

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

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

**Charakterisierung der Interaktion von Akt mit  
XIAP-associated factor 1 (Xaf1)**

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

der Medizinischen Fakultät der  
Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Martin Heni

aus

Schwäbisch Hall

2009

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

Dem Andenken an  
Ulrike Heni und Dr. med. Otto Heni

## 1. Inhalt

1.	Inhalt.....	4
2.	Einleitung .....	7
2.1.	Insulin-Signaltransduktion .....	7
2.1.1.	Der Insulinrezeptor.....	7
2.1.2.	Insulin receptor substrate (IRS).....	8
2.1.3.	Phosphoinositid-3-Kinasen und Phosphoinositide in der Zellmembran .....	9
2.1.4.	3'-Phosphoinositide-dependent Kinasen (PDK) und Akt-Aktivierung .....	10
2.2.	Apoptose.....	11
2.2.1.	Apoptose-Induktion.....	13
2.2.1.1.	Der intrinsische Weg.....	13
2.2.1.2.	Der extrinsische Weg .....	13
2.2.1.3.	Alternative Wege.....	14
2.2.2.	Gemeinsame Effektor-Mechanismen .....	15
2.2.3.	Entfernung der Zellreste .....	16
2.2.4.	Apoptose-Inhibitoren .....	17
2.2.4.1.	X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) .....	17
2.2.4.2.	Andere Inhibitors of apoptosis (IAP)-Proteine .....	18
2.3.	Akt-Kinasen .....	19
2.3.1.	Expression und Funktion.....	19
2.3.2.	Aufbau .....	20
2.3.3.	Regulation .....	20
2.3.4.	Akt-Substrate und die Bedeutung für physiologische Prozesse.....	21
2.3.4.1.	Glukosemetabolismus .....	21
2.3.4.2.	Anti-Apoptose .....	22
2.3.4.3.	Wachstum.....	22
2.3.4.4.	Proliferation.....	23
2.4.	XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor 1 (Xaf1).....	23
2.4.1.	Expression .....	23
2.4.2.	Aufbau .....	23
2.4.3.	Regulation .....	24
2.4.3.1.	Verstärkte Expression .....	24
2.4.3.2.	Abgeschwächte Expression.....	25
2.4.4.	Funktion .....	25
2.5.	Ziel der Arbeit .....	26
3.	Material und Methoden .....	27
3.1.	Bezugsquellen .....	27
3.1.1.	Chemikalien .....	27
3.1.2.	Enzyme.....	28
3.1.3.	Sonstiges.....	29
3.2.	Lösungen, Puffer und Medien .....	30
3.2.1.	Molekularbiologie .....	30
3.2.2.	Proteinbiochemie.....	31
3.2.3.	Zellkultur .....	34
3.3.	Antikörper .....	35
3.3.1.	Primäre Antikörper.....	35
3.3.2.	Sekundäre Antikörper .....	36
3.4.	Oligonukleotide .....	37
3.5.	Expressionskonstrukte.....	39
3.6.	Vektoren .....	41

3.7.	Zelllinien und Bakterienstämme .....	41
3.8.	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.8.1.	Polymerasekettenreaktion .....	43
3.8.2.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	44
3.8.2.1.	Agarose-Gelelektrophorese .....	44
3.8.2.2.	Isolierung von DNA aus Agarose .....	44
3.8.2.3.	Acrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese .....	45
3.8.2.4.	Isolierung von DNA aus Acrylamid-Harnstoff-Gel.....	46
3.8.3.	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	46
3.8.3.1.	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	46
3.8.3.2.	Konzentrationsbestimmung durch Vergleich mit Standard-DNA .....	47
3.8.4.	Enzymatische Bearbeitung von DNA .....	47
3.8.4.1.	Restriktionsverdau.....	47
3.8.4.2.	Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA .....	47
3.8.4.3.	Auffüllsynthese von 5'-Überhängen der DNA .....	48
3.8.4.4.	Entfernung von 3'-Überhängen der DNA .....	48
3.8.4.5.	Ligation .....	48
3.8.5.	Transformation .....	49
3.8.6.	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	49
3.8.6.1.	Miniprep .....	49
3.8.6.1.1.	Alkalische Lyse und alkoholische Fällung.....	50
3.8.6.1.2.	Isolierung durch DNA-bindende Matrix in Anionenaustausch-Säulen	50
3.8.6.2.	Midiprep .....	51
3.8.6.3.	Maxiprep .....	52
3.8.7.	Sequenzierung .....	53
3.8.8.	Herstellung von Expressionskonstrukten .....	53
3.9.	Zellkultur .....	58
3.9.1.	Kultivierung und Bearbeitung von Zellen.....	58
3.9.2.	Zellzahlbestimmung .....	58
3.9.3.	Transfektion .....	58
3.9.3.1.	Calcium-Phosphat-Präzipitation.....	59
3.9.3.2.	Stabile Transfektion .....	59
3.10.	Proteinbiochemische Methoden .....	60
3.10.1.	Herstellung von Fusionsproteinen in Bakterien.....	60
3.10.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	61
3.10.3.	Lyse von Zellen .....	61
3.10.4.	Co-Immunpräzipitation von Proteinen.....	62
3.10.5.	GST-pull-down assay .....	62
3.10.6.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	63
3.10.7.	Western Blot.....	64
3.10.8.	Immundetektion von Proteinen und Chemolumineszenz.....	64
3.10.9.	Stripping von Western-Blots .....	65
3.11.	Immunfluoreszenz-Mikroskopie .....	65
3.12.	Apoptose-Messung .....	66
3.13.	Präparation polyklonaler Antikörper.....	67
4.	Ergebnisse .....	69
4.1.	Interaktion von Xaf1 mit Akt .....	69
4.2.	Expression von Xaf1 in Zelllinien .....	71
4.3.	Identifikation des Interaktionsbereiches der Proteine .....	72
4.3.1.	Identifikation des Akt-interagierenden Xaf1-Abschnittes .....	72
4.3.2.	Identifikation des Xaf1-interagierenden Akt-Abschnittes .....	75

4.3.3.	Identifikation des XIAP-interagierenden Xaf1-Abschnittes .....	80
4.4.	Stabil transfizierte Zelllinien .....	84
4.5.	Einfluß von Xaf1 auf die Akt-Phosphorylierung .....	87
4.6.	Intrazelluläre Lokalisation.....	91
4.7.	Einfluß auf die Apoptose.....	94
5.	Diskussion .....	99
5.1.	Interaktion von Xaf1 mit Akt .....	99
5.2.	Interaktionsbereiche der Proteine .....	100
5.2.1.	Der Akt-interagierende Xaf1-Bereich .....	100
5.2.2.	Der Xaf1-interagierende Akt-Bereich .....	100
5.2.3.	Der XIAP-interagierende Xaf1-Bereich.....	101
5.3.	Einfluß von Xaf1 auf die Akt-Phosphorylierung .....	101
5.4.	Intrazelluläre Lokalisation der Proteine .....	103
5.5.	Einfluß auf die Apoptose.....	105
6.	Zusammenfassung .....	106
7.	Literatur .....	107
8.	Anhang .....	130
8.1.	Abkürzungen .....	130
8.2.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....	136
8.2.1.	Abbildungen .....	136
8.2.2.	Tabellen .....	137
8.3.	Danksagungen .....	138
8.4.	Lebenslauf .....	139

## 2. Einleitung

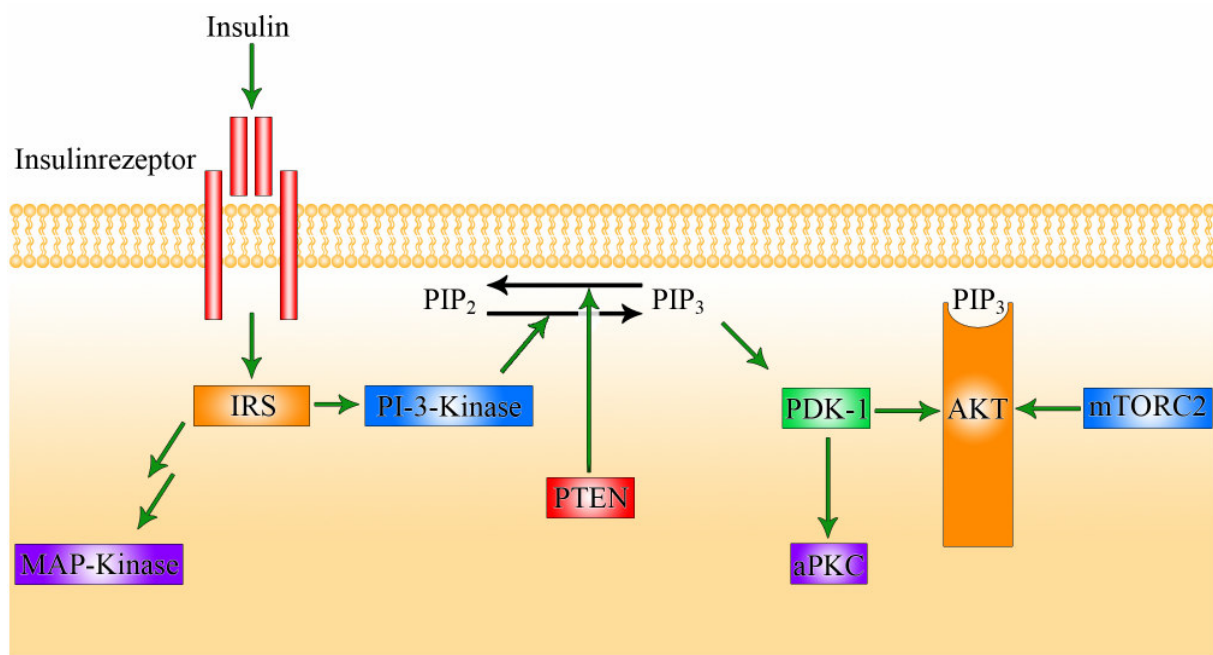
### 2.1. Insulin-Signaltransduktion

#### 2.1.1. Der Insulinrezeptor

Die primäre zelluläre Wirkung von Insulin beginnt mit seiner Bindung an den Insulinrezeptor. Dieser Transmembranrezeptor besteht als Heterotetramer aus zwei extrazellulären  $\alpha$ - und zwei intrazellulären  $\beta$ -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken verbunden sind<sup>32</sup> und gehört zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen<sup>219</sup>. Ebenfalls Mitglied dieser Gruppe ist der *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1)-Rezeptor, welcher eine große Homologie zum Insulinrezeptor hat<sup>188</sup>. Deswegen können die beiden hybride Insulinrezeptor-IGF-1-Rezeptor-Komplexe bilden<sup>119,236</sup>, die eine weitere Rezeptor-Isoform darstellen und in vielen Geweben vorkommen<sup>26</sup>.

Der Insulinrezeptor wird allosterisch reguliert: Im ligandenfreien Zustand inhibiert die  $\alpha$ -Untereinheit die Kinase-Aktivität der  $\beta$ -Untereinheiten durch sterische „Blockade“. Durch Bindung von Insulin an die  $\alpha$ -Untereinheit kommt es dann zu einer Konformationsänderung, die eine Aktivierung der Tyrosin-Kinase-Aktivität der  $\beta$ -Untereinheiten bewirkt. Nach dieser initialen Aktivierung werden Tyrosinreste der  $\beta$ -Untereinheiten durch den Insulinrezeptor selbst zusätzlich phosphoryliert, was mit einem weiteren Anstieg der Kinase-Aktivität einher geht<sup>94,142,260</sup>. Sie phosphoryliert dann verschiedene Substrate wie zum Beispiel *Insulin receptor substrate-1* (IRS-1), um so das Signal ins Zellinnere weiterzuleiten (vgl.2.1.2).

Negativ reguliert wird die Aktivität des Insulinrezeptors durch verschiedene Mechanismen: Tyrosin-Phosphatasen wie die *Protein tyrosine phosphatase-1B* (PTP1B)<sup>80</sup> dephosphorylieren Tyrosinreste des Insulinrezeptors und verringern so seine Aktivität. Andere Proteine wie die *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS)<sup>263</sup> SOCS-1 und SOCS-3 blockieren Abschnitte, an denen IRS bindet (vgl. 2.1.2) und verhindern so eine Weiterleitung des Insulin-Signals.



**Abbildung 1: Übersicht über die Insulin-Signaltransduktion.** Eine ausführliche Beschreibung der Vorgänge findet sich im Text. *Abkürzungen:* aPKC = atypische Proteinkinase C; IRS = Insulin receptor substrate; MAP-Kinase = MAP-Kinase = Mitogen-activated protein-Kinase; mTORC2 = mTOR (mammalian target of rapamycin) complex 2; PDK-1 = 3'-Phosphoinositide-dependent Kinase-1; PIP<sub>2</sub> = Phosphatidylinositol (4',5')-Bisphosphat; PIP<sub>3</sub> = Phosphatidylinositol (3',4',5')-Trisphosphat; PI-3-Kinase = Phosphoinositid-3-Kinase; PTEN = Phosphatase and tensin homolog.

