

III. Medizinische Klinik und Poliklinik  
am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

**Charakterisierung des Grb10/Akt Komplexes und  
Identifikation von 14-3-3 als neuen Interaktionspartner von Grb10**

Susanne Urschel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
*Doktors der Naturwissenschaften*  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher  
2. Univ. Prof. Dr. Chr. Peschel

Die Dissertation wurde am 05.03.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 21.05.2003 angenommen.

Meinen Eltern  
und Ronald

## **Danksagung**

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden von September 1999 bis Dezember 2002 im Labor für Leukämieforschung der III. Medizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar, der Technischen Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Adalbert Bacher danke ich für die Übernahme dieser Dissertation in den Fachbereich Chemie und Biochemie der Technischen Universität München.

Herrn Prof. Dr. Christian Peschel danke ich herzlich für die wertvolle Unterstützung und Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor für Leukämieforschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Justus Duyster für das interessante Projekt, die intensive wissenschaftliche Betreuung und seine Unterstützung bei der Verfassung dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Ren-Yuan Bai, der mir bei Fragen stets hilfsbereit zur Seite stand und Ergebnisse interessiert mit mir diskutierte.

Weiter möchte ich mich bei meinen Kollegen Herrn Dr. Florian Bassermann, Herrn Dr. Cornelius Miething, Herrn Dr. Nikolas v. Bubnoff, Frau Rebekka Grundler, Herrn Josef Hoepfl, Herrn Darioush Shirvani, Frau Silvia Klümpen, Frau Jana Sänger, Frau Katrin Angermüller und insbesondere Frau Claudia Mugler für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Duyster und Bernhard danke ich für das nette Arbeitsklima und die freundliche Zusammenarbeit.

Meinen Eltern und Ronald danke ich für die große Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Viola, Stefan und dem Rest meiner Familie möchte ich ebenfalls danken.

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha (anti)
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\mu\text{g}$	$10^{-6}$ Gramm
$\mu\text{l}$	$10^{-6}$ Liter
$\mu\text{M}$	$10^{-6}$ Mol
-/-	<i>knock out</i>
Abb.	Abbildung
A. d.	Aqua destillata
(c)AMP	(zyklisches) Adenosinmonophosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
BAD	Bcl-2/Bcl-X <sub>L</sub> -Antagonist
bp	Basenpaar
Bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
C	Celsius
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CML	chronisch myeloische Leukämie
DMEM	Dulbecco's modifiziertes <i>eagle</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiolthreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>



EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
F	Farad
FCS	fötales Kälberserum
FKHRL1	<i>fork-head related like-1</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
Grb	<i>growth factor receptor-binding protein</i>
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-pierazinethansulfonsäure
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IGF-1	<i>Insulin like growth facotr-1</i>
IL-3	Interleukin 3
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
ko	<i>knock out</i>
M	Marker
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
Mdm	<i>murine double minute</i>
min	Minute
mM	$10^{-3}$ Mol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Myc	Onkogen des Myelocytomatose-Virus
NCBI	<i>National Center of Biotechnological Information</i>
ng	$10^{-9}$ Gramm
OA	<i>ocadaic acid</i>
OD	Optische Dichte

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDK	<i>3'-Phosphoinositide-dependent kinase</i>
PH	Pleckstrin Homolog
PI3-K	Phosphoinositol 3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKN	Proteinkinase N
PLC $\gamma$	Phospholipase $\gamma$
PMSF	Phenylmetansulfonylfluorid
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten</i>
PtdIns(3,4)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-diphosphat
PtdIns(3,4)P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-triphosphat
PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RSK	Ribosomal S6 Kinase
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
s	Sekunde
SCF	Stammzell Faktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOS	<i>son of sevenless</i>
SH	Src-homolog
TAE	Tris-Acetat Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THULL	Threonin, Histidin, Uracil, Leucin, Lysin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit ( <i>unit</i> )
UV	Ultraviolett

WB

Western Blot

WT

Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung .....	3
1.1 Ziele der Arbeit .....	3
1.2 Signaltransduktion.....	4
1.3 Entartete Signaltransduktion und die Entstehung von Krebs.....	5
1.4 Proteinkinasen und Phosphatasen .....	6
1.4.1 Proteinkinase B/Akt .....	7
1.4.2 Aktivierung von Akt.....	10
1.4.3 Spezifische Rolle der Akt Aktivierung für das Überleben von Zellen .....	12
1.5 Adaptermoleküle .....	13
1.5.1 Das Adapterprotein Grb10 .....	15
1.6 14-3-3 Proteine .....	17
2. Material und Methoden .....	19
2.1 Materialien .....	19
2.1.1 Chemikalien .....	19
2.1.2 Enzyme.....	21
2.1.3 Radiochemikalien.....	21
2.1.4 Zelllinien .....	22
2.1.5 Antikörper .....	22
2.1.6 Vektoren .....	23
2.1.7 Bakterienstämme.....	23
2.1.8 Oligonukleotide zur Sequenzierung.....	23
2.1.9 Oligonukleotide zur Einführung von Mutationen und Schnittstellen in verschiedene DNA-Konstrukte .....	24
2.1.10 Standard Geräte .....	24
2.1.11 Standard Lösungen und Puffer.....	26
2.1.12 Medien und Puffer für die Arbeit mit Hefen.....	28
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken .....	30
2.2.2 Arbeiten mit Bakterien .....	37
2.2.3 Arbeiten mit eukaryoten Zelllinien .....	40
2.2.4 Biologische Assays und Zellaufreinigungsmethoden .....	43
2.2.5 Proteinbiochemische Methoden .....	50
2.2.6 Das <i>Yeast-Two-Hybrid</i> System .....	59
3. Ergebnisse .....	63
3.1 Konstitutive Lokalisation von Grb10 an die Zellmembran.....	63
3.1.2 Überprüfung der Funktionalität des farnesylierten Grb10 Konstrukts.....	64
3.2 Interaktion von Grb10FM und Akt .....	67
3.3 Konstitutive Akt Aktivierung durch Expression von Grb10FM.....	68
3.3.1 Grb10FM induziert Akt Aktivität in Ba/F3 Zellen .....	68
3.3.2 Akkumulation von phosphoryliertem Akt im Zellkern.....	69
3.5 Grb10FM Überexpression schützt Zellen vor Apoptose.....	72
3.5.1 Grb10FM Ba/F3 Zellen proliferieren nach Faktorentzug.....	72
3.5.2 Grb10 verzögert den Eintritt der Apoptose nach Faktor Entzug in Ba/F3 Zellen.....	73
3.6 Fusion von Grb10 an Akt kompensiert die Deletion der Akt Phospholipid-bindungsstelle.....	76

3.7 Grb7 induziert Akt Aktivität .....	77
3.8 Nachweis der direkten Interaktion von Grb10 und Akt .....	78
3.9 Untersuchungen zur Grb10 Phosphorylierung .....	79
3.9.1 Grb10 ist ein Substrat von Akt .....	79
3.9.2 Phosphatase PP2A dephosphoryliert Grb10 .....	81
3.10 Identifizierung von 14-3-3 als neuer Bindungspartner von Grb10 .....	83
3.10.1 Interaktion von Grb10 und 14-3-3 im Hefesystem .....	83
3.10.2 <i>In vitro</i> Bindungsstudien von 14-3-3 und Grb10 .....	85
3.10.3 Nachweis der Interaktion von Grb10 und 14-3-3 <i>in vivo</i> .....	87
3.11 Die Interaktion von 14-3-3 und Grb10 ist phosphorylierungsabhängig .....	90
3.11.1 Eine Phosphatase Behandlung reduziert die Bindung von 14-3-3 an Grb10 .....	90
3.11.2 Verstärkte Interaktion von 14-3-3 und Grb10 durch Hemmung von Phosphatasen .....	91
3.11.3 Inkubation mit dem PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin reduziert die Bindung von 14-3-3 und Grb10 .....	94
3.12 Identifikation der Bindungsstelle von 14-3-3 an Grb10 .....	95
3.13 Grb10 interagiert im nicht phosphorylierten Zustand mit Akt und im phosphorylierten Zustand mit 14-3-3 .....	97
4. Diskussion .....	99
4.1 Charakterisierung der Interaktion von Grb10 mit Akt .....	99
4.2 Identifikation von 14-3-3 als neuer Interaktionspartner von Grb10 .....	102
4.3 Regulationsmechanismus und biologische Relevanz der Interaktion von Grb10 und 14-3-3 .....	103
4.4 Ausblick .....	105
5. Zusammenfassung .....	106
6. Literaturverzeichnis .....	108

## 1. Einleitung

### 1.1 Ziele der Arbeit

Akt spielt in vielen wichtigen Signaltransduktionsprozessen eine zentrale Rolle und ist involviert in viele zelluläre Prozesse wie Glucose Metabolismus, Transkription, Apoptose, Zellproliferation, Angiogenese und Zellbewegung. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass das Adapterprotein Grb10 in der Lage ist, Akt Aktivität zu induzieren (Jahn *et al.*, 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass Grb10 Expression und die damit verbundene Aktivierung von Akt in hämatopoetischen Ba/F3 Zellen zum Schutz vor Apoptose führt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus der Grb10 induzierten Aktivierung von Akt näher zu untersuchen. Es wurden verschiedene Fragestellungen verfolgt:

- Es sollte ein Grb10 Konstrukt kloniert werden, das konstitutiv an die Zellmembran lokalisiert. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die Funktion von Grb10 für die Aktivierung von Akt in der Lokalisation von Akt an die Zellmembran besteht.
- Die Phosphorylierung von Grb10 ist vielfach beschrieben. Die Frage, ob Grb10 ein direktes Substrat von Akt ist, sollte durch *in vitro* Kinaseexperimente geklärt werden.
- Es sollten Experimente mit Phosphatasen durchgeführt werden, um die für die Grb10 Dephosphorylierung verantwortliche Phosphatase zu identifizieren.
- Ein wichtiges Ziel der Arbeit war die Identifizierung neuer Interaktionspartner von Grb10. Dafür sollte mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid Screens* eine cDNA Bibliothek der CML-Zelllinie K562 nach neuen Bindungspartnern untersucht werden. Die Bindung des neu identifizierten Proteins sollte mit verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Bindungsstudien verifiziert werden. Ebenso sollte die Bindungsstelle, die für die Interaktion mit dem neuen Protein verantwortlich ist, im Grb10 Molekül identifiziert werden.
- Die Charakterisierung der Interaktion von Grb10 mit dem neuen Protein und die Zusammenhänge mit dem bereits bekannten Bindungspartner Akt sollten einen weiteren Hauptanteil der vorliegenden Arbeit darstellen.

## 1.2 Signaltransduktion

Zu den elementaren Fähigkeiten von Zellen aller Organismen gehört es, Reize aus der Umgebung wahrzunehmen und passend zu beantworten. Eine Information kann mit Hilfe eines Liganden und der dadurch ausgelösten Signaltransduktion in das Innere einer Zelle übertragen werden. Als extrazelluläre Liganden können organische wie anorganische Moleküle oder auch kleine Polypeptide dienen. Nach Reizauslösung bindet der Ligand den spezifischen Rezeptor und kann ihn somit aktivieren. Rezeptoren können Transmembranproteine sein und aus einer extrazellulären und einer zytoplasmatischen Domäne bestehen. Der Rezeptor kann im zytoplasmatischen Teil eine Kinase besitzen. Diese wird nach Bindung des Liganden an den extrazellulären Teil des Rezeptors aktiviert. Die Kinase phosphoryliert den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, was als Autophosphorylierung bezeichnet wird. In phosphoryliertem Zustand kann der Rezeptor mit einem Zielprotein interagieren und es aktivieren, was zur Folge hat, dass dieses Protein wiederum neue Substrate in der Zelle beeinflusst. Membranständige Kinase Rezeptoren sind in der Regel Tyrosinkinasen (Rezeptor Tyrosin Kinase = RTK) (Ullrich u. Schlessinger, 1990). Eine weitere Möglichkeit zur Beantwortung eines Signals ist die Interaktion des Rezeptors mit einem G-Protein. Der Name G-Protein weist auf die Fähigkeit hin, Guaninnukleotide zu binden. In seiner aktiven Form besteht das G-Protein aus einem an GDP gebundenen Trimer. Nach Rezeptorstimulation veranlasst der Rezeptor, dass GDP durch GTP ersetzt wird. Dies hat zur Folge, dass das G-Protein in eine GTP tragende Untereinheit und in ein Dimer aus den beiden anderen Untereinheiten dissoziiert. Nun wirkt entweder die GTP tragende Untereinheit oder das Dimer auf ein Zielprotein ein, das wiederum selbst mit einem oder mehreren Zielmolekül(en) im Zytoplasma reagiert. Das klassische Beispiel für die Bildung eines solchen *second messenger* ist das zyklische AMP. Die Signalkaskade wird beendet, wenn die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins durch Interaktion mit einem GTPase aktivierenden Protein (GAP) erneut einen Komplex mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins eingeht (Hunter, 2000). Um die Aufzählung der über zellmembranständige Rezeptorübermittlung verlaufender Signalübermittlung zu vervollständigen, seien noch die über Endocytose erfolgende Rezeptorinternalisierung und die Rezeptoren mit Ionenkanalfunktion erwähnt.

Signaltransduktionsprozesse ermöglichen also die Übertragung extrazellulärer Signale ins Zellinnere bzw. deren Umwandlung in zellinterne Signale, Signalverstärkung und die Vermittlung einer spezifischen Zellantwort.

### **1.3 Entartete Signaltransduktion und die Entstehung von Krebs**

Defekte im normalen Ablauf eines Signaltransduktionsprozesses können dazu führen, dass bestimmte Zielmoleküle konstitutiv, d. h. ständig und ohne Stimulation aktiviert werden. Solche, irreversiblen Veränderungen können zu einem unkoordinierten, räumlich und zeitlich unbegrenzten Wachstum führen. Derartige Veränderungen werden als maligne Zelltransformation bezeichnet. Tumoren, die aus Epithelien entstehen, werden als Karzinome, solche die mesenchymalen Ursprungs sind als Sarkome bezeichnet. Mittlerweile sind mehr als 100 Krebsarten und Subtypen von Tumoren bekannt (Hanahan u. Weinberg, 2000). Onkogene sind Gene, deren Aktivierung zur Krebsentstehung beitragen. Ein besonders gut untersuchtes Onkogen ist Ras (Katz u. McCormick, 1997). Ras-Proteine spielen bei der Signalübertragung von Tyrosinkinasen eine zentrale Rolle (Wagener, 1999). Ras ist ein GTP-bindendes Protein, das nachgeschaltete Kinasen aktiviert, wenn es GTP gebunden hat. Es hydrolysiert GTP zu GDP und inaktiviert sich somit selbst. Wird Ras von Adaptermolekülen aktiviert, dann tauscht es das gebundene GDP gegen neues GTP aus und wird damit wieder aktiv. Bei vielen Blasentumoren und Kolonkarzinomen findet man die Punktmutation der Aminosäure 12 von Glycin zu Valin. Bei Mammakarzinom, Lungentumoren und Neuroblastom findet man die Mutation Glutamin 61 zu Lysin. Beide Mutationen hemmen die GTPase-Aktivität von Ras, d. h. Ras kann GTP zwar binden aber nicht mehr hydrolysieren und bleibt somit ständig im aktiven Zustand. Konstitutiv aktiviertes Ras führt zur Phosphorylierung von Proteinkinasen wie Raf1 und Erk1/2, die mRNA früher Antwortgene wie Fos und c-Myc wird gesteigert, ebenso wie die DNA-Synthese. Entscheidend für die transformierende Wirkung von Ras-Proteinen ist die Assoziation mit der Zellmembran. Ras ist über eine Farnesylgruppe nahe am C-Terminus an die cytoplasmatische Seite der Membran gekoppelt. Durch die Hemmung der Farnesylierung lässt sich *in vitro* die Wirkung onkogener Ras-Mutanten hemmen. Somit ist der Farnesylierungsinhibitor ein neuer Wirkstoff, der bereits in der Tumorthherapie seinen Einsatz findet.



Ein weiteres Onkogen ist die Proteinkinase B oder auch Akt genannt. Akt ist das Onkogen des akut-transformierenden Akt8-Retrovirus, welches aus T-Zell-Lymphomen von Nagern isoliert wurde (Staal *et al.*, 1977). Akt nimmt in verschiedenen Prozessen der malignen Transformation eine zentrale Rolle ein. Dies wird im Kapitel 1.4.1 näher erläutert.

#### **1.4 Proteinkinasen und Phosphatasen**

In der Signaltransduktion gehören Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen zu den wichtigsten Modifikationen, durch die Funktionen von Proteinen reguliert werden. Die Übertragung von Phosphatgruppen, in der Regel der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des ATP, wird durch Enzyme, die Proteinkinasen, katalysiert. Proteinkinasen stellen die zweitgrößte Proteinfamilie in höheren Zellen dar.

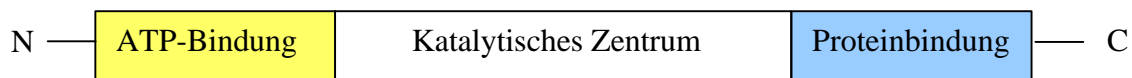
Die Proteinkinasen werden in verschiedene Gruppen eingeteilt, wobei die Serin/Threonin Proteinkinasen in die AGC, die CaMK und die CMGK Gruppe, die Tyrosin Proteinkinasen in verschiedene Untergruppen von PTKs eingeteilt werden. Bei den Rezeptoren mit Kinaseaktivität überwiegen die Tyrosinkinase (Lewin, 1998), wie z. B. die Insulinrezeptor-Kinase. Zytoplasmatische Kinasen sind häufig Serin/Threonin Kinasen, wie die für diese Arbeit entscheidende Kinase Akt. Im Zytoplasma kommen Kinasen mit doppelter Spezifität vor und können sowohl Serin/Threonin aber auch Tyrosinreste phosphorylieren.

Die katalytischen Untereinheiten sind im Hinblick auf ihre Domänenstruktur prinzipiell gleichartig aufgebaut (Abb. 1). Im N-terminalen Bereich befindet sich die ATP-Bindungsstelle, gefolgt von der katalytischen Domäne, die für die Übertragung des Phosphats von ATP auf die Aminosäure verantwortlich ist. Im C-terminalen Bereich befindet sich die Substratbindungsstelle.

Proteinkinasen können durch *second messengers*, durch Phosphorylierung, durch die regulatorische Bindung der Untereinheit, durch inhibitorische Proteine und durch subzelluläre Lokalisation reguliert werden. Jede Proteinkinase erkennt im Substratprotein ein spezifisches Sequenzmotiv, in dem die zu phosphorylierende Aminosäure enthalten ist. Somit wird gewährleistet, dass jede Proteinkinase nur ihr spezifisches Substratprotein phosphorylieren kann.

Zu jeder Art von Kinase gibt es für die entsprechenden Aminosäuren eine Phosphatase (Hunter, 1995). Diese reguliert die Dephosphorylierung von Proteinen und ist somit

direkter Gegenspieler der Kinase. Die Aktivität der Phosphatasen kann reguliert werden durch posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierung und Methylierung, *second messengers*, wie  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin und inhibitorische Proteine (Hunter, 2000). Hier gibt es zwei Gruppen, nämlich die Serin/Threonin und die Tyrosin Phosphatasen. Die Serin/Threonin Phosphatasen PP1, PP2A und PP2B interagieren mit verschiedenen Zielproteinen oder Untereinheiten (Pawson u. Scott, 1997). Die Konsensus Sequenz für PP1, RRVXF wurde auf vielen PP1 Zieluntereinheiten identifiziert. PP2A ist ein Heterotrimer bestehend aus einer 36 kD großen katalytischen, einer 65 kD großen strukturellen und einer regulatorischen Untereinheit. Die beiden Protein Phosphatasen PP1 und PP2A spielen in der vorliegenden Arbeit eine Rolle.



**Abb. 1**

**Vereinfachte, schematische Darstellung der Domänenstruktur einer Proteinkinase (nach Bielka u. Börner, 1995)**

### 1.4.1 Proteinkinase B/Akt

Proteinkinase B, auch Akt genannt, ist ein Mitglied der AGC Familie von Serin/Threonin Kinasen, welche S6K (Pullen *et al.*, 1998), RSK (Frodin *et al.*, 2000), PKN (Dong *et al.*, 2000) und alle Isoformen der Proteinkinase C (Le Good *et al.*, 1998) beinhalten. C-Akt ist das zelluläre Homolog des transformierenden Onkogens des Akt8 Retrovirus (Staal *et al.*, 1977, Staal, 1987). Beim Menschen sind drei Isoformen bekannt: PKB $\alpha$ /Akt1, PKB $\beta$ /Akt2 und PKB $\gamma$ /Akt3 (Brodbeck *et al.*, 1999), welche auf den Chromosomen 14q32, 19q13 und 1q44 lokalisiert sind (Testa u. Bellacosa, 2001). Alle drei Isoformen bestehen aus einer N-terminalen PH Domäne, einer Kinase Domäne und einem C-terminalen regulatorischen Bereich.

Die drei Isoformen von Akt werden unterschiedlich exprimiert, sowohl auf mRNA Ebene, als auch auf Protein Ebene (Brodbeck *et al.*, 1999). Akt spielt eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung. Verschiedene Studien zeigen Überexpression und

Amplifikation von Akt2 in 10-20% der humanen Ovarial- und Pankreaskarzinome (Cheng *et al.*, 1992, 1996) und Aktivierung der Akt2 Kinase in 40% der Ovarialkarzinome (Bellacosa *et al.*, 1995, Yuan *et al.*, 2000). Akt1 ist häufig in gastrointestinalen Karzinomen amplifiziert (Staal, 1987). Bei Prostata- und Mammakarzinomen geht eine gesteigerte Akt1 Kinase Aktivität mit einer schlechten Prognose einher (Testa u. Bellacosa, 2001). Akt3 Amplifikation wurde in Östrogen-defizienten Mammakarzinom- und Androgen-unabhängigen Prostata-Karzinomzelllinien beschrieben (Nakatani *et al.*, 1999).

Akt spielt in vielen wichtigen Signaltransduktionsprozessen eine zentrale Rolle und ist involviert in viele zelluläre Prozesse wie Glucose Metabolismus, Transkription, Apoptose, Zellproliferation, Angiogenese und Zellbewegung. Akt interagiert sowohl mit Substraten, als auch mit Nicht-Substraten. Diese Komplexbildungen spielen eine entscheidende Rolle für die Aktivierung und die Funktion von Akt. Das minimale Sequenzmotiv für eine effiziente Substrat-Phosphorylierung durch Akt ist RXXRXXS/T (Alessi *et al.*, 1996).

In der folgenden Tabelle 1 sind einige Beispiele der Interaktionspartner von Akt und ihre Funktion aufgelistet.

Tabelle 1: Beispiele für Akt interagierende Proteine (nach Brazil *et al.*, 2002)

Name des interagierenden Proteins	Biologischer Effekt
<u>Nicht-Substrate:</u>	
Grb10	Reguliert möglicherweise die Translokation von Akt an die Zellmembran
TCL1	Steigert die Akt Kinase Aktivität und den nukleären Transport
CTMP	Inhibiert die Akt Phosphorylierung von S473
Hsp90/Cdc37	Schutz vor Dephosphorylierung, Degradation von Akt und der Rekrutierung der Substrate
Hsp27	Aktivierung der Kinase Aktivität
GLUT4 Vesikel	Exakte Funktion ist unbekannt, jedoch wichtig für die Insulin-stimulierte Glucose Anreicherung
PKC $\alpha, \delta, \zeta$	Funktion ist unbekannt
Keratin	Inhibiert die intrazelluläre Translokation von Akt
<u>Substrate:</u>	
Mdm2/Hdm2	Nukleäre Translokation von Mdm2, Verminderung der p53 Level
P21Cip/WAF1	Steigert die Protein Stabilität von p21 und unterstützt das Überleben der Zellen
Bad	Phosphoryliertes Bad bindet an 14-3-3 und wird so im Zytosol eingeschlossen
Raf1	Inhibition des Raf1 Signalweges
14-3-3 $\zeta$	Rolle ist unklar
Gab2	Negative Regulation des mitogenen Signalweges

Akt1  $\neg$  *Knock out* (ko) Mäuse werden lebend geboren, sind aber deutlich kleiner als die Wildtyp Mäuse. Zusätzlich ist die Lebensspanne verkürzt und Testeszellen zeigen eine erhöhte spontane Apoptoserate (Chen *et al.*, 2001). Die beiden weiteren Isoformen von Akt, Akt 2 und 3, können das Fehlen des Akt1 Gens möglicherweise kompensieren. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass die ko Mäuse nur geringe Defekte aufweisen. Daher wäre es interessant, alle drei Gene gleichzeitig auszuschalten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Interaktion von Akt mit Grb10 und der Zusammenhang von Akt, Grb10 und 14-3-3.

#### 1.4.2 Aktivierung von Akt

Die Akt Aktivierung ist ein komplexer Prozess, der die Translokation von Akt an die Zellmembran und die Phosphorylierung von Akt voraussetzt. Eine entscheidende Rolle für die Translokation von Akt aus dem Zytosol an die Zellmembran spielt unter anderem die Phosphoinositide 3-Kinase (PI3-K) (Franke *et al.*, 1997, Sabbatini u. McCormick, 1999). PI3-Kinase ist ein Heterodimer, das aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit besteht. PI3-Kinase phosphoryliert Phosphatidylinositol in der D3-Position. Die wichtigsten Produkte der PI3-Kinase sind PtdIns(3,4,5)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Nach Rezeptorstimulation steigt die Konzentration dieser Metabolite unmittelbar an. Die PH Domäne von Akt besitzt eine starke Affinität zu den von PI3-Kinase gebildeten PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>2</sub>. Die Bindung der PH Domäne von Akt an die Phospholipide begünstigt die Translokation von Akt aus dem Zytosol an die Zellmembran, wobei die Affinität der PH Domäne an die Phospholipide über eine bestimmte Konsensus Sequenz vermittelt wird (Isakoff *et al.* 1998). Nach der Membranlokalisation wird Akt an Threonin 308 im Kinase Aktivierungsloop und an Serin 473 im C-terminalen Teil phosphoryliert (siehe Abb.2). Die Phosphorylierung von Threonin 308 ist wichtig für die Akt Aktivierung, wohingegen die Phosphorylierung von Serin 473 die Aktivierung maximal verstärkt. PDK1 (*3-Phosphoinositide dependent Kinase*) phosphoryliert Akt an Threonin 308 (Stephens *et al.*, 1998) und PDK2 phosphoryliert Akt *in vitro* an Serin 473 (Chan u. Tsichlis, 2002).

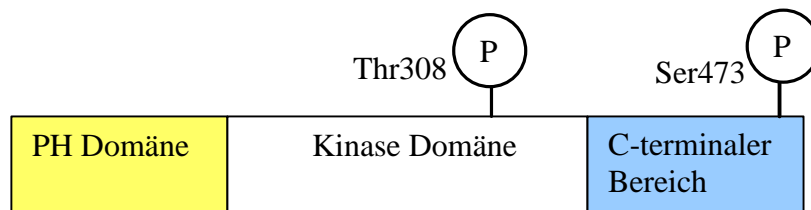


Abb. 2

Schematische Darstellung der Serin/Threonin Kinase Akt (nach Datta, *et al.* 1999)

PDK1 ist eine ubiquitär exprimierte Kinase mit einer N-terminalen Kinase Domäne und einer C-terminalen PH Domäne. PDK1 kann Akt nur in Anwesenheit der Phospholipide phosphorylieren. Die Bindung der Akt PH Domäne an die Phospholipide bewirkt eine Konformationsänderung, so dass die PH Domäne die Phosphorylierungsstelle Threonin 308 nicht mehr maskiert und diese von PDK1 phosphoryliert werden kann (Toker, 2000). Die Phosphorylierung von Akt wird durch spezifische PI3-Kinase Inhibitoren wie LY294002 und Wortmannin inhibiert.

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass es auch zu einer von PI3-Kinase unabhängigen Aktivierung von Akt kommen kann, z. B. durch cAMP/PKA und Hitze Schock (Filippa *et al.*, 1999).

Die Fusion von Akt mit einem Myristoylierungs- bzw. Palmitoylierungsmotiv führt zur konstitutiven Translokation und Aktivierung von Akt an die Zellmembran (Andjelkovic, 1997). Diese Daten unterstreichen die essentielle Bedeutung der Membranlokalisation für die Akt Aktivierung.

Nach seiner Aktivierung dissoziiert Akt von der Membran und wandert in den Zellkern (Andjelkovic, 1997), um dort verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z. B. *cAMP-responsive element-binding protein* (CREB), *forkhead transcription factors*, E2F und NF- $\kappa$ B (Kandel u. Hay, 1999) zu phosphorylieren.

Der direkte Gegenspieler von Akt bzw. von PI3-Kinase ist das Tumor Suppressor Gen PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten*). PTEN ist eine Mischphosphatase und dephosphoryliert sowohl Phosphotyrosin- als auch Phosphoserin/Threoninreste. Bei PTEN handelt es sich um eines der meist mutierten Tumor Suppressor Gene (Di Cristofano u. Pandolfi, 2000). Die spezifische Funktion von PTEN ist die Dephosphorylierung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und die damit verbundene

Regulation der Phospholipide. Der Verlust von PTEN führt zu einem Anstieg der PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> Konzentrationen und damit zu einer begünstigten Translokation von Akt an die Zellmembran (Wu *et al.*, 1998, Stambolic *et al.*, 1998, Myers *et al.*, 1998). Dies bringt eine Hyper-Aktivierung von Akt mit sich, was wiederum vor verschiedenen apoptotischen Stimuli schützt.

### 1.4.3 Spezifische Rolle der Akt Aktivierung für das Überleben von Zellen

Die Transfektion von Zelllinien mit konstitutiv aktivem Akt blockiert die Apoptose, die durch verschiedenste Stimuli wie z. B. Serumentzug und UV-Bestrahlung induziert wurde (Khwaja *et al.*, 1997, Kennedy *et al.*, 1997, Kulik *et al.*, 1997, Dudek *et al.*, 1997). Die anti-apoptotischen Effekte von Akt sind auf die Phosphorylierung der spezifischen Substrate von Akt zurückzuführen.

Als eines der ersten Substrate von Akt konnte Bad, ein Mitglied der Bcl2 Familie identifiziert werden (Datta *et al.*, 1997). Bad bindet an Mitglieder der Bcl2 Familie wie Bcl-X<sub>L</sub>, formt Heterodimere mit diesen Proteinen und unterdrückt somit Apoptose (Downward, 1999). Bad wird an zwei Stellen, Serin 112 und Serin 136 phosphoryliert (Datta *et al.*, 1997). Beide Serine liegen in einer Akt Konsensus Sequenz, wovon Akt jedoch bevorzugt Serin 136 phosphoryliert. Nach der Phosphorylierung interagiert Bad mit dem Protein 14-3-3 und kann nicht mehr an Bcl-2 oder Bcl-X<sub>L</sub> binden. Wahrscheinlich schützt die Assoziation von Bad mit 14-3-3 Bad vor der Dephosphorylierung und verhindert, dass Bad zu seinen Zielproteinen in den Mitochondrien gelangen kann (Datta *et al.*, 1999).

Ein weiteres Ziel-Substrat von Akt ist der Transkriptionsfaktor FKHRL1 (*Forkhead Transkription Faktor*) (Brunet *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von FKHRL1 durch Akt begünstigt die Interaktion mit 14-3-3, was dazu führt, dass FKHRL1 im Zytoplasma gehalten wird und nicht mehr in den Zellkern lokalisieren kann. Somit kann die Transkription der FKHRL1 Zielgene, wie z. B. Fas Ligand, nicht stattfinden und die Zelle hat einen Überlebensvorteil. Die Transkription von Fas-Ligand ist beispielsweise wichtig für die durch Serum-Entzug induzierte Apoptose.

Die folgende Skizze in Abbildung 3 zeigt einige Signalwege der Serin/Threonin Kinase Akt und verdeutlicht die zentrale Rolle von Akt für viele Signaltransduktionsprozesse.

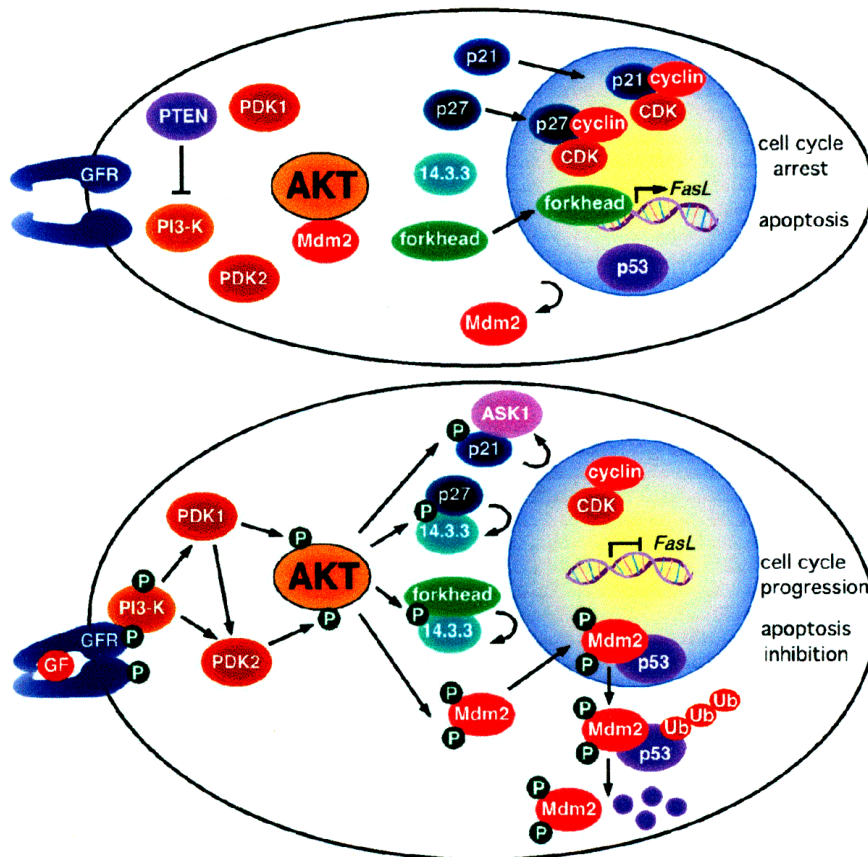


Abb. 3

Die Phosphorylierung durch Akt reguliert viele Substrate, die im Zellzyklus eine Rolle spielen, bzw. Apoptose inhibieren (nach Testa u. Bellacosa, 2001)

Als weiteren anti-apoptotischen Effekt von Akt sei das Interleukin-3 abhängige Überleben von hämatopoetischen Zellen genannt (Songyang *et al.*, 1997). Interleukin 3 (IL-3) ist ein Zytokin, das von aktivierten T-Zellen produziert wird. Stimulation mit IL-3 induziert PI3-Kinase und Akt Aktivität. Die Überexpression von Akt und konstitutiv aktiviertem Akt schützt IL-3 abhängige Zellen nach Faktor-Entzug vor Apoptose. Diese Daten in hämatopoetischen Zellen verdeutlichen den entscheidenden anti-apoptotischen Vorteil durch die Expression und die Aktivierung von Akt.

