2009) Regulation and localization of ribosomal protein S6 kinase 1 isoforms. *Growth Factors* **27**:12-21.

Kitamura,T., Asai,N., Enomoto,A., Maeda,K., Kato,T., Ishida,M., Jiang,P., Watanabe,T., Usukura,J., Kondo,T., Costantini,F., Murohara,T., and Takahashi,M. (2008) Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat.Cell Biol.* **10**:329-337.

Kobayashi,T. and Cohen,P. (1999) Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem.J.* **339** (Pt 2):319-328.

Kohn,A.D., Summers,S.A., Birnbaum,M.J., and Roth,R.A. (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J.Biol.Chem.* **271**:31372-31378.

Kovacina,K.S., Park,G.Y., Bae,S.S., Guzzetta,A.W., Schaefer,E., Birnbaum,M.J., and Roth,R.A. (2003) Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J.Biol.Chem.* **278**:10189-10194.

Krutzfeldt,J., Kausch,C., Volk,A., Klein,H.H., Rett,K., Haring,H.U., and Stumvoll,M. (2000) Insulin signaling and action in cultured skeletal muscle cells from lean healthy humans with high and low insulin sensitivity. *Diabetes* **49**:992-998.

Kumagai,A. and Dunphy,W.G. (1999) Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Dev.* **13**:1067-1072.

Lansey,M.N., Walker,N.N., Hargett,S.R., Stevens,J.R., and Keller,S.R. (2012) Deletion of Rab GAP AS160 modifies glucose uptake and GLUT4 translocation in primary skeletal muscles and adipocytes and impairs glucose homeostasis. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **303**:E1273-E1286.

Laser,M., Kasi,V.S., Hamawaki,M., Cooper,G., Kerr,C.M., and Kuppaswamy,D. (1998) Differential activation of p70 and p85 S6 kinase isoforms during cardiac hypertrophy in the adult mammal. *J.Biol.Chem.* **273**:24610-24619.

Le Niculescu,H., Niesman,I., Fischer,T., DeVries,L., and Farquhar,M.G. (2005) Identification and characterization of GIV, a novel Galpha i/s-interacting protein found on COPI, endoplasmic reticulum-Golgi transport vesicles. *J.Biol.Chem.* **280**:22012-22020.

Lee,E.K. and Gorospe,M. (2010) Minireview: posttranscriptional regulation of the insulin and insulin-like growth factor systems. *Endocrinology* **151**:1403-1408.

Lin,C., Ear,J., Pavlova,Y., Mittal,Y., Kufareva,I., Ghassemian,M., Abagyan,R., Garcia-Marcos,M., and Ghosh,P. (2011) Tyrosine phosphorylation of the Galpha-interacting protein GIV promotes activation of phosphoinositide 3-kinase during cell migration. *Sci.Signal.* **4**:ra64.

Liu,D., Bienkowska,J., Petosa,C., Collier,R.J., Fu,H., and Liddington,R. (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* **376**:191-194.