### 2.1.2. Insulin receptor substrate (IRS)

Als erstes Protein, das am aktivierten Insulin-Rezeptor binden kann, wurde das *Insulin receptor substrate-1* (IRS-1) identifiziert<sup>247</sup>. Heute sind neben weiteren IRS auch andere Proteine wie *Src-homology-2-containing protein* (Shc)<sup>105</sup>, *Grb2-associated binder-1* (Gab-1)<sup>145</sup> und *Casitas B-lineage lymphoma- protooncogene product* (Cbl)<sup>31</sup> bekannt, die ebenfalls diese Fähigkeit haben und eine Verbindung zu anderen Signaltransduktionswegen herstellen. Die wichtigste Gruppe dieser Adaptermoleküle für die Insulin-Signaltransduktion sind die IRS. Hiervon sind bisher sechs verschiedene Isoformen bekannt, die als IRS-1 bis -6 bezeichnet werden<sup>49,88,136,247,248</sup>. Die wahrscheinlich wichtigsten Substrate für den Insulinrezeptor sind dabei IRS-1 und IRS-2<sup>283</sup>. Aufgebaut sind alle IRS ähnlich: Im aminoterminalen Bereich verfügen sie über eine *Pleckstrin homology* (PH)-Domäne und eine



*Phosphotyrosine-binding* (PTB)-Domäne. Über letztere können sie an phosphorylierte Tyrosinreste des aktivierten Insulinrezeptors gebunden werden, der daraufhin in bestimmten zentralen und carboxyterminalen Abschnitten der IRS Tyrosinreste phosphoryliert. Diese aktivierten Abschnitte binden dann an Moleküle mit *Src-homology-2* (SH2)-Domäne. Dazu gehören Adaptermoleküle wie *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2)<sup>281</sup>, die *SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase* (SHP)-2<sup>175</sup> und die regulatorische Untereinheit der *Phosphoinositid-3-Kinase* (PI-3-Kinase)<sup>144</sup>. Interessanterweise haben die IRS dabei keine eigene Kinase-Aktivität, sondern aktivieren die SH2-Proteine alleine über deren Bindung<sup>95,253</sup>.

Auch die IRS werden über Mechanismen der negative Regulation genau kontrolliert: Ein solcher ist die Dephosphorylierung durch Tyrosin-Phosphatasen. Beispiel hierfür ist SHP-2, welches einerseits an zwei phosphorylierten Tyrosinresten von IRS-1 bindet und andererseits andere Tyrosinreste dephosphoryliert, die für die Bindung von Grb2 und PI-3-Kinase benötigt werden<sup>175</sup>. Ein weiterer Weg der negativen Regulation ist die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten. Diese ist allerdings nicht immer inhibierend, die Phosphorylierung einzelner Positionen kann IRS auch verstärken<sup>103</sup>.

Auf der Ebene von IRS erfolgt die Aufteilung in verschiedene weitere Signalwege. Je nachdem welches SH2-Protein gebunden wird, erfolgt eine stärkere Aktivierung des metabolischen oder des mitogenen Signalweges. Der metabolische wird vor allem durch die Aktivierung von PI-3-Kinase eingeleitet (vgl. 2.1.3), der mitogene über das Adaptermolekül Grb2. Dieses ist mit *son-of-sevenless* (SOS) assoziiert und aktiviert nach Bindung den *Ras-MAP-Kinase*-Signalweg, welcher letztendlich zu Differenzierung und Proliferation führt<sup>95,270</sup>. Die *MAP-Kinase*-Kaskade kann also durch den Insulin-Signalweg aktiviert werden, allerdings ist sie nicht spezifisch für Insulin<sup>282</sup>. Ihre Aktivierung bietet jedoch eine mögliche Erklärung für die anabolen Effekte von Insulin<sup>253</sup>.

### 2.1.3. Phosphoinositid-3-Kinasen und Phosphoinositide in der Zellmembran

Die *Phosphoinositid-3-Kinasen* (PI-3-Kinasen) sind als Heterodimer aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit aufgebaut, von denen es jeweils mehrere Isoformen gibt. Die regulatorischen Untereinheiten haben dabei ein Molekulargewicht von etwa 85 kDa, die katalytischen von etwa 110 kDa<sup>226</sup>.

Durch Bindung der beiden SH2-Domänen der regulatorischen Untereinheit an phosphorylierte Tyrosinreste in IRS wird die katalytische Untereinheit freigegeben und dadurch aktiviert. Das

aktivierte Enzym phosphoryliert dann in der Zellmembran gelegenes *Phosphatidylinositol (4',5')-Bisphosphat* (PIP<sub>2</sub>) an der 3'-Position des Phosphoinositolrings zu *Phosphatidylinositol (3',4',5')-Trisphosphat* (PIP<sub>3</sub>), welches der second-messenger dieses Signalweges ist<sup>293</sup>. Auch wenn die PI-3-Kinasen *in vitro* noch weitere Phosphoinositide umsetzen können, scheint ihr bevorzugtes Substrat *in vivo* PIP<sub>2</sub> zu sein<sup>266</sup>. So gebildetes PIP<sub>3</sub> ermöglicht die Bindung von Akt, *3'-Phosphoinositide-dependent Kinase-1* (PDK-1) und anderen Threonin-Kinasen. Die Produktion von PIP<sub>3</sub> durch die PI-3-Kinasen stellt einen entscheidenden Schritt im Insulin-induzierten Glukose- und Lipidmetabolismus vieler Gewebe dar<sup>19</sup>.

Die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung von PIP<sub>3</sub> kann durch zwei Phospholipid-Phosphatasen an unterschiedlichen Positionen erfolgen: *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN)<sup>241</sup> dephosphoryliert PIP<sub>3</sub> an der 3'-Position und *SH2-domain-containing inositol-5'-phosphatase-2* (SHIP2) macht dies an der 5'-Position<sup>106,269</sup>. Neben ihrer Bedeutung als negative Regulatoren der Insulin-Signaltransduktion<sup>269</sup> spielen diese Phosphatasen auch bei onkologischen Erkrankungen eine wichtige Rolle: Mutationen von PTEN, die zu einem erhöhten Spiegel des second-messengers PIP<sub>3</sub> führen, wurden bei verschiedenen humanen Neoplasien nachgewiesen<sup>272</sup>.

#### **2.1.4. 3'-Phosphoinositide-dependent Kinasen (PDK) und Akt-Aktivierung**

Durch die PI-3-Kinase gebildetes membranäres PIP<sub>3</sub> ermöglicht die Bindung von PH-Domänen von Proteinen. Die Serin/Threonin-Kinase PDK-1 enthält eine solche und bindet damit an PIP<sub>3</sub> in der inneren Plasmamembran. Dadurch wird PDK-1 an die Zellmembran verschoben<sup>14</sup>.

Die Akt-Kinase enthält ebenfalls eine PH-Domäne und bindet mit ihr an PIP<sub>3</sub>. Durch diese Bindung wird auch Akt an die innere Plasmamembran verlagert, was den ersten Schritt auf dem Weg zur Aktivierung darstellt<sup>15</sup>. An der Zellmembran ist Akt mit PDK-1 co-lokalisiert. Dies ermöglicht den zweiten Schritt<sup>244</sup> zur Aktivierung: PDK-1 phosphoryliert Akt1 an Threonin 308 und aktiviert es dadurch<sup>10,245</sup>.

Die Akt-Kinase-Aktivität kann allerdings durch Phosphorylierung von Serin 473 (in Akt1) noch weiter gesteigert werden<sup>253</sup>. Lange Zeit war unklar, welches Enzym für diese Phosphorylierung verantwortlich ist. Das unbekannte Enzym wurde zunächst in Analogie zu PDK-1 als PDK-2 bezeichnet<sup>51</sup>. Im Jahr 2005 wurde dann der Komplex aus dem *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und seinem assoziierten Protein *rapamycin-insensitive*

*companion of mTOR* (rictor) als PDK-2 identifiziert<sup>216</sup>. Der Komplex wird auch als *mTOR complex 2* (mTORC2) bezeichnet<sup>211</sup>. Er phosphoryliert Akt1 nach Insulin-Stimulation an Serin 473<sup>110</sup>.

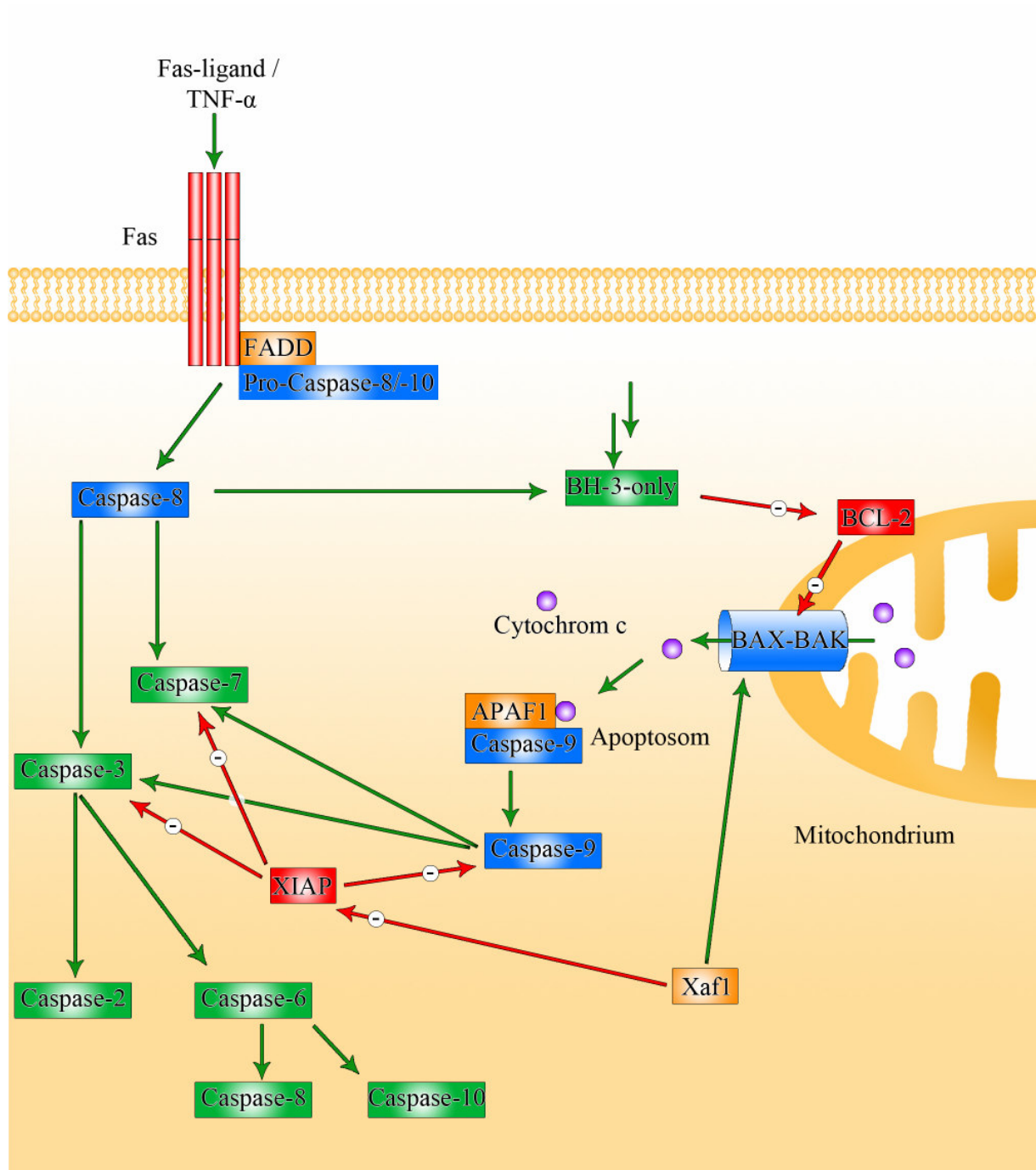
Weitere Einzelheiten zu Akt-Kinasen und ihren Substraten sind in Abschnitt 2.3 dargestellt. Neben den Akt-Kinasen phosphoryliert PDK-1 noch weitere Proteine. Ein Beispiel hierfür sind die atypische Proteinkinase C (aPKC)<sup>58</sup>  $\zeta$  und  $\lambda$  und möglicherweise noch weitere Mitglieder der Familie der Proteinkinasen C<sup>72,138</sup>. aPKC  $\zeta$  spielt eine wichtige Rolle bei der Translokation von GLUT-4 in die Zellmembran nach Insulin-Stimulation und nach körperlicher Arbeit<sup>89</sup>. Außerdem können aPKC  $\zeta$  und  $\lambda$  die Expression des *sterol regulatory element binding protein-1c* (SREBP-1c) verstärken. Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor in der Leber. Dieser Faktor ist für die Transkription von Genen wichtig, die unter anderem eine Rolle bei Glykolyse und Lipogenese spielen<sup>90</sup>. PDK-1 beeinflusst also die Glukose- und Lipidhomeostase noch auf andere Weise, zusätzlich zu ihrer Wirkung über Akt.

## 2.2. Apoptose

Schon lange sind zwei verschiedene morphologische Bilder bei sterbenden Zellen bekannt: Beim ersten, der Nekrose, führt das unkontrollierte Zusammenspiel aus Schwellung der Zelle und des Kerns, mitochondrialer Dysfunktion und massivem oxidativem Stress zur Ruptur der Zellmembran. Dadurch gelangen Zelltrümmer in die Umgebung und lösen dort eine Entzündungsreaktion aus<sup>17,288</sup>.

Die zweite Form läuft bereits morphologisch völlig anders ab: Die Zellen schrumpfen, es kommt zur Kondensation von Chromatin, der Nukleus wird fragmentiert. Anteile der Plasmamembran werden abgeschnürt („blebbing“) und die so gebildeten *Apoptotic bodies* werden letztendlich von spezialisierten Zellen phagozytiert. Die Plasmamembran reißt dabei nicht – es wird kein potentiell immunogener Inhalt der Zelle frei<sup>62</sup>. Folglich kommt es auch zu keiner lokalen Entzündungsreaktionen mit unkontrollierter Stimulation des Immunsystems<sup>123,255</sup>. Kerr, Wyllie und Currie haben für diese Art des kontrollierten Zelltodes 1972 den Begriff Apoptose eingeführt<sup>124</sup>.