### 1.5 Adaptermoleküle

Eine weitere für die Signaltransduktion wichtige Gruppe von Proteinen sind die Adaptermoleküle. Sie besitzen keine eigene enzymatische Aktivität, vielmehr vermitteln sie Wechselwirkungen zwischen Proteinen von Signalketten. Entscheidend für diese



Wechselwirkungen sind spezifische Domänen, wie z. B. die SH2-, SH3- oder die PH Domäne.

SH2-Domänen bestehen aus etwa 100 Aminosäureresten mit fünf konservierten Regionen (Pawson u. Schlessinger, 1993). SH steht für Src-Homologie, da diese Domäne ursprünglich in der c-Src-Tyrosinkinase gefunden wurde. SH2 Domänen binden spezifisch und hoch affin an Phosphotyrosinreste (Pawson u. Nash, 2000). Einige Proteine enthalten mehrere SH2 Domänen, was ihnen eine noch größere Affinität an Phosphoproteine verleiht, bzw. die Fähigkeit mehrere Phosphoproteine zu binden. SH2 Domänen enthaltende Proteine können in zwei Gruppen eingeteilt werden: solche mit enzymatischer Aktivität, wie z. B. Phospholipase C $\gamma$  oder Src und solche ohne enzymatische Aktivität, wie Grb2 und Grb10, die sogenannten SH2-Adapterproteine (Pawson u. Schlessinger, 1993). Oft führen die Interaktionen der Zielproteine mit einer SH2 Domäne zu einer Translokation zur Plasma Membran, wie im Falle des Adapterproteins Grb2 (Hunter, 2000, Lodish *et al.*, 2001). Grb2 besteht aus einer SH2 Domäne flankiert von zwei SH3 Domänen. Die SH2 Domäne von Grb2 kann mit dem aktivierten EGF- oder PDGF-Rezeptor assoziieren. Grb2 ist ein wichtiges Bindeglied zwischen Tyrosinkinasen und Ras (Wagener, 1999). Weiterhin ist Grb2 in der Lage Ras Aktivität zu induzieren (Lowenstein *et al.*, 1992).

SH3 Domänen bestehen aus etwa 60 Aminosäuren mit ausgeprägten  $\beta$ -Strangstrukturen (Pawson u. Schlessinger, 1993). SH3 Strukturen treten in aktin-bindenden und membranassoziierten Proteinen sowie in verschiedenen Myosinen auf, weshalb ihnen eine wesentliche Rolle für Membran-Zytoskelett-Wechselwirkungen zugeschrieben wird (Bielka u. Börner, 1995). Proteine, die wiederum an SH3 Domänen binden, sind durch Prolin-reiche Sequenzen der Grundstruktur PXXP gekennzeichnet, die vor allem in  $\beta$ -Faltblattstrukturen enthalten sind. Grb2 bindet über seine SH3 Domänen an SOS, was zur Aktivierung von Ras führt.

PH Domänen wurden zuerst in dem Thrombozyten-Protein Pleckstrin identifiziert und werden deshalb als Pleckstrin-Homologieeinheit bezeichnet (Gibson *et al.*, 1994). Grb7, Grb10 und Akt besitzen eine PH Domäne. PH Domänen binden Phosphoinositide in der Zellmembran und begünstigen deshalb häufig die Lokalisation der Proteine an die Membran (Pawson u. Scott, 1997).

### 1.5.1 Das Adapterprotein Grb10

Grb10 gehört wie Grb7 und Grb14 zu einer Familie von Adapter Proteinen (Daly, 1998, Han *et al.*, 2001). Diese Adaptermoleküle besitzen eine N-terminale Prolin-reiche Sequenz, eine PH Domäne, eine BPS (*between PH and SH2*) Domäne und eine C-terminale SH2 Domäne (Ooi *et al.*, 1995, Frantz *et al.*, 1997, He *et al.*, 1998) (Abb. 4).



**Abb. 4**

#### Schematische Struktur von Grb10

Grb10 interagiert sowohl mit verschiedenen Rezeptoren, wie z. B. dem IGF Rezeptor (Liu, 1995) oder dem c-Kit Rezeptor (Jahn *et al.*, 2002), als auch mit intrazellulären Proteinkinasen, wie z. B. Raf1 und Mek1 (Nantel *et al.*, 1999). Die Interaktion mit dem c-Kit Rezeptor ist abhängig von der Tyrosin Phosphorylierung des Rezeptors und der SH2 Domäne von Grb10 (Jahn *et al.*, 2002).

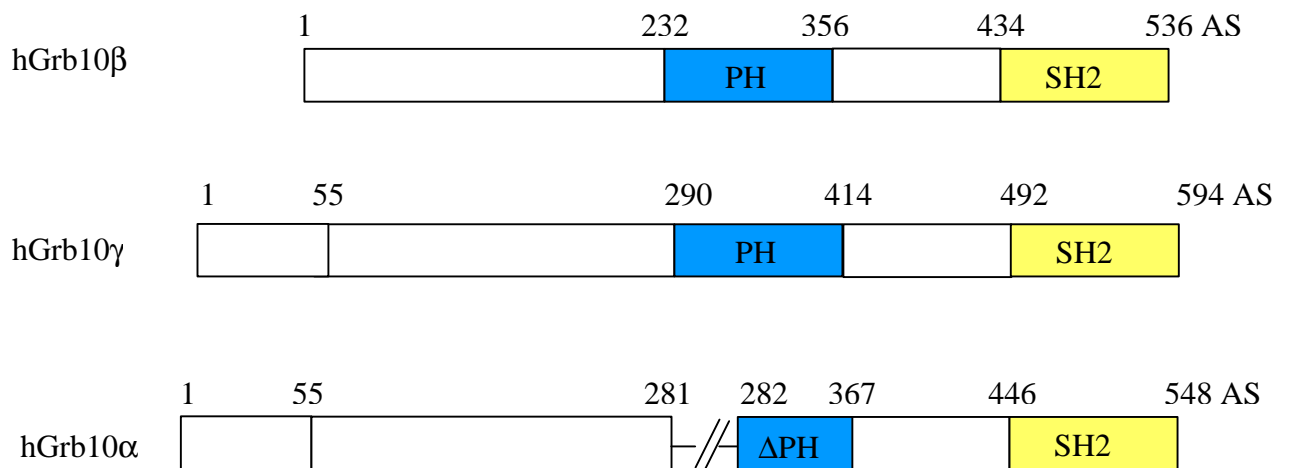
Die Mikroinjektion eines Grb10 Peptids, das die BPS und die SH2 Domäne umfasst, inhibiert die Insulin-stimulierte Synthese von DNA. Deshalb wurde spekuliert, dass Grb10 promotogene Signale weiterleitet (O'Neill *et al.*, 1996).

Grb10 wird nach Stimulation mit Insulin an Serin/Threonin- (Dong *et al.*, 1997) und als Antwort auf Bcr-Abl (Bai *et al.*, 1998), Tec (Mano *et al.*, 1998), VEGF (Giorgetti-Peraldi *et al.*, 2001) und Src (Langlais *et al.*, 2000) an Tyrosinresten phosphoryliert. Der spezifische PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin inhibiert die Grb10 Phosphorylierung (Dong *et al.*, 1997), was darauf hindeutet, dass die für die Grb10 Phosphorylierung verantwortliche Kinase unterhalb des PI3-Kinase/Akt Signalweges liegt.

Es existieren vier verschiedene *Splicing* Varianten von Grb10: human Grb10 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ . Drei der Isoformen ( $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) besitzen eine intakte PH Domäne, wohingegen die Isoform Grb10 $\alpha$  eine Deletion der PH Domäne aufweist (Dong *et al.*, 1997) (Abb. 5).

Die Expression der Isoform ohne intakte PH Domäne inhibiert sowohl die durch Insulin-stimulierte Substrat Phosphorylierung- als auch die Aktivierung von PI3-Kinase

(Liu *et al.*, 1995). Die Grb10 Isoformen mit einer intakten PH Domäne haben einen aktivierenden Effekt auf die Substratmoleküle (Jahn *et al.* 2002), was darauf schließen lässt, dass die PH Domäne von Grb10 entscheidend für seine spezifische Rolle in der Signaltransduktion ist.



**Abb. 5**

**Vergleich der verschiedenen Grb10 Splicing Varianten (nach Dong *et al.*, 1997)**

Die Überexpression von Grb10 induziert spezifisch die Aktivierung der Serin/Threonin Kinase Akt (Jahn *et al.*, 2002). Die Induktion der Akt Aktivierung ist abhängig von der Grb10 PH und der SH2 Domäne. Denn PH und SH2 Deletionsmutanten von Grb10 können keine Akt Aktivität mehr induzieren (Jahn *et al.*, 2002). Die Fusion von Grb10WT, bzw. der Grb10 SH2 Domäne an Akt bewirken die konstitutive Aktivierung von Akt. Wahrscheinlich besteht die Rolle von Grb10 in der Translokation von Akt an die Zellmembran und vermittelt so Akt Aktivität, denn Grb10 rekrutiert aus dem Zytoplasma an die Zellmembran und interagiert über die SH2 Domäne mit dem aktivierten c-Kit Rezeptor (Jahn *et al.*, 2002).

## 1.6 14-3-3 Proteine

14-3-3 Proteine sind ubiquitär exprimierte Proteine, die in den verschiedensten Signaltransduktionswegen eine Rolle spielen. 14-3-3 Proteine sind ca. 30 kD groß und bilden meist Homo- und Heterodimere (Yaffe, 2002). Die 14-3-3 Homo- und Heterodimere formen U-förmige Strukturen. Die Bindung vieler phosphorylierter Proteine erfolgt über ein im U gelegenes Zentrum (Brunet *et al.*, 2002). Der ungewöhnliche Name leitet sich aus der Fraktionierungsnummer der 14-3-3 Proteine aus DEAE-Zellulose Chromatographie und der Migrationsposition in der 2-D-Gelelektrophorese ab (Fu *et al.*, 2000). Beim Menschen sind bisher sieben Isoformen isoliert worden. Zwischen den verschiedenen Isoformen besteht eine große Homologie und es gibt konservierte Regionen, die für die Dimerbildung verantwortlich sind.

Das Interesse an diesen Proteinen lässt sich dadurch erklären, dass 14-3-3 Proteine in der Aktivierung der MAP Kinase, in Apoptose, in Zellzyklusregulation und in Genregulationsprozesse involviert sind. 14-3-3 interagiert mit Proteinkinasen, wie z. B. PKCs, Raf, Bcr, MEKK, PDK1, Akt und ASK1, mit Rezeptor Proteinen, wie z. B. IL-3/IL5/GMCSF Rezeptor, *Insulin like growth factor* Rezeptor und GABA Rezeptor, mit Enzymen, wie Tyrosin und Tryptophan Hydroxylase, mit G-Proteinen, mit Proteinen, die im Zellzyklus eine Rolle spielen, wie z. B. Cdc25, Wee1, p53, mit Proteinen, die transkriptionelle Aktivität besitzen, wie Histon Deacetylase, Forkhead Transkriptionsfaktor und mit Proteinen, die wichtig in der Regulation der Apoptose sind, wie z. B. Bad (Reuther *et al.*, 1994, Bonnefoy-Berard *et al.*, 1995, Conklin *et al.*, 1995, Craparo *et al.*, 1997, Furlanetto *et al.*, 1997, Powell *et al.*, 2002, Sato *et al.*, 2002, Yaffe, 2002).

14-3-3 Proteine kontrollieren die verschiedenen Prozesse, indem sie die nukleäre und zytoplasmatische Verteilung von Signalmolekülen beeinflussen. Die Verteilung von 14-3-3 in der Zelle ist meist zytoplasmatisch, aber man findet auch einen Anteil an 14-3-3 Proteinen im Nucleus (Brunet *et al.*, 2002).

14-3-3 Proteine binden bevorzugt an Phosphoserin/Threonin Motive (Muslin *et al.*, 1996, Yaffe *et al.*, 1997). Bevorzugte Bindungssequenzen sind: RSXpSXP, RXXpSXP und RXXpS, wobei X für eine beliebige Aminosäure, R für Arginin, S für Serin und pS für ein phosphoryliertes Serin steht. Die meisten der mit 14-3-3 interagierenden Proteine besitzen eine oder mehrere dieser Bindungsmotive. Aber es gibt auch Ausnahmen, wie z. B. die Interaktion mit PKC $\mu$  (Hausser *et al.*, 1999). PKC $\mu$

weist keines der vorher dargestellten Bindungsmotive auf. Ebenso finden auch Interaktionen mit nicht phosphorylierten Proteinen statt, wie beispielsweise mit Exoenzym S (Masters *et al.*, 1999).

14-3-3 Interaktion mit Cdc25 kontrolliert die G2/M Zellprogression (Peng *et al.*, 1997). Entscheidend für die Regulation der Apoptose ist die Interaktion von 14-3-3 mit Bad (Datta *et al.*, 1997) oder mit FKHRL (Brunet *et al.*, 1999), was bereits in Kapitel 1.4.3 kurz angesprochen wurde. Die Serin/Threonin Kinase Akt phosphoryliert die proapoptischen Moleküle Bad oder FKHRL, was zu einer Bindung an 14-3-3 führt. Die Assoziation an 14-3-3 bewirkt, dass Bad, bzw. FKHRL, in einem bestimmten Teil der Zelle festgehalten werden und nicht zu ihren Zielsubstraten gelangen können. Somit wird die Einleitung der Apoptose verhindert.

In den letzten Jahren hat das Interesse an 14-3-3 stark zugenommen, da es für viele biologische Prozesse von essentieller Bedeutung zu sein scheint.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid/bis-Acrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aprotinin, Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Ammoniumsulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Antibiotische, antimycotische Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia, steril	Braun, Melsungen
Bactoagar	Difco, Detroit, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
DOTAP, Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
DMEM, Zellmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DTT	Promega, Heidelberg
ECL-Reagenzien	Amersham Buchler, Braunschweig
DNTP-Mix, 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Neu-Ulm
FCS	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
G418, Antibiotikum	Calbiochem, MerckAG, Darmstadt
Gene Porter, Transfektionsreagenz	Gene Therapy Systems, San Diego (USA)
Glutathion Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycerin	Fluka, Deisenhofen

---

Glycin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Histofluid	Marienfeld, München
IPTG	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Lachssperma-DNA	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Leupeptin, Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
L-Glutamin	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Lysozym	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Murines, rekombinantes IL-3	R&D Systems, Wiesbaden
Naphtol Blauschwarz	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natrium-Orthovanadate	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Nonidet P 40	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS, 10-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PMSF	Roche, Mannheim
Protein A Sepharose Beads	Pharmacia Biotech, Freiburg
Rnasin, Ribonuklease Inhibitor	Promega, Heidelberg
RPMI 1640 Zellmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Slow Fade Antifade Kit mit Dapi	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
SuperSignal® Chemoluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Fluka Chemie, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trockenmilchpulver	Fluka Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka Chemie, Deisenhofen
Ziegen-Serum	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

### 2.1.2 Enzyme

#### Restriktionsenzyme:

<i>DpnI</i> , 20U/μl	New England Biolabs, Schwalbach
<i>EcoRI</i> , 10U/μl	Roche, Mannheim
<i>EcoRV</i> , 10U/μl	Roche, Mannheim
<i>SalI</i> , 10U/μl	Roche, Mannheim

#### Polymerase:

<i>Pfu-Turbo</i> , 2,5 U/μl	Stratagene, La Jollo (USA)
TNT® RNA Polymerase	Promega, Heidelberg

#### Alkalische Phosphatase:

<i>CIAP</i> , 20-30 U/μl	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
--------------------------	----------------------------

#### Ribonuclease Inhibitor:

RNasin	Promega, Heidelberg
--------	---------------------

### 2.1.3 Radiochemikalien

<sup>35</sup> S-Methionin	Amersham, Braunschweig
---------------------------	------------------------



<sup>32</sup>P-γ-ATP

Amersham, Braunschweig

**2.1.4 Zelllinien**Suspensionszellen:

Ba/F3

murine pro-B-Zelllinie

Adhärente Zellen:

293

humane embryonale  
Nierenkarzinom-Zelllinie

Cos1

*african green monkey* Nierenzellen

Cos7

*african green monkey* Nierenzellen**2.1.5 Antikörper**

Anti-14-3-3β (K-19), polyklonal, Kaninchen IgG

Santa Cruz Biotechnologie,  
Heidelberg

Anti-Akt (C-20), polyklonal, Ziege IgG

Santa Cruz Biotechnologie,  
Heidelberg

Anti-Flag (M2), Agarose gekoppelt

Sigma-Aldrich Chemie,  
Deisenhofen

Anti-Flag (M2), monoklonal, Maus IgG

Stratagene, Heidelberg

Anti-HA (Y-11), polyklonal, Kaninchen IgG

Santa Cruz Biotechnologie,  
Heidelberg

Anti-Kaninchen IgG, HRP konjugiert, Esel IgG

Amersham, Braunschweig

Anti-Kaninchen, Texas Red, Ziege IgG (H+L)

Dianova, Hamburg

Anti-Maus IgG, HRP konjugiert, Esel IgG

Amersham, Braunschweig

Anti-Maus, Fitc-F(ab')<sub>2</sub>, Ziege IgG (H+L)

Zymed, Ade, München

Anti-Mouse IgG, monoklonal, Kaninchen IgG

Dako Diagnostika, Hamburg

Anti-c-myc (9E10), monoklonal, Maus IgG

Sigma-Aldrich Chemie,  
Deisenhofen

Anti-P-Akt Serin 473, polyklonal,

New England Biolabs, Schwalbach

## Kaninchen IgG

Anti-P-Akt Threonin 308, polyklonal,

New England Biolabs, Schwalbach

## Kaninchen IgG

Anti-Ziege IgG, HRP konjugiert, Esel IgG

Santa Cruz Biotechnologie,  
Heidelberg**2.1.6 Vektoren**

Name	Resistenzen	Firma
PCDNA 3.1 (Zeo+)	Ampicillin, Zeozin	Invitrogen, Leek, Niederlande
PCMV /Flag	Kanamycin, G418	Stratagene, La Jolla (USA)
PCMV/Myc	Kanamycin, G418	Stratagene, La Jolla (USA)
PGEX-KG	Ampicillin	Pharmacia, Freiburg
PBTM116	Ampicillin	-

**2.1.7 Bakterienstämme**Escherichia Coli DH5a<sup>TM</sup>

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

F-F 80*lacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*,  
*recA1*, *endA1*, *hsdR17*(*r<sub>K</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>K</sub><sup>+</sup>*), *phoA*, *supE44*,  
*λ-thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

Epicurian Coli<sup>TM</sup> XL-1Blue Supercompetent Cells

Stratagene, Heidelberg

*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*,  
*relA1*, *lac* [*F'**proAB*, *lacI<sup>q</sup>Z*ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

**2.1.8 Oligonukleotide zur Sequenzierung**

Name	Sequenz
T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
LexA	5'-TGTCGTAGATCTTCGTCAG-3'

PACT2 Forward	5'-GATGATGAAGATACCCAC-3'
PACT2 Reverse	5'-GAGTTGAAGTGAAGTGC-3'

### 2.1.9 Oligonukleotide zur Einführung von Mutationen und Schnittstellen in verschiedene DNA-Konstrukte

Name	Sequenz
Grb10/Akt A EcoRV 3'	5'-GTGCAGCCAGATATCCTTCACAATGGC-3'
Grb10/Akt A EcoRV 5'	5'-GCCATTGTGAAGGATATCTGGCTGCAC-3'
Grb10/Akt B EcoRV 3'	5'-CAGGCAGCGGATGATATCGGTGTTGGG-3'
Grb10/Akt B EcoRV 5'	5'-CCCAACACCGATATCATCCGCTGCCTG-3'
Grb10FM 5'	5'-ATCTGATCCAGCTGGTCGACTTCTACCAG CTC-3'
Grb10FM 3'Nr.1	5'-AGATTCATCAGGAGGATTAAGTTTCATA AGGCCACGCGGATGCA-3'
Grb10FM 3'Nr.2	5'-TTTACAAGACATACAACCAGGACCAGATT CATCAGGAGGATTAAGTTT-3'
Grb10FM 3'Nr.3	5'-AAGCTTTCAAGAAAGAACACATTTACAAG ACATAACAACCAGGACC-3'
Grb10 S76A 3'	5'-GGCCGGAAGAGCTGCAGTTCTTAACTG-3'
Grb10 S76A 5'	5'-CAGTTAAGAACTGCAGCTCTTCCGGCC-3'
Grb10 S428A 3'	5'-GAGAATTCTCAGCAACACTGCGCATAGG-3'
Grb10 S428A 5'	5'-CCTATGCGCAGTGTTGCTGAGAATTCTC-3'

### 2.1.10 Standard Geräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	Kodak, New Haven, USA
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
Automativ Speed Vac AES 100	Savant
CO <sub>2</sub> -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen

---

Elektroporiergerät IBI geneZapper 450	Kodak, New Haven, USA
Elisa Reader Emax	Molecular Devices, MWG-Biotech, Ebersberg
Entwickler Hyperprocessor	Amersham, Braunschweig
Facs EPICSX1	Beckman-Coulter, Krefeld
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Geltrockner SG200	Savant
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
Image Systems	Till Photonics, München
Image Systems LSM 5 Image browser	Zeiss, Oberkochen
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Konfokales Mikroskop Axioskop 100M	Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Magnetrührgerät	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Mini-Gel Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
PCR Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter ? 32	Beckman, Fullerton, USA
Photosystem Eagleeye™	Stratagene, Heidelberg

Refrigerated Incubator-Shaker Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	Holten, Gydewang, Dänemark
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Transphor Electrophoresis Unit	Hoefler, San Fransisco, USA
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultraschall Gerät Sonifier 250	Branson, Danburry, USA
Ultrazentrifuge Sorvall Combi Plus	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen
Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge GS-6K	Beckman, Fullerton, USA

### 2.1.11 Standard Lösungen und Puffer

Amidoschwarz-Färbelösung:	0,2% Naphtol Blau Schwarz 25% Isopropanol 10% Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung:	25% Isopropanol 10% Essigsäure
Coomassie-Färbelösung:	0,25% Brilliant Blau 45% Methanol 10% Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung:	45% Methanol 10% Essigsäure
DNA Probenpuffer (10-fach):	50% Glycerin 0,2% Bromphenol Blau 0,5 M EDTA in A.d.

---

Luria-Bertani (LB) Medium (flüssig):	1% Tryptone 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl pH 7,0
LB-Medium (fest):	1,5% Bacto-Agar in LB-Medium flüssig
Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 130 mM NaCl, 5 mM EDTA 0,5% Triton X-100 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,5 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7 1 mM Natriumorthovanadate 20 mM Natriumfluorid 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 mM PMSF, 1 x Protease-Inhibitor Cocktail Tablette/10 ml A.d.
NETN-Puffer:	0,5% (V/V) NP40 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM PMSF 1 mM Benzamidin 1 x Protease Inhibitor Cocktail Tablette/10 ml A.d.
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (2-fach):	1 M Tris/HCl, pH 6,8 200 mM DTT 4% SDS 0,2% Bromphenol-Blau 20% Glycin
TAE-Puffer (10-fach):	0,4 M Tris 1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA in A.d.
TE-Puffer (10-fach):	0,1 M Tris/HCl 10 mM EDTA in A.d.

Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d. 20% Methanol in A.d.
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	1,5 M Tris, pH 8,8 0,4% SDS

### 2.1.12 Medien und Puffer für die Arbeit mit Hefen

Dropout-Lösung (10-fach):	L-Adeninhemisulfatsalz	200 mg/l
	L-Arginin HCl	200 mg/l
	L-Histidin HCl Monohydrat	200 mg/l
	L-Isoleucin	300 mg/l
	L-Leucin	1000 mg/l
	L-Lysin HCl	300 mg/l
	L-Methionin	200 mg/l
	L-Phenylalanin	500 mg/l
	L-Threonin	2000 mg/l
	L-Tryptophan	200 mg/l
	L-Tyrosin	300 mg/l
	L-Uracil	200 mg/l
L-Valin	1500 mg/l	

Für die Herstellung der Selektionsmedien wurden folgende Aminosäuren nicht zugegeben:

Dropout-Lösung (-T, 10-fach):	ohne Tryptophan
Dropout-Lösung (-TL, 10-fach):	ohne Tryptophan und Leucin
Dropout-Lösung (-THULL, 10-fach):	ohne Tryptophan, Leucin, Histidin, Lysin und Uracil

Hefe-Lysis Puffer:	2% Triton X-100 1% SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA
--------------------	--

LiAc (10-fach) :	1 M Lithiumacetat, autoklaviert
------------------	---------------------------------

---

M9-Lösung (5-fach):	6,4% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O, 1,5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,25% NaCl 0,5% NH <sub>4</sub> Cl in A.d., autoklaviert
M9-Medium:	M9-Lösung 2% Glucose 40 mg/l Prolin 337 mg/l Thiamin in A.d., autoklaviert
M9-Platten:	M9-Medium 1,6% Bacto-Agar, autoklaviert
PEG 400 (50%):	50% PEG 400 in A.d., autoklaviert
PEG/TE/LiAc Lösung:	112 ml 50% PEG 14 ml 10x TE-Puffer 14 ml 10x LiAc
SD-Lösung (10-fach):	6,7% <i>Yeast Nitrogen Base</i> (Difco) in A.d. pH 5,8, autoklaviert
Selektion-Dropout (SD) Medium:	1x SD-Lösung 1x jeweilige Dropout-Lösung 2% Dextrose 50 µg/ml Ampicillin 12,5 µg/ml Tetracyclin in A.d.
Selektion-Dropout (SD) Platten:	SD Medium mit 1,6% Bacto-Agar in A.d.
TE-Puffer (10-fach):	0,1 M Tris/HCl 10 mM EDTA in A.d. autoklavieren
YPD-Medium:	1% <i>Yeast Extract</i> (Difco) 2% Bacto-Peptone (Difco) in A.d., pH 5,8, autoklaviert 2% Dextrose 50 µg/ml Ampicillin 12,5 µg/ml Tetracyclin in A.d. für die Kultivierung der Hefen zugeben
YPD-Platten:	YPD-Medium mit 1,6% Bacto Agar (Difco)



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

#### 2.2.1.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen ermöglichen das gezielte Schneiden von doppelsträngiger DNA (Sambrook et al, 1989). Dabei entstehen je nach Enzym entweder komplementäre, überhängende Enden (*sticky ends*) oder stumpfe Enden (*blunt ends*). Um die DNA in definierte Fragmente zu zerlegen, wird sie mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und den zugehörigen Restriktionspuffern inkubiert. Die Inkubation erfolgt je nach Enzym zwischen 1-4 h meist bei 37° C. Die enzymatische Reaktion wird durch Erhitzen des Reaktionsansatz auf 65° C für 10 min gestoppt, sofern keine anderen Angaben vom Hersteller vorliegen.

#### 2.2.1.2 Dephosphorylierung

Wird für die Herstellung rekombinanter DNA nur ein einziges Restriktionsenzym eingesetzt, werden die identischen Restriktionserkennungssequenzen von der Ligase bevorzugt. Die Dephosphorylierung verhindert eine Zirkularisierung des Klonierungsvektors während der Ligation, was die Anzahl an rekombinanten Molekülen erhöht. Das zur Dephosphorylierung verwendete Enzym ist die alkalische Phosphatase, welche die freien 5'-Phosphatgruppen der linearen DNA abbaut. Dadurch ist die Ligation nur zwischen den freien 5'-Phosphat-Enden der Fremd-DNA und den 3'-OH-Enden des Vektors möglich. Die Dephosphorylierung kann direkt im Restriktionsansatz durchgeführt werden, indem der Restriktionsansatz mit 10x Dephosphorylierungspuffer und A.d. verdünnt und mit 2-5 U Phosphatase versetzt wird.

#### 2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer: 0,4 M Tris, 1,1% Essigsäure, 2% 0,5 M EDTA

DNA-Probenpuffer: 50% (M/V) Glycerin, 0,5% (M/V) Bromphenolblau, 0,5 M EDTA

Agarosegelelektrophorese ist die Standardmethode zum Auftrennen, Charakterisieren und Aufreinigen von DNA-Fragmenten. Sie beruht auf Wanderungseigenschaften der negativ geladenen DNA-Moleküle in einem Feld konstanter-, elektrischer Spannung, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur angelegten Spannung ist. Die Trägermatrix besteht aus Agarose, einem aus Algen gewonnenen linearen, neutralen Polysaccharid. Die Agarosematrix bewirkt, dass kleinere DNA-Fragmente leichter und schneller durch sie hindurch wandern als größere. Hochprozentige Agarosegele (1,5%-2%) dienen zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten (< 500 bp). Mit niedrigprozentigen Agarosegelen (0,5%-1%) lassen sich größere DNA-Fragmente (> 1000 bp) separieren. Die DNA wird im Gel durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie z. B. Ethidiumbromid, gefärbt. Durch Anregung des Farbstoffs mit UV-Licht der Wellenlänge 320 nm ist es möglich, die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen.

Für die Herstellung eines Agarosegels wird die Agarose mit TAE-Puffer aufgekocht, bis die Lösung klar und schlierenfrei ist. Nach Abkühlen auf "Handwärme" wird die Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger gegossen. Nach ca. 1 h ist das Gel vollständig polymerisiert. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgt in einer DNA-Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer durch Anlegen einer Spannung von 20-120 V.

#### **2.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Nach erfolgreicher Auftrennung der DNA durch die Agarosegelelektrophorese können die gewünschten DNA-Fragmente mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Um DNA Strangbrüche durch die UV-Bestrahlung zu vermeiden, wird eine UV-Quelle mit niedriger Bestrahlungsstärke verwendet. Die Isolation der DNA aus der Agarose erfolgt mit Hilfe des "QiaEX Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden) laut Herstellerangaben. Die DNA wird mit 30 µl EB-Puffer vom Säulenmaterial eluiert und bei -20° C gelagert.

### 2.2.1.5 Ligation von DNA

Zur Herstellung eines rekombinanten DNA-Moleküls werden der linearisierte Vektor mit dem zu klonierenden DNA-Stück verknüpft (Sambrook *et al.*, 1989). Katalysiert wird die ATP-abhängige Reaktion durch die T4-Ligase, welche 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphat-Enden verknüpft. Idealerweise beträgt das Verhältnis von Vektor zu Insertions-DNA 1:3. Die Mengenbestimmung der beiden DNAs erfolgt mit der Agarosegelelektrophorese. Für die Ligation wird ein "Rapid DNA Ligation Kit" der Firma Roche, Mannheim verwendet. Als Kontrolle dient ein Ansatz ohne DNA-Fragment mit gleicher Menge an linearisiertem Vektor. Die Ligation kann direkt durch anschließende Transformation in *E. coli* Bakterien amplifiziert oder aber bei -20° C gelagert werden.

### 2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, einen spezifischen DNA Abschnitt, der von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt wird, zu vervielfältigen (Mullis *et al.*, 1986). Die doppelsträngige Ziel-DNA wird durch Erhitzen getrennt, anschließend kühlt man die Reaktion ab, damit sich die Primer spezifisch an die Zielregion anlagern können. Die Polymerase verlängert die Primer, wenn alle vier dNTPs vorhanden sind. Somit entstehen Kopien der ursprünglichen Zielregion. Bei der verwendeten Polymerase handelt es sich um die thermostabile, aus marinen Archeabakterien *Pyrococcus furiosus* isolierte *Pfu*-Polymerase, welche bei der Firma Stratagene (Heidelberg) erhältlich ist. *Pfu*-DNA-Polymerase besitzt sowohl eine 5'→3'-DNA-Polymeraseaktivität als auch eine 3'→5'-Exonuclease-*Proofreading*-Aktivität (Lundberg, 1991). Die 3'→5'-Exonucleaseaktivität steigert die Präzision der DNA-Synthese, da sie am 3'-Ende falsch angeheftete und gepaarte Nucleotide entfernt und an deren Stelle das richtige Nucleotid einsetzt. *Pfu*-Polymerase arbeitet mit zwölfmal höherer Genauigkeit als die *Taq*-Polymerase. Zusätzlich zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente ist es möglich, Punktmutationen, Austausch von Aminosäuren, Deletionen oder Insertionen einzelner oder sogar mehrerer Aminosäuren an doppelsträngiger DNA vorzunehmen.

In dieser Arbeit wurde die PCR Methode für das Einfügen von Punktmutationen verwendet, sowie für das Anlagern einer neuen Sequenz an ein DNA-Molekül.

#### 2.2.1.6.1 Mutagenese mittels PCR

Mit dem Einführen von Punktmutationen in DNA-Moleküle werden Sequenzen verändert, um z. B. ganze Aminosäuren zu verändern oder um neue Restriktionsschnittstellen für neue Enzyme zu generieren.

Für die Grb10 c-DNA und die Grb10/Akt Chimären c-DNA, die zusammen mit den Vektoren kleiner als 10 kb sind, eignet sich das "QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit" (Stratagene, Heidelberg). Dieser Kit beinhaltet die native *Pfu*-Polymerase, spezielle superkompetente Zellen, Restriktionsenzym *DpnI* und 10x Restriktionspuffer.

Die für eine Punktmutation zum Austausch einer Aminosäure verwendeten Primer sollten die Mutation ungefähr in der Mitte des Oligonukleotids enthalten. Weiterhin sollten sie komplementär zueinander sein und somit an den gegenüberliegenden DNA-Strängen im Plasmid anlagern. Sie sollten zwischen 25 und 40 Basen lang sein und der GC-Anteil sollte mindestens 40% betragen. Die Schmelztemperatur sollte 78° C betragen, 10° C oberhalb des Temperaturoptimums der *Pfu*-Polymerase (68° C). Zum Einfügen von neuen Restriktionsschnittstellen ist darauf zu achten, dass man zusätzliche Nukleotide an das 5'-Ende anhängt, denn oft lassen sich Kopien nur dann schneiden.

Für die PCR-Reaktion werden folgende Einzelkomponenten verwendet:

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 50 ng ds DNA-Template
- 125 ng Primer 3'
- 125 ng Primer 5'
- 2,5 mM dNTP Mix
- 2,5 U native *Pfu*-Polymerase

Es ist äußerst wichtig, das Enzym zuletzt der Reaktion zuzusetzen, da seine 3'→5'-Exonucleaseaktivität Matrize und Primer abbaut, wenn dNTP Moleküle fehlen.