- Maehama,T. and Dixon,J.E.** (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J.Biol.Chem.* **273**:13375-13378.
- Mahajan,K. and Mahajan,N.P.** (2012) PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *J.Cell Physiol* **227**:3178-3184.
- Makino,T. and McLysaght,A.** (2010) Ohnologs in the human genome are dosage balanced and frequently associated with disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107**:9270-9274.
- Manning,B.D. and Cantley,L.C.** (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**:1261-1274.
- Mao,J.Z., Jiang,P., Cui,S.P., Ren,Y.L., Zhao,J., Yin,X.H., Enomoto,A., Liu,H.J., Hou,L., Takahashi,M., and Zhang,B.** (2012) Girdin locates in centrosome and midbody and plays an important role in cell division. *Cancer Sci.* **103**:1780-1787.
- Masters,S.C., Pederson,K.J., Zhang,L., Barbieri,J.T., and Fu,H.** (1999) Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **38**:5216-5221.
- Matschinsky,F.M.** (1990) Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* **39**:647-652.
- Matsushita,E., Asai,N., Enomoto,A., Kawamoto,Y., Kato,T., Mii,S., Maeda,K., Shibata,R., Hattori,S., Hagikura,M., Takahashi,K., Sokabe,M., Murakumo,Y., Murohara,T., and Takahashi,M.** (2011) Protective role of Gipiie, a Girdin family protein, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cells. *Mol.Biol.Cell* **22**:736-747.
- Meng,T.C., Fukada,T., and Tonks,N.K.** (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol.Cell* **9**:387-399.
- Miralpeix,M., Sun,X.J., Backer,J.M., Myers,M.G., Jr., Araki,E., and White,M.F.** (1992) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of multiple high molecular weight substrates in Fao hepatoma cells. *Biochemistry* **31**:9031-9039.
- Moller,N.P., Moller,K.B., Lammers,R., Kharitononkov,A., Hoppe,E., Wiberg,F.C., Sures,I., and Ullrich,A.** (1995) Selective down-regulation of the insulin receptor signal by protein-tyrosine phosphatases alpha and epsilon. *J.Biol.Chem.* **270**:23126-23131.
- Moorhead,G., Douglas,P., Morrice,N., Scarabel,M., Aitken,A., and MacKintosh,C.** (1996) Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Curr.Biol.* **6**:1104-1113.
- Moore,B.W., and Perez,V.J.** (1967). Specific acidic proteins of the nervous system. *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration.* Carlson FD (Ed), 343-359.
- Mora,A., Komander,D., van Aalten,D.M., and Alessi,D.R.** (2004) PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin.Cell Dev.Biol.* **15**:161-170.

- Morbidelli,L., Donnini,S., and Ziche,M.** (2003) Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr.Pharm.Des* **9**:521-530.
- Morrison,D.K.** (2009) The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol.* **19**:16-23.
- Mount,P.F., Kemp,B.E., and Power,D.A.** (2007) Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J.Mol.Cell Cardiol.* **42**:271-279.
- Moxham,C.P., Duronio,V., and Jacobs,S.** (1989) Insulin-like growth factor I receptor beta-subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor I and insulin receptor heterodimers. *J.Biol.Chem.* **264**:13238-13244.
- Muslin,A.J., Tanner,J.W., Allen,P.M., and Shaw,A.S.** (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**:889-897.
- Namkoong,S., Kim,C.K., Cho,Y.L., Kim,J.H., Lee,H., Ha,K.S., Choe,J., Kim,P.H., Won,M.H., Kwon,Y.G., Shim,E.B., and Kim,Y.M.** (2009) Forskolin increases angiogenesis through the coordinated cross-talk of PKA-dependent VEGF expression and Epac-mediated PI3K/Akt/eNOS signaling. *Cell Signal.* **21**:906-915.
- Nicoletti,I., Migliorati,G., Pagliacci,M.C., Grignani,F., and Riccardi,C.** (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J.Immunol.Methods* **139**:271-279.
- Nikoulina,S.E., Ciaraldi,T.P., Mudaliar,S., Carter,L., Johnson,K., and Henry,R.R.** (2002) Inhibition of glycogen synthase kinase 3 improves insulin action and glucose metabolism in human skeletal muscle. *Diabetes* **51**:2190-2198.
- Obata,T., Yaffe,M.B., Leparc,G.G., Piro,E.T., Maegawa,H., Kashiwagi,A., Kikkawa,R., and Cantley,L.C.** (2000) Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J.Biol.Chem.* **275**:36108-36115.
- Obsil,T., Ghirlando,R., Klein,D.C., Ganguly,S., and Dyda,F.** (2001) Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* **105**:257-267.
- Obsil,T. and Obsilova,V.** (2011) Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin.Cell Dev.Biol.* **22**:663-672.
- Oh,Y.S., Cho,K.A., Ryu,S.J., Khil,L.Y., Jun,H.S., Yoon,J.W., and Park,S.C.** (2006) Regulation of insulin response in skeletal muscle cell by caveolin status. *J.Cell Biochem.* **99**:747-758.
- Olivares-Reyes,J.A., Arellano-Plancarte,A., and Castillo-Hernandez,J.R.** (2009) Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Mol.Cell Endocrinol.* **302**:128-139.
- Oshita,A., Kishida,S., Kobayashi,H., Michiue,T., Asahara,T., Asashima,M., and Kikuchi,A.** (2003) Identification and characterization of a novel Dvl-binding protein that suppresses Wnt signalling pathway. *Genes Cells* **8**:1005-1017.