Zusätzlich zu den beiden erwähnten Formen gibt es noch weitere Wege des Zelltodes, die sich nur schwer in eine der beiden Kategorien einordnen lassen. Ihnen wird in den letzten Jahren zunehmende Aufmerksamkeit geschenkt<sup>70</sup>.



**Abbildung 2: Übersicht über die Apoptose.** Eine ausführliche Beschreibung der Vorgänge findet sich im Text. *Abkürzungen:* APAF1 = Apoptotic protease activating factor 1; BCL = B-cell lymphoma 2; BH = BCL-2 Homology; FADD = Fas-associated death domain protein; TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor  $\alpha$ ; Xaf1 = XIAP-associated factor 1; XIAP = X-linked inhibitor of apoptosis.

## 2.2.1. Apoptose-Induktion

### 2.2.1.1. Der intrinsische Weg

Beim intrinsischen Weg der Apoptose-Induktion werden durch verschiedene Zellschädigungen pro-apoptotische Mitglieder der *BCL-2 (B-cell lymphoma-2) Homology (BH)-3-only*-Familie aktiviert. Von dieser Proteinfamilie sind bei Säugetieren bisher acht Mitglieder bekannt<sup>255</sup>: NOXA<sup>185</sup> und PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*)<sup>180</sup> werden nach DNA-Schäden p53-abhängig upreguliert<sup>179</sup>. BIM<sup>197</sup> und BMF<sup>198</sup> werden durch Zerstörung des Zytoskeletts frei, durch welches sie normalerweise abgebaut werden. Wachstumsfaktoren führen über den *PI-3-Kinase-Akt-Stoffwechselweg* zur Phosphorylierung von *BCL-2-associated death promoter* (BAD) (vgl. 2.3.4.2) und lösen damit seine Inaktivierung an 14-3-3-Proteinen aus<sup>39,71,295</sup>. Durch den Wegfall dieses Signals wird das Protein folglich aktiv. *BH-3 interacting domain death agonist* (BID) wird proteolytisch von der Caspase-8 aktiviert und stellt so eine Quervernetzung zum extrinsischen Weg dar<sup>146,158</sup> (vgl. 2.2.1.2).

Aktivierte BH-3-only-Proteine antagonisieren dann in der mitochondrialen Membran gelegene anti-apoptotische BCL-2-Proteine, welche normalerweise BAX (*BCL-2-associated X protein*) und BAK (*BCL-2-antagonist/killer-1*) vom Oligomerisieren abhalten. Die nun mögliche Oligomerisierung dieser beiden Proteine führt zur Bildung eines Kanals in der äußeren Mitochondrienmembran, durch den der Inhalt des intermembranären Raumes ins Zytosol gelangt<sup>223</sup>. Beispiele für so freiwerdende Proteine sind der *Second mitochondria-derived activator of caspases* (SMAC)<sup>74</sup> und Cytochrom c, ein Bestandteil der Atmungskette. Kommt Cytochrom c ins Zytosol, fördert es dort die Formierung des *Apoptosoms*. Dabei handelt es sich um einen heptameren Komplex aus dem Adapterprotein APAF1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), Cytochrom c, dATP und der noch inaktiven Caspase-9<sup>147,202</sup>. Das gebildete *Apoptosom* führt zur Autoaktivierung dieser Caspase-9 und leitet damit eine Kaskade weiterer Caspase-Aktivierung ein<sup>202,238</sup> (vgl. 2.2.2).

### 2.2.1.2. Der extrinsische Weg

Der extrinsische Weg der Apoptose beginnt mit der Bindung von extrazellulären Liganden an Rezeptoren der death-receptor-Familie<sup>222</sup>. Der am besten untersuchte Rezeptor dieser Familie ist Fas (CD 95/Apo-1)<sup>192</sup>: Dieser transmembranäre Rezeptor gehört zur Familie der *Tumor*

*necrosis factor* (TNF)-Rezeptoren. Er hat eine extrazelluläre Rezeptor-Domäne und eine intrazelluläre Todes-Domäne (Death-domain).

Zu den Liganden gehören pro-apoptotische und inflammatorische Zytokine wie Fas-ligand und TNF- $\alpha$ . Die Bindung eines solchen Liganden führt zur Trimerisierung von Fas-Rezeptoren<sup>186</sup>. An die nun beieinander liegenden Death-domains der drei Rezeptoren binden *Fas-associated death domain* (FADD)-Adapterproteine<sup>55,255</sup>. Diese haben je eine *death effector domain* (DED), mit denen dann Pro-Caspase-8 und Pro-Caspase-10 gebunden und zu Initiator-Caspasen aktiviert werden<sup>40,192,237</sup>. Der Komplex aus Ligand, Fas, FADD und Pro-Caspase wird als *death-inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet<sup>126,277</sup>.

Die aktive Caspase-8 wird vom DISC ins Zytoplasma entlassen. Dort leitet sie über BID den intrinsischen Weg der Apoptose-Induktion ein (vgl. 2.2.1.1) und aktiviert eine Kaskade weiterer Effektor-Caspasen (vgl. 2.2.2). Die genauen Aufgaben der aktivierten Caspase-10 sind bisher unklar<sup>137</sup>.

### 2.2.1.3. Alternative Wege

Neben den klassischen Wegen der Induktion von Apoptose wurden in den letzten Jahren weitere Wege entdeckt, die Effektor-Caspasen zu aktivieren<sup>20</sup>.

Ein Beispiel hierfür ist die Apoptose-Induktion durch Stress am Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dieser Weg ist bisher erst unvollständig verstanden: Stress am ER kann durch Änderungen der Ca<sup>2+</sup>-Homeostase, Hypoxie<sup>292</sup> oder fehlerhafte Proteine wie  $\beta$ -Amyloid<sup>178</sup> oder Prion-Proteine<sup>107</sup> ausgelöst werden. Eine wichtige Rolle dabei spielen durch den Stress nicht korrekt gefaltete Proteine. Diese führen dazu, dass am ER gebundene Pro-Caspase-12 aktiviert wird und dann Apoptose induziert<sup>178,252</sup>. Es gibt auch Hinweise darauf, dass bei der ER-vermittelte Aktivierung von Caspase-12 der intrinsische Weg der Apoptose ebenfalls eine wichtige Rolle spielt<sup>231,235</sup>.

Ein weiterer Weg ist die *Granzym B*-abhängige Apoptose-Induktion: Zytotoxische T-Zellen und *Natural killer* (NK)-Zellen enthalten Granula mit Perforin und verschiedenen Granzymen. Diese Lymphozyten werden durch virusinfizierte oder maligne transformierte Zellen aktiviert. Neben ihrer Apoptose-Induktion über Fas geben die Zellen auch ihre Granula in den Raum zwischen Lymphozyt und Zielzelle frei, welche dann von den Granula erreicht wird<sup>29,206</sup>. Dort polymerisiert Perforin und bildet einen Kanal in der Zellmembran der Zielzelle, durch den Granzyme ins Zytoplasma gelangen. Darüber hinaus gibt es noch weitere Wege für Granzyme das Zytoplasma zu erreichen<sup>41</sup>. Hier kann eines davon, Granzym B, dann

(ähnlich wie Caspase-8) BID proteolytisch aktivieren und so den intrinsischen Weg der Apoptose-Induktion einleiten<sup>30</sup>. Außerdem kann Granzym B direkt Caspase-3<sup>21</sup> und Caspase-8<sup>169</sup> aktivieren und so Apoptose induzieren<sup>29,41,206</sup>.

### 2.2.2. Gemeinsame Effektor-Mechanismen

Der weitere Verlauf der Apoptose ist durch die Wirkung der Effektor-Caspasen gekennzeichnet, die durch Initiator-Caspasen aktiviert wurden (vgl. 2.2.1). Inaktive monomere Pro-Caspasen werden durch proteolytische Spaltung in ihre große und kleine Untereinheit und anschließende Oligomerisierung aktiviert. Diese Spaltung erfolgt kaskadenartig; das bedeutet, eine aktive Initiator-Caspase spaltet und aktiviert Effektor-Caspasen, welche dann wiederum weitere Caspasen spalten können. Die wichtigsten menschlichen Effektor-Caspasen sind die Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7<sup>52,203</sup>. Sie sind auch für viele proteolytische Effekte an anderen Proteinen verantwortlich und so entscheidend für die Ausführung der Apoptose. Mittlerweile sind etwa 400 Substrate von Effektor-Caspasen bekannt<sup>159</sup>, die Bedeutung der meisten davon ist jedoch noch unklar. Einige wenige, besser erforschte, sollen hier weiter beleuchtet werden:

Ein Teil davon scheint für die Degradierung von zellulären Strukturproteinen verantwortlich zu sein: Dazu gehören die Aktinfilamente, bei denen Aktin<sup>64</sup>, Myosin<sup>64,120,264</sup>, Filamin<sup>45</sup> und Spectrine<sup>166,280</sup> von Caspasen gespalten werden. Auch die etwas größeren Intermediärfilamente werden im Verlauf der Apoptose zerstört. Substrate sind hier unter anderem Lamine<sup>187,200</sup>, Keratine<sup>24,129</sup> und Vimentine<sup>48,173</sup>. Diese Prozesse könnten eine Rolle bei der Abrundung und beim Schrumpfen von apoptotischen Zellen spielen und ein Schritt beim *blebbing* sein.

Caspasen spalten wichtige Proteine von anti-apoptotischen Signaltransduktionswegen<sup>284</sup>. Eines dieser Ziele ist Akt1<sup>22,23</sup>. Caspasen inaktivieren somit diese Wege und verhindern eine Inhibition der einmal ausgelösten Apoptose.

Bei der Auflösung des Zellkerns spielen unter anderem die Proteine aus der Kernmembran Lamin A, Lamin B und Lamin C eine Rolle, die alle von Caspasen gespalten werden<sup>200</sup>. Die Apoptose-induzierte Kontraktion von Aktin-Myosin trägt ebenfalls zu diesem Prozess bei<sup>65</sup>. Die Spaltung von DNA erfolgt durch *caspase-activated deoxyribonuclease* (CAD)<sup>82</sup>. Diese Endonuklease wird aktiv, indem Caspase-3 den *inhibitor of CAD* (ICAD) abbaut und somit CAD freisetzt<sup>208</sup>. Zusätzlich werden auch verschiedene Transkriptionsfaktoren,

Initiationsfaktoren und ribosomale Proteine zerstört<sup>255</sup>. Somit wird der Zellkern und die DNA zerstört und eine Synthese weiterer Proteine verhindert.

### 2.2.3. Entfernung der Zellreste

Nachdem eine Zelle durch Apoptose unwiederbringlich zu sterben begonnen hat, ist es wichtig, diese mit noch intakter Zellmembran zu entfernen und somit das Freiwerden potentiell immunogener Zellbestandteile zu verhindern. Das geschieht durch Phagozyten<sup>217</sup>. Um sie anzulocken, sekretieren apoptotische Zellen chemotaktisch wirksame Stoffe. Von diesen sind bisher erst einige wenige bekannt. Ein Beispiel ist *Lysophosphatidylcholin* (LPC), ein Phospholipid, das Caspase-3-abhängig freigesetzt wird und Monozyten anlocken kann<sup>27,135</sup>.

Einmal angelockte Phagozyten erkennen die apoptotische Zelle dann an Veränderungen der Zusammensetzung ihrer Zellmembran. Eine Rolle dabei spielt *Phosphatidylserin* (PS), das normalerweise in der inneren Schicht der Zellmembran vorkommt. Wird eine Zelle apoptotisch, dann wird PS in die äußere Schicht der Plasmamembran transloziert und kann dort Phagozytose induzieren<sup>86,167</sup>. Über welchen Rezeptor PS dabei von Phagozyten erkannt wird, ist bisher noch nicht vollständig geklärt, doch werden einige Kandidaten diskutiert<sup>134,255</sup>. Es gibt noch einige andere bekannte Veränderungen der Zusammensetzung der Zellmembran, deren Bedeutung aber noch nicht abschließend geklärt werden konnte<sup>255</sup>.

Um eine lokale Entzündungsreaktion zu unterdrücken, setzen die aktivierten Phagozyten anti-inflammatorische Zytokine wie *Interleukin* (IL)-10, *Prostaglandin-E<sub>2</sub>* (PgE<sub>2</sub>) und *Transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  frei<sup>85,113,274</sup>.

Interessanterweise werden aber auch Peptide der aufgenommenen apoptotischen Zelle von dendritischen Zellen über *Major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-I-Komplexe präsentiert und können so zytotoxische T-Zellen aktivieren<sup>9,44,133,243</sup>. Der MHC-Klasse-I-Komplex hat eigentlich die Aufgabe, Peptide zu präsentieren, die in der Zelle selbst produziert und im Proteasom gespalten wurden<sup>128,181</sup>. Durch diesen zusätzlichen Mechanismus können apoptotische Zellen selbst sogar noch nach ihrer Aufnahme in dendritische Zellen vom adaptiven Immunsystem überprüft werden und falls nötig eine Immunantwort induzieren. Allerdings muss dieser Prozess sehr genau reguliert sein, da sonst die Gefahr der Erkennung von Autoantigenen besteht und damit eine Autoimmunreaktion droht.