Die PCR-Reaktion läuft in folgenden Schritten ab:

1x	95° C, 30 sec
16-18x	95° C, 30 sec
	55° C-62° C, 1 min
	68° C, 2 min/kb Matrizen DNA
1x	68° C, 7 min

Die Zyklenzahl ist abhängig von der Anzahl der auszutauschenden Basen. Die Anlagerungstemperatur der Primer ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird die methylierte Template DNA mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut. Somit wird die nicht-mutierte Ausgangs-DNA von dem mutierten PCR-Produkt entfernt. Die Transformation des PCR-Produkts erfolgt in superkompetenten XL1-Blue Zellen. Dieser besondere Bakterienstamm besitzt die Eigenschaft, den „Nick“, der durch die Anheftung der Polymerase bei der PCR-Mutagenese entstanden ist, zu reparieren. Die erfolgreiche Einführung der gewünschten Mutation wird durch Sequenzanalysen der Firma GATC-Biotech (Konstanz) überprüft. Um die Ras-Farnesylierungssequenz an Grb10 zu fusionieren, wurde eine Drei-Schritt-PCR nach Chen et al. gewählt (Chen *et al.*, 2000) (Abb. 6). Als Matrize dient die cDNA von Grb10WT im pCMV-Flag Vektor. Die Sequenz des 5'-Primers beinhaltet eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *SallI*. Dieser 5'-Primer wird für alle PCR Reaktionen verwendet. Die 3'-Primer variieren von PCR zu PCR Reaktion. Der 3'-Primer für die erste PCR Reaktion besteht aus einem Anteil der Grb10 Sequenz, damit eine erfolgreiche Anlagerung gewährleistet werden kann und aus einem Anteil der Ras-Farnesylierungssequenz als Überhang. Das Produkt der ersten PCR Reaktion wird mit Hilfe des *QIAquick Spin Purification Kits* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und als Matrize für die zweite PCR eingesetzt. Der 3'-Primer für die zweite PCR besteht ausschließlich aus der Ras-Farnesylierungssequenz. Für die dritte PCR Reaktion wird das aufgereinigte PCR Produkt aus der zweiten PCR als Matrize verwendet. Der 3'-Primer für die dritte PCR enthält das Ende der Ras-Farnesylierungssequenz und einen Teil der

Grb10 Sequenz mit einer *HindIII*-Schnittstelle. Das Produkt der dritten PCR Reaktion wird mit den beiden Enzymen *SalI* und *HindIII* geschnitten und in Grb10WT, *SalI/HindIII* geschnitten, subkloniert. Zur Bestätigung der erfolgreichen Fusion der Ras-Farnesylierungssequenz an Grb10 dient die Sequenzanalyse der Firma GATC-Biotech (Konstanz).

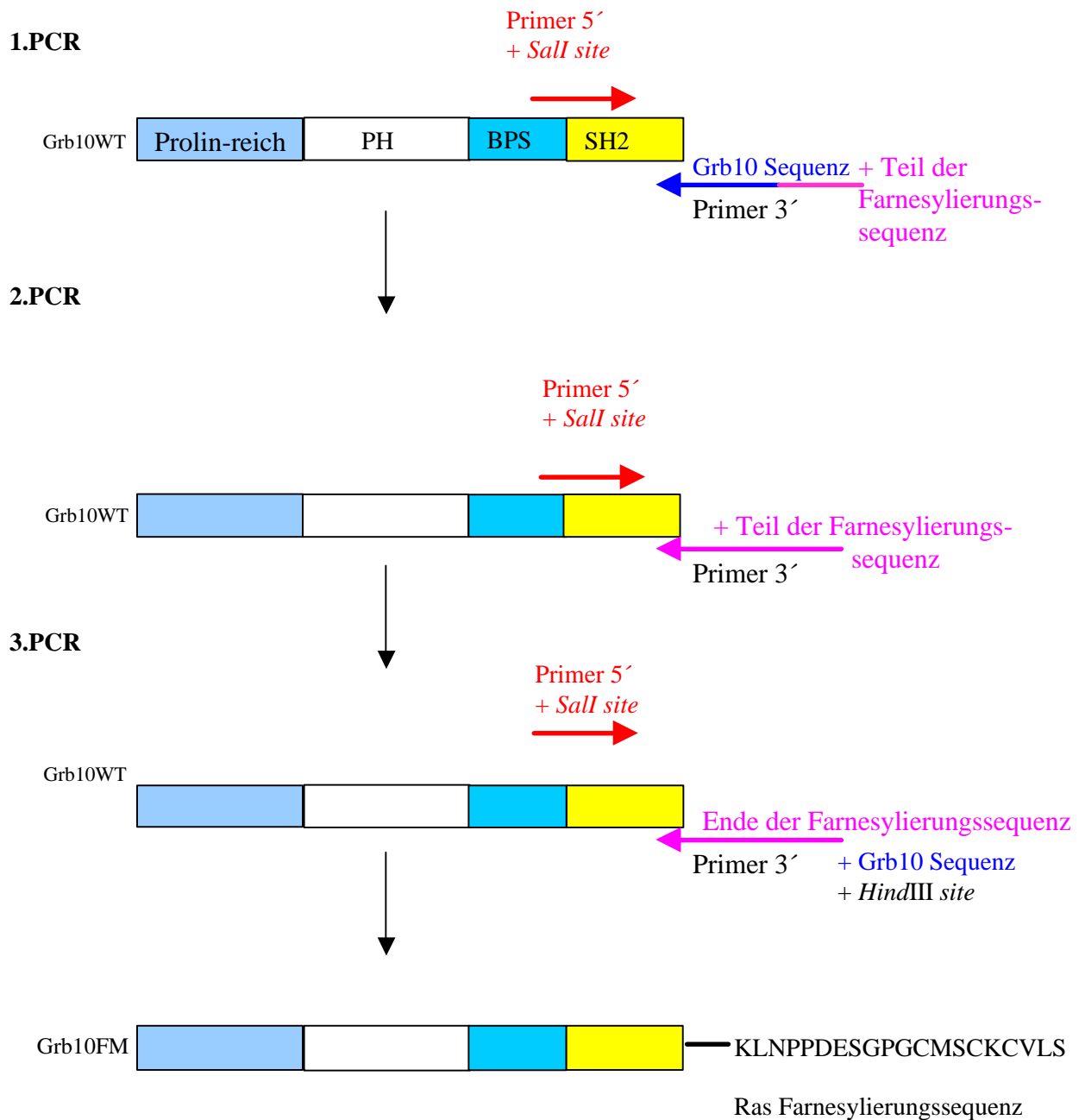


Abb. 6

Schematische Darstellung der Drei-Schritt-PCR zur Fusionierung der Ras-Farnesylierungssequenz an das C-terminale Ende von Grb10 (nach Chen *et al.*, 2000)

### 2.2.1.7 Isolation von Plasmid-DNA (Miniprep/Maxiprep)

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien erfolgt mit Hilfe eines kommerziell angebotenen Kits von Qiagen (Hilden). Dabei kann unterschieden werden zwischen dem „Nucleospin-Plasmid Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) zur Aufreinigung kleinerer DNA-Mengen und dem „Plasmid Maxi-Kit“ (Qiagen, Hilden) zur Gewinnung größerer DNA-Mengen.

Bis zu 20 µg Plasmid-DNA kann man gewinnen, indem man den entsprechenden Klon in 5 ml LB-Selektions-Medium animpft und über Nacht bei 37° C schüttelnd inkubiert. Bis zu 500 µg DNA können gewonnen werden, indem man den Klon in 200 ml LB-Selektionsmedium animpft und über Nacht bei 37° C schüttelnd inkubiert. Die Bakterienkultur wird bei 5000 rpm 5 min lang abzentrifugiert und das Pellet laut Herstellerangaben aufgearbeitet.

### 2.2.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren in wässriger Lösung liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Daher kann man durch Absorptionsmessungen im Wellenlängenbereich von 260 nm und 280 nm Rückschlüsse sowohl bezüglich der Reinheit als auch Konzentration der Nukleinsäurelösung ziehen. Bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter und einer Wellenlänge von 260 nm ist die optische Dichte gleich eins, wenn doppelsträngige DNA eine Konzentration von 47 µg/ml und einzelsträngige RNA eine Konzentration von 40 µg/ml aufweist. Das Verhältnis von Extinktion (Ratio) gibt ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren an. Je größer der Quotient aus spezifischem Signal ( $\Delta E^{260}$ ) zu unspezifischem Signal ( $\Delta E^{280}$ ) ist, desto reiner und damit qualitativ hochwertiger ist die Nukleinsäureprobe. Liegt der Wert zwischen 1,7 und 2,0 spricht man von einer reinen Nukleinsäure-Präparation. Ist der Quotient kleiner als 1,7, dann liegt eine Verunreinigung vor.

Die Konzentrationsbestimmung der verwendeten DNAs erfolgt mit dieser Methode.

## 2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

### 2.2.2.1 Kulturbedingungen

LB-Medium: 1% Bactoagar, 1% NaCl, 0,5% Hefeextrakt in A.d., autoklaviert

LB-Agarplatten: LB-Medium und 1,5% Agar, autoklaviert

Antibiotika: 100 mg/ml Ampicillin, 10 mg/ml Kanamycin

Die Bakterien werden in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft oder auf LB-Agarplatten (mit Ampicillin oder Kanamycin) ausgestrichen und anschließend bei 37° C über Nacht inkubiert.

### 2.2.2.2 Herstellung kompetenter Zellen für Elektroporation

Für die Herstellung kompetenter Bakterien impft man 5 ml einer ü. N. Bakterienvorkultur in 200-500 ml LB-Medium an und lässt die Bakterien bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 wachsen. Die Kultur wird für 15 min auf Eis gestellt und dann in kalte Röhrchen überführt und 15 min bei 5000 rpm und 4° C abzentrifugiert. Das Pellet wird in eiskaltem A. d. gewaschen, wie zuvor zentrifugiert und anschließend wird es in 10 ml kalter 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert und danach wie zuvor zentrifugiert. Das Pellet wird in 2 ml 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert, zu 50 µl aliquotiert und bei -80° C gelagert.

### 2.2.2.3 Transformation durch Elektroporation

Ursprünglich wurde die Methode der Elektroporation zum Einschleusen von DNA-Molekülen in eukaryotische Zellen entwickelt. Mittlerweile dient sie auch der Transformation von *E. coli* und anderen Bakterien (Dower *et al.*, 1988). Durch einen elektrischen Impuls wird ein erhöhtes Membranpotential ausgelöst, das eine gesteigerte Membranpermeabilität der Zelle bewirkt (Neumann u. Rosenheck, 1972). Somit können DNA und RNA-Moleküle in die Zelle diffundieren.

Für die Elektroporation werden 50 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA in gekühlten 0,2 cm Transformationsküvetten (Biorad, München) gemischt. Die Transformation erfolgt bei 2500 V, 14 µF und 200 Ohm (IBI geneZapper 450, Kodak).



#### 2.2.2.4 Transformation durch Hitzeschock

Bei dieser Art von Transformation wird die Ziel-DNA nicht wie bei der Elektroporation durch die kurzzeitig angelegte Spannung in die Bakterien eingebracht, sondern durch einen Hitzeschock.

50 µl der kompetenten Bakterien (DH5α, Epicurian XL1-Blue) werden auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligationsansatz oder mit 1 µl Plasmid-DNA gemischt und für 20-30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt der Hitzeschock bei 37° C (DH5α) bzw. 42° C (Epicurian XL1-Blue) für 42 Sekunden. Anschließend inkubiert man die Bakterienkultur für 2 min auf Eis, bevor jeweils 900 µl LB-Medium zugesetzt werden. Es folgt eine einstündige Inkubation bei 37° C und 225 rpm. Die Bakterien werden bei 3000 rpm pelletiert und der Überstand abgenommen. Dann wird das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf LB-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin ausplattiert. Die Inkubation bei 37° C sollte eine Dauer von 12-16 h nicht überschreiten. Die Rekombinanten werden aufgrund ihrer jeweiligen Resistenz von den Transformanten selektioniert und bilden einzelne Kolonien.

#### 2.2.2.5 Kultivierung der Bakterien

Zur Anreicherung der durch die Transformation entstandenen Kolonien werden diese in LB-Medium kultiviert. Dafür impft man einen Klon von der Agar-Platte in 5 ml LB-Medium an und lässt die Bakterienkultur über Nacht bei 37° C und 225 rpm schütteln. Anschließend kann die Plasmid-DNA, wie in Abschnitt 2.2.1.7 beschrieben, isoliert werden.

#### 2.2.2.6 Induktion und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Induktion: LB-Amp-Medium; NETN-Puffer, 1 mM IPTG

Aufreinigung: 10 mg/ml Lysozym, Glutathion-Sepharose

Für die Induktion rekombinanter Fusionsproteine wird der GST-Epressionsvektor pGEX-KG verwendet. Dieser Vektor enthält ein induzierbares *lacZ*-Operon, das in *E. coli* die Transkription des *lacZ*-Gens reguliert. Dieses kodiert für die β-Galaktosidase.

Durch die Zugabe des Galaktosederivats IPTG wird der *lac*-Promotor des Operons angeschaltet. Dem *lacZ*-Operon folgt die Sequenz des Enzyms Glutathion-S-Transferase (GST) im GST-Vektor. Dieses Enzym besitzt eine hohe Affinität zu seinem Substrat. Der GST-Sequenz folgt die Multiklonierungsstelle, in welche die cDNA des zu exprimierenden Proteins kloniert wird. Die Aktivierung des *lac*-Promotors bewirkt die Transkription der GST-cDNA zusammen mit der nachfolgenden neu klonierten DNA. Man erhält ein rekombinantes GST-Fusionsprotein.

Die Expression dieser Fusionsproteine erfolgt in DH5 $\alpha$ -Bakterien. Nach der Transformation wird der Klon in eine 5 ml LB-Amp Kultur angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Vorkultur wird zur Proteinexpression in bis zu 300 ml LB-Amp-Medium überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 kultiviert. In dieser logarithmischen Wachstumsphase erfolgt die zweistündige Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach der Induktion ist es wichtig, alle weiteren Schritte auf Eis durchzuführen, um einer Degradation des GST-Proteins entgegenzuwirken. Eine 100 ml Bakterienkultur wird bei 5000 rpm und 4° C zentrifugiert, das Pellet in 1 ml NETN-Puffer resuspendiert und anschließend bei -80° C gelagert.

Für die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wird das in NETN-Puffer resuspendierte Bakterienpellet auf Eis aufgetaut. Auch hier müssen alle Reaktionsschritte auf Eis und alle Zentrifugationsschritte bei 4° C durchgeführt werden, damit das Fusionsprotein nicht degradiert. Die Zugabe von 100  $\mu$ g/ml Lysozym bewirkt, dass die Zellmembran der Bakterien angedaut wird. Nach einer 30-minütigen Inkubation erfolgt eine Ultraschallbehandlung (10 Impulse bei 50% Leistung). Die unlösliche Proteinfraction (Pellet) wird in einem Zentrifugationsschritt von der löslichen Proteinfraction (Überstand) getrennt. Die Bindung des Sepharose-gekoppelten Glutathions an den GST-Abschnitt des Fusionsproteins erfolgt durch Zugabe von 25  $\mu$ l Glutathion-Sepharose bei einer Inkubation von 20-30 min auf dem Rollrad. Nach dieser Inkubation kann das an Sepharose gebundene Protein durch Zentrifugation pelletiert werden. Das Pellet wird 3-4 mal mit NETN-Puffer gewaschen, um mögliche Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend resuspendiert man das Pellet in 100  $\mu$ l NETN-Puffer und lagert es bei 4° C. Zur Überprüfung der erfolgreichen Induktion des Fusionsproteins wird ein Aliquot der Probe in einem Test-SDS-Gel aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung detektiert.

### **2.2.3 Arbeiten mit eukaryoten Zelllinien**

#### **2.2.3.1 Kultivierung der Zelllinien**

DMEM-Medium: DMEM, 2 mM Glutamin, 1% antibiotische Lösung, 10% FCS

RPMI-Medium: RPMI1640, 2 mM Glutamin, 1% antibiotische Lösung, 10% FCS

Die adhärennten Zelllinien 293, Cos1 und Cos7 werden in DMEM-Medium kultiviert. Adhärennte Zellen können durch enzymatischen Abbau mittels einer Trypsin/EDTA Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst werden. Dazu wäscht man die Zellen zuerst mit warmem, sterilem PBS und versetzt sie anschließend mit einigen Tropfen Trypsin/EDTA. Nach einer 1-3 minütigen Inkubationszeit bei 37° C lösen sich die Zellen ab. Es ist wichtig darauf zu achten, die Inkubationszeit nicht zu überschreiten, da sonst die Zellmembran angedaut werden kann, was sich in fehlender Adhärenz der Zellen widerspiegelt. Die Zellen werden mit Medium ab gespült und 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Anschließend werden sie in frischem Medium resuspendiert und die gewünschte Zellmenge in einer neuen Kulturflasche ausgesät.

Die Suspensionszellen Ba/F3 werden in RPMI-Medium kultiviert. Sie benötigen als Wachstumsfaktor murines IL-3 (0,2 ng/ml). Die Suspensionszellen werden alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:10 verdünnt und neues Medium wird zur weiteren Kultivierung zugeführt.

Die Zellen werden im Inkubator bei 37° C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **2.2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Einfriermedium 2-fach: 20% FCS; 80% DMSO

Zum Einfrieren von Zellen wird 1 Milliliter einer dichten Zellsuspension in ein Einfrierröhrchen pipettiert, anschließend mit 1 Milliliter Einfriermedium gemischt und sofort bei -80° C eingefroren. Nach ca. 12 h können die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen von Zellen, werden diese aus dem flüssigen Stickstoff genommen und sofort in ein 37° C-Wasserbad überführt. Nach dem Auftauen nimmt man die Zellen in

Kulturmedium auf und entfernt das DMSO in einem Zentrifugationsschritt. Das Zellpellet wird in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

### **2.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt in einer Neubauer-Zählkammer (Reichert, New York, USA). Dazu mischt man ein Aliquot der Zellsuspension mit einer 0,5%-igen Trypanblaulösung im Verhältnis 1:2. Anschließend zählt man die Zellen im Mikroskop im vorgegebenen Raster der Neubauer-Kammer. Der Farbstoff Trypanblau färbt tote Zellen und Zelltrümmer an, und somit können diese von den intakten, vitalen Zellen unterschieden werden. Man zählt die Zellen in den vier vorgegebenen Quadraten aus und ermittelt die Zellkonzentration, indem man die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor  $10^4$  multipliziert.

### **2.2.3.4 Transfektion von adhärennten Zellen**

293 Transfektionen: DOTAP® Transfektionsreagenz, 20 mM Hepes-Puffer  
Cos Transfektionen: GenePorter Transfektionsreagenz, DMEM ohne FCS

Es gibt verschiedene Möglichkeiten DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen, wie beispielsweise die Elektroporation, die Mikroinjektion oder die retrovirale Transfektion. Für die transiente Transfektion hat sich die Lipofektion als sehr effiziente und gut reproduzierbare Methode bewährt. Die negativ geladenen DNA Moleküle werden mit positiv geladenen Lipidmolekülen inkubiert und von diesen umschlossen. Die Aufnahme der DNA in das Zytoplasma erfolgt durch die Verschmelzung der DNA-Lipid-Komplexe mit der lipophilen Zellmembran.

Für die Transfektion von 293 Zellen eignet sich am besten das Transfektionsreagenz DOTAP, wohingegen Cos Zellen effizienter mit GenePorter transfiziert werden.

Am Vortag der Transfektion werden die Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag ca. 60-70% konfluent sind. Auf einer 10 cm Platte werden  $1 \times 10^6$  Zellen (293 oder Cos1), in kleineren Platten entsprechend weniger Zellen ausplattiert. Für die Mikroskopie eignen sich Cos7 Zellen besser als Cos1 Zellen. Cos1 und 7 Zellen werden mit GenePorter transfiziert. Dafür mischt man 12  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit 500  $\mu\text{l}$

serumfreiem Medium und 60 µl GenePorter mit je 500 µl serumfreiem Medium. Beide Ansätze werden gemischt und 30-45 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wird mit 4 ml serumfreiem Medium aufgefüllt, das Medium auf den zu transfizierenden Zellen abgenommen und durch das DNA-GenePorter-Gemisch ersetzt. Nach 3-5 h gibt man 5 ml 20%-iges Medium dazu. Die Angaben beziehen sich auf eine Transfektion von Zellen auf einer 10 cm Platte.

293 Zellen werden mit dem Transfektionsreagenz DOTAP® transfiziert. Sowohl die Plasmid-DNA (8 µg), als auch das Transfektionsreagenz DOTAP® werden mit 20 mM HEPES-Puffer (Endvolumen des DNA-Gemisches: 75 µl, Endvolumen des DOTAP®-Gemisches: 140 µl) versetzt. Die beiden Ansätze werden gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das Medium gegen neues, mit dem DNA-DOTAP®-Gemisch versetztes Medium, ausgetauscht. Die weitere Kultivierung erfolgt bei 37° C im Inkubator. 24 h nach der Transfektion wird das Medium erneuert, da die Reagenzien nach einer gewissen Zeit toxisch für die Zellen sind. Nach weiteren 24 h werden die Zellen abgeerntet. Für die Akt Aktivierungsassays müssen die Zellen vor dem Abernten gehungert werden, um die Grundlevels der Akt Aktivierung durch Serum möglichst gering zu halten. Dafür tauscht man das serumhaltige gegen serumfreies Medium aus und kultiviert die Zellen für mindestens weitere 6 h. Geerntet werden die Zellen, indem man das Medium entfernt und sie mit eiskalter PBS-Lösung abkratzt. Dann werden sie durch Zentrifugation pelletiert und anschließend bei -80° C bis zur weiteren Verwendung weggefroren.

### **2.2.3.5 Elektrotransformation von Suspensionszellen**

Wie bereits unter Punkt 2.2.2.3 beschrieben, können DNA und RNA-Moleküle durch einen elektrischen Impuls in die Zelle diffundieren, da ein erhöhtes Membranpotential ausgelöst wird, das eine gesteigerte Membranpermeabilität der Zelle bewirkt (Neumann u. Rosenheck, 1972).

Ba/F3 Zellen werden durch Elektroporation und anschließende Selektion stabil mit Plasmid-DNA transfiziert (Bai *et al.*, 1998). 5 Mio Zellen werden 2 mal mit kalter PBS-Lösung gewaschen und in 400 µl kalter PBS-Lösung resuspendiert. Anschließend überführt man die Zellen in eine kalte Elektroporationsküvette (0,4 cm, Biorad) und

versetzt sie mit 25 µg Plasmid-DNA. Die Zellen werden bei 250 Volt und 950 µF für 5 msec elektroporiert (IBI geneZapper 450/2500, Eastman Kodak, New Haven, USA). Danach inkubiert man die Zellen für 10 min auf Eis. Für die Weiterkultivierung werden die Zellen in 5 ml 10%-iges RPMI-Medium mit IL-3 überführt. Nach 48 h beginnt man mit der Selektion durch Zugabe von 1 mg/ml G418 (Calbiochem). Nach ungefähr 2 Wochen sind die Zellen selektioniert und beginnen zu wachsen. Für die weitere Kultivierung empfiehlt es sich, den Selektionsdruck beizubehalten.

## **2.2.4 Biologische Assays und Zellaufreinigungsmethoden**

### **2.2.4.1 Proliferations-Assay**

CellTiter 96 Proliferationskit (Promega, Mannheim)

Ba/F3 Zellen sind murine Pro-B-Zellen, die für Wachstum und Überleben IL-3 benötigen (Rodriguez-Tarduchy *et al.*, 1990). Nach Faktorentzug gehen die Zellen in Apoptose.

Die Proliferation von Ba/F3 Zellen, welche unter suboptimalen IL-3 Bedingungen kultiviert werden, wird mit einem Proliferationskit von Promega gemessen.

Viable Zellen sind in der Lage die Substanz MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sul-fophenyl)-2H-tetrazolium (CellTiter 96, Promega, Mannheim) in braunes Formazan umzuwandeln. Das in lebenden Zellen aktive Enzym Dehydrogenase sorgt für die Umwandlung von MTS in lösliches Formazan (Abb. 7). Die Absorption dieses Farbstoffes wird im Elisa Reader (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) bei 490 nm gemessen. Somit können viable von toten Zellen unterschieden werden.

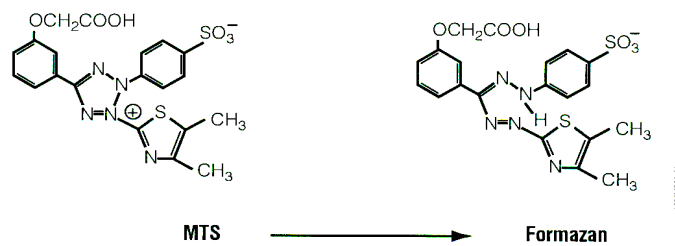


Abb. 7

**Struktur von MTS und Formazan**

Für die Proliferationsmessung werden Ba/F3 Zellen mit Grb10WT, Grb10FM und Leervektor elektroporiert und selektioniert wie im Abschnitt 2.2.3.5 beschrieben. In der Western-Blot Analyse wird die Expression der Proteine überprüft, um sicher zu gehen, dass alle Proteine gleich stark exprimiert werden. Die Zellen werden dreimal mit warmem PBS gewaschen und in Medium mit geringerer IL-3 Konzentration (0,1 ng/ml) in 96-Lochplatten kultiviert. Es werden  $1 \times 10^3$  Zellen in 200  $\mu$ l Medium pro Loch ausplattiert. Für die Messung der Proliferation ist es wichtig, Flachboden- und keine Rundbodenplatten, zu verwenden. Um die Proliferation zu messen, werden die Zellen mit 40  $\mu$ l MTS (10 mg/ml) für 2 h bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung bei 490 nm im Elisa Reader.

**2.2.4.2 Apoptose Messungen****2.2.4.2.1 AnnexinV/Propidiumiodid Messung**

Annexin-Puffer: 10 mM HEPES pH 7,4 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>  
AnnexinV-Fitc, 50  $\mu$ g/ml Propidium-Iodid

In normalen Zellen sind Phosphatidylserine (PS) auf der zytoplasmatischen Oberfläche der Zellmembran lokalisiert. Nach Induktion der Apoptose beginnen Zellveränderungen, wie z. B. die Präsentation der Phosphatidylserine, auf der Zelloberfläche. In einem *in vitro* Assay ist es möglich, diese PS durch Interaktion mit dem Anti-Koagulant AnnexinV, zu detektieren. Der Präsentation der PS an der Zelloberfläche folgt rasch der Zerfall des Nukleus, die DNA-Fragmentierung und das

Auftreten von typischen Apoptosemarkern. Somit misst die PS-Messung mit AnnexinV ein frühes Stadium der Apoptose.

Mit voranschreitender Apoptose wird die Zellmembran immer poröser und durchlässiger. Mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidium-Iodid (PI) kann der fortgeschrittene Apoptoseverlauf gemessen werden. Die Messung erfolgt in der *Fluorescence-activated cell sorter* (Facs) Analyse. Mit dieser Methode können Zellen bezüglich ihrer Größe, Granulation und Viabilität, unterschieden werden. Die Zellen werden einzeln durch einen Laserstrahl geleitet und können anhand der Zerstreuung des Lichts oder nach Färbung bestimmter Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff unterschieden werden.

Die Experimente werden mit IL-3 abhängigen Ba/F3 Zellen durchgeführt, da durch IL-3 Entzug Apoptose induziert werden kann. 5 Mio der Grb10 und der Vektor exprimierenden Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und in Medium ohne IL-3 für 36 h bzw. 60 h kultiviert. Für die AnnexinV/PI Messung werden  $1 \times 10^6$  Zellen/ml zentrifugiert, 2 mal mit PBS gewaschen und anschließend in 5 ml Annexinpuffer mit 5  $\mu$ l AnnexinV (Fitsc markiert) und 1  $\mu$ l PI versetzt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 4° C im Dunkeln können die Proben im Facs gemessen werden.

#### 2.2.4.2.2 Messung der DNA Fragmentierung

4% PFA/PBS

80% Ethanol

TBS-Puffer: 2,25 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA pH 8,0

Fluorescein-FragEL Kit, Oncogene

Eine weitere Möglichkeit Apoptose zu messen, bietet das *FragELä DNA Fragmentation Detection Kit* der Firma Oncogene (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden). Die fortschreitende Apoptose geht mit einer Fragmentierung der DNA einher. Das Enzym Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) bindet an die freien 3'-OH Enden fragmentierter DNA und katalysiert die Anheftung von Fluoreszeinmarkierten und unmarkierten Desoxynukleotiden (Bai *et al.*, 2000). Durch eine bestimmte Wellenlänge angeregt, kann die Emission des Fluoreszeins als intensives Lichtsignal in der Facs Analyse gemessen werden.



5 Mio Grb10 und als Kontrolle Vektor exprimierende Ba/F3 Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen, in Medium ohne IL-3 resuspendiert und bei 37° C für 26 h inkubiert. Um die Fragmentierung der DNA in den Zellen messen zu können, werden  $1 \times 10^6$  Zellen pelletiert und mit 4% PFA für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert und in 80%-igem Ethanol fixiert. Im fixierten Zustand können die Zellen entweder gleich weiterverarbeitet oder aber bei 4° C 2-6 Monate aufbewahrt werden. Für die Färbung werden die Zellen in Facs Röhrchen überführt und zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen 5 min bei 1200 rpm. Das Ethanol wird abgeschüttet und die Zellen werden in 500 µl 1x TBS-Puffer resuspendiert und bei RT 10-15 min inkubiert, anschließend erneut pelletiert und das TBS durch 100 µl Proteinase K/Tris pH 8,0 ersetzt. Es folgt eine Inkubation bei RT für maximal 5 min. Die Proteinase K Lösung wird nach Zentrifugation entfernt und das Zellpellet mit 100 µl 1x Equilibrierungspuffer für 10-30 min bei RT inkubiert. Es folgt die eigentliche Markierung: der Equilibrierungspuffer wird nach dem Zentrifugationsschritt entfernt und die Zellen werden in TdT Markierungsmix (57 µl *Fluorescein-FragEL<sup>®</sup> TdT Labeling Reaction Mix* mit 3 µl TdT Enzym) aufgenommen und bei 37° C für 1-1,5 h im Dunkeln inkubiert. Ein Ansatz wird nicht mit TdT Enzym versetzt und dient als Negativkontrolle. Die Zellen werden mehrmals mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend in der Facs Analyse gemessen.

#### 2.2.4.3 Fraktionierung von Zellen

Ernte-Puffer : 1x PBS-Puffer, 1 mM Iodoacetat, 0,1 mM PMSF, 0,1 mM Ortho-Vanadate  
Hypotoner Puffer: 5 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM Na-Pyrophosphat, 10 mM NaF, 1 mM Iodoacetat, 0,5 mM Ortho-Vanadate, 1 mM PMSF  
Kompensationspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 6,7, 0,95 M Sucrose, 0,1 M NaCl, 30 mM Na-Pyrophosphat, 100 µM NaF, 0,5 M Ortho-Vanadate, 0,025 mM ZnCl  
Lysis-Puffer  
SDS-Probenpuffer

Um die Lokalisation von Proteinen in der Zelle zu zeigen, werden Fraktionierungsexperimente durchgeführt. Es gibt mehrere Möglichkeiten, Zellkomponenten zu trennen, unter anderem Zellfraktionierung durch verschiedene Zentrifugationsschritte oder durch Dichte-Gradient Zentrifugation. In der Dichte-Gradient Zentrifugation wird die homogene Organellen-Fraktion in ein Röhrchen mit

einer Nicht-ionischen Substanz, wie z. B. Sucrose gefüllt. Während der Zentrifugation wandert jedes Organell an die Stelle, an der die Dichte des umgebenden Materials gleich der Dichte des Organells ist. Mit dieser Methode kann man das Endoplasmatische Reticulum (Dichte=1,2 g/cm<sup>3</sup>), Golgi Vesikel (Dichte=1,14 g/cm<sup>3</sup>) und die Plasma Membran (Dichte=1,12 g/cm<sup>3</sup>) voneinander trennen.

Die Fraktionierung durch verschiedene Zentrifugationsschritte erlaubt die Auftrennung der Zelle in Kern-, Membran- und Zytosolfraktion (Abb. 8).

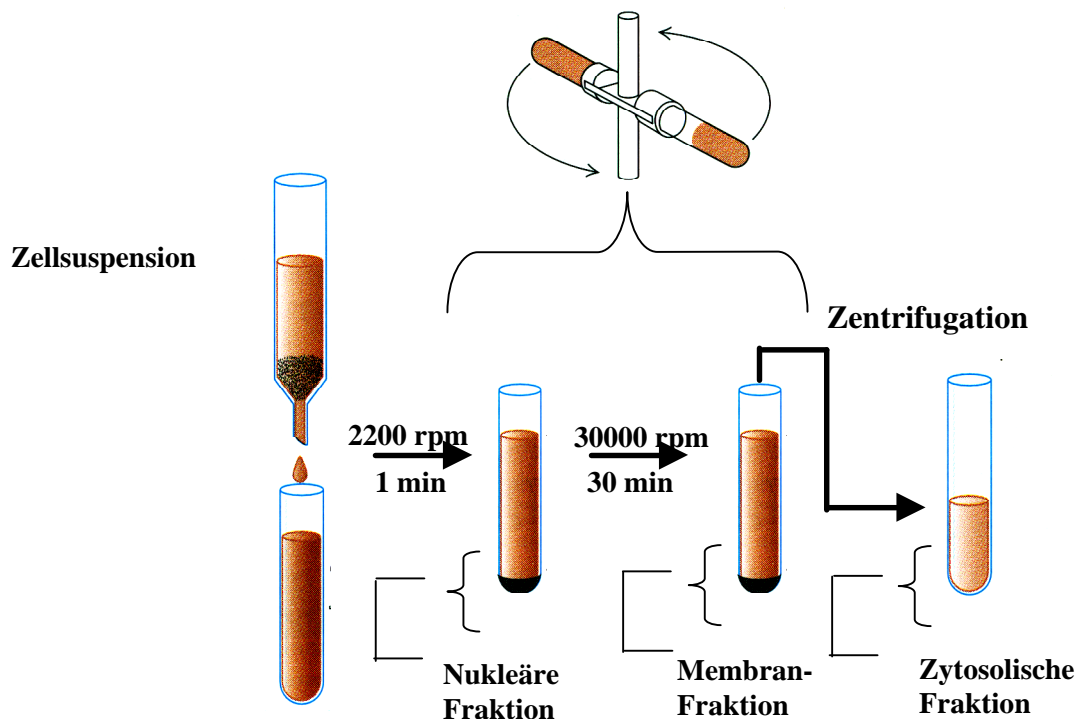


Abb. 8

Zellfraktionierung durch verschiedene Zentrifugationsschritte (nach Lodish *et al.*, 1999)

Um die Plasma Membran zu zerstören, werden die Zellen mit einem hypotonem Puffer behandelt (Chen *et al.*, 2000). Die Salzkonzentration in der Zelle ist höher als die des sie umgebenden hypotonen Puffers, so dass Wasser in die Zelle hinein diffundiert. Dieser osmotische Vorgang bewirkt, dass die Zelle anschwillt und sie leichter zum Platzen gebracht werden kann. Anschließend werden die Zellen mit Ultraschall

behandelt oder aber mit einem speziellen Homogenisator aufgebrochen. Die nachfolgenden Zentrifugationsschritte trennen Kern von Membran und Zytosol.