Ottmann,C., Marco,S., Jaspert,N., Marcon,C., Schauer,N., Weyand,M., Vandermeeren,C., Duby,G., Boutry,M., Wittinghofer,A., Rigaud,J.L., and Oecking,C. (2007) Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Mol.Cell* **25**:427-440.

Ozes,O.N., Akca,H., Mayo,L.D., Gustin,J.A., Maehama,T., Dixon,J.E., and Donner,D.B. (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:4640-4645.

Pandini,G., Frasca,F., Mineo,R., Sciacca,L., Vigneri,R., and Belfiore,A. (2002) Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J.Biol.Chem.* **277**:39684-39695.

Park,E., Kim,G.H., Choi,S.C., and Han,J.K. (2006) Role of PKA as a negative regulator of PCP signaling pathway during *Xenopus* gastrulation movements. *Dev.Biol.* **292**:344-357.

Park,S., Chapuis,N., Bardet,V., Tamburini,J., Gallay,N., Willems,L., Knight,Z.A., Shokat,K.M., Azar,N., Viguie,F., Ifrah,N., Dreyfus,F., Mayeux,P., Lacombe,C., and Bouscary,D. (2008) PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositide 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. *Leukemia* **22**:1698-1706.

Parmar,S., Smith,J., Sassano,A., Uddin,S., Katsoulidis,E., Majchrzak,B., Kambhampati,S., Eklund,E.A., Tallman,M.S., Fish,E.N., and Plataniias,L.C. (2005) Differential regulation of the p70 S6 kinase pathway by interferon alpha (IFNalpha) and imatinib mesylate (STI571) in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood* **106**:2436-2443.

Pavlidis,S., Tsirigos,A., Vera,I., Flomenberg,N., Frank,P.G., Casimiro,M.C., Wang,C., Fortina,P., Addya,S., Pestell,R.G., Martinez-Outschoorn,U.E., Sotgia,F., and Lisanti,M.P. (2010) Loss of stromal caveolin-1 leads to oxidative stress, mimics hypoxia and drives inflammation in the tumor microenvironment, conferring the "reverse Warburg effect": a transcriptional informatics analysis with validation. *Cell Cycle* **9**:2201-2219.

Pearson,R.B. and Kemp,B.E. (1991) Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* **200**:62-81.

Postlethwait,J.H. (2007) The zebrafish genome in context: ohnologs gone missing. *J.Exp.Zool.B Mol.Dev.Evol.* **308**:563-577.

Pozuelo,R.M., Geraghty,K.M., Wong,B.H., Wood,N.T., Campbell,D.G., Morrice,N., and MacKintosh,C. (2004) 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem.J.* **379**:395-408.

Putnam,N.H., Butts,T., Ferrier,D.E., Furlong,R.F., Hellsten,U., Kawashima,T., Robinson-Rechavi,M., Shoguchi,E., Terry,A., Yu,J.K., Benito-Gutierrez,E.L., Dubchak,I., Garcia-Fernandez,J., Gibson-Brown,J.J., Grigoriev,I.V., Horton,A.C., de Jong,P.J., Jurka,J., Kapitonov,V.V., Kohara,Y., Kuroki,Y., Lindquist,E., Lucas,S., Osoegawa,K., Pennacchio,L.A., Salamov,A.A., Satou,Y., Sauka-Spengler,T., Schmutz,J., Shin,I., Toyoda,A., Bronner-Fraser,M., Fujiyama,A., Holland,L.Z., Holland,P.W., Satoh,N., and Rokhsar,D.S. (2008) The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* **453**:1064-1071.

Reed,P.W. and Lardy,H.A. (1972) A23187: a divalent cation ionophore. *J.Biol.Chem.* **247**:6970-6977.

Reinhard,C., Fernandez,A., Lamb,N.J., and Thomas,G. (1994) Nuclear localization of p85s6k: functional requirement for entry into S phase. *EMBO J.* **13**:1557-1565.