## 2.2.4. Apoptose-Inhibitoren

Die Aktivierung einer Caspase löst eine Kaskade weiterer Caspase-Aktivierungen aus, die dann zum Zelltod führt. Deswegen ist es sehr wichtig, diese Proteasen zu hemmen, bis sie wirklich gebraucht werden. Die *inhibitor of apoptosis* (IAP)-Proteine sind dabei wichtige Regulatoren. Zuerst identifiziert wurden sie 1993 in Baculoviren<sup>66</sup>, seither gelang der Nachweis von homologen Proteinen in vielen anderen Spezies<sup>239</sup>. Beim Menschen sind aus der Familie der IAP-Proteine bisher folgende Mitglieder bekannt<sup>275</sup>: *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP; alternativ BIRC4), *cellular IAP 1* (c-IAP1 alternativ BIRC2), c-IAP2 (alternativ BIRC3), *neuronal apoptosis inhibitor protein* (NAIP alternativ BIRC1), *Survivin* (alternativ BIRC5), *Apollon* (alternativ BIRC6), *melanoma IAP* (ML-IAP alternativ BIRC7) und *IAP-linked protein 2* (ILP2 alternativ BIRC8). Mit der BIRC (*BIR-containing protein*)-Terminologie wird versucht, eine neue Nomenklatur dieser Proteinfamilie einzuführen, die sich mehr an ihrer Struktur als an ihren Aufgaben orientiert<sup>233</sup>. Mitglieder der Familie der IAP-Proteine sind dadurch gekennzeichnet, dass sie alle eine oder mehrere *Baculovirus IAP repeat* (BIR)-Domänen enthalten. Dabei handelt es sich um eine Sequenz von etwa 70 Aminosäuren, die an Caspasen binden kann, und in manchen Proteinen auch die Fähigkeit hat diese zu inhibieren<sup>78,108,154</sup>.

### 2.2.4.1. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)

Das am besten charakterisierte Mitglied der Familie der IAP-Proteine ist *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP). Hierbei handelt es sich um ein etwa 55 kDa schweres Protein, das drei BIR (BIR 1 bis 3)- und eine RING (*really interesting new gene*)-Finger-Domäne enthält<sup>1,154</sup>. Exprimiert wird XIAP in allen untersuchten menschlichen Geweben - außer in Leukozyten des peripheren Blutes<sup>154</sup>.

XIAP ist der potenteste bekannte natürliche Caspase-Inhibitor<sup>78</sup> und möglicherweise das einzige Mitglied der Familie der IAP-Proteine, das auch unter physiologischen Bedingungen diese Funktion übernehmen kann<sup>239</sup>. Verantwortlich dafür sind verschiedene Abschnitte von XIAP:

Ein Abschnitt zwischen BIR 1 und BIR 2 kann zusammen mit der BIR 2-Domäne die Effektor-Caspasen 3 und 7 inhibieren, indem deren aktives Zentrum sterisch blockiert wird<sup>112,201,224</sup>.

Die Initiator-Caspase-9 wird durch die BIR 3-Domäne gehemmt. Diese Domäne blockiert den für die Dimerisierung verantwortlichen Caspase-Abschnitt und hält diese somit in ihrer monomeren und damit inaktiven Form<sup>229</sup>.

Diese anti-apoptischen Funktionen von XIAP können durch SMAC aufgehoben werden. Wird SMAC aus den Mitochondrien frei (vgl. 2.2.1.1), kann er an XIAP binden, die XIAP-Caspase-Interaktion aufheben und so die Aktivierung dieser Caspasen ermöglichen<sup>155,230,240</sup>. Auch *XIAP-associated factor 1* (Xaf1) vermindert die anti-apoptischen Effekte von XIAP (vgl. 2.4).

Die BIR 1-Domäne spielt keine Rolle bei Hemmung von Caspasen. Stattdessen ist sie an der Signaltransduktion der TGF- $\beta$ - und *bone morphogenetic protein* (BMP)-Rezeptoren durch XIAP-vermittelte NF- $\kappa$ B- und MAP-Kinase-Aktivierung beteiligt. Dies geschieht durch direkte Interaktion von XIAP mit *TAK1-binding protein-1* (TAB1), einem Aktivator der *TGF- $\beta$  activated kinase-1* (TAK1)-Kinase<sup>157</sup>. Diese Kinase aktiviert dann die *inhibitor of  $\kappa$ B* (I $\kappa$ B)-Kinase und die MAP-Kinase-Kinase<sup>183,210</sup>.

Die RING-Finger-Domäne hat Ubiquitin-Ligase (E3)-Aktivität und kann somit Proteine für eine Degradierung im Proteasom markieren<sup>290</sup>. Welche Proteine so ubiquitiniert werden, ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass XIAP Caspasen<sup>251</sup> sowie nach Bindung von SMAC auch sich selbst<sup>153,161,290</sup> ubiquitiniieren kann. Allerdings gibt es auch Studien, die diesen Hinweisen widersprechen<sup>267</sup>. Auch die Regulation, wann welches Protein ubiquitiniert wird, ist bisher kaum bekannt. Ein Modell postuliert, dass in gesunden Zellen Caspasen ubiquitiniert werden und so die anti-apoptische Funktion von XIAP verstärkt wird<sup>153</sup>. Nach Aktivierung von Apoptose und Freisetzung von SMAC aus den Mitochondrien wird dann aber der XIAP-SMAC-Komplex ubiquitiniert und somit entfernt.

Interessanterweise kann die Ubiquitinierung von XIAP durch sich selbst oder andere Proteine verhindert werden, wenn dieses zuvor von Akt phosphoryliert wurde<sup>69</sup>. Der Abbau von XIAP könnte somit auch teilweise durch die Aktivität des *PI-3-Kinase-Akt-Stoffwechselweges* reguliert werden (vgl.2.3.4.2). Dies ist ein Hinweis auf eine weitere molekulare Grundlage für die anti-apoptische Wirkung der Achse.

#### **2.2.4.2. Andere Inhibitors of apoptosis (IAP)-Proteine**

Da alle IAP-Proteine außer XIAP keine physiologisch potenten Inhibitoren von Caspasen sind<sup>78,275</sup>, müssen sie ihre anti-apoptische Funktion auf andere Weise erfüllen oder gänzlich andere Funktionen haben.

c-IAP1, c-IAP2 und ML-IAP können möglicherweise SMAC binden und dadurch eine Blockade von XIAP durch SMAC verhindern<sup>275,276</sup>.

Bei der TNF-induzierten Apoptose spielen c-IAP1 und c-IAP2 eine Rolle: Sie binden über ihre BIR-1-Domäne an *TNF-receptor-associated factor* (TRAF)-1 und TRAF-2. Mit diesen bilden sie einen Komplex, der dann an den TNF-Rezeptor 2 gebunden wird<sup>204,212</sup>. Darüber hinaus kann c-IAP1 auch TRAF-2 ubiquitinieren und ins endoplasmatische Retikulum translozieren<sup>150,286</sup>.

Survivin spielt eine wichtige Rolle bei der Mitose<sup>11</sup>. Reguliert wird es unter anderem durch p53, das seine Expression unterdrückt<sup>172</sup>. Außerdem kann es über einen bisher noch nicht vollständig erforschten Mechanismus Apoptose inhibieren<sup>11,242</sup>.

Ähnlich wie XIAP können NAIP und ML-IAP möglicherweise auch über TAB1 zu einer Aktivierung von TAK1 führen<sup>157</sup> (vgl. 2.2.4.1). Sie könnten somit ebenfalls an der Transduktion des NF- $\kappa$ B- und MAP-Kinase-Signalweges beteiligt sein.

Darüber hinaus werden noch einige andere Funktionen von Mitgliedern der Familie der IAP-Proteine diskutiert<sup>239</sup>.

## 2.3. Akt-Kinasen

Die Familie der Akt-Kinasen besteht aus drei Isoformen: Akt1, Akt2 und Akt3. Alternativ wird auch der Name *Proteinkinase B* (PKB) verwendet. Die drei Isoformen werden dann als PKB  $\alpha$ , PKB  $\beta$  und PKB  $\gamma$  bezeichnet. Dabei handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen mit einem Molekulargewicht von etwa 57 kDa. Jede dieser Isoformen wird von einem anderen Gen auf einem anderen Chromosom codiert<sup>2,3,7,164,211</sup>.

### 2.3.1. Expression und Funktion

Akt1 wird beim Menschen ubiquitär exprimiert. Akt2 ist ebenfalls in allen untersuchten Geweben nachweisbar, mit einer verstärkten Expression in Insulin-sensitivem Gewebe wie Leber, Skelettmuskel und Fett. Akt3 wird beim Adulten in Hirn, Lunge und Nieren kräftig und in Herz, Leber und Hoden wenig exprimiert. In fetalem Gewebe lässt sich Akt3 im Herz, in der Leber und im Hirn nachweisen, nicht aber in den Nieren<sup>2,3,7,164,211,253</sup>.

*Knock-out* Tiermodelle zeigten die Beteiligung der verschiedenen Isoformen an unterschiedlichen Prozessen: Das Deaktivieren von Akt1 führte zu retardiertem Wachstum

und verkürztem Leben<sup>54</sup>, metabolische Störungen traten hierbei keine auf<sup>57</sup>. Entfernen von Akt2 führte zu Insulinresistenz und Diabetes mellitus<sup>56</sup> bei nur geringer Wachstumsretardierung<sup>99</sup>. Das Ausschalten von Akt3 führte zu einer Reduktion der Größe des Gehirns, ohne Effekte auf Glukose-Metabolismus oder Wachstum zu haben<sup>76,77,262</sup>.

### 2.3.2. Aufbau

Alle drei Isoformen von Akt haben einen hohen Grad an Homologie untereinander und mit anderen Kinasen der Proteinkinase (A/B/C)-Familie<sup>164</sup> und sind gleichartig aufgebaut: Sie bestehen aus einer aminoterminalen PH-Domäne, einer zentralen katalytischen Domäne und einer carboxyterminalen hydrophoben Domäne<sup>2,3,7</sup>. In dieser unterscheiden sich die beiden Splicevarianten von Akt3<sup>7,43</sup>.

Die PH-Domäne bindet Akt an PIP<sub>3</sub> in der Zellmembran und macht die Kinasen so für ihre Aktivierung zugänglich (vgl. 2.1.4). Im Bereich der katalytischen Domäne befindet sich auch Threonin 308. Diese Aminosäure wird von PDK-1 phosphoryliert und aktiviert so Akt (vgl. 2.1.4). Die hydrophobe Domäne enthält eine Sequenz, die in vielen Proteinkinasen der A/B/C-Familie vorkommt. Hier befindet sich auch Serin 473, durch dessen Phosphorylierung die Akt-Aktivität noch weiter gesteigert werden kann<sup>130,164,211,256</sup> (vgl. 2.1.4).

### 2.3.3. Regulation

Wie oben beschrieben (vgl. 2.1.4) wird Akt nach Bindung an PIP<sub>3</sub> durch Phosphorylierung an zwei Aminosäureresten aktiviert: PDK-1 phosphoryliert Threonin und der Komplex aus mTOR und rictor phosphoryliert Serin 473 (beides in Akt1).

Neben der Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub> (vgl. 2.1.3) kann Akt auch durch direkte Dephosphorylierung der Kinase selbst negativ reguliert werden<sup>91</sup>: *Protein phosphatase 2A* (PP2A) dephosphoryliert Threonin 308<sup>131</sup> und *PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase* (PHLPPα) Serin 473<sup>97</sup>. Andere Proteine wie *Tribbles homolog 3* (Trb3) binden an nicht-phosphoryliertes Akt und verhindern dadurch seine Aktivierung<sup>75</sup>.

### 2.3.4. Akt-Substrate und die Bedeutung für physiologische Prozesse

Nach Aktivierung löst sich Akt von der Zellmembran, um Serin- und Threonin-Rest in verschiedenen Substraten zu phosphorylieren<sup>91</sup>. Diese spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen in der Zelle. Einige wichtige der mittlerweile über 100 bekannten Substrate<sup>164</sup> sollen hier näher beleuchtet werden. Sie sind unter anderem beteiligt an:

#### 2.3.4.1. Glukosemetabolismus

Muskel- und Fettzellen nehmen nach Insulin-Stimulation Glukose über den GLUT-4-Transporter auf. Dieser Transporter wird aktiviert, wenn er in die Zellmembran transloziert wird. Schon länger ist bekannt, dass in diesem Prozess neben den aPKC (vgl. 2.1.4) die Aktivierung von Akt2 eine wichtige Rolle spielt<sup>117,121</sup>, die genauen Mechanismen sind bisher aber noch nicht vollständig bekannt<sup>211</sup>.

Akt-Aktivität steigert die Produktion von Glykogen, indem *Glycogen synthase kinase 3* (GSK-3) phosphoryliert wird<sup>68</sup>. Diese wird dadurch inaktiviert, wodurch die hemmende Wirkung auf die Glykogen-Synthase aufgehoben wird<sup>93</sup>. Das Enzym wird aktiv und kann Glukose in Glykogenketten einfügen. Darüber hinaus spielt GSK-3 in vielen anderen Prozessen eine Rolle<sup>73,93</sup>.