293 Zellen werden in 10 cm Platten ausgesät und am darauffolgenden Tag mit den DNA-Konstrukten transfiziert (Abschnitt 2.2.3.4). 48 h später werden die Zellen mit Ernte-Puffer von den Kulturschalen abgelöst und bei 1200 rpm, 4° C 5 min pelletiert. Alle folgenden Schritte müssen unbedingt auf Eis durchgeführt werden, damit eine Degradation der Proteine verhindert wird. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 8 Volumen hypotonem Puffer für 15 min inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit Ultraschall behandelt, bis ca. 90% der Zellen aufgebrochen sind (Analyse im Mikroskop). Durch Zugabe von 0,25 Volumen Kompensationspuffer erhält man eine isotone Zelllösung. Durch Zentrifugation bei 2200 rpm für 1 min pelletiert man die Kerne. Der Überstand wird abgenommen und in der Ultrazentrifuge bei 30000 rpm für 30 min zentrifugiert. Die Kerne werden in 1x Lysispuffer resuspendiert, mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und auf Eis gelagert. Mit dem Ultrazentrifugationsschritt trennt man Membran (Pellet) von zytosolischer (Überstand) Fraktion. Der Überstand, der das lösliche Zytoplasma enthält, wird abgenommen und mit der gleichen Menge von 2x SDS-Probenpuffer gemischt. Das Pellet mit der Membranfraktion wird in Lysis-Puffer resuspendiert und ebenfalls mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Kern-, Membran- und Zytosolfractionen werden durch Aufkochen bei 95° C denaturiert und in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Western-Blot Analyse detektiert die Proteine.

#### **2.2.4.3 Behandlung von Zellen mit Okadeinsäure**

Die Behandlung mit der Substanz Okadeinsäure bewirkt durch die Inhibition der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A eine 2,5- bis 3- fache Erhöhung der Phosphorylierung von Proteinen (Chiang *et al.*, 2001). PP1 wird bei einer Konzentration von 1 µM gehemmt und PP2A bei Konzentrationen im nM Bereich.

Cos1 Zellen werden in 60 mm Platten ausgesät und am nächsten Tag mit der GenePorter Methode transfiziert (Kapitel 2.2.3.4). Nach 48 h werden die Zellen mit Okadeinsäure (Roche, Mannheim) in den Konzentrationen 100 nM, 250 nM und 1 µM für 2 h bei 37° C inkubiert. Okadeinsäure wird in Ethanol gelöst, und deshalb werden die Kontrollzellen mit der entsprechenden Menge Ethanol behandelt. Die Zellen werden

nach der Inkubation mit eiskaltem PBS abgespült, zentrifugiert, lysiert und die Proteine in der Western-Blot Analyse ausgewertet.

Um den Zeitpunkt der Hyper-Phosphorylierung durch Okadeinsäure zu ermitteln, werden transfizierte Cos1 Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  OA behandelt und nach 20, 40, 60, 80 und 140 min geerntet und anschließend lysiert. Die Proteine werden in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western-Blot detektiert.

#### **2.2.4.4 Behandlung von Zellen mit Wortmannin**

Wortmannin ist ein spezifischer Inhibitor des PI-3 Kinase/Akt Signalweges (Yano *et al.*, 1993). Die Kinaseaktivität von PI3 Kinase und Akt wird blockiert und die unterhalb dieses Signalweges liegenden Effektormoleküle können nicht mehr phosphoryliert werden.

293 Zellen werden in 10 cm Platten ausgesät und mit der DOTAP<sup>®</sup>-Methode transient transfiziert. Nach 48 h werden die Zellen für 30 min mit serumfreiem Medium mit 1  $\mu\text{M}$  Wortmannin (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) bei 37° C inkubiert. Die Kontrollansätze werden mit der gleichen Menge DMSO behandelt. Anschließend werden die Zellen in eiskaltem PBS von den Platten abgespült, lysiert und es wird eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Die Präzipitate werden im SDS-Gel aufgetrennt und in der Western-Blot Analyse detektiert.

#### **2.2.4.5 Behandlung von Zellen mit Farnesylierungsinhibitor**

Mevinolat ist eine wichtige Komponente in der Cholesterol- und der Isoprenoidproduktion. Durch die Inhibition der Bildung von Mevinolat können Moleküle nicht mehr farnesyliert werden (Van de Donk *et al.*, 2002). Mevinolin oder auch Lovastatin ist ein irreversibler Inhibitor der HMG-CoA Reduktase und blockiert die Produktion von Mevinolat.

5 Mio stabil Grb10WT und Grb10FM exprimierende Ba/F3 Zellen werden mit 0,02 nM Mevinolin (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) für 8 h bei 37° C behandelt. Die Zellen werden nach der Behandlung geerntet und lysiert. Die Proteine werden in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Antikörpern im Western-Blot detektiert.

## 2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.5.1 SDS-Gelelektrophorese

SDS-Probenpuffer

SDS-Gelelektrophoresepuffer: 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,25 mM Glycin, 0,5% SDS

Sammelgel Puffer: 5% Polyacrylamid, 12,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,03% APS, 0,1% TEMED

Trenngel Puffer : 7%-12% Polyacrylamid, 0,375 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,03% APS, 0,1% TEMED

Das gebräuchlichste Verfahren zur Auftrennung eines Proteingemisches ist die SDS-PAGE. In der Regel hängt die Wandergeschwindigkeit von Molekülen im elektrischen Feld von ihrer Größe, ihrer Form und ihrer elektrischen Ladung ab. Bei der SDS-PAGE sorgt eine Vorbehandlung des Proteingemisches dafür, dass für die Wanderung nur noch die molekulare Masse der Proteine entscheidend ist. Erreicht wird dies durch den Zusatz von SDS, einem starken Detergens, welches komplexierte Proteine trennt und denaturiert. Dieser Effekt wird durch die Zugabe von Reduktionsmitteln verstärkt, welche Disulfidbrücken spalten. Die SDS-Moleküle lagern sich gleichmäßig an die denaturierten Proteine an und verleihen ihnen eine stark negative Ladung. Der Auftrennungsbereich der Proteine kann durch eine variierende Polyacrylamidkonzentration des Trenngels (5-20%) bestimmt werden. Höher konzentrierte Gele trennen besser kleinere und niedriger konzentrierte besser größere Proteine auf.

Für die Herstellung eines Polyacrylamidgels werden zwei saubere Glasplatten (Biometra, Göttingen) mit einem Dichtungsgummiband zusammengesetzt. Das Trenngel wird luftblasenfrei in die Gelvorrichtung pipettiert und mit 500 µl Methanol überschichtet. Nach ca. 20 min ist das Gel polymerisiert und das Methanol kann abgegossen werden. Das Sammelgel wird auf das Trenngel gegossen und der Kamm kann eingesetzt werden. Ist das Sammelgel polymerisiert, wird der Kamm wieder entfernt und das Gel in eine SDS-Elektrophoresekammer eingespannt. Das Gel wird mit SDS-Elektrophoresepuffer überschichtet. Dann kann man die aufgekochten und somit denaturierten Proteinproben in die Geltaschen auftragen und sie durch Anlegen einer Spannung (25-120 V) auftrennen.

Nach dem Lauf wird das Gel entweder auf eine PVDF-Membran transferiert, mit Coomassie gefärbt oder aber sofort auf ein Filterpapier gelegt und im Gelrockner 2 h bei 80° C getrocknet.

### **2.2.5.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen**

Coomassie-Färbelösung: 0,25% Coomassie-Blau, 45% Methanol, 10% Essigsäure  
Entfärbelösung: 45% Methanol, 10% Essigsäure

Mit der Coomassie-Färbung werden Proteine im SDS-Gel nachgewiesen. Nach dem Elektrophoreselauf wird das Gel in eine Färbeschale mit Coomassie-Färbelösung gelegt und ca. 30 min schüttelnd bei RT inkubiert. Die Färbelösung kann für mehrere Färbungen verwendet werden. Nach der Färbung erfolgt ebenfalls bei RT die Entfärbung.

### **2.2.5.3 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)**

Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl, 0,25 mM Glycin, 0,05% SDS, 20% Methanol, 3 mm Whatmanpapier, PVDF Membran (Millipore)

Diese Methode beruht darauf, elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus der Gelmatrix auf eine PVDF-Membran zu übertragen. Die Übertragung der Proteine erfolgt in einer *Wet-Blot*-Kammer der Firma Hoefer. Die Transfermembran wird auf die passende Größe zurechtgeschnitten und kurz in Methanol eingetaucht. Das SDS-Gel wird in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale möglichst luftblasenfrei auf die Membran gelegt und zwischen jeweils zwei Lagen Whatmanpapier und Schwämmchen in ein „Plastik-Sandwich“ eingespannt. Das „Sandwich“ wird zwischen die Elektrodenplatten der mit Transferpuffer gefüllten Transferkammer gehängt. Der Transfer erfolgt unter ständiger Kühlung bei 1000 mA. Die Dauer des Transfers hängt von der Größe des zu transferierenden Proteins ab.

#### 2.2.5.4 Amidoschwarz-Färbung der Transfermembran

Amidoschwarz-Färbelösung: 0,2% Naphtolblauschwarz, 25% Isopropanol, 10% Essigsäure  
Entfärbelösung: 25% Isopropanol, 10% Essigsäure

Die auf die Transfermembran transferierten Proteine können mit Amidoschwarz angefärbt werden. Die Transfermembran wird für 15 min bei RT in Amidoschwarz-Färbelösung gefärbt. Die Entfärbung erfolgt in der Entfärbelösung. Nach der Färbung kann die Transfermembran weiter für die immunchemische Detektion von Proteinen verwendet werden.

#### 2.2.5.5 Immunchemische Färbung von transferierten Proteinen

Blocking-Puffer: PBS mit 10% Trockenmilchpulver, 0,1% Tween, PBS mit 5% BSA, 0,1% Tween  
PBS-Tween-Puffer: 1x PBS-Puffer, 0,1% Tween  
Lumineszenz-Reagenzien (ECL, Amersham, Supersignal, Pierce)  
Hyperfilm ECL

Durch Antigen-spezifische Antikörper können transferierte Proteine in einem komplexen Proteingemisch nachgewiesen werden. Unmittelbar nach dem Transfer wäscht man die Membran kurz in PBS-Tween-Puffer und inkubiert sie anschließend 30 min bei 37° C in Blocking-Puffer. Dadurch werden, um eine Hintergrundfärbung zu vermeiden, unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran gesättigt. Antikörper gegen phosphorylierte Proteine werden, da viele Milchproteine stark phosphoryliert sind, in 5%-iger BSA-PBS-Tween Lösung angesetzt. Der erste Antikörper, der spezifisch gegen das Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, wird in BSA, bzw. Milch-PBS-Tween-Puffer angesetzt. Die Bindung des ersten Antikörpers erfolgt schüttelnd für mindestens 2 h bei RT oder ü. N. bei 4° C. Durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween-Puffer wird der ungebundene Erstantikörper beseitigt. Der zweite Antikörper ist HRP-konjugiert und gegen den F<sub>C</sub>-Teil des Erstantikörpers gerichtet. Die Inkubation des zweiten Antikörpers, der auch in Blocking-Puffer angesetzt wird, erfolgt bei RT für 30 min. Anschließend wird die Membran dreimal für je 10 min mit PBS-Tween, dann kurz mit PBS ohne Tween gewaschen, bevor die Membran dann zur Detektion der Proteine mit einer Chemilumineszenz-Substrat-Lösung inkubiert wird. Die Membran wird in eine Klarsichtfolie gelegt. Die Substrate der Lösung werden

durch die HRP an den Stellen umgesetzt, wo Erst- und Zweitantikörper jeweils spezifisch binden. Das erzeugte Signal wird auf einem Hyperfilm (Amersham, Braunschweig) dokumentiert.

#### **2.2.5.6 Entfernung des gebundenen Erstantikörpers von der Membran**

Amidoblack-Entfärbelösung

Um weitere Proteine auf einer bereits mit Antikörpern markierten Membran zu detektieren, wird die Membran *gestrippt*. Die Bindung des Erstantikörpers an das spezifische Protein lässt sich durch Amidoschwarz-Entfärbelösung aufheben. Die Membran wird dafür mit der Lösung für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Membran mehrmals mit A. d. und mit PBS-Tween-Puffer abgespült. Nun kann die Membran geblockt und mit einem neuen Antikörper inkubiert werden.

#### **2.2.5.7 Herstellung von Zelllysaten**

Lysis-Puffer mit Inhibitoren

Die Zellen werden geerntet, pelletiert und mit PBS-Lösung gewaschen. Das Zellpellet kann sofort weiterverarbeitet oder aber auch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden. Zum Lysieren der Zellen werden die Zellpellets in frischem Lysis-Puffer resuspendiert, 20 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend 30 min bei 14000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder mit der gleichen Menge an 2x SDS-Probenpuffer versetzt oder beispielsweise für Bindungsexperimente weiterverwendet.

#### **2.2.5.8 Immunpräzipitation**

Lysis-Puffer

Protein-A-Sepharose-Lösung

Unspezifisches Kaninchen-Antiserum ( $\text{R}\alpha\text{M}$ ), Spezifische monoklonale oder polyklonale Antikörper, Agarose-gekoppelter Antikörper



Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht darauf, aus einem Molekülgemisch, wie z. B. einem Zelllysate, unter Einsatz spezifischer Antikörper bestimmte Proteine zu isolieren (Duyster *et al.*, 1995). Liegen die Proteine *in vivo* mit anderen Proteinen komplexiert vor, können so auch Interaktionspartner identifiziert werden. Diese Methode bezeichnet man als Koimmunpräzipitation. Die eigentliche Präzipitation erfolgt durch die Adsorption der Antigen-Antikörper-Komplexe an Protein-A, das kovalent an Sepharose gekoppelt ist. Aufgrund der hohen Masse der Sepharose-*Beads* lassen sich die Komplexe schnell pelletieren und vom übrigen Lysat separieren.

Die Zellen werden mit kalter PBS-Lösung gewaschen und in Lysis-Puffer resuspendiert. Die Lyse erfolgt bei 4° C für 30 min. Die Zelltrümmer werden bei 14000 rpm 30 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wird mit Protein-A-Beads 30 min bei 4° C auf dem Rollrad inkubiert, um unspezifische Bindungen abzudecken. Nach dem sogenannten *Preclear* werden die Sepharose-Beads durch kurze Zentrifugation bei 14000 rpm aus dem Lysat entfernt und verworfen. Der Überstand wird mit jeweils 2 µg des spezifischen Antikörpers versetzt und unter Rotation bei 4° C für mindestens 2 h oder über Nacht inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wird die Hälfte des Lysates unter den gleichen Bedingungen mit 2 µg unspezifischem Kaninchen-Antiserum behandelt. Für die Präzipitation mit Agarose-gekoppelten Antikörpern wird das Lysat mit 10 µl Antikörper-*Beads* versetzt. Als Kontrolle dient hierbei ein mit Leervektor transfiziertes Zelllysate. Nach der Antikörperreaktion werden die Lysate mit 30 µl Protein A-Sepharose bei 4° C für 1 h unter Rotation inkubiert. Dieser Schritt entfällt bei der Präzipitation mit bereits an Agarose-gekoppelten Antikörpern. Die gebundenen Immunkomplexe werden bei 14000 rpm pelletiert und dreimal mit Lysis-Puffer gewaschen. Anschließend wird das Pellet mit 30 µl SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95° C für 10 min gekocht, um die präzipitierten Proteine zu denaturieren und sie von den Sepharose-*Beads* zu lösen. Nach einer kurzen Zentrifugation können die Immunkomplexe gelelektrophoretisch aufgetrennt werden.

### 2.2.5.9 Spezifische Hemmung der Phosphorylierung durch Phosphatase

Lysis-Puffer

Protein A-Sepharose Lösung

Unspezifisches Kaninchen-Antiserum (R&M)  
Spezifische monoklonale oder polyklonale Antikörper  
Phosphatase-Puffer: 50 mM Pipes pH 6,0, 1 mM DTT

Ein entscheidender Mechanismus in der Regulation von Proteinen ist die Anlagerung und die Entfernung von Phosphatgruppen. Protein Kinasen katalysieren die Phosphorylierung, Phosphatasen die Dephosphorylierung von Proteinen. Unspezifische saure Phosphatasen bauen Phosphatgruppen ab und wirken so auf den Phosphorylierungsstatus eines Proteins. In diesem Versuch soll gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus von Grb10 für die Interaktion mit 14-3-3 entscheidend ist.

Zuerst erfolgt eine Immunpräzipitation, wie in Abschnitt 2.2.5.8 beschrieben. Die präzipitierten Immunkomplexe werden dreimal mit Lysis-Puffer und anschließend dreimal mit Phosphatase-Puffer gewaschen. Die Pellets werden in 50 µl Phosphatase-Puffer aufgenommen, mit 0,4 Units Phosphatase (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) versetzt und bei 30° C 5 min bzw. 10 min lang inkubiert. Als Kontrolle wird ein Ansatz ohne Phosphatase und ein weiterer Ansatz mit Phosphatase und mit Phosphatase-Inhibitoren (1 mM NaF, 1mM Ortho-Vanadate, 1mM Glycerolphosphat) versetzt. Die Pellets werden dreimal mit Phosphatase-Puffer gewaschen, in 30 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### **2.2.5.10 *In vitro* Translation von Proteinen**

Proteine können im zellfreien System in Gegenwart von RNA-Polymerase, Aminosäuren und zirkulärer Plasmid-DNA translatiert werden. Durch Zugabe von <sup>35</sup>S-Methionin können diese radioaktiv markiert werden. Die dafür geeigneten Vektoren besitzen einen T3, T7 oder einen SP6-Promotor (z. B. PCMV oder PCZeo). Unter Verwendung des „T3/T7 TNT Reticulocytan Lysat System“ erfolgt die *in vitro* Translation nach Angaben des Herstellers.

Pipettierschema:

TNT-Reaktionspuffer	2 $\mu$ l
Aminosäure-Mix ohne Methionin	1 $\mu$ l
Rnase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
T3 bzw. T7 Polymerase	1 $\mu$ l
Plasmid DNA	1 $\mu$ g
<sup>35</sup> S-Methionin (5 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)	4 $\mu$ l
TNT Rabbit Reticulocytenlysat	25 $\mu$ l, A. d. 50 $\mu$ l

Der Ansatz wird bei 30° C für 1 h inkubiert. Anschließend wird ein 5  $\mu$ l Aliquot des Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine autoradiographisch dargestellt.

#### 2.2.5.11 Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteinen

Glutathion-Sepharose  
NETN-Puffer  
Lysis-Puffer

Bindungsassays mit GST-Fusionsproteinen weisen das Bindungsverhalten von Proteinen nach. Es können entweder Zelllysate oder radioaktiv markierte Proteine untersucht werden. Dabei wird das Volumen von *in vitro* translatierten Proteinen auf 500  $\mu$ l mit Lysis-Puffer aufgefüllt.

Die Zelllysate werden mit 30  $\mu$ l Glutathion-Sepharose 30 min bei 4° C vorbehandelt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Anschließend wird das Lysat mit zuvor aufgereinigtem GST-Fusionsprotein (Abschnitt 2.2.2.6) für 1-3 h bei 4° C unter Rotation inkubiert. Als Negativkontrolle dient eine vergleichbare Menge an GST. Der Bindung folgt ein dreimaliger Waschschrift mit NETN-Puffer. Das Pellet wird mit 30  $\mu$ l SDS-Probenpuffer versetzt und die Proteine anschließend gekocht und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die gebundenen Proteine werden entweder in der Western-Blot Analyse nachgewiesen oder, im Falle der radioaktiv markierten Proteine, autoradiograph dargestellt.

### 2.2.5.12 *In vitro* Kinasierung

[ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP (Amersham, Braunschweig)

Kinase-Puffer: 20 mM MOPS pH 7,2, 25 mM Glycerolphosphat, 5 mM EGTA, 1 mM Orthovanadate, 1 mM DTT

$\gamma$ -ATP-Mix: 75 mM MgCl<sub>2</sub>, 500  $\mu$ M ATP, 1  $\mu$ Ci/ $\mu$ l [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP

Wie bereits in Abschnitt 2.2.5.9 beschrieben, herrscht in Zellen ein Gleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen. Kinasen sind in der Lage, in einer katalytischen Reaktion Phosphatgruppen an Proteine anzulagern. Diese Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung, was wiederum die spezifische Interaktion mit Liganden fördert oder die Aktivität eines Proteins beeinflusst. Um eine Phosphorylierung im *in vitro* Assay zu verdeutlichen, wird der Reaktion radioaktives [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP zugesetzt. In der anschließenden Autoradiographie lässt sich der Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat visualisieren.

GST-Grb10 wird in *E. coli* induziert und durch Bindung an Sepharose-gekoppeltes Glutathion präzipitiert (Abschnitt 2.2.2.6). Das GST-Fusionsprotein wird dreimal mit NETN-Puffer und anschließend zweimal mit Kinase-Puffer gewaschen. Für die Kinasereaktion wird das GST-Pellet in 30  $\mu$ l Kinase-Puffer resuspendiert. Anschließend werden 1  $\mu$ l aktive Akt Kinase, 9  $\mu$ l Kinase-Puffer und 10  $\mu$ l  $\gamma$ -ATP-Mix (alle Substanzen von: Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) zugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 30° C für 30 min schüttelnd inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wird inaktive Akt Kinase pipettiert. Als Positiv-Kontrolle werden 15  $\mu$ l Bad (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) zusammen mit aktiver Akt Kinase inkubiert. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 25  $\mu$ l SDS-Puffer terminiert. Die Proben werden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das SDS-Gel wird mit Coomassie gefärbt und anschließend getrocknet. Der Einbau von  $^{32}$ P wird durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

### 2.2.5.13 Indirekte Immunfluoreszenz

PBS-Puffer

3,7%-iges PFA

Methanol

Goat Serum

Monoklonale oder Polyklonale Erstantikörper, Fluorochrom markierte Zweitantikörper

Mit der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich Proteine mit Fluoreszenz-Farbstoffen markieren (Jahn *et al.*, 2001 und 2001). Das markierte Protein kann im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dabei wird das Fluorochrom mit kurzwelliger Strahlung angeregt und das längerwellige emittierte Licht wird registriert.

Diese Methode eignet sich besonders um die Lokalisation von Proteinen in intakten Zellen zu definieren, aber auch um Interaktionen von mehreren Proteinen darzustellen. Hierbei werden die verschiedenen Proteine mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert und die Aufnahmen überlagert.

Um die Lokalisation von Grb10 und die Interaktion von Grb10 und 14-3-3 in morphologisch intakten Zellen darzustellen, werden Cos7 Zellen auf Objektträgern (Lab Tek II Chamber Slide, Nunc, Naperville IL, USA) ausplattiert und, wie unter 2.2.3.4 beschrieben, mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert. Nach 48 h werden die Zellen mehrmals gründlich mit PBS gewaschen, um den Hintergrund durch Zellfragmente möglichst gering zu halten. Anschließend werden die Zellen mit 3,7%-igem PFA für 10 min bei RT fixiert. Die fixierten Zellen werden erneut mit PBS gewaschen und in einer zweiminütigen Behandlung mit Methanol permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung spült man die Objektträger mit PBS und blockt die unspezifischen Bindungen durch Inkubation mit *Goat* Serum für 1 h bei RT. Der Erstantikörper oder die Mischung aus zwei Antikörpern (Anti-Maus und Anti-Kaninchen) werden in *Goat* Serum angesetzt. Die Antikörperreaktion erfolgt leicht schüttelnd bei RT für 2 h oder bei 4° C über Nacht. Die Objektträger werden mit PBS gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Der oder die Zweitantikörper sind Fluorochrom markiert und werden ebenfalls in *Goat* Serum verdünnt und für 1 h bei RT auf die Zellen gegeben. Die Reaktion mit dem Zweitantikörper muss abgedunkelt stattfinden, damit die Fluorochrome nicht an Farbtintensität verlieren. Vor dem Eindecken der Objektträger werden diese erneut mit PBS gewaschen. Die Objektträger können abgedunkelt bei 4° C aufbewahrt werden. Unter Einsatz eines Fluoreszenzmikroskops lassen sich grün-fluoreszierende (FITC) Proteine bei einer Wellenlänge von 475 nm und rot-fluoreszierende (Texas Red) Proteine bei einer Wellenlänge von 580 nm anregen und visualisieren.

## 2.2.6 Das *Yeast-Two-Hybrid* System

### 2.2.6.1 Arbeitsschema

Diese Technik ermöglicht es, Protein-Protein-Interaktionen in einem eukaryotischen System zu untersuchen (Fields u. Song, 1998).

Der Transkriptionsfaktor Gal4 der Hefe *Saccharomyces Cerevisiae* enthält zwei unterschiedliche Domänen, eine DNA-bindende Domäne und eine transaktivierende Domäne. Mit der N-terminalen, DNA-bindenden Domäne erkennt der Transkriptionsfaktor eine spezifische DNA-Sequenz im Genom. Die zweite, C-terminale Domäne, bewirkt die Initiation der Transkription. Die beiden Domänen arbeiten unabhängig voneinander, sind aber alleine nicht in der Lage, die Transkription einzuleiten.

Zuerst wird die DNA-bindende Domäne mit der cDNA eines Proteins fusioniert und die transaktivierende Domäne mit der cDNA eines zweiten Proteins. Dann werden beide Konstrukte in Hefen kotransfiziert. Interagieren die beiden Proteine miteinander, so werden die beiden Domänen in räumliche Nähe gebracht und die Transkription eines Reportergens wird initiiert (Fields u. Song, 1989). In vielen Fällen codiert das Reportergen für die Aminosäure Histidin. Daher können nach der Aktivierung der Transkription die Hefen auf Histidin-freiem Nährmedium wachsen (Abb. 9). Interagierende Moleküle der cDNA Bibliothek können in Hefen auf Histidin-freien Nährböden selektioniert und kloniert werden.

Mit dem *Yeast-Two-Hybrid* System sollen neue Interaktionspartner von Grb10 identifiziert werden.

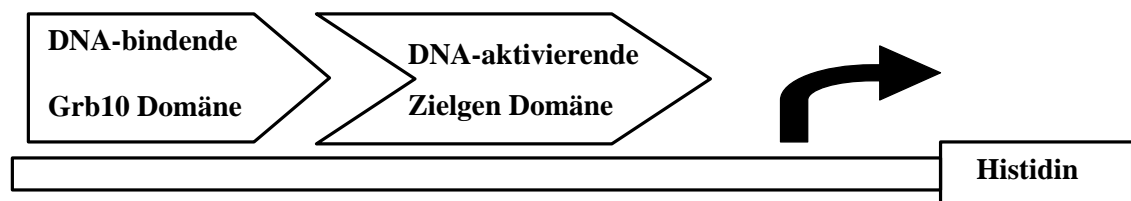


Abb. 9

Schematische Darstellung des *Yeast-Two-Hybrid* Systems

### 2.2.6.2 Verwendeter Hefe-Stamm, Plasmide und cDNA Bibliotheken

Das zu untersuchende Gen (Grb10) wird an die LexA-Sequenz in den Vektor BTM116 fusioniert. Grb10 wird dafür *BamHI/XhoI* geschnitten und in den *BamHI/SalI* geschnittenen Vektor BTM116 subkloniert. Bei der verwendeten cDNA Bibliothek handelt es sich um die CML-Zelllinie K562, welche in den Hefevektor pACT2 (Clontech, Heidelberg) kloniert ist. Der verwendete Hefestamm ist *Saccharomyces Cerevisiae* L40.

### 2.2.6.3 Herstellung von kompetenten Hefen und Transformation

YPD-Medium: 1% *Yeast Extract*, 2% Bacto Peptone in A. d. pH 5,8, 50 µg/ml Ampicillin, 12,5 µg/ml Tetracyclin, 2% Dextrose

YPD-Platten: YPD-Medium mit 1,6% Bacto Agar

TE-Puffer 10x: 0,1 M Tris/HCl, 10 mM EDTA in A. d.

LiAc 10x: 1 M Lithiumacetat, autoklaviert

50% PEG 4000 autoklaviert

PEG/TE/LiAc-Lösung : 112 ml 50% PEG, 14 ml 10x TE-Puffer, 14 ml 10x LiAc

Eine einzelne Hefe-Kolonie wird von einer YPD-Platte abgenommen und in 20 ml YPD-Medium bei 30° C über Nacht geschüttelt. Die Hefekultur wird auf 300 ml YPD-Medium aufgefüllt und erneut bei 30° C schüttelnd inkubiert. Bei Erreichen der  $OD_{600nm} = 0,6$  werden die Zellen bei 2300 rpm für 5 min bei RT pelletiert und anschließend in 50 ml A. d. gewaschen. Das Hefepellet wird in 1,5 ml TE/LiAc-Lösung resuspendiert.

In einem Reaktionsgefäß werden 100 µg Lachssperma-DNA (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) zusammen mit 0,1 µg der Plasmid-DNA und 100 µl Hefe-Suspension gemischt. Nach Zugabe von 0,6 ml PEG/TE/LiAc-Lösung wird der Ansatz gevortext. Anschließend erfolgt eine 30-minütige Inkubation bei 30° C und 100 rpm. Nach Zugabe von 70 µl DMSO erfolgt der Hitzeschock bei 42° C für 15 min. Die Zellen werden nach dem Hitzeschock sofort auf Eis inkubiert und anschließend bei 10000 rpm 5 sec zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 µl A. d. resuspendiert und auf Platten ausgestrichen.

#### 2.2.6.4 Kotransformation

SD-Medium: 6,7% *Yeast Nitrogen Base* in A. d. pH 5,8

SD-Platten: SD-Medium mit 1,6% Bacto Agar

YPD-Medium

-THULL-Platten: Dropout-Lösung ohne Tryptophan, Leucin, Histidin, Lysin und Uracil mit 1,6% Bacto-Agar

Die Hefe (L40) wird mit pBTM116-Grb10 durch Hitzeschock transformiert und auf eine SD-Platte (-T) ausplattiert. Eine Einzelkolonie wird in 5 ml YPD-Medium vermehrt und nach zwei Verdünnungsschritten in 1000 ml bei 30° C kultiviert. Die anschließende Kotransformation erfolgt mit 100 µg der cDNA Bibliothek und 20 mg Lachssperma-DNA. Die Hefen werden auf ca. 80 Platten (-THULL) und einer Platte (-TL) ausplattiert und bei 30° C für 3-4 Tage inkubiert. Das Wachstum auf der -TL-Platte zeigt die Transformationseffizienz.

#### 2.2.6.5 DNA-Isolierung aus Hefen

Dropout-Lösung: L-Adeninhemisulfatsalz 200 mg/l, Arginin HCl 200 mg/l, L-Histidin HCl Monohydrat 200 mg/l, L-Isoleucin 300 mg/l, L-Leucin 1000 mg/l, L-Lysin HCl 300 mg/l, L-Methionin 200 mg/l, L-Phenylalanin 500 mg/l, L-Threonin 2000 mg/l, L-Tryptophan 200 mg/l, L-Tyrosin 300 mg/l, L-Uracil 200 mg/l, L-Valin 1500 mg/l

Dropout-Lösung (-TL): ohne Tryptophan

Dropout-Lösung (-THULL): ohne Tryptophan, Leucin, Histidin, Lysin und Uracil

Hefe-Lysis-Puffer: 2% TritonX-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

Die Kolonien der Platten (-THULL) werden in 5 ml Dropout-Medium (-THULL) bei 30° C über Nacht kultiviert. Die Kultur wird bei 2500 rpm 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wird in 0,2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,2 ml Hefe-Lysis-Puffer resuspendiert und mit 0,3 g Glass-Beads (Sigma) versetzt. Der Ansatz wird 2 min stark gevortext und anschließend bei 14000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und mit 0,1 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wird zweimal mit 70%-igem EtOH gewaschen, anschließend bei RT luftgetrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.



#### 2.2.6.6 Transformation von DNA in *E. coli*

M9-Lösung (5x): 6,4% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 1,5% KPO<sub>4</sub>, 0,25% NaCl, 0,5% NH<sub>4</sub>Cl in A. d.

M9-Platten: M9-Medium mit 1,6% Bacto Agar

40 µl des kompetenten *E. coli* Stammes (Hb101, *Leu*<sup>-</sup>) werden auf Eis aufgetaut und mit 0,1 µg der Hefe-DNA gemischt. Die Elektroporation erfolgt bei 2500 Volt, 21 µF und 200 Ω. Anschließend werden sofort 500 µl LB-Medium zugegeben. Es erfolgt eine Inkubation bei 37° C für 1 h. Die Bakterien werden kurz abzentrifugiert, zweimal mit M9-Medium gewaschen und auf M9-Platten ausplattiert. Die Bebrütungsdauer liegt bei 2-3 Tagen. Da der verwendete *E. coli* Stamm Leucin-defizient ist, können erfolgreich mit dem pAKT2-Leu-Vektor transformierte Klone selektioniert werden. Einzelkolonien werden in 5 ml LB-Medium vermehrt und die Plasmid-DNA präpariert.

#### 2.2.6.7 Rücktransformation von DNA in Hefen

Um die spezifische Interaktion zwischen Köder-Protein (Grb10) und Ziel-Protein nachzuweisen, erfolgt eine Kontrolle mit dem unspezifischen Oberflächenprotein Lamin. Dabei wird die Plasmid-DNA des zu untersuchenden Klons in Hefe rücktransformiert, die bereits mit Lamin-DNA transfiziert ist. Die transformierten Hefen werden auf -TL und -THULL Platten ausgestrichen. Das Wachstum auf -THULL Platten bedeutet eine Interaktion zwischen Lamin und dem Protein aus der cDNA Bibliothek. Daraus lässt sich schließen, dass die Interaktion zwischen dem neuen Protein und dem Köder-Protein (Grb10) unspezifisch ist.

#### 2.2.6.8 Sequenzierung und Subklonierung der im *Yeast-Two-Hybrid* identifizierten cDNAs

Die DNA der spezifisch mit Grb10 interagierenden Klone wird isoliert und präpariert. Sie wird mit einem pACT2 *forward* und einem pACT2 *reverse* Primer der Firma GATC sequenziert und die Sequenzen werden mit dem NCBI-Blast Search analysiert.

Die cDNAs werden im richtigen Leseraster in den GST-Fusionsvektor pGEX KG subkloniert und die Interaktion näher analysiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Konstitutive Lokalisation von Grb10 an die Zellmembran

Die konstitutive Membranlokalisierung von Akt erzielt im Vergleich zu AktWT einen bis zu 60-fach erhöhten Anstieg der Aktivierung von Akt (Andjelkovic *et al.*, 1997). Dies bedeutet, dass die Lokalisation von Akt an die Zellmembran entscheidend für die Phosphorylierung und die Aktivierung von Akt ist. Grb10 dient möglicherweise als Vehikel für Akt und rekrutiert zusammen mit Akt im Komplex an die Membran. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die 20 Aminosäuren lange Ras-Farnesylierungssequenz an das C-terminale Ende von Grb10 fusioniert. Die Ras-Farnesylierungssequenz lokalisiert Proteine konstitutiv an die Zellmembran (Chen *et al.*, 2000). Durch die Fusion dieser Farnesylierungssequenz sollte ein Grb10 Konstrukt kloniert werden, das konstitutiv an die Membran lokalisiert. Die Farnesylierungssequenz wurde in einer Drei-Schritt PCR an Grb10 fusioniert (Abb. 6). Als Matrize diente die cDNA von Grb10WT im pCMV-Flag Vektor.