Rittinger,K., Budman,J., Xu,J., Volinia,S., Cantley,L.C., Smerdon,S.J., Gamblin,S.J., and Yaffe,M.B. (1999) Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol.Cell* **4**:153-166.

Robinson,K., Jones,D., Patel,Y., Martin,H., Madrazo,J., Martin,S., Howell,S., Elmore,M., Finnen,M.J., and Aitken,A. (1994) Mechanism of inhibition of protein kinase C by 14-3-3 isoforms. 14-3-3 isoforms do not have phospholipase A2 activity. *Biochem.J.* **299** (Pt 3):853-861.

Rosenquist,M., Sehnke,P., Ferl,R.J., Sommarin,M., and Larsson,C. (2000) Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *J.Mol.Evol.* **51**:446-458.

Rosner,M. and Hengstschlager,M. (2011) Nucleocytoplasmic localization of p70 S6K1, but not of its isoforms p85 and p31, is regulated by TSC2/mTOR. *Oncogene* **30**:4509-4522.

Sakamoto,K. and Holman,G.D. (2008) Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **295**:E29-E37.

Saltiel,A.R. and Kahn,C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**:799-806.

Sancak,Y., Thoreen,C.C., Peterson,T.R., Lindquist,R.A., Kang,S.A., Spooner,E., Carr,S.A., and Sabatini,D.M. (2007) PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol.Cell* **25**:903-915.

Sapkota,G.P., Cummings,L., Newell,F.S., Armstrong,C., Bain,J., Frodin,M., Grauert,M., Hoffmann,M., Schnapp,G., Steegmaier,M., Cohen,P., and Alessi,D.R. (2007) BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochem.J.* **401**:29-38.

Sarbassov,D.D., Guertin,D.A., Ali,S.M., and Sabatini,D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**:1098-1101.

- Seino,S., Seino,M., and Bell,G.I.** (1990) Human insulin-receptor gene. Partial sequence and amplification of exons by polymerase chain reaction. *Diabetes* **39**:123-128.
- Sekimoto,T., Fukumoto,M., and Yoneda,Y.** (2004) 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). *EMBO J.* **23**:1934-1942.
- Shi,J., Luo,L., Eash,J., Ibebunjo,C., and Glass,D.J.** (2011) The SCF-Fbxo40 complex induces IRS1 ubiquitination in skeletal muscle, limiting IGF1 signaling. *Dev.Cell* **21**:835-847.
- Shier,P. and Watt,V.M.** (1989) Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family. *J.Biol.Chem.* **264**:14605-14608.
- Silhan,J., Vacha,P., Strnadova,P., Vecer,J., Herman,P., Sulc,M., Teisinger,J., Obsilova,V., and Obsil,T.** (2009) 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of forkhead transcription factor FOXO4. *J.Biol.Chem.* **284**:19349-19360.
- Simpson,F., Martin,S., Evans,T.M., Kerr,M., James,D.E., Parton,R.G., Teasdale,R.D., and Wicking,C.** (2005) A novel hook-related protein family and the characterization of hook-related protein 1. *Traffic.* **6**:442-458.
- Soos,M.A. and Siddle,K.** (1989) Immunological relationships between receptors for insulin and insulin-like growth factor I. Evidence for structural heterogeneity of insulin-like growth factor I receptors involving hybrids with insulin receptors. *Biochem.J.* **263**:553-563.
- Stefan,N., Machicao,F., Staiger,H., Machann,J., Schick,F., Tschritter,O., Spieth,C., Weigert,C., Fritsche,A., Stumvoll,M., and Haring,H.U.** (2005) Polymorphisms in the gene encoding adiponectin receptor 1 are associated with insulin resistance and high liver fat. *Diabetologia* **48**:2282-2291.
- Sun,X., Majumder,P., Shioya,H., Wu,F., Kumar,S., Weichselbaum,R., Kharbanda,S., and Kufe,D.** (2000) Activation of the cytoplasmic c-Abl tyrosine kinase by reactive oxygen species. *J.Biol.Chem.* **275**:17237-17240.
- Sun,X.J., Crimmins,D.L., Myers,M.G., Jr., Miralpeix,M., and White,M.F.** (1993) Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol.Cell Biol.* **13**:7418-7428.
- Suzuki,A., Ozono,K., Kubota,T., Kondou,H., Tachikawa,K., and Michigami,T.** (2008) PTH/cAMP/PKA signaling facilitates canonical Wnt signaling via inactivation of glycogen synthase kinase-3beta in osteoblastic Saos-2 cells. *J.Cell Biochem.* **104**:304-317.
- Taniguchi,C.M., Emanuelli,B., and Kahn,C.R.** (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **7**:85-96.
- Tinti,M., Johnson,C., Toth,R., Ferrier,D.E., and MacKintosh,C.** (2012) Evolution of signal multiplexing by 14-3-3-binding 2R-ohnologue protein families in the vertebrates. *Open.Biol.* **2**:120103.