Zusätzlich wird der Glukosemetabolismus auf Transkriptionsebene durch Einwirkung von Akt auf Mitglieder der Familie der *forkhead*-Transkriptionsfaktoren reguliert. Akt phosphoryliert beispielsweise *forkhead box protein (FOX)O1*<sup>259</sup> und *FOXA2*<sup>285</sup>. Diese Phosphorylierungen ermöglichen deren Bindung an 14-3-3 Proteine und verhindern so die Verschiebung in den Zellkern hinein. Dadurch wird die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren gehemmt<sup>259</sup>. Normalerweise aktivieren diese Transkriptionsfaktoren unter anderem die Glukoneogenese in der Leber<sup>196</sup> und hemmen die Lipogenese<sup>177</sup>. Beides wird durch Akt-Aktivität aufgehoben. Weiterhin sind viele andere Mitglieder der *forkhead*-Familie bekannt, die durch Akt reguliert werden und eine wichtige Rolle im zellulären Metabolismus spielen<sup>104</sup>.

### 2.3.4.2. Anti-Apoptose

Akt inhibiert Apoptose auf verschiedenen Wegen: Durch Phosphorylierung von Serin 136 in BAD wird dieses pro-apoptotische Protein an 14-3-3 Proteine gebunden und dadurch inaktiviert<sup>39,71,295</sup> (vgl. 2.2.1.1).

Auch Pro-Caspase-9 wird durch Akt phosphoryliert. Dadurch wird die Aktivierung dieser Initiator-Caspase (vgl. 2.2.1.1) verhindert<sup>50</sup>.

XIAP wird ebenfalls von Akt phosphoryliert. Das verhindert die Ubiquitinierung und den Abbau dieses Apoptose-Inhibitors im Proteasom (vgl. 2.2.4.1)<sup>69</sup>.

Weiter inhibiert Akt die Expression von BH-3-only-Proteinen (vgl. 2.2.1.1) durch Phosphorylierung von Mitgliedern der *forkhead*-Transkriptionsfaktoren<sup>164</sup>. So wird die pro-apoptotische Wirkung dieser Proteine verringert. Auch die Expression von Fas-ligand (vgl. 2.2.1.2) wird auf diesem Wege reduziert<sup>46</sup>.

Die Beeinflussung des MAP-Kinase-Weges spielt auch eine Rolle bei der anti-apoptotischen Funktion von Akt. *Apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase, wirkt bei der durch zellulären Stress induzierten Apoptose mit<sup>176</sup>. Sie wird durch Akt phosphoryliert und inaktiviert<sup>125</sup>.

### 2.3.4.3. Wachstum

Stimulation der Akt-Kinasen führt auch zum Zellwachstum und so zur Vergrößerung der Zellmasse. Eine wichtige Rolle dabei spielt der *mTOR complex 1* (mTORC1)<sup>98,287</sup>, der von Akt aktiviert wird. Die Aktivierung erfolgt dabei indirekt durch Phosphorylierung von *tuberous sclerosis complex* (TSC)-2. Dieser ist in nicht phosphoryliertem Zustand an TSC-1 gebunden. TSC-1 und TSC-2 inhibieren gemeinsam mTORC1. Nach Phosphorylierung von TSC-2 durch Akt wird mTORC1 dann durch *Ras-related small G protein* (Rheb) aktiviert<sup>114,163,194</sup>.

Zusätzlich wird noch ein weiterer mTORC1-Bindungspartner diskutiert, der von Akt phosphoryliert wird: Hierbei handelt es sich um *proline-rich Akt substrate of 40 kDa* (PRAS40). Dieses Protein inhibiert in nicht phosphoryliertem Zustand mTORC1. Nach Phosphorylierung durch Akt wird diese Inhibition aufgehoben<sup>213</sup>.

Die den beiden oben beschriebenen Prozessen folgende Aktivierung von mTOR führt über mehrere Zwischenschritte zu einer verstärkten Translation<sup>211</sup>.

#### 2.3.4.4. Proliferation

Die Zellproliferation wird von Akt über die Regulation des Zellzyklus induziert:

Akt phosphoryliert die beiden Inhibitoren des Zellzyklus p21<sup>Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup>. Diese werden dadurch an 14-3-3-Proteine gebunden und so im Zytoplasma inaktiviert<sup>151,228,268,296</sup>. Dadurch kann eine Progression des Zellzyklus stattfinden.

Außerdem führen noch weitere durch Akt beeinflusste Proteine zu einer Progression des Zellzyklus. Diese wurden bereits oben erwähnt. Dazu gehören unter anderem GSK-3 und mTORC1<sup>164</sup>.

### 2.4. XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor 1 (Xaf1)

XIAP-associated factor 1 (Xaf1) wurde durch Yeast-two-hybrid-screening als XIAP-interagierendes Protein gefunden<sup>152</sup>. Mittlerweile sind sieben Isoformen des Proteins identifiziert, die durch alternatives Splicing entstehen<sup>6,291</sup>.

#### 2.4.1. Expression

Xaf1 wird in allen untersuchten normalen humanen Geweben exprimiert. Die Expression ist im Herz und den Ovarien am stärksten, am schwächsten ist sie im Gehirn und in den Hoden<sup>6,152</sup>. In vielen Tumoren wird Xaf1 hingegen nur wenig oder gar nicht exprimiert<sup>61,92,122,143,160,182,209</sup>. In einigen Tumorentitäten ist die Expression dabei in untersuchtem Gewebe mit ungünstigem Grading noch weiter verringert.

#### 2.4.2. Aufbau

Die Isoform 1 von Xaf1 besteht aus 301 Aminosäuren und enthält im Bereich der Aminosäuren 22 bis 99 einen *TRAF type zinc finger*. In Teilen dieses Abschnittes unterscheiden sich die Isoformen 2, 4, 6 und 7 von der Isoform 1<sup>6,291</sup>. Den Isoformen 3 und 4 fehlen die carboxyterminalen 159 Aminosäuren; Isoform 5 ist in diesem carboxyterminalen Abschnitt verändert<sup>6</sup>.

### 2.4.3. Regulation

Reguliert wird Xaf1 weder durch Phosphorylierung (wie beispielsweise die Akt-Kinasen) noch durch proteolytische Spaltung (wie die Caspasen), sondern durch die unterschiedlich starke Expression dieses Proteins<sup>193</sup>. Möglicherweise spielen darüber hinaus noch Veränderungen durch alternatives Splicing eine Rolle. Hinweis darauf ist die Erkenntnis, dass bestimmte Splicevarianten hauptsächlich in Zellen aus Tumoren exprimiert werden<sup>87,227,291</sup>. Auch das Xaf1-interagierende Protein CBP (*cAMP response element binding protein (CREB)-binding protein*) scheint zumindest einige der Wirkungen von Xaf1 zu regulieren<sup>250</sup> (vgl. 2.4.4).

#### 2.4.3.1. Verstärkte Expression

Die Expression von Xaf1 kann durch Interferon- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  sowie durch TNF- $\alpha$  gesteigert werden. Wegen der Stimulierbarkeit der Expression durch Interferone wird Xaf1 zur Gruppe der *Interferon stimulated genes* (ISG) gezählt<sup>193</sup>.

Interferon- $\beta$  bindet an Typ-1 Interferon-Rezeptoren und aktiviert so *Januskinasen*. Diese phosphorylieren den *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 1. Der bindet dann an ein *interferon stimulated response element* (ISRE), das vor einem Gen gelegen ist, und kann so dessen Transkription induzieren<sup>221</sup>. Ein solches ISRE befindet sich auch 55 bis 66 Nukleotide vor dem ersten ATG von Xaf1<sup>249</sup>, ein weiteres 30 bis 38 Nukleotide davor<sup>279</sup>. Durch die Bindung von STAT 1 an diese ISRE kann Interferon zu einer verstärkten Expression von Xaf1 führen, was dann zu einer höheren Empfindlichkeit für Apoptose führt<sup>249,279</sup>. Die Expression erfolgt selbst dann noch, wenn der Promoter methyliert ist<sup>170</sup> (vgl. 2.4.3.2).

Bemerkenswert ist, dass Interferon- $\gamma$  in manchen Zellen die Xaf1 Expression auf völlig andere Weise als die anderen Interferone verstärkt: Hier wird Xaf1 durch Aktivierung von STAT 3 unabhängig von STAT 1 zur Verfügung gestellt. Dies führt dann ebenfalls zu einer erhöhten Empfindlichkeit für die Induktion von Apoptose<sup>25</sup>. Die genauen molekularen Mechanismen hierfür sind noch unklar.

Interferon- $\alpha$  scheint im Gegensatz zu den beiden anderen Interferonen nur eine untergeordnete Rolle in der Induktion von Xaf1 zu spielen. Es wurde zwar eine verstärkte Xaf1-Transkription nach Stimulation mit Interferon- $\alpha$  nachgewiesen, allerdings war sie deutlich schwächer als die Interferon- $\beta$ -induzierte Expression<sup>140,141</sup>. Dies könnte



möglicherweise aber auch daran liegen, dass Zellen untersucht wurden, in denen *Interferon regulatory factor 1* (IRF) 1 und IRF 7 nicht durch Interferon- $\alpha$  aktivierbar waren<sup>258</sup>.

TNF- $\alpha$  steigert die Expression von Xaf1. Auch hierfür sind die genauen molekularen Grundlagen bisher ungeklärt, es gibt aber Hinweise darauf, dass NF- $\kappa$ B dabei eine Rolle spielen könnte<sup>246</sup>.

#### 2.4.3.2. Abgeschwächte Expression

Die Transkription von Xaf1 wird durch Methylierung von CpG Sequenzen (Cytosin-Phosphat-Guanin) in der Promoter-Region von Xaf1 abgeschaltet<sup>170,297</sup>. Welche DNA-Methyltransferase die Methylierung katalysiert, ist bisher unbekannt. Diese Suppression von Xaf1 durch Methylierungen in der Promoter-Region spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Tumoren<sup>47,122,143,174,297</sup>.

Ein weiterer Weg, die Expression von Xaf1 zu verringern, ist die Bindung von *heat-shock transcription factor 1* (HSF1) vor der Promoter-Region von Xaf1. Dort befindet sich 862 bis 821 Nukleotide vor der codierenden Sequenz von Xaf1 ein *heat-shock element* (HSE), an dem HSF1 bindet und dann die Transkription von Xaf1 verhindert<sup>278</sup>. HSF1 wird nach zellulärem Stress exprimiert<sup>13</sup>. Die Suppression von Xaf1 durch HSF1 könnte also dazu beitragen, durch Zellstress induzierte Apoptose zu verhindern. Hinweis darauf ist auch die verstärkte Expression von HSF1 und Suppression von Xaf1 in manchen Tumoren<sup>148,149,278</sup>.

#### 2.4.4. Funktion

Xaf1 reguliert die Empfindlichkeit von Zellen für apoptotische Stimuli. Es kann Apoptose nicht selbst induzieren, aber in Kombination mit anderen Faktoren kann es sie verstärken<sup>141,152,193</sup>. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind bisher nicht vollständig verstanden und konnten jeweils nur in wenigen Zelltypen gezeigt werden. Welche Abschnitte von Xaf1 für seine Wirkungen verantwortlich sind, wurde bisher ebenfalls nicht geklärt. Beobachtet wurde lediglich, dass der Abschnitt mit dem *TRAF type zinc finger* alleine nicht in der Lage ist, die Empfindlichkeit für Apoptose zu steigern<sup>141</sup>.

Der erste beschriebene Wirkmechanismus von Xaf1 war die Inaktivierung von IAPs (vgl. 2.2.4): So wird XIAP in seiner anti-apoptotischen Funktion durch Xaf1 gehemmt<sup>109,152</sup>. In einigen Zellen scheint dies durch die Verschiebung von XIAP in den Nukleus zu geschehen<sup>152,205,232</sup>. Es gibt allerdings andere Zelllinien, in denen dieser Vorgang nicht

gefunden werden konnte<sup>141,279,289</sup>. Die Lokalisierung im Zellkern scheint also zelltypspezifisch zu sein. Ihre physiologische Rolle ist bisher unklar.

Neben XIAP kann Xaf1 auch an andere Mitglieder der Familie der IAP binden<sup>18</sup>. Die Interaktion mit NAIP scheint dessen Aktivität zu verringern<sup>191</sup>. Welche Funktionen die Interaktionen mit weiteren IAPs erfüllen, ist bisher nicht geklärt.

Eine weitere Wirkung von Xaf1 ist die Aktivierung des intrinsischen Weges der Apoptose-Induktion (vgl. 2.2.1.1). Diese gelingt durch Translokation von Xaf1 an die Mitochondrien. Dort aktiviert es dann BAX und darüber die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma<sup>246,289</sup>. Dieser Weg scheint auch zur Spaltung von XIAP und damit zu dessen Inaktivierung zu führen<sup>246</sup>.

Darüber hinaus ist Xaf1 im Komplex mit XIAP an der Inaktivierung des IAP Survivin durch Ubiquitinierung und anschließenden Abbau im Proteasom beteiligt<sup>18</sup>.

Der Transkriptionsfaktor *Activator protein 1* (AP-1) reguliert eine Reihe von Genen, die für die Progression des Zellzyklus und die Regulation von Apoptose verantwortlich sind<sup>225</sup>. Xaf1 kann die AP-1-Aktivität verringern. Dieser Effekt wird durch das Xaf1-interagierende Protein CBP noch weiter verstärkt<sup>250</sup> (vgl. 2.4.3). Bei CBP handelt es sich um einen Co-Aktivatoren, der normalerweise die Aktivität der *cAMP response element binding protein* (CREB)-vermittelten Transkription verstärkt<sup>118,273</sup>. Interessanterweise verringert er im Gegensatz dazu in Kombination mit Xaf1 die AP-1-Aktivität. Welche der AP-1-regulierten Gene davon in welcher Form beeinflusst werden, ist bisher nicht untersucht. Darüber hinaus wird spekuliert, ob die Interaktion von Xaf1 mit CBP auch die Transkription anderer CBP-beeinflussender Proteine verändern könnte<sup>250</sup>.