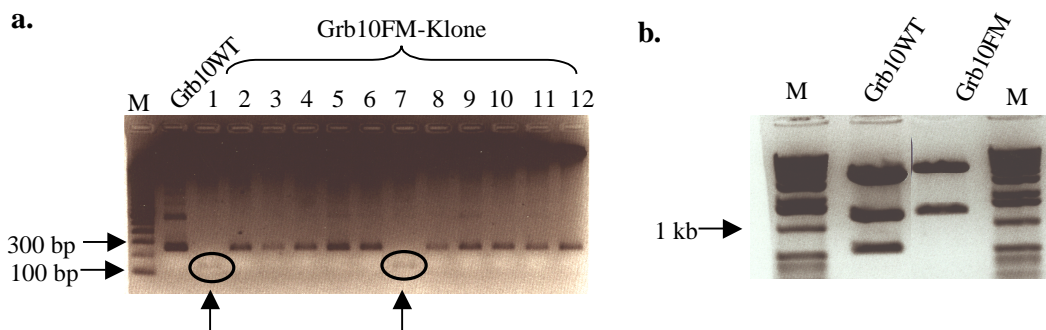


Abb. 10

##### a. Analyse von 12 Grb10FM Klonen

Die Grb10FM Klonen wurden nach der PCR in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Pfeile markieren die Grb10FM Klonen (Nr. 1+7), bei denen das Fragment mit der richtigen Größe erscheint. M= 100 bp Marker

##### b. *EcoRI* Restriktion von Grb10FM im Vergleich zu Grb10WT

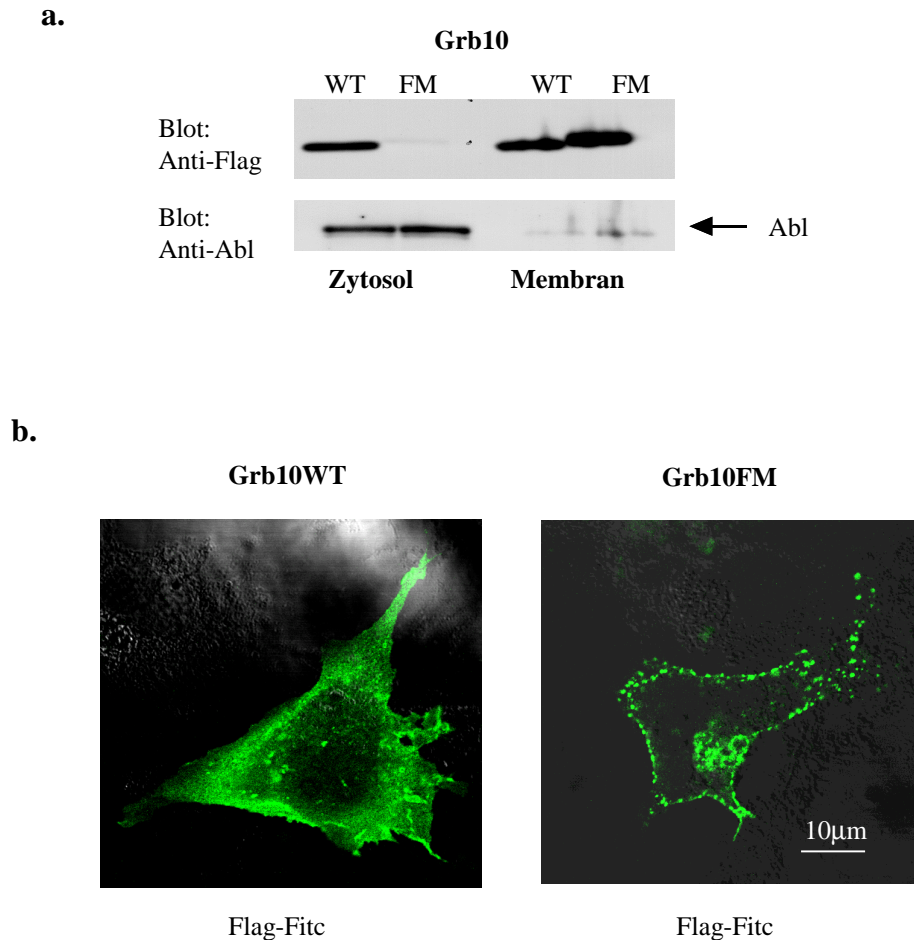
Grb10WT und ein Grb10FM Klon wurden *EcoRI* geschnitten und im Agarose-Gel aufgetrennt. Die Fusion der Ras-Farnesylierungssequenz an Grb10WT eliminierte eine *EcoRI* Schnittstelle. Aus diesem Grund wurde Grb10WT nach Restriktion in drei und Grb10FM in nur zwei Fragmente gespalten. M= 1 kb Marker

Zwölf Klone wurden untersucht (Abb. 10a). Als Kontrolle diente Grb10WT geschnitten mit den Enzymen *SalI/HindIII*. Die Proben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und das Ergebnis zeigt, dass zwei der zwölf Klone das gewünschte 100 bp Fragment aufwiesen, das heißt, dass ausschließlich bei diesen beiden Klonen die PCR erfolgreich war. Einer der beiden positiven Klone wurde mit *EcoRI* geschnitten, da eine *EcoRI* Schnittstelle durch die Fusion der Ras-Farnesylierungssequenz eliminiert worden war (Abb. 10b). Grb10WT zerfiel nach *EcoRI* Restriktion in drei Grb10 Farnesylierungsmutante (FM) hingegen nur in zwei Fragmente (Abb. 10b). Dieser Klon wurde sequenziert, um die fehlerfreie Aminosäureabfolge der Ras-Farnesylierungssequenz zu überprüfen.

### 3.1.2 Überprüfung der Funktionalität des farnesylierten Grb10 Konstrukts

Zwei verschiedene Ansätze sollten die Membranlokalisierung des farnesylierten Grb10 Konstrukts zeigen. Zum einen wurden Fraktionierungsexperimente durchgeführt, die es ermöglichen Zellmembranfraktionen vom Zytosol zu trennen. In Abbildung 12a ist das Ergebnis der Fraktionierung gezeigt. Das Grb10WT Konstrukt oder die Grb10FM wurden in 293 Zellen exprimiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und wie bereits in Material und Methoden Kapitel 2.2.4.3 beschrieben lysiert und fraktioniert. Die Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot mit den angegebenen Antikörpern nachgewiesen. Grb10WT war gleichermaßen in der zytosolischen und in der Membran Fraktion detektierbar. Die Lokalisation von Grb10FM war fast ausschließlich membranär und nur zu einem geringen Anteil zytosolisch (Abb. 11a, oberes Bild). Durch die Fusion der Ras-Farnesylierungssequenz vergrößerte sich das Grb10FM Konstrukt. Um die erfolgreiche Fraktionierung zu kontrollieren, wurde der Western-Blot zusätzlich mit einem Antikörper gegen das endogene Protein Abl inkubiert, welches vorwiegend im Zytosol lokalisiert ist (Abb. 11a, unteres Bild). Sowohl in der Grb10WT als auch in der Grb10FM Fraktion konnten gleiche Mengen von Abl nachgewiesen werden, was zeigt, dass gleiche Mengen an Protein auf das SDS Gel geladen wurden. Das Fraktionierungsergebnis deutet darauf

hin, dass die Fusion von Grb10 mit der Farnesylierungssequenz Grb10 konstitutiv an die Zellmembran lokalisierte.



**Abb. 11**

**Grb10 Farnesylierungsmutante ist konstitutiv an der Zellmembran lokalisiert**

**a:** 293 Zellen wurden transient mit Grb10WT und Grb10FM transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet. Durch mehrere Zentrifugationsschritte wurden Zytosol und Membranfraktion voneinander getrennt und im SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden im Western-Blot mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

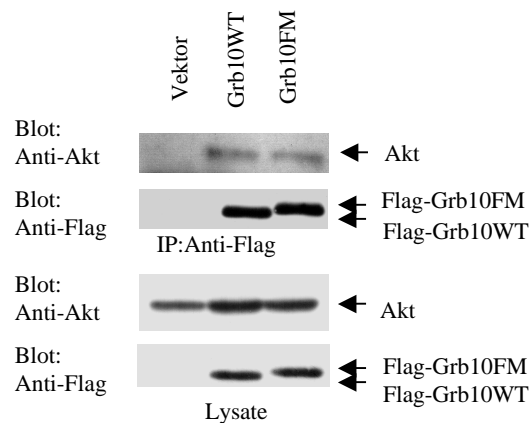
**b:** Grb10WT und Grb10FM wurden transient in Cos7 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden auf Objektträgern fixiert und durch indirekte Immunfluoreszenz visualisiert. Die konfokalen Mikroskopieaufnahmen zeigen links die zytosolische Verteilung von Grb10WT und rechts die membranäre Verteilung von Grb10FM in intakten Zellen.

Zum anderen wurde die Technik der indirekten Immunfluoreszenz angewendet. Hierbei wurden Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transient transfiziert und auf Objektträgern fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem ersten nicht markierten Grb10-Antikörper inkubiert. Da die käuflich erwerblichen Antikörper gegen Grb10 von schlechter Qualität waren, wurden Grb10WT und Grb10FM in den pCMV Vektor kloniert, der am N-terminalen Ende ein Flag-Epitop besitzt. Ein Anti-Flag Antikörper ermöglichte die erfolgreiche Detektion der Proteine mit Flag-Epitop. Außerdem wurden so ausschließlich die überexprimierten, hingegen nicht die endogenen Proteine detektiert. Um die Proteine im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurde ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper ausgewählt, der gegen das Epitop des ersten Antikörpers gerichtet war. Jedes Fluorochrom kann mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Das angeregte Fluorochrom emittiert seinerseits eine bestimmte Wellenlänge. Diese wird durch Umleitung durch verschiedene Filter sichtbar gemacht. Für die Detektion von Grb10 wurde ein FITC markierter Zweit-Antikörper verwendet. Um die Membranlokalisierung des farnesylierten Grb10 nachzuweisen, wurden die fluoreszierenden Zellen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, Zellen in verschiedene Ebenen darzustellen. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie. Die Verteilung von Grb10 in intakten Zellen ist in Abbildung 11b als grüne Fluoreszenz zu sehen. Entsprechend den Fraktionierungsdaten bestätigten die Fluoreszenzdaten eine zytosolische Verteilung von Grb10WT (Abb. 11b, linkes Bild). Grb10FM war hingegen komplett an der Zellmembran lokalisiert und nicht mehr im Zytosol nachweisbar (Abb. 11b, rechtes Bild). Die Fraktionierungsdaten und auch die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz bestätigten damit, dass nach Fusion von Grb10 mit der Ras-Farnesylierungssequenz Grb10 nunmehr ausschließlich an der Zellmembran lokalisiert war. Dies war Voraussetzung für die folgenden Untersuchungen, welche die spezifische Rolle von Grb10 für die Aktivierung von Akt aufklären sollten.

### 3.2 Interaktion von Grb10FM und Akt

Um die spezifische Interaktion zwischen Akt und dem neuen Grb10FM Konstrukt *in vivo* nachzuweisen, wurden Koimmunpräzitationsstudien durchgeführt. Diese sollten zeigen, dass die Fusion der Ras-Farnesylierungssequenz an Grb10 keine Behinderung für die Interaktion der beiden Proteine darstellte.

Grb10WT bzw. Grb10FM wurden zusammen mit Akt in Cos1 Zellen koexprimiert. Als Kontrolle wurde Akt zusammen mit Leervektor transfiziert. Nach Herstellung der Zelllysate wurde Flag-Grb10 mit einem agarosegekoppelten monoklonalen Anti-Flag Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden denaturiert und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Wie die Western Blot Analyse im oberen Teil der Abbildung 12 zeigt, koimmunpräzipitierten sowohl Grb10WT, als auch Grb10FM mit Akt. Es wurde keine unspezifische Interaktion von Akt mit der Vektorkontrolle nachgewiesen (Abb. 12, obere Abbildung, Spur 1). Das mittlere Bild in Abbildung 12 zeigt die vergleichbaren Mengen an immunpräzipitiertem Flag-gekoppeltem Grb10WT und Grb10FM. Im unteren Teil der Abbildung 12 sind die Expressionsniveaus von Grb10WT und Grb10FM, bzw. von Akt dargestellt.



**Abb. 12**

#### Koimmunpräzitation von Grb10WT und Grb10FM mit Akt in transfizierten Cos1 Zellen

**Cos1 Zellen wurden mit insgesamt 8 mg pCMV-Flag Grb10WT oder pCMV-Flag Grb10FM zusammen mit pCMV6-HA Akt kotransfiziert und nach 48 h lysiert. Die Immunkomplexe wurden mit 10 ml Agarose-gekoppeltem monoklonalem Anti-Flag Antikörper präzipitiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinkomplexe wurden im Western-Blot mit einem Akt-Antikörper und einem Flag-Antikörper (M2) nachgewiesen.**

Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass sowohl Grb10WT, als auch Grb10FM in der Lage sind mit Akt *in vivo* zu interagieren. Das bedeutet, dass die Fusion der Ras-Farnesylierungssequenz an Grb10 die Interaktion mit Akt nicht beeinflusst.

### 3.3 Konstitutive Akt Aktivierung durch Expression von Grb10FM

#### 3.3.1 Grb10FM induziert Akt Aktivität in Ba/F3 Zellen

Um die biologische Relevanz des Grb10 Membran Konstrukts für die Akt Aktivierung zu untersuchen, wurde das Grb10FM Konstrukt stabil in Ba/F3 Zellen exprimiert. Ba/F3 Zellen sind murine Pro-B-Zellen, die Faktor-abhängig wachsen (Rodriguez-Tarduchy *et al.*, 1990). Neben dem Grb10 Membran-Konstrukt wurden auch Grb10WT und als Kontrolle pCMV Leervektor transfiziert. Die transfizierten Ba/F3 Zellen wurden mit dem Antibiotikum G418 selektioniert und die Expression der Konstrukte wurde mittels Western-Blot Analyse überprüft (Abb. 13, unteres Bild). Zelllysate der stabil exprimierenden Ba/F3 Zellen wurden hergestellt und der Phosphorylierungsstatus von endogenem Akt mit Phospho-spezifischem Akt Antikörper im Western Blot analysiert (Abb. 13, oberes Bild).

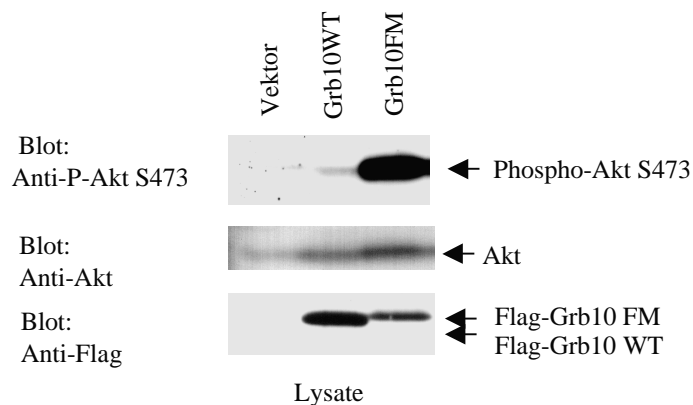


Abb. 13

#### Die konstitutive Lokalisation von Grb10 an die Zellmembran vermittelt eine verstärkte Akt Aktivierung

5 Mio Ba/F3 Zellen wurden mit pCMV-Flag Leervektor, pCMV-Flag Grb10WT oder pCMV-Flag Grb10FM elektroporiert und nach 48 h mit dem Antibiotikum G418 selektioniert. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit den dargestellten Antikörpern detektiert. Die Expression von Grb10 wurde mit einem monoklonalen Flag Antikörper nachgewiesen. Der Phosphorylierungsstatus von Akt wurde mit dem Phospho-spezifischen Akt Antikörper, die Menge von endogenem Akt mit einem polyklonalen Akt Antikörper gezeigt.

Die Überexpression von Grb10WT in Ba/F3 Zellen induziert einen Anstieg der Akt Phosphorylierung im Vergleich zur Leervektorkontrolle, wie bereits beschrieben (Jahn *et al.*, 2002). Grb10FM induzierte eine deutlich gesteigerte Aktivierung von Akt im Vergleich zu Grb10WT und zur Vektorkontrolle (Abb.13, oberes Bild). Die konstitutive Membranlokalisation von Grb10 führte also zu einer erheblichen Steigerung der Akt Phosphorylierung und unterstreicht somit die Relevanz der Membranlokalisation für die Grb10 vermittelte Akt Aktivierung.

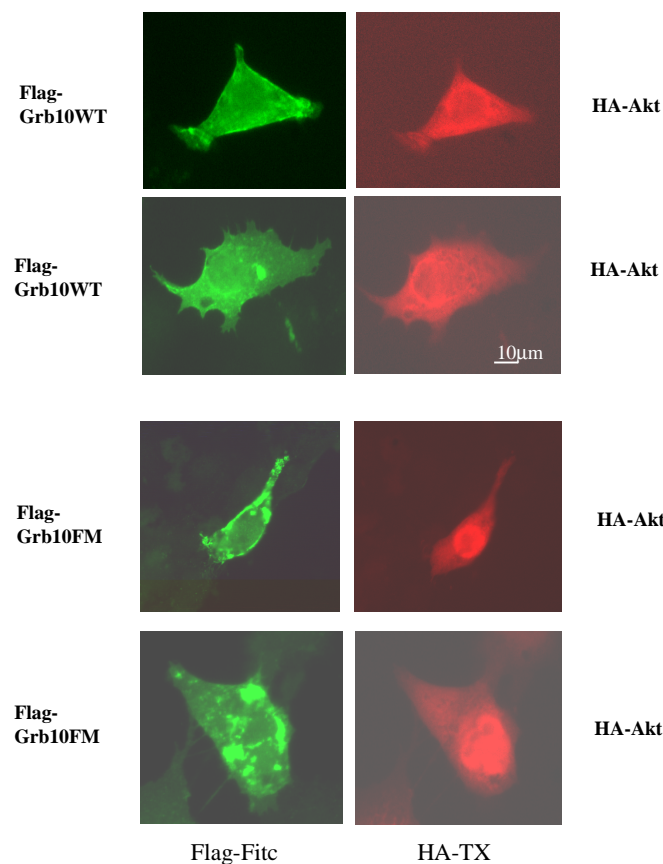
### 3.3.2 Akkumulation von phosphoryliertem Akt im Zellkern

In unstimulierten Zellen ist die Verteilung von Akt hauptsächlich zytosolisch. Nach Stimulation lokalisiert Akt an die Zellmembran (Sable *et al.*, 1998) und wird hier von PDK1 und PDK2 phosphoryliert und somit aktiviert (Stephens *et al.*, 1998; Chan u. Tsichlis, 2001). Das phosphorylierte und aktivierte Akt fällt von der Membran ab und wandert durch das Zytosol in den Zellkern (Meier *et al.*, 1997; Andjelkovic *et al.*, 1997).

Es sollte gezeigt werden, dass die konstitutiv an der Membran lokalisierte Grb10 Mutante nicht nur zu einer stärkeren Aktivierung, sondern auch zu einer Translokationsänderung von Akt führen kann. Die Translokation von Akt in den Zellkern ist Voraussetzung dafür, dass Akt seine nukleären Substrate phosphorylieren kann. Es wurden Immunfluoreszenzaufnahmen von Cos7 Zellen, die HA-markiertes Akt mit Flag-markiertem Grb10WT bzw. mit Flag-markiertem Grb10FM koexprimieren, gemacht (Abb. 14). 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Proteine mit indirekter Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Grb10WT und Grb10FM wurden mit einem Flag Anti-Maus Antikörper und einem Maus-FITC Antikörper detektiert. Akt wurde mit einem HA Anti-Kaninchen Antikörper und mit einem Kaninchen-Texas Red Antikörper angefärbt. Die auf den Objektträgern fixierten Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die FITC markierten Grb10 Proteine wurden mit einer Wellenlänge von 475 nm, Texas Red markiertes Akt bei 580 nm angeregt. Die grüne Fluoreszenz zeigt die rein zytosolische Verteilung von Grb10WT in der Zelle (Abb. 14, obere, linken Bilder). Ebenfalls in grün ist die



membranäre Verteilung von Grb10FM gezeigt. Die rote Fluoreszenz stellt die Verteilung von Akt dar. Bei Koexpression von Grb10WT ist Akt hauptsächlich im Zytosol der Zelle zu finden (Abb. 14, obere, rechten Bilder). Wurde Akt zusammen mit Grb10FM exprimiert, zeigte sich eine Anreicherung von Akt im Zellkern (Abb. 14, untere, rechten Bilder). Diese Daten weisen darauf hin, dass Grb10FM nicht nur die Aktivierung durch die Membranlokalisierung, sondern auch die Lokalisation von Akt in den Zellkern begünstigt.



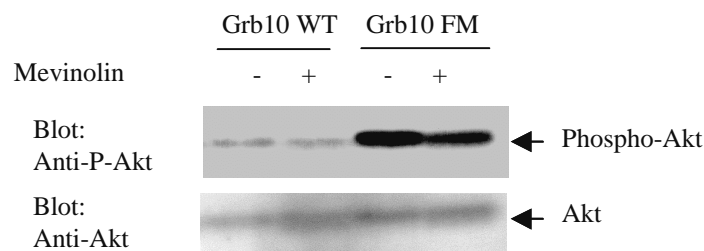
**Abb. 14**

**Die Koexpression von Grb10FM bewirkt eine Anreicherung von Akt im Zellkern**

In Cos7 Zellen wurde HA-Akt zusammen mit Flag-Grb10WT bzw. mit Flag-Grb10FM transient transfiziert. HA-markiertes Akt wurde mit indirekter Immunfluoreszenz mit Kaninchen-Anti-HA und mit Kaninchen-Texas Red Antikörper (TX, rot) gefärbt. Flag-markiertes Grb10WT und Grb10FM wurden mit einem Maus-Anti-Flag Antikörper und einem Anti-Maus-FITC Antikörper (grün) angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

### 3.4 Die Membranlokalisation von Grb10FM ist Voraussetzung für die Aktivierung von Akt

Um zu zeigen, dass die Farnesylierung von Grb10 entscheidend für die Aktivierung von Akt ist, wurden Ba/F3 Zellen, die stabil Grb10 exprimierten, mit dem Farnesylierungsinhibitor Mevinolin behandelt. Mevinolin oder auch Lovastatin ist ein irreversibler Inhibitor der HMG-CoA Reduktase und blockiert die Produktion von Mevinolat. Mevinolat ist eine wichtige Komponente in der Cholesterol- und der Isoprenoidproduktion. Durch Inhibition der Bildung von Mevinolat können Moleküle nicht mehr farnesyliert werden (Van De Donk *et al.*, 2002). Grb10WT und Grb10FM exprimierende Zellen wurden 8 h mit Mevinolin behandelt, anschließend lysiert und die Phosphorylierung von Akt im Western Blot überprüft (Abb. 15).



**Abb. 15**

#### Die Inhibition der Farnesylierung von Grb10FM bewirkt eine Abnahme der Akt Aktivierung

**5 Mio stabil Grb10WT oder Grb10FM exprimierende Ba/F3 Zellen wurden für 8 h mit 0,02 nM Farnesylierungsinhibitor Mevinolin inkubiert. Die Kontrollansätze wurden nicht mit Mevinolin behandelt. Die Zellen wurden lysiert und die Phosphorylierung von Akt wurde im Western Blot analysiert.**

Wie schon in vorherigen Versuchen gezeigt wurde, induziert Überexpression von Grb10FM eine verstärkte Akt Aktivität (Abb. 15, oberes Bild, 1. Spur). Nach Behandlung der Zellen mit Mevinolin wurde eine Abnahme der Akt Phosphorylierung verzeichnet (Abb. 15, oberes Bild, 4. Spur), wohingegen die Mengen an Akt gleich blieben (Abb.15, unteres Bild). Die durch Grb10WT induzierte Akt Phosphorylierung änderte sich nach Inkubation mit dem Farnesylierungsinhibitor nicht (Abb. 15, oberes Bild, 1. und 2. Spur). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass nach Inhibition der Farnesylierung von Grb10FM die Akt Aktivität abnimmt. Dies bedeutet, dass die

konstitutive Lokalisation von Grb10 an die Zellmembran entscheidend für die durch Grb10 induzierte Aktivierung von Akt ist.

### **3.5 Grb10FM Überexpression schützt Zellen vor Apoptose**

#### **3.5.1 Grb10FM Ba/F3 Zellen proliferieren nach Faktorentzug**

Konstitutiv aktiviertes Akt blockiert den Prozess der Apoptose, der z.B. durch Faktor Entzug, UV-Bestrahlung und den Verlust der Zelladhäsion induziert werden kann (Dudek *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 1997; Khwaja *et al.*, 1997; Kulik *et al.*, 1997).

Ba/F3 Zellen sind murine Pro-B-Zellen, die für Wachstum und Überleben IL-3 benötigen (Rodriguez-Tarduchy *et al.*, 1990). IL-3 wird von aktivierten T-Zellen produziert und ist für das Überleben vieler hämatopoetischer Zellen essentiell (Metcalf *et al.*, 1989). Die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt Signalweges schützt Ba/F3 Zellen vor dem durch IL-3 Entzug induzierten Zelltod. Hierbei werden durch die Akt Aktivierung anti-apoptotische Moleküle wie FKHRL1 phosphoryliert und somit aktiviert.

Um die biologische Relevanz der durch Grb10 induzierten Aktivierung von Akt zu untersuchen, wurden Grb10 exprimierende Ba/F3 Zellen mit suboptimalen IL-3 Konzentrationen inkubiert und die Proliferation gemessen. Für ein optimales Wachstum benötigen Ba/F3 Zellen eine IL-3 Konzentration von 0.2 ng/ml. Die stabil Grb10 exprimierenden Ba/F3 Zellen wurden mit 0.1 ng/ml inkubiert und die Proliferation über sechs Tage gemessen (Abb. 16). Die Vektor exprimierenden Zellen proliferierten bei suboptimalen IL3 Bedingungen nicht (Abb. 16, blaue Linie). Zellen, die Grb10WT exprimierten, zeigten am Tag 4 einen Anstieg des Zellwachstums (Abb. 16, rote Linie), der noch viel deutlicher in Grb10FM Zellen (Abb. 16, grüne Linie) war. Diese Daten zeigen, dass die durch Grb10 induzierte Aktivierung von Akt einen Überlebensvorteil für die Zellen darstellt und machen die biologische Relevanz der Grb10 Expression im Ba/F3 Zellsystem deutlich.

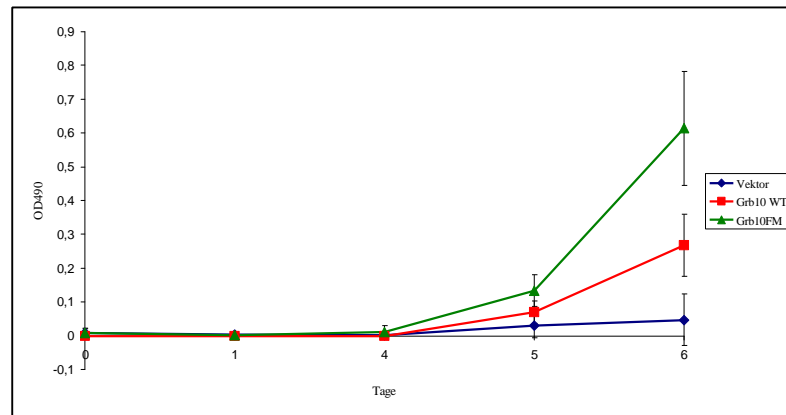


Abb. 16

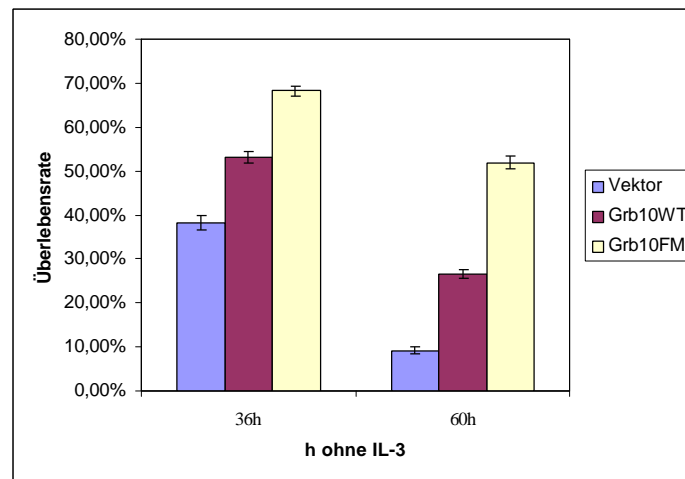
#### Grb10 exprimierende Ba/F3 Zellen wachsen unter suboptimalen IL-3 Bedingungen

**10<sup>3</sup> stabil Grb10WT, Grb10FM oder Vektor exprimierende Ba/F3 Zellen wurden mehrmals gewaschen und anschließend in Medium mit lediglich 0.1 ng/ml IL-3 resuspendiert. Die Zellen wurden in 96-Loch Platten ausplattiert und die Proliferation wurde täglich über 6 Tage hinweg gemessen. Hierfür wurden die Zellen mit einer Substanz namens MTS für 2 h inkubiert. Diese Substanz ist in der Lage viable Zellen zu quantifizieren. Die Messung der viable Zellen erfolgte im Elisa-Reader bei 490 nm.**

#### 3.5.2 Grb10 verzögert den Eintritt der Apoptose nach Faktor Entzug in Ba/F3 Zellen

Im vorherigen Kapitel wurde der Wachstumsvorteil der Grb10FM exprimierenden Ba/F3 Zellen beschrieben. Um den Überlebensvorteil von Grb10FM exprimierenden Zellen näher zu untersuchen, wurde den stabil transfizierten Ba/F3 Zellen IL-3 entzogen. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit zwei Farbstoffen gefärbt, die es möglich machen, die toten von den lebenden Zellen in der FACS-Analyse zu unterscheiden. Der frühe Prozess der Apoptose beginnt mit der Präsentation von Phosphatidylserinen auf der Zelloberfläche. Der Farbstoff Annexin bindet an diese Phospholipide und ermöglicht somit eine Darstellung der frühen Apoptose. Mit dem Farbstoff Propidium-Iodid kann man DNA anfärben. Indem die Zellmembran im Verlauf der Apoptose immer poröser und durchlässiger wird, nimmt der Anteil der Propidium-Iodid positiven Zellen bei voranschreitender Apoptose zu.

Vor Beginn des Experimentes wurden die Zellen auf ihre Viabilität hin untersucht, um sicher zu gehen, dass Grb10WT, Grb10FM und Vektor exprimierende Zellen gleich viabel waren. Nach 36 h IL-3 Entzug wurden die Zellen Annexin/PI gefärbt. Die Facs-Analyse detektierte 38% lebendige Vektor exprimierende Zellen (Abb. 17, linkes Bild, blauer Balken). Es konnten 52% lebendige Grb10WT und 68% lebendige Grb10FM exprimierende Zellen nachgewiesen werden (Abb. 17, linke Seite, rosa und gelber Balken). Nach 60 h IL-3 Entzug waren noch 25% lebendige Grb10WT und über 50% lebendige Grb10FM Zellen detektierbar im Vergleich zu weniger als 10% lebendiger Vektor exprimierende Zellen (Abb. 17, rechte Seite). Diese Ergebnisse sprechen für den deutlichen Schutz vor Apoptose in Grb10 exprimierenden Ba/F3 Zellen nach Faktorentzug.



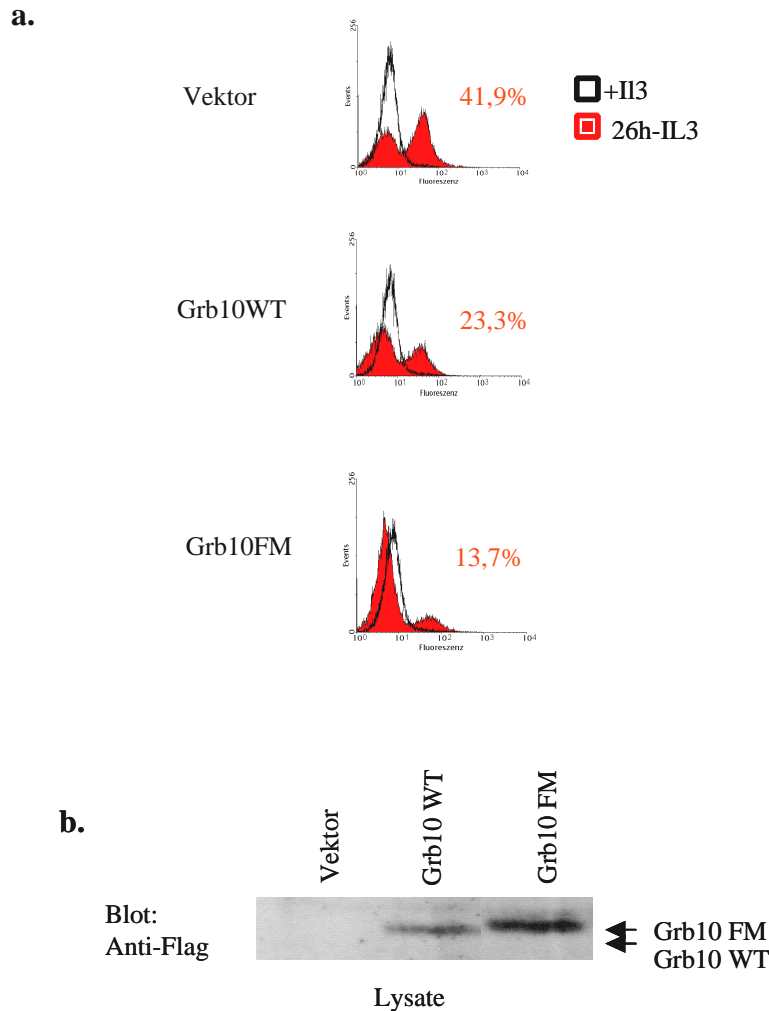
**Abb. 17**

**Gesteigerte Überlebensrate in Grb10 exprimierenden Ba/F3 Zellen nach IL-3 Entzug**

**5 Mio Ba/F3 Zellen wurden mehrmals gewaschen und anschließend in Medium ohne IL-3 kultiviert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen Annexin/PI gefärbt und anschließend im Facs analysiert.**

Der dritte Ansatz um die biologische Relevanz der Grb10 induzierten Akt Aktivierung zu zeigen, war der sogenannte Tunel-Assay. Die Apoptose geht mit einer Fragmentierung der DNA einher. Im Tunel-Assay werden die DNA Fragmente markiert

und in der Facs-Analyse bestimmt. Somit kann der Anteil der apoptotischen Zellen gemessen werden.



**Abb. 18**

**Verzögerter Eintritt der Apoptose durch Expression von Grb10**

a: 5 Mio Grb10WT, Grb10FM und Vektor exprimierende Ba/F3 Zellen wurde IL-3 entzogen. Nach 26 h wurde ein TUNEL-Assay mit anschließender FACS-Analyse durchgeführt.

b: Die Lysate der in Abb. 16, 17 und 18a verwendeten Zellen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Expression von Grb10 im Western Blot mit einem Anti-Flag Antikörper detektiert.