Toker,A., Sellers,L.A., Amess,B., Patel,Y., Harris,A., and Aitken,A. (1992) Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1/14-3-3) from sheep brain. Amino acid sequence of phosphorylated forms. *Eur.J.Biochem.* **206**:453-461.

Trajkovski,M., Hausser,J., Soutschek,J., Bhat,B., Akin,A., Zavolan,M., Heim,M.H., and Stoffel,M. (2011) MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* **474**:649-653.

Van Der Hoeven,P.C., Van Der Wal,J.C., Ruurs,P., Van Dijk,M.C., and Van Blitterswijk,J. (2000) 14-3-3 isotypes facilitate coupling of protein kinase C-zeta to Raf-1: negative regulation by 14-3-3 phosphorylation. *Biochem.J.* **345 Pt 2**:297-306.

Vincenz,C. and Dixit,V.M. (1996) 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules. *J.Biol.Chem.* **271**:20029-20034.

Volonte,D., Galbiati,F., Pestell,R.G., and Lisanti,M.P. (2001) Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J.Biol.Chem.* **276**:8094-8103.

Wang,B., Yang,H., Liu,Y.C., Jelinek,T., Zhang,L., Ruoslahti,E., and Fu,H. (1999) Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display. *Biochemistry* **38**:12499-12504.

Watt,M.J., Holmes,A.G., Pinnamaneni,S.K., Garnham,A.P., Steinberg,G.R., Kemp,B.E., and Febbraio,M.A. (2006) Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **290**:E500-E508.

White,M.F. (1997) The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* **40 Suppl 2**:S2-17.

Wiley,H.S. and Burke,P.M. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic.* **2**:12-18.

Wilker,E.W., Grant,R.A., Artim,S.C., and Yaffe,M.B. (2005) A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity. *J.Biol.Chem.* **280**:18891-18898.

Wu,S.B. and Wei,Y.H. (2012) AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication of the cell survival in mitochondrial diseases. *Biochim.Biophys.Acta* **1822**:233-247.

Wullschleger,S., Loewith,R., and Hall,M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**:471-484.

Xiao,B., Smerdon,S.J., Jones,D.H., Dodson,G.G., Soneji,Y., Aitken,A., and Gamblin,S.J. (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* **376**:188-191.

Yaffe,D. and Saxel,O. (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270 (5639)**:725-727.

Yaffe,M.B. (2002) How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* **513**:53-57.

Yaffe,M.B., Rittinger,K., Volinia,S., Caron,P.R., Aitken,A., Leffers,H., Gamblin,S.J., Smerdon,S.J., and Cantley,L.C. (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**:961-971.

Zhai,J., Lin,H., Shamim,M., Schlaepfer,W.W., and Canete-Soler,R. (2001) Identification of a novel interaction of 14-3-3 with p190RhoGEF. *J.Biol.Chem.* **276**:41318-41324.

Zhang,J., Gao,Z., Yin,J., Quon,M.J., and Ye,J. (2008) S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *J.Biol.Chem.* **283**:35375-35382.

Zhang,L., Chen,J., and Fu,H. (1999) Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:8511-8515.

Zhao,Y.Y., Zhao,Y.D., Mirza,M.K., Huang,J.H., Potula,H.H., Vogel,S.M., Brovkovich,V., Yuan,J.X., Wharton,J., and Malik,A.B. (2009) Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. *J.Clin.Invest* **119**:2009-2018.