Ein hemmender Effekt von Xaf1 auf die Angiogenese wurde ebenfalls beschrieben. Auch dieser scheint über die Regulation der Expression weiterer Proteine vermittelt zu werden<sup>199</sup>.

## 2.5. Ziel der Arbeit

In der Arbeitsgruppe von PD Dr. Lammers wurde zur Suche nach neuen Interaktionspartnern von Akt1 ein Yeast-two-hybrid-screening durchgeführt. Ein Protein, das dabei gefunden wurde, ist Xaf1 (bisher unveröffentlichte Daten).

Ziel der Arbeit ist es nun, diese Interaktion zu bestätigen, ihre Rolle in Stoffwechselfvorgängen zu charakterisieren und erste Hinweise auf ihre physiologische Bedeutung zu finden. Dazu sollen mögliche Effekte der Interaktion auf die Aktivität der beiden Proteine aufgedeckt werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Bezugsquellen

##### 3.1.1. Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese 30 Gelmix)	Roth (Karlsruhe)
Agar	Difco (Detroit, USA)
Agarose	Roche (Mannheim)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
APS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
ATP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP	GE Healthcare (München)
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Roche (Mannheim)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
CaCl <sub>2</sub>	Merck (Darmstadt)
Coomassie-Brillant-Blau R 250	Roth (Karlsruhe)
DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DTT	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Etoposide	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ficoll	Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd	Polysciences (Warrington, USA)
Gelatine	Merck (Darmstadt)
Glutamin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
HCl	Merck (Darmstadt)
Insulin	Eli Lilly (Indianapolis, USA)
IPTG	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mitomycin C	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

NaCl	Merck (Darmstadt)
NaI	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
SDS	Roth (Karlsruhe)
Staurosporine	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
TNF- $\alpha$	Biomol (Hamburg)
TO-PRO 3	Molecular Probes (Karlsruhe)
TRAIL	Biomol (Hamburg)
Trizma <sup>®</sup> base	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Trypsin	Lonza (Wuppertal)

Hier nicht aufgelistete Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in p.a.-Qualität bezogen.

### 3.1.2. Enzyme

Antarctic Phosphatase	New England Biolabs (Schwalbach im Taunus)
Klenow-DNA-Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach im Taunus)
Pwo-Polymerase	Peqlab (Erlangen)
Pfx-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Schwalbach im Taunus)
RNase	Roche (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Schwalbach im Taunus)
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach im Taunus)
Taq-Polymerase	Eppendorf (Hamburg)

### 3.1.3. Sonstiges

Bio-Rad Protein Assay	Biorad (München)
CEX-Marker	Eigene Herstellung, AG PD Dr. Lammers
CryoTubes	Nalge (Rochester, USA)
CNBr-Sepharose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMEM	Invitrogen (Karlsruhe)
Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Kit	GE Healthcare (München)
EMEM	Invitrogen (Karlsruhe)
Foetal Calf Serum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Function-line-Inkubator	Heraeus (Hanau)
Gel-Blotting Papiere (3mm)	Roth (Karlsruhe)
Herasafe	Heraeus (Hanau)
HiSpeed Plasmid Midi-Kit	QIAGEN (Hilden)
Kanülen Sterican 24 G x 1''	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Nitrozellulose Hybond (0,45 mm)	GE Healthcare (München)
NucleoSpin Plasmid-Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Oligonukleotide	Operon Biotechnologies (Köln)
Parafilm	American National Can (Neenah, USA)
PCR-Purification-Kit	Macherey-Nagel (Düren)
PCR-Thermocycler	Progene (Los Angeles, USA)
PermaFluor	Dianova (Hamburg)
Pipettierhilfen	Eppendorf (Hamburg)
Poly-Prep Chromatographie Säule	Biorad (München)
Protein A Sepharose	GE Healthcare (München)
Protein G Sepharose	GE Healthcare (München)
Protein Molekulargewichts-Marker	Eigene Herstellung, AG PD Dr. Lammers
Röntgenfilme (Hyperfilm)	GE Healthcare (München)
Sepharoseperlen	GE Healthcare (München)
Sepharose-gebundenes Glutathion	GE Healthcare (München)
Spritzen Injekt Luer Solo 20 ml	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
WST-1-Reagenz	Roche (Mannheim)
Zentrifugen	Heraeus (Hanau) und Eppendorf (Hamburg)

## 3.2. Lösungen, Puffer und Medien

### 3.2.1. Molekularbiologie

Acrylamid-Harnstoffgel (10 %), 50 ml	12,5 ml	Acrylamid (40:2)
	21,02 g	Harnstoff
	2,5 ml	10x TBE
	14,5 ml	H <sub>2</sub> O
	450 µl	APS
	35 µl	TEMED
	6x DNA-Ladepuffer	0,25 % (w/v)
0,25 % (w/v)		Xylencyanol
30 % (w/v)		Glycerin
10 mM		EDTA
KCM	0,5 M	KCl
	0,15 M	CaCl <sub>2</sub>
	0,25 M	MgCl <sub>2</sub>
LB-Medium	10 g/l	Tryptone
	5,0 g/l	Hefeextrakt
	9,5 g/l	NaCl
	pH 7,2 (mit NaOH eingestellt)	
Sequenzierpuffer	98 %	Formamid, deionisiert
	10 mM	EDTA
	0,025 %	Bromphenolblau
	0,025 %	Xylencyanol

10x TAE	400 mM	Tris
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
	pH 8 (mit Essigsäure eingestellt)	

10x TBE	89 mM	Tris
	89 mM	Borat
	2 mM	EDTA

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

### 3.2.2. Proteinbiochemie

Acrylamid (37,5:1 w/w) 30%	29,22 % (w/v)	Acrylamid
	0,78 % (w/v)	Bis-acrylamid

Kopplungspuffer	50 mM	Borat pH 8,0
	150 mM	NaCl

Elutionspuffer	0,5 M	Ammoniumacetat
	1 mM	EDTA

HNTG	20 mM	HEPES pH 7,5
	150 mM	NaCl
	0,1% (v/v)	Triton X-100
	10% (v/v)	Glycerol
	10 mM	NaF
	1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>

Kinase-Assay-Puffer	20 mM	Tris-HCl pH 7.6
	5 mM	$\beta$ -Glycerophosphat
	2 mM	DTT
	0,1 mM	Natriumpervanadat
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	100 $\mu$ M	ATP
Laemmli-Puffer	20 % (v/v)	Glycerin
	3 % (w/v)	SDS
	3 % (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
	10 mM	EDTA
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
Lysepuffer	10 % (v/v)	Glycerol
	1 % (v/v)	Triton X-100
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	150 mM	NaCl
	50 mM	HEPES pH 7,5
	1 mM	EGTA
	100 mM	NaF
	10 mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
	1 mM	PMSF
	10 $\mu$ g/ml	Aprotinin
		[gegebenenfalls 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ]
10x NET	1,5 M	NaCl
	50 mM	EDTA
	0,5 M	Tris-HCl pH 7,5
	0,5 % (v/v)	Triton X-100
10x NET-G	10x NET	
	0,25 % (w/v)	Gelatine



Ponceau Säure	0,25 % (w/v)	Ponceau S
	2 % (w/v)	Trichloressigsäure in deionisiertem H <sub>2</sub> O
Sammelgel (4 %), 15ml	2 ml	Acrylamid 37,5:1
	3,75 ml	Sammelgelpuffer
	9,25 ml	H <sub>2</sub> O
	150 µl	APS 10 %
	25 µl	TEMED
Sammelgelpuffer	1 M	Tris-HCl pH 6,8
	0,4 % (w/v)	SDS
Stripping-Puffer	62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8
	2 % (v/v)	SDS
	67 mM	β-Mercaptoethanol
TN-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150 mM	NaCl
Transblotpuffer	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol
	0,004% (v/v)	SDS
		in deionisiertem H <sub>2</sub> O
Trenngel (8 %), 40ml	10,6 ml	Acrylamid 37,5:1
	10 ml	Trenngelpuffer
	19,4 ml	H <sub>2</sub> O
	270 µl	APS 10 %
	66 µl	TEMED

Trenngel (10 %), 40 ml	13,2 ml	Acrylamid 37,5:1/0,8
	10 ml	Trenngelpuffer
	16,8 ml	H <sub>2</sub> O
	270 µl	APS 10 %
	66 µl	TEMED
Trenngel (11 %), 10 ml	3,7 ml	Acrylamid 37,5:1/0,8
	2,5 ml	Trenngelpuffer
	3,8 ml	H <sub>2</sub> O
	67,5 µl	APS 10 %
	16,5 µl	TEMED
Trenngel (12 %), 40 ml	16 ml	Acrylamid 37,5:1/0,8
	10 ml	Trenngelpuffer
	14,2 ml	H <sub>2</sub> O
	270 µl	APS 10 %
	66 µl	TEMED
Trenngelpuffer	1 M	Tris-HCl pH 6,8
	0,4 % (v/v)	SDS
10x TG	248 mM	Tris
	1918 mM	Glycin
	35 mM	SDS

### 3.2.3. Zellkultur

DMEM-Medium 0,5 %	DMEM mit	
	4,5 g/l	Glukose
	2 mM	L-Glutamin
	0,5 % (v/v)	FCS

DMEM-Medium 10 %	DMEM mit	
	4,5 g/l	Glukose
	2 mM	L-Glutamin
	10 % (v/v)	FCS
EMEM-Medium 10 %	EMEM mit	
	4,5 g/l	Glukose
	2 mM	L-Glutamin
	10 % (v/v)	FCS
Friermedium	FCS mit	
	10 % (v/v)	DMSO
2x BBS Puffer	50 mM	BES pH 6,97
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Trypsin/EDTA	0,5 g/l	Trypsin
	0,2 g/l	EDTA

### 3.3. Antikörper

#### 3.3.1. Primäre Antikörper

$\alpha$ -Akt	Polyklonale Kaninchen-Immunglobuline gegen GST-Akt2 (aa 410-481) Eigene Herstellung, diese Arbeitsgruppe
---------------	--

$\alpha$ -HA	Maus IgG gegen das HA-Peptid YPYDVPDYA (Klon 16B12) Eurogentec (Köln)
$\alpha$ -MYC	Maus IgG gegen das Myc-Peptid EQKLISEEDL (Klon 9E10) Eigene Herstellung, diese Arbeitsgruppe
$\alpha$ -Phospho-Threonin 308	Polyklonale Kaninchen-Immunglobuline gegen Akt Phospho-Threonin 308 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
$\alpha$ -Phospho-Tyrosin (4G10)	Monoklonale Maus IgG gegen Phospho-Tyrosin (4G10) United Biomedical (Hauppauge, NY, USA)
$\alpha$ -VSV	Maus IgG gegen das VSV-Peptid YTDIEMNRLGK (Klon P5D4) Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
$\alpha$ -Xaf1	Polyklonale Kaninchen-Immunglobuline gegen GST-Xaf1 (aa 151-301) Eigene Herstellung, diese Arbeitsgruppe
$\alpha$ -XIAP	Maus IgG gegen XIAP (aa 268-426) (Klon 48/hILP/XIAP) Becton Dickinson (Heidelberg)

### 3.3.2. Sekundäre Antikörper

Ziege- $\alpha$ -Maus POD-konjugiert	Antikörper aus Ziege gegen Maus IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
--------------------------------------	--

Ziege- $\alpha$ -Kaninchen POD-konjugiert	Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Rabbit IgG Alexa 546	Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG, konjugiert mit Alexa Fluor 546 Molecular Probes (Karlsruhe)
Mouse IgG Alexa 546	Antikörper aus Ziege gegen Maus IgG, konjugiert mit Alexa Fluor 546 Molecular Probes (Karlsruhe)
Rabbit IgG Alexa 588	Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG, konjugiert mit Alexa Fluor 588 Molecular Probes (Karlsruhe)
Mouse IgG Alexa 588	Antikörper aus Ziege gegen Maus IgG, konjugiert mit Alexa Fluor 588 Molecular Probes (Karlsruhe)

### 3.4. Oligonukleotide

Tabelle 1

Oligonukleotid	Sequenz
Akt1 fwd 310	GAG AAT TCA TGA CAC CTG AGT ACC TGG CCC CCG
Akt1 fwd aa 21	GAG AAT TCA TGA CCT GGC GGC CAC GCT ACT TC
Akt1 fwd aa 41	GAG AAT TCA TGC CGC AGG ATG TGG ACC AAC GTG
Akt1 fwd 43	GAG AAT TCA TGC AGG ATG TGG ACC AAC GTG AG
Akt1 fwd 86	GAG AAT TCA TGC GCA CCT TCC ATG TGG AGA CTC
Akt1 fwd 155	GAG AAT TCA TG C TGC TGG GCA AGG GCA CTT TC
Akt1 fwd 178	GAG AAT TCA TGA AGA TCC TCA AGA AGG AAG TC
Akt1 fwd 200	GAG AAT TCA TGC GCG TCC TGC AGA ACT CCA GG