Grb10WT, Grb10FM und Vektor exprimierenden Ba/F3 Zellen wurde IL-3 entzogen und nach 26 h die DNA Fragmentierung gemessen. Erneut zeigten die Grb10 exprimierenden Zellen ein verzögertes Eintreten der Apoptose. Nach 26 h ohne IL-3

waren über 40% der Vektor exprimierenden Zellen apoptotisch (Abb. 18a, oberes Bild). Wohingegen in Grb10WT exprimierenden Zellen 23% apoptotische Zellen (Abb. 18a, mittleres Bild) und in Grb10FM exprimierenden Zellen nur 13% apoptotische Zellen (Abb. 18a, unteres Bild) nachgewiesen werden konnten. Dieses dritte Experiment unterstreicht die Daten der vorangegangenen Analysen und zeigt den deutlichen Schutz vor Apoptose durch Expression von Grb10.

In Abbildung 18b sind die Expressionsniveaus von Grb10WT und Grb10FM dargestellt.

### **3.6 Fusion von Grb10 an Akt kompensiert die Deletion der Akt Phospholipidbindungsstelle**

Für die Akt Aktivierung sind die von Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) generierten Phospholipide essentiell. Diese werden nach Stimulation der Zelle gebildet. Die Akt PH-Domäne interagiert mit diesen Phospholipiden, was eine Lokalisation von Akt aus dem Cytosol an die Zellmembran begünstigt (Sable *et al.*, 1998; Stephens *et al.*, 1998).

Die Fusion von Grb10WT und Grb10 SH2-Domäne an Akt bewirkt die konstitutive Aktivierung von Akt (Jahn *et al.*, 2002). In diesen beiden Grb10/Akt Chimären wurde die Phospholipidbindungsstellen deletiert und die Akt Aktivierung überprüft. Um die Bindungsstelle für die Phospholipide zu eliminieren, wurden mittels der PCR Technik zwei neue Restriktionsschnittstellen in die Grb10/Akt Chimäre eingeführt. Die beiden Konstrukte wurden geschnitten und das Fragment, das die Bindungsstelle für Phospholipide enthielt, wurde gelelektrophoretisch vom übrigen Konstrukt getrennt. Die neuen Grb10WT/Akt $\Delta$ PIP und Grb10SH2-Domäne/Akt $\Delta$ PIP Konstrukte wurden in Zellen transient exprimiert und im Vergleich zu den ursprünglichen Grb10/AktWT Konstrukten auf die Akt Aktivität hin überprüft (Abb. 19). Wie die Western-Blot Analyse zeigte, bewirkte die Fusion von Grb10WT mit AktWT die Aktivierung von Akt (Jahn *et al.*, 2002). Nach der Deletion der Akt Bindungsstelle an Phospholipide war nur das an Grb10WT, nicht aber das an die Grb10 SH2-Domäne fusionierte Akt Konstrukt aktiviert (Abb. 19, oberes Bild, Spur 2+4). Somit kann lediglich ein intaktes Grb10 Molekül den Verlust der Phospholipidbindungsstelle kompensieren.

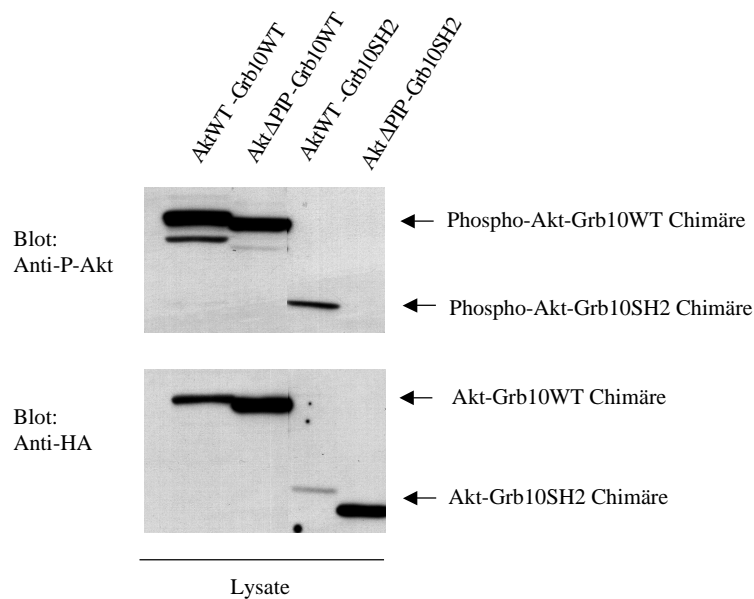


Abb. 19

**Deletion der Akt Bindungsstelle an Phospholipide wird durch Fusion mit Grb10WT kompensiert.**

In die beiden Konstrukte Grb10WT/Akt und Grb10SH2-Domäne/Akt wurden mittels PCR zwei *EcoRV*-Restriktionsschnittstellen eingeführt. Diese ermöglichten das Ausschneiden des Fragments, das die Phospholipidbindungsstelle enthielt. Die Grb10/AktDPIP Konstrukte wurden transient in Cos1 Zellen exprimiert und anschließend mit den angegebenen Antikörpern auf die Aktivierung von Akt untersucht.

### 3.7 Grb7 induziert Akt Aktivität

Grb10 gehört ebenso wie Grb7 und Grb14 zu einer Familie von Adapterproteinen. Diese Proteine zeichnen sich durch eine starke Homologie aus. Daher stellte sich die Frage, ob Grb7 auch in der Lage war, Akt Aktivität zu induzieren. Die verschiedenen Grb Konstrukte wurden zusammen mit Akt in einem transienten Zellmodell in die Zelllinie Cos1 transfiziert, wie bereits in Material und Methoden beschrieben. Grb7 war ebenso, wie es bereits für Grb10 gezeigt ist, in der Lage Akt Aktivierung zu induzieren (Abb. 20).



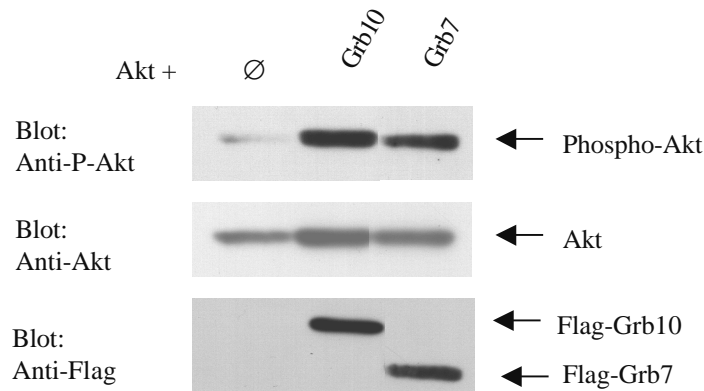


Abb. 20

**Grb7 induziert Akt Aktivität**

Akt wurde zusammen mit Grb10 als Kontrolle und mit Grb7 transient in Cos1 Zellen exprimiert. Die Zellysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine immunochemisch mit den angegebenen Antikörpern dargestellt.

**3.8 Nachweis der direkten Interaktion von Grb10 und Akt**

Grb10 bildet mit Akt einen Komplex und induziert Akt Aktivierung (Jahn *et al.*, 2002). Um zu zeigen, dass die Interaktion zwischen Grb10 und Akt direkt ist, wurde ein Bindungsexperiment mit <sup>35</sup>S-markiertem *in vitro* translatiertem Grb10 und GST-fusioniertem Akt durchgeführt.

Da dieses Experiment im zellfreien System durchgeführt wird, kann davon ausgegangen werden, dass die nachgewiesene Interaktion nicht über dritte Proteine vermittelt wird. Zwei Grb10 Konstrukte, Grb10WT und Grb10ΔPH, wurden in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Methionin *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert. Anschließend wurden gleiche Mengen an GST-Akt sowie GST als Negativkontrolle mit den *in vitro* translatierten Proteinen inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine autoradiographisch dargestellt (Abb. 21). In Abbildung 21 ist die Bindung von Grb10WT und Grb10ΔPH an GST-Akt dargestellt. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen eindeutig, dass die Interaktion von Grb10 und Akt direkt ist und nicht durch weitere Moleküle vermittelt wird.

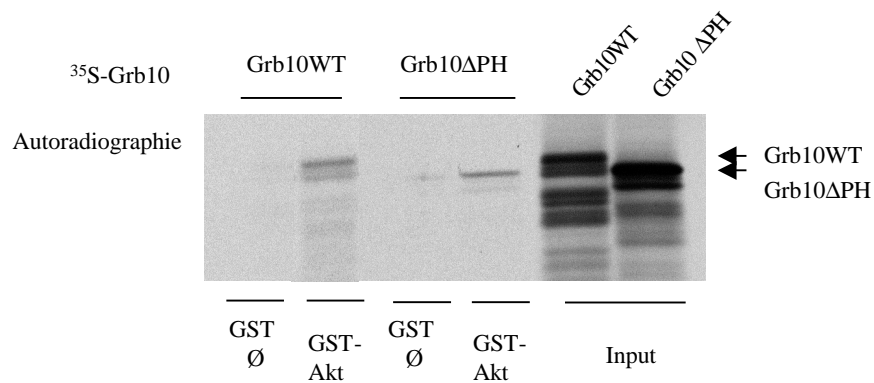


Abb. 21

<sup>35</sup>S-markiertes Grb10 zeigt eine direkte Interaktion mit Akt

Die Konstrukte pCMV Grb10WT und Grb10DPH wurden im zellfreien System *in vitro*-translatiert und mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert. Die Proteinlösungen wurden mit jeweils 20 ml GST-Akt und jeweils 10 ml GST als Negativkontrolle für 1 h bei 4° C inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine autoradiographisch dargestellt.

### 3.9 Untersuchungen zur Grb10 Phosphorylierung

Unser Labor konnte zeigen, dass Grb10 in c-Kit Rezeptor exprimierenden Mo7e Zellen und in Bcr-Abl exprimierenden K562 Zellen phosphoryliert ist (Bai *et al.*, 1998, Jahn *et al.*, 2002). Desweiteren wurde die Phosphorylierung von Grb10 an Tyrosinresten als Antwort auf Tec beschrieben (Mano *et al.*, 1998), sowie die Serin Phosphorylierung nach Stimulation mit Insulin (Dong *et al.*, 1997).

Daher sollte im Folgenden die für die Grb10 Phosphorylierung verantwortliche Kinase identifiziert werden.

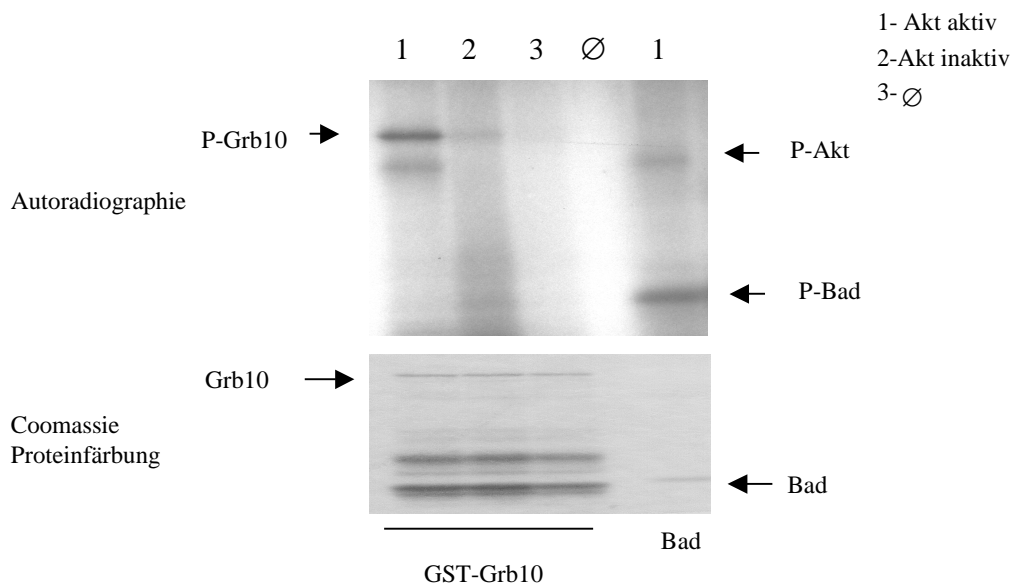
#### 3.9.1 Grb10 ist ein Substrat von Akt

Die Phosphorylierung von Grb10 kann durch die Inkubation mit Wortmannin, einem spezifischen PI3-Kinase/Akt Inhibitor blockiert werden (Dong *et al.*, 1997, Jahn *et al.*, 2002). Das deutet darauf hin, dass die für die Grb10 Phosphorylierung verantwortliche

Kinase unterhalb des PI3-Kinase/Akt Signalweges liegt. Um die Kinase zu identifizieren, wurden *in vitro* Kinase Versuche durchgeführt.

Die Tatsache, dass Grb10 direkt mit Akt interagiert (Abb. 21) und dass die Grb10 Phosphorylierung sensitiv auf Wortmannin reagiert, ließ vermuten, dass Akt die gesuchte Kinase ist.

Der Kinase-Assay wurde mit aufgereinigtem GST-Grb10 Protein durchgeführt. Die Aufreinigung des gesamten Grb10 Moleküls stellte sich als schwierig heraus. Aus diesem Grund wurde eine Deletionsmutante von Grb10, GST-Grb10 $\Delta$ SH2 in folgendem *in vitro* Kinasierungsexperiment eingesetzt. Die Grb10 GST Proteine wurden 1. mit aktiver Akt Kinase, 2. mit nicht aktiver Akt Kinase und 3. mit Reaktionspuffer ohne Kinase inkubiert. Die Reaktion erfolgte in Anwesenheit von 10  $\mu$ Ci [ $\gamma$ <sup>32</sup>-P]-ATP. Der Einbau von radioaktivem <sup>32</sup>P wurde in der Autoradiographie dargestellt (Abb. 22, oberes Bild).



**Abb. 22**

***In vitro* Phosphorylierung von Grb10 durch Akt**

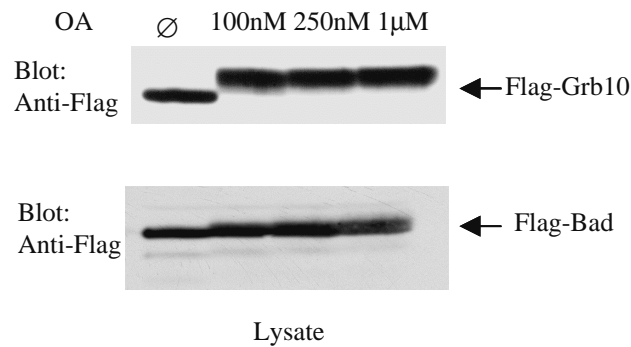
**GST-Grb10 $\Delta$ SH2 wurde mit (1) aktiver Akt Kinase, (2) nicht aktiver Akt Kinase und (3) ohne Kinase in Anwesenheit von [ $\gamma$ <sup>32</sup>-P]-ATP in 40 ml Kinasepuffer bei 30° C für 30 min inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden in einem 10%-igen SDS-Gel aufgetrennt, Coomassie gefärbt und anschließend autoradiographiert.**

In Abbildung 22 ist eine deutliche *in vitro* Kinasierung von Grb10 $\Delta$ SH2 durch aktive Akt Kinase, zu erkennen. Die Aktivierung von Akt wurde anhand der Phosphorylierung gemessen (Abb. 22, oberes Bild, Spur 1). Die Phosphorylierung von Grb10 ist spezifisch auf die Akt Kinase zurückzuführen, da bei Inkubation mit nicht aktiver Akt Kinase und bei Inkubation ohne Kinase keine Phosphorylierung von Grb10 gemessen werden konnte (Abb. 22, oberes Bild, Spur 2+3), obwohl die Coomassiefärbung gleiche Mengen an GST-Grb10 Fusionsprotein zeigt (Abb. 22, unteres Bild). Die Phosphorylierung von Bad, als bekanntes Substrat von Akt, zeigt, daß der Kinase Assay erfolgreich durchgeführt wurde (Abb. 22, oberes Bild, rechte Spur). Die Phosphorylierung von Grb10 durch Akt im *in vitro* System identifizierte Grb10 als direktes Substrat von Akt.

### 3.9.2 Phosphatase PP2A dephosphoryliert Grb10

Es ist bekannt, dass Okadeinsäure ein potenter Inhibitor der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A ist. Okadeinsäure induziert eine 2,5 bis 3 fache Erhöhung der Phosphorylierung von Proteinen in Zelllinien (Chiang *et al.*, 2001). Die Dephosphorylierung der Proteine wird gehemmt, und somit wird das Gleichgewicht auf die Seite der Phosphorylierung verlagert. Okadeinsäure inhibiert PP1 bei einer Konzentration im  $\mu$ M Bereich und PP2A bei Konzentration im nM Bereich. Um die für die Grb10 Dephosphorylierung verantwortliche Phosphatase zu identifizieren, wurden Cos1 Zellen mit pCMV Flag-Grb10 transfiziert und mit Okadeinsäure in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Als Positivkontrolle wurden Cos1 Zellen mit pCMV Flag-Bad transfiziert, da PP2A die für die Bad Dephosphorylierung bekannte Phosphatase ist (Chiang *et al.*, 2001). Die Zellen wurden für 2 h mit Okadeinsäure in Konzentrationen von 100nM, 250nM und 1 $\mu$ M inkubiert (Abb. 23). Wie in Abbildung 24 deutlich zu sehen ist, läuft Grb10 bereits nach Behandlung mit 100 nM Okadeinsäure viel langsamer im SDS-Gel, im Vergleich zum unbehandelten Zellysate (Abb. 23, oberes Bild). Da die Hyper-Phosphorylierung bereits nach Inkubation der Okadeinsäure mit 100 nM zu beobachten ist, kann daraus geschlossen werden, dass PP2A Grb10 dephosphoryliert. Die Bad Positivkontrolle zeigt ebenfalls nach Inkubation von 100 nM

Okadeinsäure den Einbau von Phosphatresten. Da Bad nur ca. 30kD groß ist, erfolgte eine Auftrennung des Proteins in einem hochprozentigen SDS-Gel. Aus diesem Grund kann die Hyper-Phosphorylierung von Bad weniger deutlich dargestellt werden, als die Hyper-Phosphorylierung von Grb10, das 75kD groß ist.



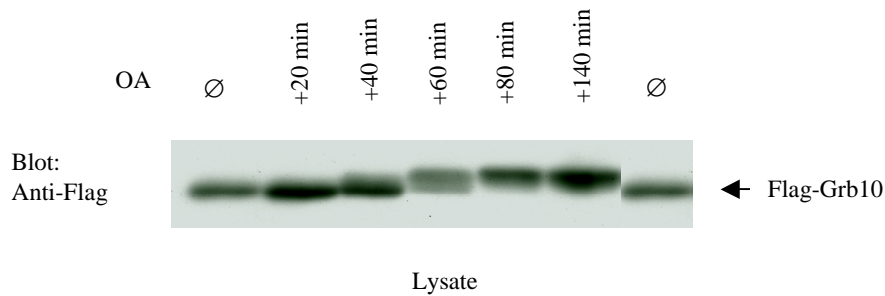
**Abb. 23**

**PP2A dephosphoryliert Grb10**

**Cos1 Zellen wurden transient mit pCMV-Flag Grb10 und mit pCMV-Flag Bad (als Positivkontrolle) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von Okadeinsäure für 2 h bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden nach der Behandlung abgeerntet und lysiert. Grb10 wurde in einem 8%-igen SDS-Gel und Bad in einem 12%-igen SDS-Gel separiert. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblottet und anschließend im Western-Blot mit einem Anti-Flag Antikörper detektiert.**

Es stellte sich die Frage, innerhalb welchen Zeitrahmens die Grb10 Phosphorylierung stattfindet. Dafür wurden pCMV Grb10 exprimierende Cos1 Zellen mit Okadeinsäure behandelt und die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Die Grb10 Phosphorylierung wurde dann in der Western Blot Analyse überprüft.

Abbildung 24 zeigt, dass bereits nach 40 min Inkubation mit Okadeinsäure der Einbau von Phosphatgruppen an das Grb10 Molekül zu beobachten ist. Nach 60 minütiger Inkubation mit Okadeinsäure sieht man beide Formen von Grb10. Die im SDS-Gel schneller laufende nichtphosphorylierte Form und die langsamer migrierende phosphorylierte Form. Das Verhältnis der beiden Formen ändert sich nach 80 min Inkubation mit Okadeinsäure zu Gunsten der phosphorylierten Form. Die Grb10 Moleküle liegen also nach 80 min Inkubation mit Okadeinsäure voll phosphoryliert in der Zelle vor.



**Abb. 24**

**Nach 80 minütiger Inkubation mit Okadeinsäure ist Grb10 voll phosphoryliert**

PCMV Flag-Grb10 wurde transient in Cos1 Zellen überexprimiert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 1 mM Okadeinsäure behandelt und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und lysiert. Grb10 wurde in einem 8%-igen SDS-Gel separiert und anschließend im Western Blot mit einem Anti-Flag Antikörper detektiert.

### 3.10 Identifizierung von 14-3-3 als neuer Bindungspartner von Grb10

Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Grb10 in zwei verschiedenen Phosphorylierungsformen in der Zelle vorliegt. Im nicht phosphorylierten Zustand interagiert Grb10 mit Akt. Nach Rezeptor Stimulation lokalisiert Grb10 zusammen mit Akt an die Zellmembran. An der Zellmembran erfolgt die Phosphorylierung von Akt. Das aktivierte Akt phosphoryliert wiederum Grb10. Die Phosphorylierung von Grb10 mag seinerseits wieder Voraussetzung für die Interaktion mit einem noch unbekanntem Protein sein.

#### 3.10.1 Interaktion von Grb10 und 14-3-3 im Hefesystem

Um neue Interaktionspartner von Grb10 zu identifizieren, wurde ein *Yeast-two Hybrid-Screen* durchgeführt. Dafür wurde Grb10 mit einem LexA-Hefevektor fusioniert. Der Hefestamm L40 wurde mit LexA-Grb10 und einer K562 cDNA Bibliothek auf Interaktionen untersucht. Aufgrund des Defizits an Histidin, Leucin und Tryptophan sind nur diejenigen Hefe-Klone in der Lage auf „-THULL“ Platten (ohne Tryptophan,

Histidin, Uracil, Lysin und Leucin) zu wachsen, in denen eine Interaktion zwischen Grb10 und einem Protein aus der cDNA Bibliothek stattgefunden hat (Abb. 25).

Mit dieser Hefetechnik konnten insgesamt 30 Klone identifiziert werden, die spezifisch mit Grb10 interagierten. Zur Identifizierung der DNA-Sequenzen wurde die gewonnene Plasmid-DNA aus den Klonen sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden über NCBI (*National Center of Biotechnological Information*) zugänglichen Genbanken überprüft. Unter den Klonen waren viele Proteine mit bekannter, aber auch einige mit unbekannter Aminosäuresequenz. Der stärkste Interaktionspartner von Grb10 im Hefesystem war die epsilon Isoform von 14-3-3. Weiterhin konnten ESRRRA (*Estrogen related receptor alpha*), humaner Transkriptionsfaktor ETR101 und ein G-Protein als spezifische und neue Interaktionspartner von Grb10 identifiziert werden. Da die Interaktion von Grb10 mit 14-3-3 am stärksten war, wurde diese Bindung näher charakterisiert.

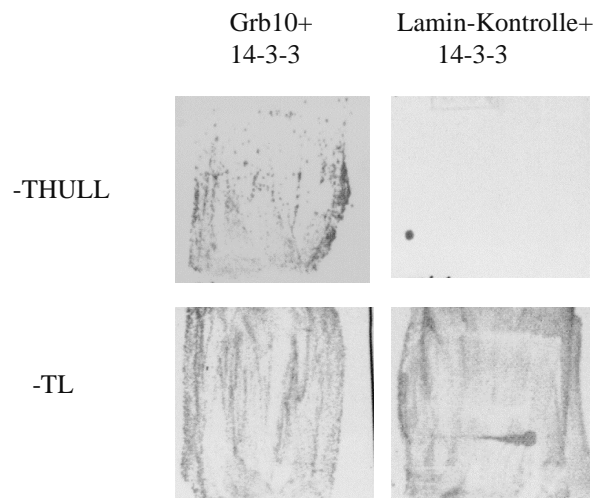


Abb. 25

#### Spezifische Interaktion von Grb10 mit 14-3-3 in Hefen

Das Grb10-Konstrukt wurde zusammen mit einer K562 c-DNA Bibliothek in Hefen kotransfiziert. Das Wachstum der Klone auf Agarplatten ohne Tryptophan und Leucin (-TL) zeigte die Transfektionseffizienz. Das Wachstum auf Agarplatten ohne Tryptophan, Histidin, Uracil, Lysin und Leucin (-THULL) zeigte die spezifische Interaktion mit dem Zielklon. Als Spezifitätskontrolle diente die Kotransfektion mit dem unspezifischen Oberflächenprotein

14-3-3 Proteine sind ubiquitär exprimiert und hoch konserviert, es konnten bis dato sieben Isoformen in humanen Zellen und 15 Isoformen in pflanzlichen Zellen nachgewiesen werden.

14-3-3 Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und interagieren beispielsweise mit Zellzyklusproteinen (CDC25), Proteinen die transkriptionelle Gene regulieren (FKHRL) und Apoptoseproteinen (Bad). 14-3-3 Proteine generieren Homo- und Heterodimere (Liu *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1995) und binden spezifische Phosphoserin/Threonin Motive (Muslin *et al.*, 1996; Yaffe *et al.*, 1997).

14-3-3 Proteine besitzen eine wichtige Bedeutung bezüglich der Regulation von Proteinen. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein FKHRL1 von Akt phosphoryliert wird, was Voraussetzung für die Interaktion mit 14-3-3 (Brunet *et al.*, 1999) ist. Die Bindung von FKHRL1 an 14-3-3 verhindert die Kernlokalisierung von FKHRL1. Dadurch wird die Aktivierung von verschiedenen Apoptosegenen, wie z. B. Fas-Ligand verhindert, was einen anti-apoptotischen Effekt zur Folge hat.

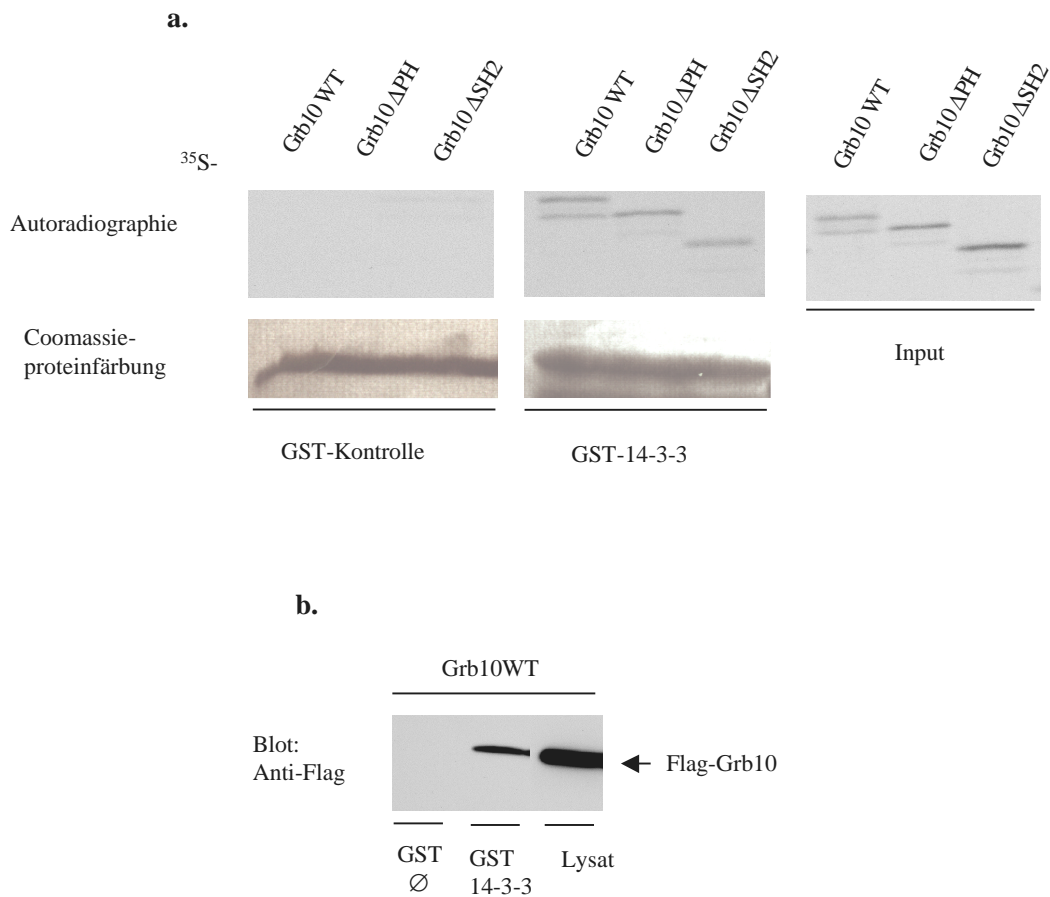
Die Identifikation von 14-3-3 als neuen Interaktionspartner von Grb10 stellt möglicherweise einen neuen Regulationsmechanismus für die Grb10 induzierte Akt Aktivierung dar und schien daher vielversprechend.

### **3.10.2 *In vitro* Bindungsstudien von 14-3-3 und Grb10**

Für die weitere Untersuchung der Interaktion zwischen Grb10 und 14-3-3 wurden GST-Bindungsstudien durchgeführt. Diese Experimente sollten zeigen, dass die Interaktion von Grb10 und 14-3-3 nicht ausschließlich auf das Hefesystem beschränkt ist. Dafür wurde zunächst die cDNA von 14-3-3 aus dem Hefe-Expressionsvektor pACT2 geschnitten und in den GST-Expressionvektor pGEX KG subkloniert. Anschließend wurde das pGEX-KG-14-3-3 Konstrukt in den *E. coli* Bakterienstamm DH5 $\alpha$  transformiert und induziert. Nach erfolgreicher Induktion und Aufreinigung des GST-14-3-3 Fusionsproteins wurde ein *in vitro* Bindungsexperiment durchgeführt. Grb10WT sowie die beiden Deletionsmutanten Grb10 $\Delta$ PH und Grb10 $\Delta$ SH2 wurden in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Methionin *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert. Die verschiedenen Ansätze wurden mit Glutathion-Sepharose vorinkubiert, um unspezifische Bindungen



zwischen den *in vitro* translatierten Proteinen und dem Glutathion oder der Sepharose auszuschließen. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Grb10 Konstrukte mit gleichen Mengen an GST-14-3-3, bzw. mit GST als Negativkontrolle inkubiert. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese erfolgte die Darstellung der radioaktiv markierten Proteine im Autoradiogramm (Abb. 26a).



**Abb. 26**

**Interaktion von Grb10 und GST-14-3-3 *in vitro***

**a.** Die verschiedenen Grb10 Konstrukte wurden mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin radioaktiv markiert und anschließend mit GST-14-3-3 bzw. mit GST als Negativkontrolle inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Coomassie angefärbt, getrocknet und mittels Autoradiographie visualisiert.

**b.** Grb10WT wurde in Cos1 Zellen exprimiert und mit GST-14-3-3 inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot detektiert

Im oberen, mittleren Teil von Abbildung 26a ist die spezifische Bindung der Grb10 Konstrukte an GST-14-3-3 dargestellt. Grb10WT interagiert im *in vitro* Bindungsexperiment ebenso mit GST-14-3-3, wie auch die Deletionsmutanten Grb10 $\Delta$ PH und Grb10 $\Delta$ SH2. Im oberen linken Teil der Abbildung 26a ist die GST-Kontrolle dargestellt, die keine unspezifische Bindung der Grb10 Konstrukte an GST aufweist. Im unteren Teil der Abbildung 26a ist die Coomassieproteinfärbung der im Experiment eingesetzten GST-Proteinmengen dargestellt. Im oberen, rechten Teil der Abbildung 26a sind die Proteinmengen an radioaktiv markiertem Grb10 aufgeführt. Das Ergebnis des *in vitro* GST-Bindungsexperiments zeigt, dass die Interaktion von Grb10 mit 14-3-3 direkt ist und nicht über weitere Moleküle vermittelt wird.

Zusätzlich wurde Grb10WT in Cos1 Zellen transient exprimiert und die Zelllysate wurden mit GST-14-3-3 inkubiert. Dieses Experiment bestätigt die Daten aus dem vorangegangenen Experiment und zeigt auch eine deutliche Interaktion von Grb10 mit GST-14-3-3 (Abb. 26b).

### 3.10.3 Nachweis der Interaktion von Grb10 und 14-3-3 *in vivo*

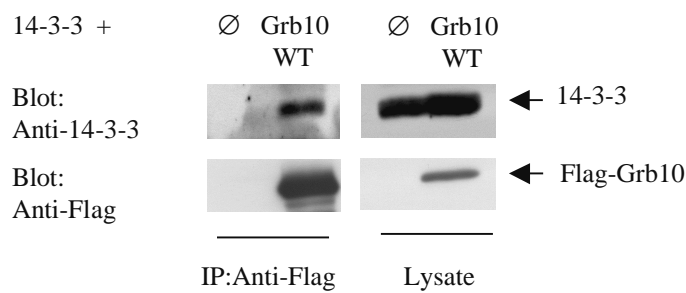
Um nachzuweisen, dass der Grb10/14-3-3 Komplex *in vivo* existiert, wurden Koimmunpräzitationsstudien und Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt.

Für die Koimmunpräzitationsstudien wurden Flag-markiertes Grb10 und Myc-markiertes 14-3-3 in der humanen Nierenzellkarzinom-Zelllinie 293 transient ko-exprimiert. Die Flag-Sequenz am Grb10 Konstrukt und die Myc-Sequenz am 14-3-3 Konstrukt ermöglichte die Darstellung der Proteine mit einem spezifischen Flag- bzw. Myc-Antikörper. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Es wurden Präzitationen in beide Richtungen durchgeführt. Das bedeutet, dass sowohl Grb10 als auch 14-3-3 präzitiert wurde. Zunächst wurde eine Flag-Immunpräzitation mit einem Agarose-gekoppelten Flag-Antikörper durchgeführt. Die Western-Blot Analyse mit einem 14-3-3 Antikörper zeigte eine spezifische Interaktion zwischen Grb10 und 14-3-3 (Abb. 27a). Als Negativ-Kontrolle wurde 14-3-3 zusammen mit Leervektor transfiziert. Das Ergebnis der Immunpräzitation zeigte keine unspezifische Interaktion (Abb. 27a, linke Spur).