Akt1 fwd 260	GAG AAT TCA TGG CCC TGG ACT ACC TGC ACT CG
akt delta NT 147	GAG AAT TCA AGC ACC GCG TGA CCA TGA AC
CDCP1_ED_GSTfwd	CTT ACC CCA AGG ACT GTG GAC GTA TTC ATG TCC CCT ATA CTA G
GSRSRPSYRL_fwd	GAG GAT CCC GGA TCA CGA AGC CGT AGA CCA AGT TAC CGA CTC TGA ATT CCG A
GSRSRPSYRL_rev	TCG GAA TTC AGA GTC GGT AAC TTG GTC TAC GGC TTC GTG ATC CGG GAT CCT C
GRPRTTSFAES_fwd	GAG GAT CCC GGA CGA CCA AGG ACC ACA AGC TTC GCA GAA TCG TGA ATT CGA
GRPRTTSFAES_rev	TCG AAT TCA CGA TTC TGC GAA GCT TGT GGT CCT TGG TCG TCC GGG ATC CTC
pRK 400	GGT TTT GGC AGT ACA TCA AT
pRK 5' PCR	TTG CCT TTC TCT CCA CAG GTG T
pRK fwd	TTG CCT TTC TCT CCA CAG GTG T
pRK rev	TAT AAG CTG CAA TAA AC
pRK rep. fwd	CTT TAC TTT TGG GAC ATG GAT ATA CTC AGT TAA CAA GGA G
pRK rep. rev	CTC CTT GTT AAC TGA GTA TAT CCA TGT CCC AAA AGT AAA G
XAF1 NT VSV	GAG AAT TCA CCA TGT ACA CCG ACA TTG AAA TGA ACC GTC TAG GCA AAG GCG GTG AAG GAG ACT TCT CGG TGT GC
Xaf1-920 rev	GAG ACT CGA GTC AAC TTT CAG AAT GAA GAG GAA ATC TG
Xaf1-992 rev	GAT CCT CGA GCT ACC TGG GCT TGG GCT CTG ACA TC
xaf D 179-181 fwd	GTA AAT GTT GTC CAG ACT CAG AGT TTT TTC CTG TTG GAA ATC CAG AAA TTC TTC
xaf D 179-181 rev	GAA GAA TTT CTG GAT TTC CAA CAG GAA AAA ACT CTG AGT CTG GAC AAC ATT TAC
XAF1-840 rev	GAT CCT CGA GCT ATT CAG CAG CTT GAC TTG GAA G
XAF 289 rev	GAG ACT CGA GCT ATA ACC ACC GGC ATT TCT CCT GAT G

XIAP fwd myc	GAG AAT TCG CCA TGG GAC AGA AAC TGA TCT CAG AAG AGG ACC TAA ACG AAG GAG GCA CTT TTA ACA GTT TTG AAG GAT C
--------------	---

### 3.5. Expressionskonstrukte

Tabelle 2

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pGEX-GS	GST-Fusionsprotein mit der GSK-3 Phosphorylierungsstelle GSRSRPSYRL in pGEX 5x1	Diese Arbeit, Du et al., 2003 <sup>75</sup>
pGEX-GR	GST-Fusionsprotein mit der GSK-3 Phosphorylierungsstelle GRPRTTSAES in pGEX 5x1	Diese Arbeit, Cross et al., 1995 <sup>67</sup>
pGEX5x1_Grb2	Humanes GST-gekoppeltes Grb2 in pGEX 5x1	Diese Arbeitsgruppe
pGEX5x1_XAF1 (bp 451-906 = 151aa)	Humanes GST-gekoppeltes Xaf1 aa 151- 301 in pGEX 5x1	Diese Arbeitsgruppe
pRK5_Akt1 $\Delta$ NT 20	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) aa 20-480 in pRK 5	Diese Arbeit
pRK5_Akt1 $\Delta$ NT 40	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) aa 40-480 in pRK 5	Diese Arbeit
pRK_Akt1 $\Delta$ NT 42	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) aa 42-480 in pRK 5	Diese Arbeit
pRK_Akt1 $\Delta$ NT 85	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) aa 85-480 in pRK 5	Diese Arbeit
pRK_CTMP VSV CT	Humanes CTMP, carboxyterminal mit VSV markiert in pRK 5	Diese Arbeitsgruppe
pRK_Ft1_VSV CT	Humanes Ft 1, carboxyterminal mit VSV markiert in pRK 5	Diese Arbeitsgruppe
pRK5_PKB $\alpha$ (aa 310- 480)	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) aa 310- 480 in pRK 5	Diese Arbeit

pRKrs_PKB $\alpha$	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) in pRK 5	Diese Arbeitsgruppe
pRKrs_PKB $\beta$	Humane Akt2-Kinase (PKB $\beta$ ) in pRK 5	Diese Arbeitsgruppe
pRK_PKB $\gamma$	Humane Akt3-Kinase (PKB $\gamma$ ) in pRK 5	Diese Arbeitsgruppe
pRK_PKB $\alpha$ myr 130	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) aa 130-480 in pRK 5	Diese Arbeitsgruppe
pRK5_PKB $\alpha$ (aa 147-480)	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) aa 147-480 in pRK 5	Diese Arbeit
pRK5_PKB $\alpha$ (aa 155-480)	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) aa 155-480 in pRK 5	Diese Arbeit
pRK5_PKB $\alpha$ (aa 178-480)	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) aa 178-480 in pRK 5	Diese Arbeit
pRK5_PKB $\alpha$ (aa 200-480)	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) aa 200-480 in pRK 5	Diese Arbeit
pRK5_PKB $\alpha$ (aa 260-480)	Humane Akt1-Kinase (PKB $\alpha$ ) aa 260-480 in pRK 5	Diese Arbeit
pRK <sub>RS</sub> _trb3 VSV CT	Humanes Trb3, carboxyterminal mit VSV markiert in pRK 5	Diese Arbeitsgruppe
pRKrs_XAF1	Humanes Xaf1 in pRK 5	Diese Arbeitsgruppe
pRK_XIAP AF1_VSV CT (XAF)	Humanes Xaf1, carboxyterminal mit VSV markiert in pRK 5	Diese Arbeitsgruppe
pRK <sub>RS</sub> _XAF1_200_VSV NT	Humanes Xaf1 aa 1-200, aminoterminal mit VSV markiert in pRK 5	Diese Arbeit
pRK <sub>RS</sub> _XAF1_225_VSV NT	Humanes Xaf1 aa 1-225, aminoterminal mit VSV markiert in pRK 5	Diese Arbeit
pRK <sub>RS</sub> _XAF1_250_VSV NT	Humanes Xaf1 aa 1-250, aminoterminal mit VSV markiert in pRK 5	Diese Arbeit
pRK <sub>RS</sub> _XAF1 $\Delta$ 179-181	Humanes Xaf1 ohne die Aminosäuren 179-181 in pRK 5	Diese Arbeit
pRK <sub>RS</sub> _XAF1 (1-289)_VSV NT	Humanes Xaf1 aa 1-289, aminoterminal mit VSV markiert in pRK 5	Diese Arbeit
pRK <sub>RS</sub> _XIAP myc NT	Humanes XIAP, aminoterminal mit MYC markiert in pRK 5	Diese Arbeit



### 3.6. Vektoren

Tabelle 3

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pGEX5x1, 2, 3	Expressionsvektor für <i>Escherichia coli</i> amp <sup>r</sup> , lacI <sup>q</sup> , P <sub>tac</sub> , GST	GE Healthcare (München)
pRK 5	Expressionsvektor für Säugetierzellen amp <sup>r</sup> , f1-ori, ColE1-ori, CMV-Promoter, SP6-promoter, SV40 poly(A)	Genentech (San Francisco, USA)
pCR zero blunt	Klonierungsvektor für PCR-Produkte P <sub>lac</sub> , lacZα, ccdB, kan <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> , ColE1-ori	Invitrogen (Karlsruhe)
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor amp <sup>r</sup> , neo <sup>r</sup> , ColE1-ori, 5'-LTR aus MoMSV, 3'-aus MoMULV, LTR-Promotor	Miller und Rosman, 1989 <sup>171</sup>

### 3.7. Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 4: Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz / ATCC- Nummer
BHK	Goldhamster ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) Nierenfibroblasten	Mcpherson et al., 1962 <sup>162</sup> ATCC: CCL-10
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>	Maus Myoblasten	Blau et al., 1958 <sup>38</sup> ATCC: CRL-1772
CHO-K1	Chinesischer Grauhamster ( <i>Cricetulus griseus</i> ) Ovarialzellen	Puck et al., 1958 <sup>195</sup> ATCC: CCL-61
HeLa	Humane Zervixkarzinom Zellen	Gey et al., 1952 <sup>100</sup> Scherer et al., 1953 <sup>218</sup> ATCC: CCL-2

HEK-293	Humane embryonale Nierenzellen mit DNA-Abschnitten des humanen Adenovirus 5	Graham et al., 1977 <sup>101</sup> Louis et al., 1997 <sup>156</sup> ATCC: CRL-1573
HepG2	Humane Hepatozelluläres Karzinom Zellen	Aden et al., 1979 <sup>8</sup> ATCC: HB-8065
HL-60	Humane Promyelozytenleukämie (M3) Zellen	Collins et al., 1977 <sup>63</sup> Gallagher et al., 1979 <sup>96</sup> ATCC: CCL-240
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämie Zellen	Schneider et al., 1977 <sup>220</sup> ATCC: TIB-152
NIH 3T3	Mausembryo Fibroblasten	Jainchill et al., 1969 <sup>116</sup> ATCC: CRL-1658
Rin m5F	Rattenpankreas Betazellen	Bhathena et al., 1984 <sup>33</sup> ATCC: CRL-11605
SK-BR3	Humane Brust-Adenokarzinom Zellen	Trempe, 1976 <sup>261</sup> ATCC: HTB-30

Tabelle 5: Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Escherichia coli 298 F'	F <sup>+</sup> , kan <sup>r</sup> , λ <sup>r</sup> , recA <sup>-</sup> , tonA <sup>-</sup> , lacI <sup>-</sup> aus MM294	Genentech (San Francisco, USA)
Escherichia coli BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> dcm ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) galλ (DE3)	Novagen (Madison, USA)

### 3.8. Molekularbiologische Methoden

#### 3.8.1. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase-chain-reaction PCR) dient der exponentiellen Amplifizierung von DNA-Abschnitten<sup>207</sup>. In dieser Arbeit wurde sie zur Klonierung von DNA-Konstrukten und zur Analyse solcher Konstrukte eingesetzt.

Der Ansatz für eine Reaktion (50 µl) beinhaltete dabei 10 ng der zu amplifizierenden Original-DNA, je 1,25 µl sense- und antisense-Oligonukleotid (Primer) [10 µM], 2,5 U Polymerase, Reaktionspuffer des Herstellers mit 10 mmol MgCl<sub>2</sub> und 0,2 mM dNTP. Die Auswahl der Polymerase richtete sich dabei nach dem Einsatzziel: Um DNA zu analysieren, wurde die Taq-Polymerase verwendet, die kostengünstig und zuverlässig ist, aber eine höhere Fehlerrate hat. Für Klonierungen kamen deswegen Pfx- und Pwo-Polymerasen zum Einsatz, die Fehler mit ihrer proof-reading Funktion<sup>102</sup> korrigieren können.

Es wurden jeweils 25 bis 35 PCR-Zyklen durchgeführt, die sich aus Denaturierung, Annealing und Elongation zusammensetzten. Während des ersten Schritts, der Denaturierung, heizt der Thermocycler das Reaktionsgemisch für eine Minute auf 95°C auf. Dadurch werden die H<sup>+</sup>-Brückenbindungen zwischen den DNA-Strängen gelöst. Der zweite Schritt, das Annealing, erfolgte in dieser Arbeit für eine Minute bei 40-55 °C. Dies dient der Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge. Die Temperatur richtet sich dabei nach der Glycin- und Cytosin-Menge in den jeweiligen Primern. Hieraus kann die theoretische Schmelztemperatur errechnet werden; die Temperatur wurde hier etwa fünf Grad unter dieser Schmelztemperatur gewählt. Im dritten Schritt, der Elongation, werden die Primer durch die Polymerase soweit verlängert, bis erneut DNA-Doppelstränge entstehen. Die optimale Temperatur hierzu beträgt für die Taq-Polymerase 70°C, für die Pfx-Polymerase 68°C und für die Pwo-Polymerase 72°C. Die erforderliche Syntheszeit wird durch die Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes bestimmt: Für 700 bp benötigt die Polymerase etwas eine Minute. Nach dem letzten Zyklus wurde einmalig ein zehnminütiger Elongationsschritt durchgeführt, um eventuell noch nicht abgeschlossene Synthesen zu beenden.

### **3.8.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA**

#### **3.8.2.1. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA-Abschnitten nach Größe und elektrischer Ladung. Dabei fungiert ein Gel aus Agarose-Polymeren als Matrix, durch welche die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung der Anode wandern. Die Laufgeschwindigkeit wird dabei hauptsächlich durch zwei Faktoren bestimmt: die Größe der DNA-Abschnitte und die Konzentration des Agarose-Gels.

Die Konzentration des Gels wurde in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente gewählt: Für Größen bis 600 bp wurden 1,5- bis 2,5 %-ige Agarose verwendet, für Größen über 600 bp 0,9 %-ige Agarose. Gelöst wurde die Agarose dabei in 1x TAE, das kurz in der Mikrowelle aufgeköcht wurde. Diese Lösung wurde anschließend mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, einem Farbstoff, der nach Einlagerung zwischen Basenpaaren von DNA und RNA eine verstärkte Fluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht (302 nm) zeigt<sup>139</sup>. Deswegen können nach solcher Anregung durch UV-Licht (302 nm) die DNA-Abschnitte als fluoreszierende Banden gesehen werden.