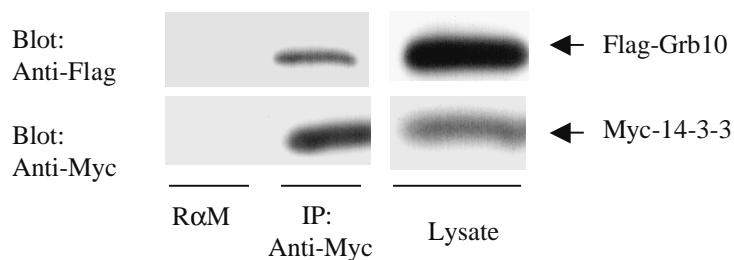
Anschließend wurde 14-3-3 mit einem monoklonalen Myc-Antikörper immunpräzipitiert. Als Negativkontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit einem unspezifischen Kaninchen-Antiserum (R $\alpha$ M) durchgeführt. Die Immunkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern nachgewiesen.

In Abbildung 27b ist die spezifische Koimmunpräzipitation von 14-3-3 mit Grb10 dargestellt. Der Ansatz mit unspezifischem R $\alpha$ M Antikörper zeigte keine Interaktion mit Grb10. Die immunpräzipitierte Menge an 14-3-3 ist im unteren Teil der Abbildung 27b dargestellt. Die Blots auf der rechten Seite der Abbildung 27b weisen die Expressionsmengen von Grb10 und 14-3-3 auf.

a.



b.



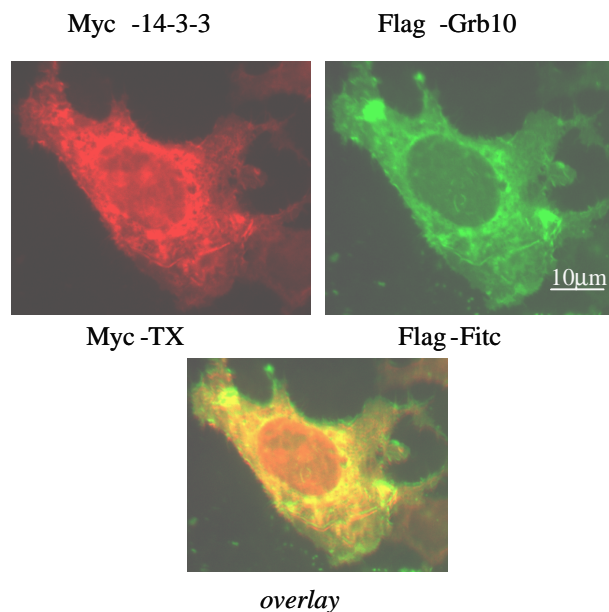
**Abb. 27**

#### Koimmunpräzipitation von 14-3-3 mit Grb10 in transfizierten 293 Zellen

a. In 293 Zellen wurde Flag-Tag Grb10 mit Myc-Tag 14-3-3 transient exprimiert. Als Kontrolle wurde 14-3-3 zusammen mit Vektor exprimiert. Die Ko-Immunpräzipitation wurde mit einem an Agarose-Beads gekoppelten Flag-Antikörper durchgeführt. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend in der Western-Blot Analyse detektiert.

b. 293 Zellen wurden mit 14-3-3 und Grb10 kotransfiziert. Die Zellysate wurden mit einem monoklonalen Anti-Myc Antikörper oder Kontroll-Antikörper (R $\alpha$ M) bei 4° C für 2 h inkubiert. Die Immunkomplexe wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf PVDF Membran transferiert. Anschließend wurden die Proteine mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

Um die Interaktion von Grb10 und 14-3-3 auch in intakten Zellen nachzuweisen, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte weiterhin gezeigt werden in welchen Zellkompartimenten die Interaktion von 14-3-3 und Grb10 stattfindet. Für den Kolokalisationsversuch wurden Cos7 Zellen mit Grb10 und mit 14-3-3 kotransfiziert. Anschließend wurden die Proteine mittels der indirekten Immunfluoreszenz visualisiert (Abb. 28). In unstimulierten Cos7 Zellen war die Verteilung von Grb10 (grün dargestellt) größtenteils zytoplasmatisch. Die Verteilung von 14-3-3 (rot dargestellt) zeigte eine diffuse zytoplasmatische und perinukleäre Verteilung, was bereits von anderen Gruppen beschrieben wurde (Grozinger *et al.*, 2000). Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzaufnahmen ergab eine zytoplasmatische Kolokalisation von Grb10 und 14-3-3, welche gelb dargestellt ist. Diese Ergebnisse bestätigen die Bindung von Grb10 an 14-3-3 in intakten Zellen.



**Abb. 28**

**Kolokalisation von Grb10 und 14-3-3 in intakten Zellen**

**In Cos7 Zellen wurden pCMV Flag-Grb10 und pCZeo Myc-14-3-3 transient auf Objektträgern koexprimiert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und durch indirekte Immunfluoreszenz visualisiert. Grb10 ist grün, 14-3-3 rot dargestellt. Das Überlagerungsbild erscheint gelb.**

### **3.11 Die Interaktion von 14-3-3 und Grb10 ist phosphorylierungsabhängig**

#### **3.11.1 Eine Phosphatase Behandlung reduziert die Bindung von 14-3-3 an Grb10**

14-3-3 Proteine erkennen und interagieren bevorzugt mit phosphorylierten Serin und Threonin Resten (Michaud *et al.*, 1995). Die Interaktion mit nicht-phosphorylierten Proteinen ist allerdings auch bekannt (Masters *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob die Interaktion von 14-3-3 mit Grb10 phosphorylierungsabhängig oder -unabhängig ist, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Flag-Grb10 wurde zusammen mit Myc-14-3-3 in Zellen koexprimiert und die Immunkomplexe anschließend mit einem Anti-Myc Antikörper präzipitiert. Nach der Präzipitation wurden die Komplexe mit saurer Phosphatase behandelt. Phosphatasen bauen Phosphatgruppen ab und bewirken so eine Reduktion des Phosphorylierungsstatus eines Proteins.

Im oberen Teil der Abbildung 29 sind die Ergebnisse des Phosphataseversuchs dargestellt. Es wurden vier verschiedene Reaktionen angesetzt. Die Immunpräzipitationen wurden mit einem bestimmten Phosphatase-Puffer gewaschen und anschließend 1. ohne Phosphatase, 2. mit Phosphatase (5 min Inkubation), 3. mit Phosphatase (10 min Inkubation) und 4. mit Phosphatase und mit Phosphatase-Inhibitoren (als Kontrolle) bei 30° C inkubiert. In der ersten Spur ist der unbehandelte Reaktionsansatz aufgetragen. Zu sehen ist die starke Interaktion zwischen Grb10 und 14-3-3. In der zweiten Spur wurde die Immunpräzipitation für 5 min mit Phosphatase behandelt. Man erkennt deutlich die verringerte Interaktion zwischen Grb10 und 14-3-3, obwohl gleiche Mengen an Myc-14-3-3 präzipitiert wurden (Abb. 29, zweiter Blot von oben). Nach 10 minütiger Behandlung der Immunpräzipitation mit Phosphatase ist keine Interaktion zwischen Grb10 und 14-3-3 mehr nachweisbar, obwohl auch in diesem Reaktionsansatz wieder gleiche Mengen an Myc-14-3-3 präzipitiert wurden. Der Reaktionsansatz, welcher mit Phosphatase und mit Phosphatase-Inhibitoren behandelt wurde, zeigte wiederum eine Bindung von 14-3-3 an Grb10. In den unteren beiden Blots der Abbildung 29 sind die gleichmäßigen Expressionsniveaus von Myc-14-3-3 und Flag-Grb10 dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Komplexbildung von 14-3-3 und Grb10 phosphorylierungsabhängig ist.

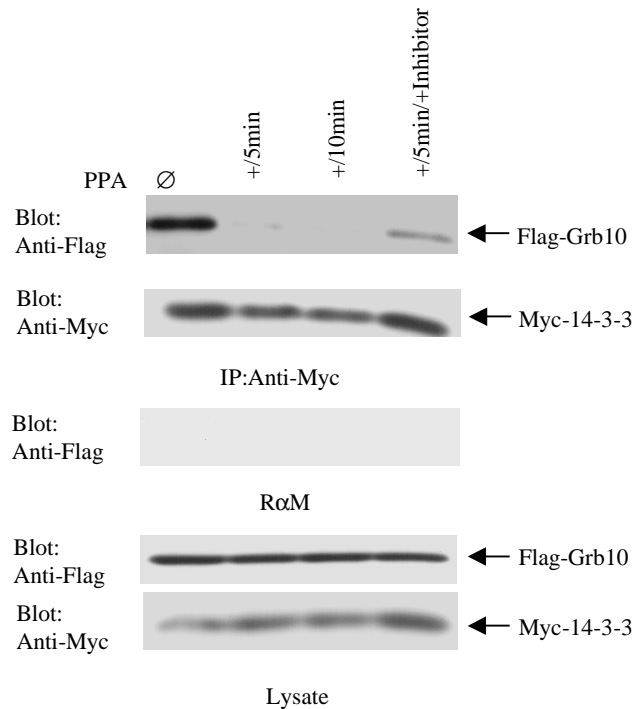


Abb. 29

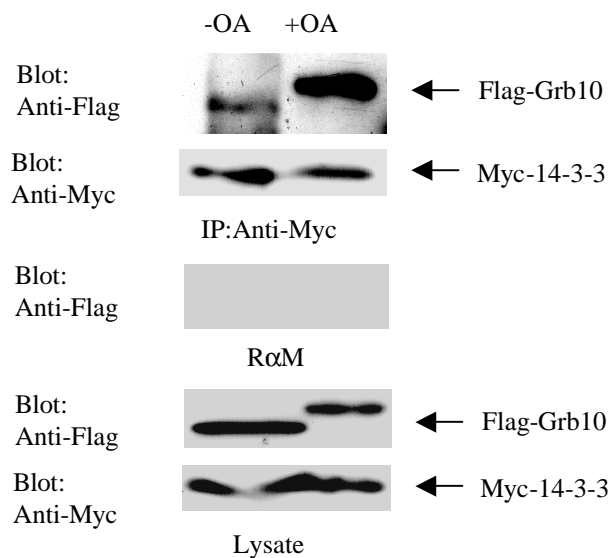
#### Phosphatase Behandlung reduziert die Interaktion von 14-3-3 und Grb10

293 Zellen wurden transient mit Myc-14-3-3 und Flag-Grb10 kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Anschließend wurde eine Anti-Myc Koimmunpräzipitation durchgeführt. Die präzipitierten Immunokomplexe wurden ohne Phosphatase, mit Phosphatase, bzw. mit Phosphatase und Phosphatase-Inhibitoren bei 30° C inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden mittels SDS-Gelelektrophorese separiert und in der Western Blot Analyse mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

#### 3.11.2 Verstärkte Interaktion von 14-3-3 und Grb10 durch Hemmung von Phosphatasen

Um die Bedeutung der Phosphorylierung für die Interaktion von 14-3-3 und Grb10 näher zu untersuchen, wurden Experimente mit konstitutiv hyper-phosphoryliertem Grb10 durchgeführt. Um die konstitutiv hyperphosphorylierte Form von Grb10 zu generieren, wurden die Zellen mit dem Phosphatase-Inhibitor Okadeinsäure behandelt (siehe Kapitel 3.9.2). 293 Zellen wurden transient mit Myc-14-3-3 und Flag-Grb10 kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 2 h mit Okadeinsäure behandelt. Anschließend wurden Zelllysate gewonnen und eine Anti-Myc Immunpräzipitation durchgeführt. Das Ergebnis des Experiments ist in Abbildung 30 dargestellt. Im oberen

Blot in der rechten Spur ist der unbehandelte Reaktionsansatz aufgetragen. Zu sehen ist die Komplexbildung zwischen Myc-14-3-3 und Flag-Grb10. In der zweiten Spur ist der mit Okadeinsäure behandelte Ansatz aufgetragen und man erkennt eine deutliche Zunahme der Interaktion von 14-3-3 und Grb10, da die präzipitierten Mengen an Myc-14-3-3 in beiden Ansätzen identisch sind (2. Blot von oben). Der mittlere Blot stellt den Kontrollansatz mit Kaninchenantiserum dar, der keine unspezifischen Reaktionen zeigt. Im unteren Teil der Abbildung 30 sind die Lysate aufgetragen, welche die gleichen Expressionen der Proteine darstellen. Deutlich ist auch der Grb10 *shift* zu sehen, der bestätigt, dass Grb10 nach Behandlung mit Okadeinsäure in einer hyperphosphorylierten Form vorliegt. Dieses Experiment bestätigt die bisherigen Daten und zeigt, dass die Phosphorylierung von Grb10 für die Interaktion mit 14-3-3 Voraussetzung ist.

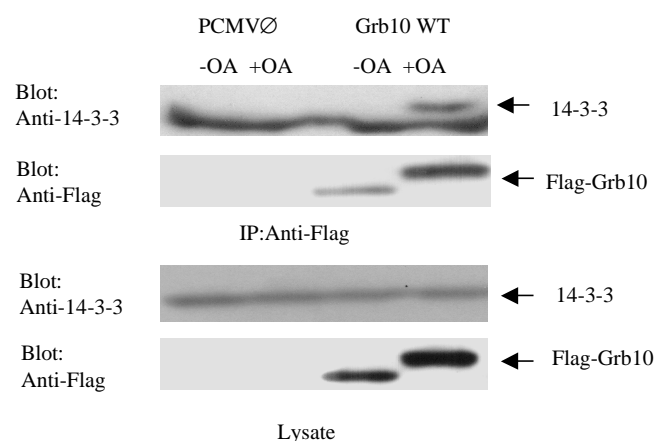


**Abb. 30**

**Verstärkte Interaktion von 14-3-3 mit hyper-phosphoryliertem Grb10**

293 Zellen wurden transient mit Myc-14-3-3 und Flag-Grb10 kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 2 h mit 1 mM Okadeinsäure behandelt. Anschließend wurde eine Anti-Myc Immunpräzipitation durchgeführt, die Proteinkomplexe im SDS-Gel aufgetrennt und in der Western Blot Analyse mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

Alle bisherigen Experimente zeigten die Interaktion von überexprimiertem 14-3-3 mit überexprimiertem Grb10. Aus diesem Grund sollte der Frage nachgegangen werden, ob auch endogenes 14-3-3 mit Grb10 interagiert. Die entsprechenden Experimente wurden in murinen Ba/F3 Zellen durchgeführt, welche stabil Flag-Grb10 exprimierten. Als Kontrolle dienten Ba/F3 Zellen, welche stabil Leervektor exprimierten. Es wurden je zwei Versuchansätze durchgeführt. Der eine Ansatz wurde erneut für 2 h mit Okadeinsäure behandelt, um die Phosphorylierung von Grb10 zu gewährleisten, der zweite Ansatz blieb unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und es wurde eine Koimmunpräzipitation mit einem an Agarose-*Beads* gekoppelten monoklonalen Anti-Flag Antikörper durchgeführt. Das Ergebnis der Kopräzipitation zeigt, dass lediglich eine Interaktion von endogenem 14-3-3 mit hyper-phosphoryliertem Grb10 nachweisbar ist (Abb. 31, oberes Bild). In den unbehandelten Zellen, sprich in den Zellen in denen Grb10 nicht phosphoryliert ist, konnte keine Assoziation zwischen Grb10 und endogenem 14-3-3 nachgewiesen werden. In beiden Ansätzen wurden gleiche Mengen an Flag-Grb10 immunpräzipitiert. Desweiteren zeigten die Kontrollansätze keine unspezifischen Reaktionen. Im unteren Teil der Abbildung 31 sind die Lysate dargestellt, die gleiche Expression sowohl von endogenem 14-3-3, als auch von stabil exprimierendem Flag-Grb10 zeigen. Diese Daten belegen die Notwendigkeit der Phosphorylierung für die Assoziation von 14-3-3 mit Grb10.



**Abb. 31**

**Endogenes 14-3-3 interagiert lediglich mit hyper-phosphoryliertem Grb10**

**Ba/F3 Zellen, welche stabil Flag-Grb10 exprimieren, bzw. Leervektor als Kontrolle, wurden mit bzw. ohne Okadeinsäure inkubiert. Anschließend erfolgte eine Anti-Flag Immunpräzipitation. Die Proteinkomplexe wurden im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend in der Western-Blot Analyse mit den angegebenen Antikörpern detektiert.**



### 3.11.3 Inkubation mit dem PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin reduziert die Bindung von 14-3-3 und Grb10

Die Phosphorylierung von Grb10 ist durch Wortmannin inhibierbar (Dong *et al.*, 1997; Jahn *et al.*, 2002). Wortmannin ist ein spezifischer Inhibitor des PI3-Kinase/Akt Signalweges (Yano *et al.*, 1993). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wird Grb10 *in vitro* von Akt phosphoryliert (Kapitel 3.9.1). PI3-Kinase wird von Wortmannin inhibiert. Dadurch ist die Phosphorylierung der Serin/Threonin Kinase Akt unterbunden und damit auch die Phosphorylierung von Grb10. Da die Interaktion mit 14-3-3 die Phosphorylierung von Grb10 voraussetzt, könnte die Inkubation mit Wortmannin die Interaktion von 14-3-3 und Grb10 reduzieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Myc-14-3-3 und Flag-Grb10 in 293 Zellen transient koexprimiert. Anschließend wurde ein Ansatz mit Wortmannin behandelt. Ein zweiter Ansatz diente als Kontrolle und wurde nicht mit Wortmannin behandelt. Aus den gewonnenen Zelllysaten wurden schließlich Anti-Myc Koimmunpräzitationen durchgeführt. In Abbildung 32 ist das Ergebnis des Experiments dargestellt.

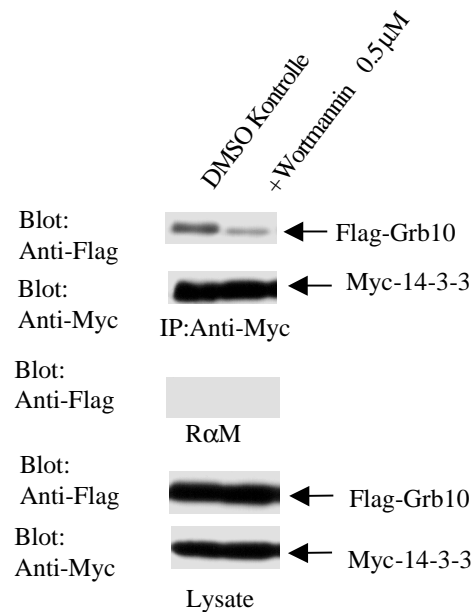


Abb. 32

#### Die Interaktion von Grb10 und 14-3-3 ist Wortmannin sensitiv

293 Zellen wurden transient mit Myc-14-3-3 und Flag-Grb10 kotransfiziert. Die Zellen wurden für 1 h mit 0,5 mM Wortmannin inkubiert, geerntet und lysiert. Anschließend erfolgte eine Anti-Myc Immunpräzitation. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden mittels Western-Blot Analyse mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

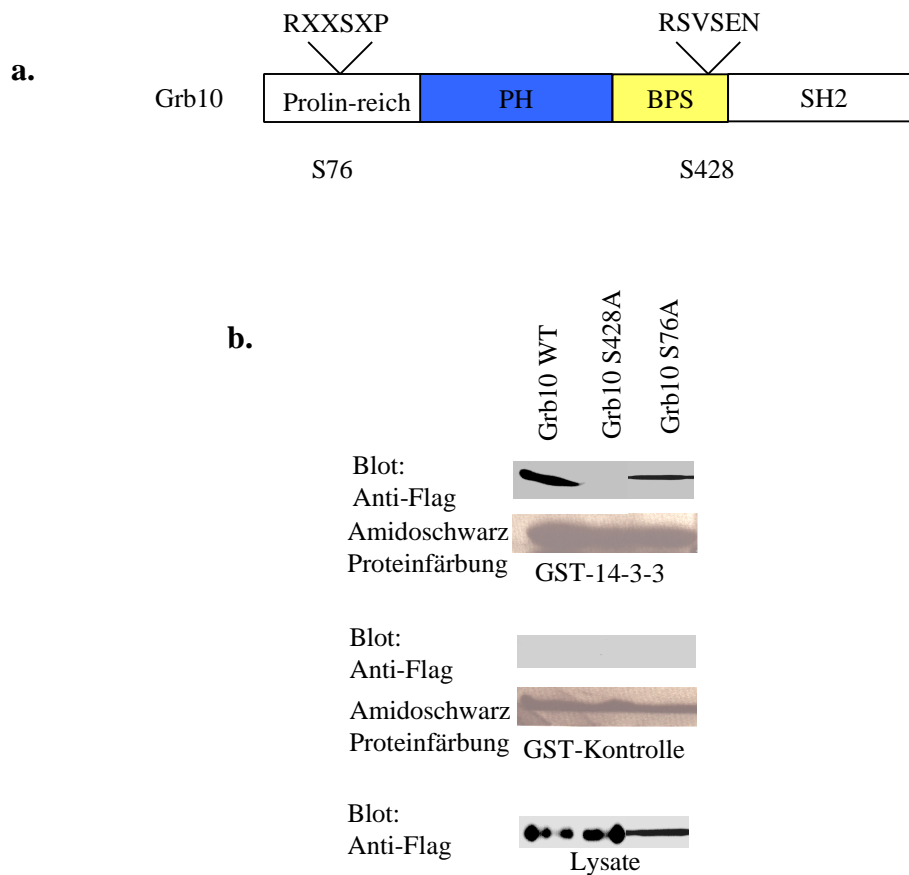
Tatsächlich reduzierte die Behandlung mit Wortmannin deutlich die Interaktion von 14-3-3 und Grb10 im Vergleich zum Kontrollansatz, obwohl in beiden Ansätzen gleiche Mengen an Myc-14-3-3 immunpräzipitiert wurden. Die Immunpräzipitation ist spezifisch, da die Kaninchenantiserumkontrolle keinerlei unspezifische Reaktionen zeigte (Abb. 32, mittleres Bild). Im unteren Teil der Abbildung 32 sind die Expressionsmengen der Proteine aufgetragen. Diese Daten zeigen, dass Grb10 *upstream* des PI3-Kinase/Akt Signalweges liegt und, dass Grb10 phosphoryliert sein muss, um mit 14-3-3 zu interagieren.

### 3.12 Identifikation der Bindungsstelle von 14-3-3 an Grb10

14-3-3 Proteine erkennen konservierte Phospho-Serin Motive, wie z. B. RXXpSXP, RSXpSXP und RXXpS (Muslin *et al.*, 1996; Yaffe *et al.*, 1997). Die meisten Bindungspartner von 14-3-3 besitzen eines der beschriebenen Motive. Tatsächlich konnten zwei potentielle 14-3-3 Bindungsstellen im Grb10 Molekül identifiziert werden. Es handelt sich dabei um das Serin an Position 76 innerhalb eines RXXpSXP Motivs und um das Serin an Position 428 innerhalb eines RSVpSEN Motivs (Abb. 33a). Um festzustellen, ob einer dieser Grb10 Serinreste für die Bindung an 14-3-3 verantwortlich ist, wurden PCR-Mutagenesen durchgeführt. Es wurden Punktmutationen eingeführt, welche Serinrest 76 bzw. Serinrest 428 innerhalb des Grb10 Konstruktes zu Alanin mutierten. Als Matrizen-DNA diente die c-DNA von Grb10WT im pCMV-Flag Vektor. Nachdem die Analyse der Sequenzierung ergeben hatte, dass die Serine erfolgreich zu Alanin mutiert worden waren, wurden GST-Bindungsstudien durchgeführt, um die Interaktion von GST-14-3-3 mit den neuen Grb10 Serin→Alanin Mutanten zu untersuchen. Grb10S76A, Grb10S428A und Grb10WT (als Positiv-Kontrolle) wurden in Cos1 Zellen transient exprimiert und die Lysate anschließend mit GST-14-3-3 inkubiert. Die gebundenen Proteinfractionen wurden in der Western-Blot Analyse mit einem monoklonalen Flag-Antikörper detektiert (Abb. 33b). Wie die Abbildung 33b zeigt, ist die Interaktion von GST-14-3-3 mit der Punktmutante Grb10S428A fast vollständig aufgehoben. Die Punktmutante Grb10S76A ist weiterhin in der Lage mit GST-14-3-3 zu interagieren. Die

Amidoschwarz-Färbung detektierte jeweils identische Mengen an GST-14-3-3 in allen drei Ansätzen. Desweiteren zeigt der Lysate Blot im unteren Teil der Abbildung 33b die gleichen Expressionsniveaus der drei verschiedenen Grb10 Konstrukte. Die Kontrollen mit GST-Leervektor zeigen keine unspezifischen Reaktionen.

Die Experimente zeigen also, dass 14-3-3 an den Serinrest 428 im Grb10 Molekül bindet.



**Abb. 33**

**14-3-3 bindet an Grb10 Serin 428**

**a:** Schematische Darstellung der beiden bekannten 14-3-3 Bindungsmotive innerhalb des Grb10 Moleküls

**b:** Grb10 Serin 76 bzw. Serin 428 wurde mittels PCR zu Alanin mutiert. Die Mutanten wurden in Cos1 Zellen transfiziert. Die Lysate wurden mit GST-14-3-3 inkubiert, die Proteinfraktionen im SDS-Gel separiert und in der Western-Blot Analyse mit einem monoklonalen Anti-Flag Antikörper detektiert.

### **3.13 Grb10 interagiert im nicht phosphorylierten Zustand mit Akt und im phosphorylierten Zustand mit 14-3-3**

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Daten lassen vermuten, dass Grb10 in zwei verschiedenen Phosphorylierungsformen in der Zelle vorliegt. Im nicht phosphorylierten Zustand interagiert Grb10 mit Akt. Nach Rezeptorstimulation rekrutiert Grb10 zusammen mit Akt im Komplex an die Zellmembran. An der Zellmembran befinden sich die für die Akt Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen PDK1 und PDK2. Diese phosphorylieren Akt an den zwei bekannten Phosphorylierungsstellen Threonin 308 und Serin 473. Die Phosphorylierung von Akt ist Voraussetzung für die Aktivierung von Akt. Aktiviertes Akt wiederum ist in der Lage Grb10 zu phosphorylieren (siehe Kapitel 3.9.1). Der Grb10/Akt Komplex zerfällt, und das phosphorylierte Grb10 ist in der Lage, mit 14-3-3 zu interagieren. Anschließend wird Grb10 von der Phosphatase PP2A dephosphoryliert. Der Grb10/14-3-3 zerfällt, und Grb10 kann wieder an Akt binden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Cos1 Zellen wurden mit Akt und mit bzw. ohne 14-3-3 und mit Grb10WT bzw. mit Grb10 S428A (Mutante, die nicht mehr mit 14-3-3 interagieren kann) transfiziert. Im oberen Teil der Abbildung 34 ist der Phosphorylierungsstatus von Akt gezeigt. Man kann, wie auch schon in Vorarbeiten gezeigt wurde (Jahn *et al.*, 2002), deutlich die Induktion der Akt Aktivierung durch Grb10WT Expression im Vergleich zur Vektorkontrolle erkennen (Abb. 34, Spur 2). Die Koexpression von Akt mit Grb10 S428A, der Grb10 Mutante, die 14-3-3 nicht mehr binden kann, zeigte eine weitere Zunahme der Akt Aktivierung (Abb. 34, Spur 3). Die Koexpression von Grb10 und 14-3-3 resultierte in einer leicht verringerten Induktion der Akt Aktivierung, im Vergleich zur Koexpression von Akt mit Grb10 ohne 14-3-3 (Abb. 34, Spuren 5 und 3). Interessanterweise konnte die Induktion der Akt Aktivierung wieder gesteigert werden, durch die Koexpression Grb10 S428A, die 14-3-3 nicht mehr binden kann, und 14-3-3 (Abb. 34, Spur 6). Die Koexpression von 14-3-3 allein konnte keine Aktivierung von Akt induzieren (Abb. 34, Spur 4).

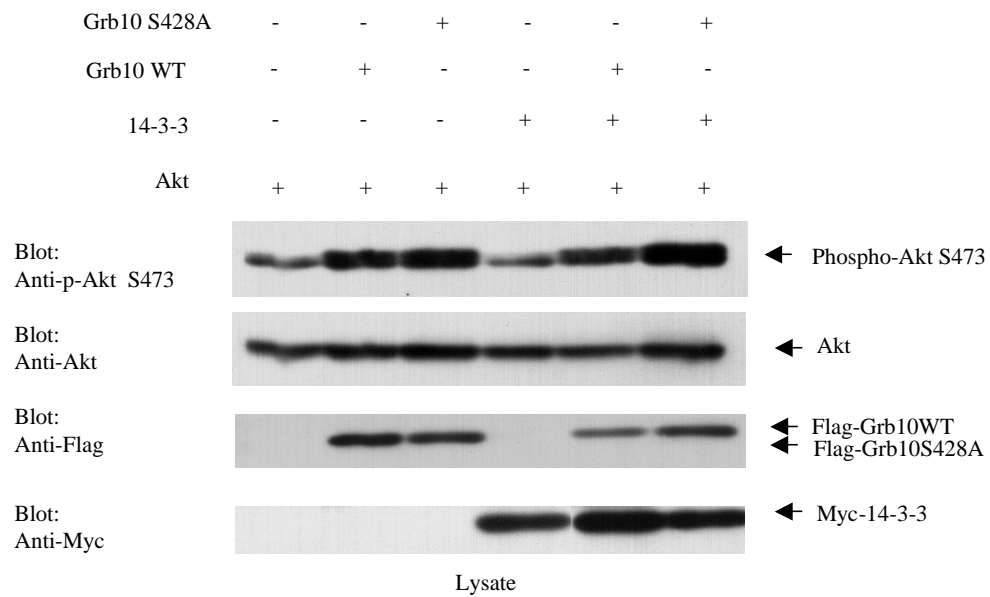


Abb. 34

**Grb10 interagiert entweder mit Akt oder mit 14-3-3**

**Cos1 Zellen wurden mit Akt und 1. mit Leervektor, 2. mit Leervektor und Grb10WT, 3. mit Leervektor und Grb10S428A, 4. mit Leervektor und 14-3-3, 5. mit Grb10WT und 14-3-3 und 6. mit Grb10S428A und 14-3-3 kotransfiziert. Die Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese separiert und im Western-Blot mit den angegebenen Antikörpern detektiert.**

Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Akt und 14-3-3 um die Interaktion mit Grb10 konkurrieren könnten. Grb10 interagiert also möglicherweise entweder mit Akt oder aber mit 14-3-3.

## 4. Diskussion

In der nachfolgenden Diskussion soll auf die beiden Hauptaspekte dieser Arbeit, die Interaktion von Grb10 mit Akt und die Interaktion von Grb10 mit 14-3-3, eingegangen werden. Abschließend werden die Zusammenhänge dargestellt und Schlussfolgerungen bezüglich der biologischen Relevanz dieser Interaktionen gezogen.

### 4.1 Charakterisierung der Interaktion von Grb10 mit Akt

Grundlage dieser Arbeit sind Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, die zeigen, dass das Adapterprotein Grb10 spezifisch mit der Serin/Threonin Kinase Akt interagiert und die Aktivierung von Akt induziert (Jahn *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Fusion von Grb10WT bzw. der Grb10 SH2 Domäne an das Akt Molekül eine konstitutive Aktivierung von Akt bewirkt.

Die Translokation von Akt aus dem Zytosol an die Zellmembran ist entscheidend für die Aktivierung von Akt (Andjelkovic *et al.*, 1997). Begünstigt wird dieses Translokation durch die Affinität der Akt PH Domäne an die von PI3-Kinase gebildeten Phospholipide (Isakoff *et al.*, 1998).

Die aktivierte Akt Kinase bewirkt durch Phosphorylierung der anti-apoptischen Substrate, wie FKHRL1 und Bad, einen deutlichen Schutz vor Apoptose (Datta *et al.*, 1997 und 1999, Brunet *et al.*, 1999). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Grb10 mit einer membranständigen Rezeptor Tyrosin Kinase (c-Kit) interagiert (Jahn *et al.*, 2002). Daher lag die Vermutung nahe, dass Grb10 als Transportvehikel für Akt dient und zusammen mit Akt im Komplex an die Zellmembran lokalisiert. Um die Bedeutung der Membranlokalisierung von Grb10 zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Grb10 Konstrukt kloniert, das konstitutiv an die Zellmembran lokalisiert (Kapitel 3.1). Die Membranlokalisierung und konstitutive Bindung an den stimulierten c-Kit Rezeptor kann somit imitiert werden. Dafür wurde die Ras-Farnesylierungssequenz an das C-terminale Ende von Grb10 fusioniert (Abb. 6). Die Funktionalität des Grb10FM Konstrukts wurde in Koimmunpräzipitationen, Fraktionierungsexperimenten und konfokaler Mikroskopie zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation, verifiziert (Abb. 11a+b, 12). Der Einfluss des

membrangebundenen Grb10FM Konstrukts auf die Akt Aktivierung wurde im Ba/F3 Zellsystem untersucht (Kapitel 3.3.1). Die Expression von Grb10FM induzierte hier einen deutlichen Anstieg der Akt Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle und zu Grb10WT (Abb.13). Bei diesem Experiment wurde ausschließlich endogenes Akt untersucht, was mögliche Artefakte durch Überexpression, ausschließt. Die Membranlokalisierung von Grb10FM ist somit direkt mit der Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt verknüpft. Das spricht dafür, dass Grb10 Akt an die Zellmembran transloziert. Ein solcher Mechanismus konnte bereits für das Adapterprotein Grb2 gezeigt werden. Dieses rekrutiert den Ras Aktivator SOS an die Zellmembran. Wobei bei dieser Interaktion alleine die Membranlokalisierung für die Aktivierung von Ras ausreichend ist (Aronheim *et al.*, 1994). Die beschriebenen Daten sprechen dafür, dass der funktionelle Zusammenhang zwischen Grb10 und Akt ähnlich gelagert ist.

Nach seiner Aktivierung, akkumuliert Akt im Zellkern und phosphoryliert seine nukleären Substrate (Meier *et al.*, 1997, Andjelkovic *et al.*, 1997). Grb10FM wurde zusammen mit Akt in Zellen exprimiert und in der indirekten Immunfluoreszenz visualisiert (Kapitel 3.3.2). Tatsächlich akkumulierte Akt im Zellkern (Abb.14), was dafür spricht, dass Grb10FM neben der Aktivierung von Akt auch die Phosphorylierung der nukleären Substrate von Akt induziert.

Wie in Kapitel 3.5 gezeigt wurde, schützt Akt IL-3 abhängige Zellen nach IL-3 Entzug vor Apoptose. Es wurde daher der Frage nachgegangen, ob die durch Grb10FM Expression induzierte Aktivierung von Akt mit einem gesteigerten Schutz vor Apoptose einhergeht. Zu diesem Zweck wurde den Grb10FM exprimierenden, IL-3 abhängigen Ba/F3 Zellen, IL-3 entzogen (Kapitel 3.5). Die Ergebnisse zeigten, dass der Schutz vor Apoptose mit der Membranlokalisierung von Grb10 korreliert (Kapitel 3.5.1 und 3.5.2). Dabei vermittelt die Expression von Grb10WT einen partiellen Schutz vor Apoptose, wohingegen die Expression von membrangebundenen Grb10FM einen außerordentlich starken Apoptoseschutz bietet (Abb. 16, 17 und 18). Die Erklärung für den anti-apoptotischen Schutz von Grb10FM liegt in der starken Induktion der Akt Aktivierung. Unklar bleibt, wie Grb10WT Apoptose nach Serumentzug blockiert. Erste Versuche deuten darauf hin, dass Grb10WT nach Serumentzug verstärkt an den Interleukin-3 (IL-

3) Rezeptor bindet. Grb10 lokalisiert also auch nach Faktorentzug an die Zellmembran und kann weiter die Aktivierung von Akt induzieren.

Dass tatsächlich die Membranlokalisation von Grb10FM ausschlaggebend für die gesteigerte Aktivierung von Akt ist, wurde durch Inhibition der Farnesylierung gezeigt (Kapitel 3.4). Die Substanz Mevinolin inhibiert die Farnesylierung und somit die konstitutive Membranlokalisation von Proteinen. Nach Behandlung mit Mevinolin nahm die Phosphorylierung von Akt in Grb10FM exprimierenden Zellen deutlich ab (Abb.15). Die Phosphorylierung in Grb10WT exprimierenden Zellen blieb hingegen unbeeinflusst.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Fusion von Grb10WT bzw. der SH2 Domäne von Grb10 an Akt eine konstitutive Aktivierung von Akt induziert (Jahn *et al.*, 2002). Die PH Domäne von Akt besitzt eine starke Affinität zu den von PI3-Kinase gebildeten Phospholipiden, was die Translokation von Akt aus dem Zytosol an die Zellmembran begünstigt (Kapitel 1.4.2) (Ferguson *et al.*, 1995). Dabei ist eine bestimmte Konsensus Sequenz innerhalb der Akt PH Domäne für die Interaktion mit den Lipiden verantwortlich (Isakoff *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Deletion der Phospholipidbindungsstelle im Akt Molekül durch Fusion an Grb10WT kompensiert werden konnte (Kapitel 3.6) (Abb. 19).

Die Interaktion von Grb10 und Akt konnte in unserer Arbeitsgruppe durch Koimmunpräzipitationen gezeigt werden (Jahn *et al.*, 2002). Die Koimmunpräzipitationen wurden mit Zelllysaten durchgeführt und somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion von Grb10 und Akt über weitere Moleküle vermittelt wird. Um die direkte Assoziation von Grb10 und Akt zu zeigen, wurden Untersuchungen mit aufgereinigten GST-Fusionsproteinen durchgeführt (Kapitel 3.8). Diese Technik stellt eine bewährte Untersuchungsmethode dar, mit der direkte Interaktionen zwischen Proteinen nachgewiesen werden können (Duyster *et al.*, 1995, Bai *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu unseren vorherigen Arbeiten (Jahn *et al.*, 2002) konnte der Nachweis erbracht werden, dass Grb10 und Akt direkt interagieren (Abb. 21).

Phosphorylierung von Grb10 konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden (Dong *et al.*, 1997, Bai *et al.*, 1998, Mano *et al.*, 1998, Langlais *et al.*, 2000, Giorgetti-Peraldi



*et al.*, 2001). In einem *in vitro* Kinaseexperiment wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Grb10 ein direktes Substrat der Serin/Threonin Kinase Akt ist (Kapitel 3.9.1). Hier konnte gezeigt werden, dass die aktive Akt Kinase Grb10 *in vitro* phosphoryliert. Diese Phosphorylierung war bei Inkubation mit inaktiver Akt Kinase nicht nachweisbar (Abb. 22). Die Kinasierungsexperimente wurden in dieser Arbeit ausschließlich *in vitro* durchgeführt. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob Grb10 auch *in vivo* ein Substrat von Akt ist.

Grb10 liegt in einigen Zelllinien phosphoryliert und in einigen Zelllinien nicht phosphoryliert vor (Jahn *et al.*, 2002). Es existieren also verschiedene Phosphorylierungszustände von Grb10, die neben der Kinase auch eine Phosphatase voraussetzen. Dazu wurden Experimente mit dem Phosphatase Inhibitor Okadeinsäure durchgeführt, die zeigten, dass PP2A Grb10 dephosphoryliert (Abb. 23). Diese Daten unterstützen zusätzlich die Hypothese, dass Grb10 in zwei verschiedenen Phosphorylierungszuständen in der Zelle vorliegt. Zum einen in einer nicht phosphorylierten Form, was eine Interaktion mit Akt begünstigt und zum anderen in einer phosphorylierten Form, was eine Interaktion mit einem neuen Protein bevorzugt. Die Interaktion mit diesem neuen Interaktionspartner von Grb10 wird im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben.

#### **4.2 Identifikation von 14-3-3 als neuer Interaktionspartner von Grb10**

Um neue, biologisch relevante Bindungspartner von Grb10 zu identifizieren, wurde ein *Yeast-Two-Hybrid Screen* durchgeführt (Kapitel 3.10). Dabei wurde 14-3-3 als neuer Interaktionspartner von Grb10 identifiziert (Kapitel 3.10.1).

14-3-3 Proteine sind eine Familie von Molekülen, die eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von eukaryotischen Zellen spielen (Kapitel 1.6). 14-3-3 Proteine erkennen spezifisch kurze Phosphoserin/Threonin Motive (Muslin *et al.*, 1996, Yaffe *et al.*, 1997). Dabei gibt es bestimmte Konsensus-Sequenzen, wie: RSXpSXP, RXXpSXP oder RXXpS, an die 14-3-3 bevorzugt bindet (Muslin *et al.*, 1996, Yaffe *et al.*, 1997).

Um die Assoziation von Grb10 und 14-3-3 *in vitro* zu reproduzieren, wurde ein GST-Bindungsexperiment mit rekombinantem GST-14-3-3 Fusionsprotein und Grb10

durchgeführt (Kapitel 3.10.2) (Abb. 26a+b). Der Nachweis der Interaktion der Proteine im zellfreien System und im *Yeast-Two-Hybrid* System deutet auf eine direkte Interaktion hin, die nicht durch Adaptermoleküle vermittelt wird.

Um zu zeigen, dass die Interaktion von Grb10 und 14-3-3 auch in intakten Zellen stattfindet, wurden Koimmunpräzipitationsstudien und indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt (Kapitel 3.10.3) (Abb. 27+28). Beide Techniken bestätigen die Interaktion von Grb10 und 14-3-3 *in vivo*.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von 14-3-3 mit FKHRL1, Bad oder PDK1 phosphorylierungsabhängig ist (Datta *et al.*, 1997, Brunet *et al.*, 1999, Sato *et al.*, 2002). Auch Grb10 muß phosphoryliert vorliegen, um mit 14-3-3 interagieren zu können (Abb. 29-31) (Kapitel 3.11.1, 3.11.2).

14-3-3 Proteine binden mit hoher Spezifität an RXXRXXpSXP oder RXXpS Motive (Yaffe *et al.*, 1997). Im Grb10 Molekül konnten zwei solcher Motive identifiziert werden (Kapitel 3.12) (Abb. 33a). Das erste 14-3-3 Bindungsmotiv liegt zwischen den Aminosäuren 71 und 78 Serin, das zweite Motiv zwischen den Aminosäuren 425 bis 430. Um zu zeigen, dass eines dieser Motive für die Bindung an 14-3-3 verantwortlich ist, wurden Serin 76 innerhalb des RXXSXP Motivs und Serin 428 innerhalb des RSVSEN Motivs zu Alanin mutiert. Interessanterweise konnte die Beobachtung gemacht werden, dass die RSVSEN Mutante im SDS Gel schneller migriert als die RXXSXP Mutante oder Grb10WT. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass Serin 428 eine mögliche Phosphorylierungsstelle darstellt. Tatsächlich zeigten GST-Bindungsstudien mit aufgereinigtem GST-14-3-3, dass Serin 428 verantwortlich für die Interaktion mit 14-3-3 ist (Abb. 33b). Der potentielle Regulationsmechanismus der Grb10/14-3-3 Interaktion liegt also darin, dass die Phosphorylierung von Serin 428 zur Interaktion mit 14-3-3 führt. Die Mutation des Serins 76 hatte keinen Einfluss auf die Interaktion mit 14-3-3.

### **4.3 Regulationsmechanismus und biologische Relevanz der Interaktion von Grb10 und 14-3-3**

Interessanterweise konnte die Grb10S428A Mutante, die nicht mehr in der Lage ist mit 14-3-3 zu interagieren, die Aktivität von Akt zusätzlich steigern (Abb. 34). Aus diesen Daten stellen wir folgende Hypothese auf (Abb. 35): Grb10 existiert in zwei

verschiedenen Phosphorylierungsstadien in der Zelle. Im nicht phosphorylierten Zustand interagiert Grb10 mit Akt und rekrutiert Akt an die Zellmembran. Akt wird phosphoryliert und somit aktiviert. Aktiviertes Akt phosphoryliert wiederum Grb10. Möglicherweise ist diese Modifikation des Grb10 Moleküls das Signal für die Dissoziation des Grb10/Akt Komplexes. Phosphoryliertes Grb10 interagiert mit 14-3-3. Die Interaktion von 14-3-3 mit phosphoryliertem Grb10 ist möglicherweise für den Transport von Grb10 zurück ins Zytoplasma notwendig. Grb10 wird von der Phosphatase PP2A dephosphoryliert und kann nun wieder mit Akt interagieren. Die Interaktion von 14-3-3 mit Grb10 könnte einen Regelmechanismus für die Akt Aktivierung darstellen, da an 14-3-3 gebundenes Grb10 nicht mehr mit Akt interagieren und somit auch keine Akt Aktivierung induzieren kann.

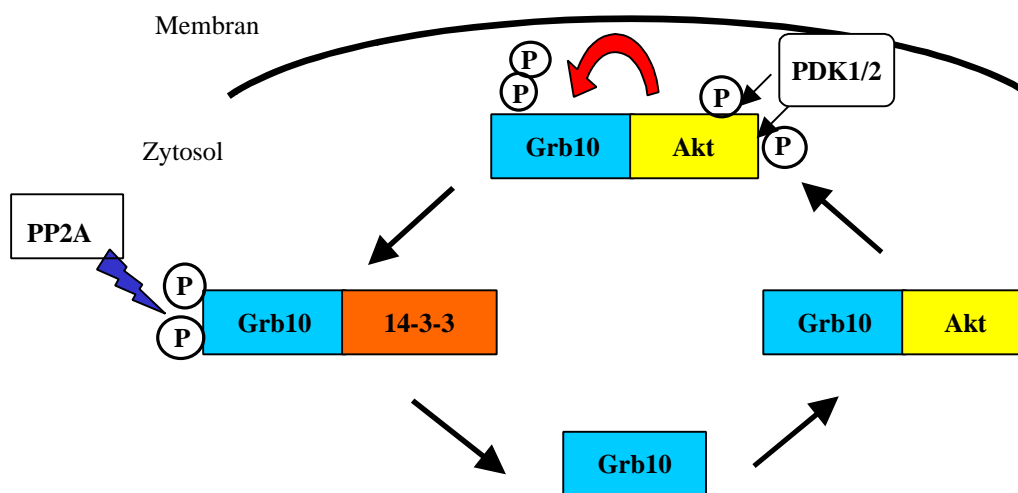


Abb. 35

**Modell der Grb10 Regulation durch Interaktion mit Akt oder mit 14-3-3**

Somit zeigt diese Arbeit eine weitere Funktion für 14-3-3 Proteine, als sogenannte *Gatekeeper*, die keinen direkten Einfluss auf die Interaktionspartner haben, sondern

ausschließlich die Lokalisation von Proteinen beeinflussen (Yaffe *et al.*, 2002, Brunet *et al.*, 2002).

#### 4.4 Ausblick

Weiterführende Experimente in unserer Arbeitsgruppe beschäftigen sich mit den verschiedenen *Splice* Varianten von Grb10. Diese Untersuchungen sollen zeigen, ob das alternative *Splicing* von Grb10 einen Einfluss auf die Induktion der Akt Aktivierung haben könnte. Es existieren verschiedene *Splicing* Varianten von Grb10, solche mit intakter PH Domäne und solche ohne PH Domäne (Kapitel 1.5.1) (Abb.5). Die Isoform ohne intakte PH Domäne besitzt einen inhibitorischen Effekt auf den Insulin Rezeptor Signalweg (Liu *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu wurde ein stimulatorischer Effekt der Grb10 Isoform mit intakter PH-Domäne beschrieben (O'Neill *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt, konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Grb10WT im Gegensatz zu Grb10 $\Delta$ PH, Akt Aktivität induzieren kann (Jahn *et al.*, 2002). Im Hinblick auf diese Daten wurden in ersten Vorversuchen Tumorzelllinien, in denen Akt Aktivierung oder Amplifikation beschrieben ist, auf Grb10 Expression untersucht. Dabei wurde das Verhältnis von Grb10WT zu Grb10 $\Delta$ PH Expression überprüft. Für dieses Experiment wurde die Methode der *Real-Time* PCR gewählt. Es wurden Primer hergestellt, die es ermöglichen Grb10WT von Grb10 $\Delta$ PH zu unterscheiden. Diese ersten Vorversuche deuten darauf hin, dass das Verhältnis von Grb10WT (induziert Akt Aktivität) zu Grb10 $\Delta$ PH (induziert keine Akt Aktivität) in normalen Zellen annähernd gleich ist, wohingegen in Tumorzelllinien, in denen Akt stark aktiviert ist, dieses Gleichgewicht zugunsten der Grb10WT-Expression verschoben ist. Möglicherweise liegt die Bedeutung von Grb10 nicht nur in der Aktivierung von Akt, sondern auch in dessen Regulation.

Da die Akt Kinase eine zentrale Rolle in der Tumorentstehung und der Tumorentwicklung besitzt, ist die Blockierung der Akt Kinase ein attraktives Ziel für die Tumorthherapie. Die Identifikation von Regulatorproteinen ist im Hinblick auf die Generierung sekundärer, therapeutischer Angriffsmechanismen interessant. Die Identifizierung von Grb10 und 14-3-3 als zwei neue Regulationsproteine von Akt, stellen daher zwei neue mögliche therapeutische Angriffspunkte dar.

## 5. Zusammenfassung

Die Serin/Threonin Kinase Akt ist das zelluläre Homolog des viralen Onkoproteins v-Akt und ist in vielen Tumoren amplifiziert und stark aktiviert. Die Überexpression und Aktivierung von Akt führt in vielen verschiedenen Zelllinien zu einer Verzögerung des Zelltods. Die PI3-Kinase abhängige Aktivierung von Akt wird dadurch reguliert, dass Akt über seine PH Domäne an die von PI3-Kinase generierten Phospholipide bindet. Die Translokation aus dem Zytosol an die Zellmembran ist Voraussetzung für die Phosphorylierung und somit Aktivierung von Akt durch die Kinasen PDK1 und PDK2. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass das Adapterprotein Grb10 Akt Aktivität induziert. Da die Rekrutierung von Akt aus dem Zytosol wichtig für seine Aktivierung ist, wurde vermutet, dass Grb10 diese Translokation begünstigt.

Grb10 gehört zu einer Familie von Adapterproteinen, welche in der Tyrosin Kinase vermittelten Signaltransduktion eine Rolle spielen. So interagiert Grb10, z. B. über seine SH2-Domäne, mit stimulierten Rezeptortyrosinkinasen.

Um zu verifizieren, dass Grb10 als Transportvehikel für Akt dient, wurde ein Grb10 Konstrukt kloniert, das konstitutiv an die Zellmembran lokalisiert. Hierfür wurde die Ras-Farnesylierungssequenz an das C-terminale Ende von Grb10 fusioniert. Stabil Grb10 Farnesylierungsmutante (FM) exprimierende hämatopoetische Ba/F3 Zellen zeigten einen deutlichen Anstieg der Aktivität von Akt im Vergleich zu Grb10WT bzw. Leervektor exprimierenden Zellen. Zusätzlich induzierten Grb10FM exprimierende Zellen einen deutlichen Schutz vor Apoptose. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Mechanismus der Grb10 induzierten Akt Aktivierung über die Translokation an die Zellmembran erfolgt.

Grb10 wird an Tyrosin- und an Serin/Threoninresten phosphoryliert. Die Grb10 Phosphorylierung kann mit dem spezifischen PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin unterbunden werden. Anhand dieser Daten wurde vermutet, dass die für die Grb10 Phosphorylierung verantwortliche Kinase unterhalb des PI3-Kinase/Akt Signalweges zu finden ist. Zusätzlich zum Nachweis der direkten Interaktion von Grb10 und Akt, wurde Grb10 als Substrat von Akt identifiziert.

Um neue und biologisch relevante Interaktionspartner von Grb10 zu identifizieren, wurde mit Hilfe eines *Yeast-Two-Hybrid* Systems eine c-DNA Bibliothek der CML-

Zelllinie K562 auf Interaktionen mit Grb10 untersucht. Dabei konnte die Bindung an das Protein 14-3-3 nachgewiesen werden.

14-3-3 Proteine regulieren den Zellzyklus und beugen der Apoptose vor, indem sie nukleäre und zytosolische Verteilung von Signalmolekülen kontrollieren.

In GST-Bindungsstudien konnte die spezifische Interaktion von Grb10 mit 14-3-3 *in vitro* gezeigt werden. Mittels Koimmunpräzitationsstudien und indirekter Immunfluoreszenz wurde die Assoziation von Grb10 und 14-3-3 *in vivo* nachgewiesen.

Zusätzliche Daten belegen die Bedeutung der Grb10 Phosphorylierung für die Interaktion mit 14-3-3. Die Interaktion von endogenem 14-3-3 findet ausschließlich mit hyperphosphoryliertem Grb10 statt.

Der Serinrest 428 des Grb10 Moleküls ist für die Bindung an 14-3-3 verantwortlich; dies konnte durch Bindungsexperimente mit verschiedenen Grb10 Mutanten gezeigt werden. Dieser Serinrest liegt innerhalb eines 14-3-3 Bindungsmotivs RSVSEN.

Die Grb10 RSVSEN Mutante, welche nicht mehr mit 14-3-3 interagieren kann, ist in der Lage mehr Akt Aktivität zu induzieren als Grb10WT.

Die in dieser Arbeit generierten Daten ermöglichen die Erstellung des folgenden Modells: Grb10 existiert in zwei verschiedenen Phosphorylierungsstadien in der Zelle. Im nicht phosphorylierten Zustand interagiert Grb10 im Zytosol mit Akt. Nach Rezeptorstimulation rekrutiert Grb10 an den stimulierten Rezeptor, dient dabei als Transportvehikel für Akt und nimmt Akt mit an die Plasma Membran. An der Zellmembran befinden sich die für die Akt Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen PDK1 und 2. Die Phosphorylierung und somit Aktivierung von Akt ist Voraussetzung für die Phosphorylierung von Grb10. Die Phosphorylierung von Grb10 ermöglicht die Interaktion von Grb10 mit dem neuen Bindungspartner 14-3-3. So ist 14-3-3 möglicherweise als Gegenspieler von Akt zu sehen, der mit Akt um die Bindung an Grb10 kompetitiert. Dies könnte ein Mechanismus sein, der dazu dient, die konstitutive Aktivierung von Akt durch Grb10 zu regulieren.

## 6. Literaturverzeichnis

Alessi, D. R., Caudwell, F. B., Anjelkovic, M., Hemmings, B. A. and Cohen, P. (1996) Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 399: 333-338

Andjelkovic, M., Alessi, D. R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N. J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J. M. and Hemmings, B. A. (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 272: 31515-24

Aronheim, A., Engelberg, D., Nanxin, L., Al-Alawi, N., Schlessinger, J. and Karin, M. (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor SOS is sufficient for activating the Ras signalling pathway. *cell* 78: 949-961

Bai, R. Y., Jahn, T., Schrem, S., Munzert, G., Weidner, K. M., Wang, J. Y. and Duyster, J. (1998) The SH2-containing adapter protein Grb10 interacts with Bcr-Abl. *Oncogene* 17: 941-948

Bai, R. Y., Ouyang, T., Miething, C., Morris, S. W., Peschel, C. and Duyster, J. (2000) Nucleolar phosphoprotein nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood* 96, 4319-27.

Bellacosa, A., Defeo, D., Godwin, A. K., Bell, D. W., Chen, J. Q., Altomare, D. A., Wan, M. H., Dubeau, L., Scambia, G. Maciullo *et al.* (1995) Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 64: 280-285

Bielka, H. u. Börner, T. (1995) *Molekulare Biologie der Zelle.* Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart

---

Bonnefoy-Berard, N., Liu, Y. C., von Willebrand, M., Sung, A., Elly, C. et al. (1995) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10142-10146

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

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

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-868

Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J. V., Dalal, S. N., DeCaprio, J. A., Greenberg, M. E. and Yaffe, M. B. (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J. Cell. Biol.* 156: 817-828

Chan, T. O. and Tsichlis, P. N. (2002) PDK2: a complex tail in one Akt. *SciSTKE*: E1

Chen, M., She, H., Kim, A., Woodley, D. T. and Li, W. (2000) Nckbeta adapter regulates actin polymerisation in NIH 3T3 fibroblasts in response to platelet-derived growth factor bb. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7867-7880

Chen, W. S., Xu, P.-Z., Gottlob, K., Chen, M.-L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T. and Hay, N. (2001) Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes & Dev.* 15: 2203-2208



---

Cheng, J.Q. Godwin, A. K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T. F., Hamilton, T. C., Tsichlis, P. N. and Testa, J. A. (1992) Akt2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9267-9271

Cheng, J. Q., Ruggeri, B., Klein, W. M., Sonoda, G., Altomare, D. A., Watson, D. K. and Testa, J. R. (1996) Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3636-3641

Chiang, C.W., Harris, G. Ellig, C., Masters, S. C, Subramanian, R., Shenolikar, S., Wadzinski, B. E. and Yang, E. (2001) Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood* 97: 1289-1297

Conklin, D. S., Galaktionov, K. and Beach, D. (1995) 14-3-3 proteins associate with Cdc25 phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7892-7896

Craparo, A., Freund, R. and Gustafson, T. A. (1997) 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phospho-serine-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 272: 11663-11669

Daly, R. J. (1998) The Grb7 family of signalling proteins. *Cell. Signal.* 10: 613-618

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M. E. (1997) Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241

Datta, S. R., Brunet, A. and Greenberg, M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development* 13: 2905-2927

---

Di Cristofano, A. and Pandolfi, P. P. (2000) The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 100: 387-390

Dong, L. Q., Du, H., Porter, S., Kolakowski Jr., L. F., Lee, V. A., Mandarino, J., Fan, J., Yee, D. and Liu, F. (1997) Cloning, chromosome localization, expression, and characterization of an src homology 2 and pleckstrin homology domain-containing insulin receptor binding protein hGrb10 $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* 272: 29104-29112

Dong, L. Q., Landa, L. R., Wick, M. J., Zhu, L., Mukai, H., Ono, Y. and Liu, F. (2000) Phosphorylation of Protein Kinase N by phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates insulin signals to the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5098-5094

Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-45.

Downward, J. (1998) Mechanism and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:262-267

Downward, J. (1999) How Bad phosphorylation is good for survival. *Nat. Cell. Biol.* 1: E33-35

Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R. and Greenberg, M. E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275: 661-665

Duyster, J., Baskaran, R. & Wang, J. Y. (1995) Src homology 2 domain as a specificity determinant in the c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeated domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1555-1559.

- 
- Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. and Sigler, P. B. (1995) Structure of a high affinity complex between inositol-1,4,5-triphosphat and a phospholipase C pleckstrin domain. *Cell* 83: 1037-1046
- Fields, S. and Song, O. K. (1989) A novel genetic System to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246
- Filippa, N., Sable, C. L., Filloux, C., Hemmings, B. A. and Van Oberghen, E. (1999) Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4989-5000
- Franke, T. F., Kaplan, D. R. and Cantley, L. C. (1997) PI3K: a downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88: 435-437
- Frantz, J. D., Giorgetti-Peraldi, S., Ottinger, E. A. and Shoelson, S. E. (1997) Human GRB/IR beta/Grb10: splice variants of an insulin and growth factor receptor-binding protein with PH and SH2 domains. *J. Biol. Chem.* 272: 2659-2667
- Frodin, M., Jensen, C. J., Merienne, K. and Gammeltoft, S. (2000) A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *EMBO J.* 19: 2924-2934
- Fu, H., Subramanian, R. R. and Masters, S. C. (2000) 14-3-3 Proteins: Structure, Function and Regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 617-647
- Furlanetto, R. W., Dey, B. R., Lopaczynski, W. and Nissley, S. P. (1997): 14-3-3 proteins interact with the insulin-like growth factor receptor but not with the insulin receptor. *Biochem. J.* 327: 765-771
- Gibson, T. J., Hyvonen, M., Musacchio, A., Saraste, M. and Birney, E. (1994) PH domain: the first anniversary. *Trends. Biochem. Science* 19: 348-353

---

Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Mas, J. C. and Van Obberghen, E. (2001) The adapter protein Grb10, a positive regulator of vascular endothelial growth factor signalling. *Oncogene* 20: 3959-3968

Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L. (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7835-7840

Han, D. C., Shen, T.-L. and Guan, J.-L. (2001) The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signalling molecules and potential cellular functions. *Oncogene* 20: 6315-6321

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer, *Cell* 100: 57-70

Hausser, A., Storz, P., Link, G., Stoll, H., Liu, Y. C., Altmann, A., Pfizenmaier, K. and Johannes, F. J. (1999) Protein Kinase C mu is negatively regulated by 14-3-3 signal transduction proteins. *J. Biol. Chem.* 274: 9258-64

He, W., Rose, D. W., Olefsky, J. M. and Gustafson, T. A. (1998) Grb10 interacts differentially with the insulin receptor, insulin-like growth factor-I receptor, and epidermal growth factor receptor via the Grb10 Src homology 2 (SH2) domain and a second domain located between the pleckstrin homology and SH2 domains. *J. Biol. Chem.* 273: 6860-6867

Hunter, T. (1995) Protein Kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell* 80: 225-236

Hunter, T. (2000) Signaling-2000 and Beyond. *Cell* 100: 113-127

Isakoff, S. J., Cardozo, T., Andreev, J., Li, Z., Ferguson, K. M., Abagyan, R., Lemmon, M. A., Aronheim, A. and Skolnik, E. Y. (1998) Identifikation and analysis of PH

domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel *in vivo* assay in yeast. *EMBO J.* 17: 5374-5387

Jahn, T., Seipel, P., Coutinho, S., Miething, C., Peschel, C. & Duyster, J. (2001) Grb4/Nckbeta acts as a nuclear repressor of v-Abl-induced transcription from c-jun/c-fos promoter elements. *J Biol Chem* 276, 43419-27.

Jahn, T., Seipel, P., Coutinho, S., Urschel, S., Schwarz, K., Miething, C., Serve, H., Peschel, C. and Duyster, J. (2002) Analysing c-kit internalisation using a functional c-kit-EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain. *Oncogene* 21, 4508-20.

Jahn, T, Seipel, P. Urschel, S. Peschel. C. and Duyster, J. (2002) Role for the Adapter Protein Grb10 in the Activation of Akt. *Mol. Cell. Biol.* 22: 979-991

Kandel, E. S. and Hay, N. (1999) The regulation and activities of the multifunctional serin/threonine kinase Akt. *Exp. Cell. Res.* 253: 210-229

Katz, M. E. and McComick, F. (1997) Signal transduction from multiple Ras effectors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 75-79

Kennedy, S. G., Wagner, A. J., Conzen, S. D., Jordan, J., Bellacosa, A., Tschlis, P. N. and Hay, N. (1997) The PI 3-kinase signalling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes. Dev.* 11: 701-713

Khwaja, A., Rodriguez-Viciano, P., Wennstrom, S., Warne, P. H. and Downward, J. (1997) Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J.* 16: 2783-2793

Kulik, G., Klippel, A. and Weber, M. J. (1997) Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1595-1606

- 
- Langlais, P., Dong, L. Q., Hu, D. and Liu, F. (2000) Identification of Grb10 as a direct substrate for members of the Src tyrosine kinase family. *Oncogene* 19: 10287-10291
- Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P. and Parker, P. J. (1998) Protein Kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281: 2042-2045
- Lewin, B. (1998) *Molekularbiologie der Gene*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
- 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
- Liu, F. and Roth, R. A. (1995) Grb10-IR: a SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 10287-10291
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2001) *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, New York
- Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D. and Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein Grb2 links receptor tyrosine kinases to ras signalling. *Cell* 70: 431-442
- Lundberg, K. S. Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M. Sorge, J. A. and Mathur, E. J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108: 1-6
- Mano, H., Ohya, K., Miyazato, A., Yamashita, Y., Ogawa, W., Inazawa, J., Ikeda, U., Shimada, K., Hatake, K. Kasuga, M., Ozawa, K. and Kajigaya, S. (1998) Grb10/Grb10IR as an in vivo substrate of Tec tyrosine kinase. *Genes Cells* 3: 431-441

---

Masters, S. C., Pederson, K. J., Zhang, L., Barbieri, J. T. and Fu, H. (1999) Interaction of 14-3-3 zeta required for activation of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 38; 5216-5221

Meier, R. Alessi, D. R., Cron, P., Andjelkovic, M. and Hemmings, B. A. (1997) Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. *J. Biol. Chem.* 272: 30491-30497

Metcalf, D. (1989) The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 339: 27-30

Michaud, N. R., Fabian, J. R., Mathes, K. D. and Morrison, D. K. (1995) 14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3390-3397

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Ehrlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp.* 51: 263-273

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 phosphoserin. *Cell* 84: 889-897

Myers, M. P., Pass, I., Batty, I. H., Van der Kaay, J., Stolarov, J. P. Hemmings, B. A., Wigler, M. H., Downes, C. P. and Tonks, N. K. (1998) The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13513-13518

Nakatani, K. Thompson, D. A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R. and Roth, R. A. (1999) Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J. Biol. Chem.* 274, 21528-21532

---

Nantel, A., Huber, M. and Thomas, D. Y. (1999) Localization of endogenous Grb10 to the mitochondria and its interaction with the mitochondrial-associated Raf-1 pool. *J. Biol. Chem* 274: 35719-35724

Neumann, E. and Rosenheck, K. (1972) Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* 10: 279-290

O'Neill, T. J., Rose, D. W., Pillay, T. S., Hotta, K., Olefsky, J. M. and Gustafson, T. A. (1996) Interaction of a Grb10-IR splice variant (a human Grb10 homolog) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. Evidence for a role in mitogenic signalling. *J. Biol. Chem.* 271: 22506-22513

Ooi, J., Yajnik, V., Immanuel, D., Gordon, M., Moskow, J. J., Buchberg, A. M. and Margolis, B. (1995) The cloning of Grb10 reveals a new family of SH2 domain proteins. *Oncogene* 10: 1521-1630

Pawson, T. and Nash, P. (2000) Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* 14: 1027-1047

Pawson, T. and Schlessinger, J. (1993) SH2 and SH3 domains. *Curr. Biol.* 3: 434-442

Pawson, T. and Scott, J. D. (1997) Signaling through scaffold anchoring and adapter proteins. *Science* 278: 2075-2080

Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S. and Piwnica-Worms, H. (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277: 1501-1505

Powell D. W., Rane, M. J., Chen, Q., Singh, S. and McLeish, K. R. (2002) Identification of 14-3-3 zeta as a protein kinase B/Akt substrate. *J. Biol. Chem.* 277: 21639-21642



Pullen, N., Dennis, P. B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S. C., Hemmings, B. A. and Thomas, G. (1998) Phosphorylation and activation of p70SK by PDK1. *Science* 297: 707-710

Reuther, G. W. Fu, H., Cripe, L. D., Collier, R. J. and Pendergast, A. M. (1994) Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* 266: 129-133

Rodriguez-Tarduchy, G., Collins, M. and Lopez-Rivas, A. (1990) Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. *Embo J.* 9: 2997-3002

Sabbatini, P and McCormick, F. (1999) Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 24263-24269

Sable, C. L., Fillippa, N., Filloux, C., Hemmings, B. A. and Van Obberghen, E. (1998) Involvement of the Pleckstrin Homology Domain in the Insulin-stimulated activation of Protein Kinase B. *J. Biol. Chem.* 273: 29600-29606

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2. Auflage

Sato, S., Fujita, N. and Tsuruo, T. (2002) Regulation of kinase activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 by binding to 14-3-3. *J. Biol. Chem.* 277, 12

Songyang, Z., Baltimore, D., Cantley, L. C., Kaplan, D. R. and Franke, T. F. (1997) Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11345-11350

---

Staal, S. P., Hartley, J. W. and Rowe, W. P. (1977) Isolation transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3065-3067

Staal, S. P. (1987) Molecular cloning of the akt oncogene and its homologs Akt1 and Akt2: Amplification of Akt1 in a primary human gastric adenocarcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 5034-5037

Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M. Siderovski, D. P. and Mak, T. W. (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent Cell survival by tumor suppressor PTEN. Cell 95: 29-39

Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G. F., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J. and Hawkins, P. T. (1998) Protein Kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent activation of protein kinase B. Science 297: 704-710

Testa, J. R. and Bellacosa, A. (2001) Akt plays a central role in tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 10983-10985

Toker, A. (2000) Protein Kinases as Mediators of Phosphoinositide 3-Kinase Signaling. Molecular Pharmacology 57: 652-658

Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell 61: 203-212

Van de Donk, N. W., Kamphuis, M. M., Lokhorst, H. M. and Bloem, A. C. (2002) The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. Leukemia 16: 1362-71

Wagener, C. (1999) *Molekulare Onkologie, Entstehung und Progression maligner Tumoren*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Wang, J., Dai, H., Yousaf, M., Moussaif, M., Deng, Y., Boufelliga, A., Swamy, O. R., Leone, M. E. and Riedel, H. (1999) Grb10, a positive stimulatory signalling adapter in platelet-derived growth factor BB-, insulin-like growth factor I-, and insulin-mediated mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 19: 6217-6228

Wu, X., Senechal, K., Neshat, M. S., Whang, Y. E. and Sawyers, C. L. (1998) The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15587-15591

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, 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

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

Yano, H., Nakanishi, S., Rimura, K., Hanai, N., Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y. and Matsuda, Y. (1993) Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 25846-25856

Yuan, Z. Q., Sun, M., Feldman, R. I., Wang, G., Ma, X., Jiang, C., Coppola, D., Nicosia, S. V. and Cheng, J. Q. (2000) Frequent activation of Akt2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 19: 2324-2330

## Lebenslauf

Name: Susanne Urschel  
Geburtsdatum: 10. März 1975  
Geburtsort: Kaiserslautern  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Bildungsgang:

1981-1985 Grundschole Mehlingen  
1985-1994 Staatl. Hohenstaufen-Gymnasium in Kaiserslautern

Oktober 1994 – Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern  
September 1999  
Oktober 1996 Vordiplom  
1998-1999 Diplomarbeit in der Abteilung für Genetik an der  
Universität Kaiserslautern

Titel der Diplomarbeit:  
Vergleich der physikalischen Karten von *Saccharopolyspora erythraea* DSM40517 und NRRL2338

Seit September 1999 Promotion am Klinikum rechts der Isar, TU München bei  
Prof. Peschel im Labor für Leukämieforschung bei  
PD Dr. Duyster