Das Gemisch aus Agarose und Ethidiumbromid wurde in heißem, noch flüssigem Zustand in Kammern gegossen, und es wurden Kämmen eingefügt, um Taschen zur Beladung zu schaffen. Nach Abkühlung wurden diese Kämmen wieder entfernt und das Gel mit 1x TAE als Laufpuffer überschichtet. DNA-haltige Lösungen wurden vor dem Auftragen mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Als Längenstandard diente der CEX-Marker, der Fragmente mit 9267 bp, 5167 bp, 4398 bp, 2988 bp, 2390 bp, 2268 bp, 1970 bp, 1657 bp, 1256 bp, 999 bp, 835 bp, 785bp, 630 bp-Doppelbande und 411 bp Länge enthält.

Die Elektrophorese wurde dann mit einer elektrischen Spannung von 70 V durchgeführt.

#### **3.8.2.2. Isolierung von DNA aus Agarose**

DNA wurde aus dem Agarose-Gel mittels der Freeze-Squeeze-Methode<sup>254</sup> isoliert: Dazu wurde aus dem Agarose-Gel nach abgeschlossener Elektrophorese (vgl. 3.8.2.1) die gesuchte Bande mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. In den Boden dieses Gefäßes war zuvor ein Loch gestochen worden, das untere Drittel des Gefäßes war mit Glaswolle gefüllt. Nach Überführung des Agarose-Blockes wurde dieses Gefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde es in ein 2 ml-Reaktionsgefäß

gehängt, das mit 50-80 µl Phenol befüllt war. Durch zehnmünütige Zentrifugation mit 6500 rpm bei Raumtemperatur (Biofuge pico von Heraeus) wurde die DNA durch die Öffnung im inneren Gefäß in das Phenol im äußeren Gefäß überführt, während die Agarose in der Glaswolle innen hängen blieb und mitsamt des inneren Gefäßes weggeworfen wurde. Das Phenol-DNA-Gemisch wurde dann in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben, dadurch konnte das Volumen bestimmt werden. Falls der Phenolanteil unter einem Drittel des Gesamtvolumens lag, wurde die entsprechende Phenolmenge ergänzt. Nach kurzem Mischen folgte eine erneute fünfminütige Zentrifugation mit 13000 rpm bei Raumtemperatur (Biofuge pico von Heraeus). Sie trennte das schwere Phenol vom leichteren Wasser mit der DNA. Die obere, DNA-haltige Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 5,9) und 3 Volumen 100 % Ethanol versetzt. Zur Fällung der DNA wurde dieses Gemisch für eine Stunde bei -20 °C oder für 20 Minuten bei -80 °C inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde dann 15 Minuten lang mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco von Heraeus), der flüssige Überstand wurde nicht weiter verwendet.

Nach zweimaligem Waschen mit 70 % Ethanol, anschließendem Abzentrifugieren und Absaugen des Überstandes trocknete das Pellet für ein bis zwei Minuten bei 65°C und wurde danach in 10 µl TE gelöst.

### **3.8.2.3. Acrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese**

Einzelsträngige DNA-Fragmente können mit der Acrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt werden. Die Elektrophorese erlaubt dabei die Auftrennung von DNA-Abschnitten nach Größe und elektrischer Ladung. Ein Gel aus Acrylamid-Polymeren dient als Matrix, durch die DNA-Fragmente wandern; Harnstoff wird zur Denaturierung zugegeben und verhindert ein Aneinanderlagern von Basenpaaren im Gel.

Jeweils 100 µg des Oligonukleotids wurden mit 1 Volumen Sequenzierpuffer versetzt, für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend auf ein 10 % Acrylamid-Harnstoffgel in einer vertikale Elektrophoresekammer geladen. Die Elektrophorese erfolgte dann für etwa 2 Stunden. Anschließend wurde die DNA im Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und durch Anregung mit UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht.

### **3.8.2.4. Isolierung von DNA aus Acrylamid-Harnstoff-Gel**

Die Isolierung von DNA aus dem Acrylamid-Harnstoffgel erfolgte mittels der crush and soak-Methode: Die Bande, die das Oligonukleotid enthielt, wurde mit einer Rasierklinge ausgeschnitten, auf eine Glasplatte überführt und darauf in kleine Stücke zerschnitten. Diese wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und mit Elutionspuffer überschichtet. Die DNA diffundierte über Nacht bei 37 °C in den Puffer. Am nächsten Morgen wurde die Probe kurz gemischt und für eine Minute mit 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge pico von Heraeus). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke im ersten Reaktionsgefäß wurden mit 500 µl Elutionspuffer überschichtet, kurz gemischt und erneut für eine Minute mit 13000 rpm (Biofuge pico von Heraeus) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Überstand der ersten Zentrifugation in das neue Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde 1/3 Volumen Phenol zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation für drei Minuten mit 13000 rpm bei Raumtemperatur (Biofuge pico von Heraeus) wurde die obere Phase mit dem Phenol-DNA-Gemisch in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Um das Probenvolumen zu verringern, wurde 2-Methyl-1-Propanol beigemischt und anschließend für eine Minute mit 13000 rpm (Biofuge pico von Heraeus) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Dann folgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 5,9) und 3 Volumen 100 % Ethanol und Inkubation für eine Stunde bei -20 °C. Die ausgefallene DNA wurde dann 15 Minuten lang mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco von Heraeus), der flüssige Überstand wurde nicht weiter verwendet. Anschließend wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und das Pellet schließlich in 10 µl TE gelöst.

### **3.8.3. Konzentrationsbestimmung von DNA**

#### **3.8.3.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Eine genaue Konzentrationsbestimmung von DNA ist mit dem UV-Spektrometer möglich. Dazu wurde die Probe zweihundertfach verdünnt und die Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm gemessen, wobei 1 OD<sub>260</sub> 50 µg/ml Doppelstrang-DNA entspricht.

Die Reinheit der Probe konnte durch den Quotienten der Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$  nm abgeschätzt werden. Bei Proben mit hoher Reinheit liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0.

### **3.8.3.2. Konzentrationsbestimmung durch Vergleich mit Standard-DNA**

Wesentlich ungenauer ist die Konzentrationsbestimmung durch Vergleich. Dazu wurde die Probe neben DNA-Standards bekannter Konzentration auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch etwa einen Zentimeter ins Gel gebracht (vgl. 3.8.2.1). Durch Vergleich der Fluoreszenzintensität nach Anregung durch UV-Licht (302 nm) konnte die Konzentration geschätzt werden.

## **3.8.4. Enzymatische Bearbeitung von DNA**

### **3.8.4.1. Restriktionsverdau**

Restriktionsendonukleasen können DNA an einer bestimmten Sequenz zerschneiden, wobei jedes dieser Enzyme eine eigene Sequenz erkennt. Es werden drei Typen von Restriktionsendonukleasen unterschieden: Typ I, II und III. Sie unterscheiden sich in ihren Erkennungs- und Schneidestellen, ihrem ATP-Verbrauch und ihrer Methyltransferase-Aktivität. In der Molekularbiologie werden vor allem Typ II-Enzyme verwendet: Sie erkennen kurze, oft palindromische Sequenzen und schneiden innerhalb ihrer Erkennungssequenzen oder in deren Nähe. Außerdem benötigen sie kein ATP und haben keine Methyltransferase-Aktivität. Einige dieser Enzyme schneiden versetzt (sticky ends), andere schneiden gerade (blunt ends).

Ein Reaktionsansatz setzte sich aus 1-5 µg der zu verdauenden DNA, 10-20 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease und dem empfohlenen Puffer zusammen. Die Reaktion erfolgte dann für ein bis zwei Stunden bei der für das Enzym optimalen Temperatur.

### **3.8.4.2. Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA**

Da Ligasen nur phosphorylierte DNA-Enden miteinander verbinden können, wird durch Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren eine Religation dieser linearisierten DNA verhindert.

Diese Dephosphorylierung erfolgte mit 2,5 U Antarctic Phosphatase, welche an blunt ends und sticky ends aktiv ist. Als Puffer wurde der Puffer der jeweiligen Restriktionsendonuklease

verwendet. Die Reaktion erfolgte dann für 30 Minuten bei 37°C. Danach wurde das Gemisch für fünf Minuten auf 65°C erwärmt, um die Reaktion zu beenden.

#### **3.8.4.3. Auffüllsynthese von 5'-Überhängen der DNA**

Die Auffüllsynthese wird verwendet, um 5'-Überhänge von DNA-Doppelsträngen, wie sie nach einem Restriktionsverdau vorhanden sein können (vgl. 3.8.4.1), zu einem glatten Ende aufzufüllen (blunt-end). Dazu kann die 5'-3'-Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragments, der größeren Untereinheit der Escherichia coli DNA-Polymerase I, genutzt werden.

Ein Ansatz dazu enthielt den jeweiligen DNA-Abschnitt, 33 µM dNTP, 1x Reaktionspuffer des Herstellers und 1 U Klenow-DNA-Polymerase pro µg eingesetzter DNA. Die Reaktion erfolgte für 15 Minuten bei 25 °C und wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA und Erhitzen auf 75°C für 20 Minuten gestoppt.

#### **3.8.4.4. Entfernung von 3'-Überhängen der DNA**

Auch die Entfernung von 3'-Überhängen an DNA-Doppelsträngen, wie sie nach Restriktionsverdau vorhanden sein können (vgl. 3.8.4.1), dient dazu, glatte Enden zu erhalten (blunt-end). Dafür kann die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der T4 DNA Polymerase genutzt werden. Ein Ansatz dazu enthielt den jeweiligen DNA-Abschnitt, 100 µM dNTP, 1x Reaktionspuffer und 1 U T4 DNA Polymerase pro µg eingesetzter DNA. Die Reaktion erfolgte für 15 Minuten bei 12 °C und wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA und Erhitzen auf 75 °C für 20 Minuten gestoppt.

#### **3.8.4.5. Ligation**

Durch Ligation können DNA-Fragmente in einen zuvor linearisierten Vektor eingefügt werden. Dies wird durch den Einsatz von Ligasen bewerkstelligt, die 3'-Enden mit 5'-Enden verbinden können.

In dieser Arbeit wurde 1 U T4 DNA Ligase verwendet. Vektor und DNA-Abschnitt wurden im molaren Verhältnis von 1 zu 2 (Vektor zu cDNA) bei Zwei-Faktoren-Ligationen und im Verhältnis 1 zu 1 zu 1 (Vektor zu Abschnitt eins der cDNA zu Abschnitt zwei der cDNA) bei



Drei-Faktoren-Ligationen eingesetzt. Dabei kamen etwa 20-30 ng des Vektors und die entsprechende DNA-Menge zum Einsatz. Der Ansatz enthielt zudem 1x Ligasepuffer. Die Reaktion erfolgte bei 4 °C über Nacht.

### **3.8.5. Transformation**

Wird ein Vektor, der einen bestimmten DNA-Abschnitt enthält, in kompetente Bakterien aufgenommen, so kann dieser DNA-Abschnitt durch Vermehrung der Bakterien vervielfacht werden.

Die Transformation dient dieser Aufnahme von Vektoren in kompetente Bakterien und erfolgte in dieser Arbeit nach der von Chung und Miller (1989)<sup>59,60</sup> vorgestellten Methode.

In dieser Arbeit wurde als kompetentes Bakterium *Escherichia coli* 298 eingesetzt. Ein Transformationsansatz enthielt 10 µl des zu transfizierenden Vektors mit der eingefügten DNA (vgl. 3.8.4.5), 20 µl KCM, 70 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl *Escherichia coli* 298. Dieser Ansatz wurde dann für 30 Minuten auf Eis gestellt und danach für 40 Sekunden auf 42 °C erhitzt. Anschließend wurden 800 µl 1x LB-Medium zugegeben, gefolgt von 50 Minuten Inkubation bei 37 °C. Die Bakterien wurden dann auf drei Ampicillin-haltige LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Das Antibiotikum verhinderte dabei das Wachstum von nicht transformierten Ampicillin-sensiblen Bakterien, während transformierte Bakterien durch die im Vektor pRK5 enthaltene β-Laktamase Ampicillin-resistent waren und deshalb Kolonien bilden konnten.

### **3.8.6. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien**

#### **3.8.6.1. Miniprep**

Minipreps dienen der Extraktion von geringen Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien und werden vor allem für Proben, die weiter analysiert werden sollen, eingesetzt.

Hierzu wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Transformations-Platte (vgl. 3.8.5) abgenommen, in 2 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler vermehrt.

Die Präparation erfolgte in dieser Arbeit durch zwei Methoden, wobei die Phenolextraktion DNA von geringerer Reinheit als die Isolierung über die Anionenaustausch-Säule lieferte.

### **3.8.6.1.1. Alkalische Lyse und alkoholische Fällung<sup>34,35</sup>**

Die Kulturen wurden für 30 Sekunden mit 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge pico von Heraeus), der Überstand wurde abgesaugt. Anschließend wurden die Bakterien in 200 µl TE resuspendiert und mit 100 µl 0,2 M NaOH/1 % SDS lysiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 50 µl eiskaltem 5 M Kaliumacetat (pH 4,8 - 5,3). Der Ansatz wurde für fünf Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach folgte eine weitere Zentrifugation für drei Minuten mit 13000 rpm bei 4 °C (Biofuge fresco von Heraeus). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Phenol vermischt. Durch erneute Zentrifugation für drei Minuten mit 13000 rpm bei Raumtemperatur (Biofuge pico von Heraeus) trennte sich die phenolhaltige Phase von der wässrigen Phase. Letztere wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt; daraus konnte die DNA mit 200 µl Isopropanol gefällt werden. Es folgte eine weitere Zentrifugation für drei Minuten mit 13000 rpm (Biofuge pico von Heraeus) bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach abermaliger Zentrifugation für drei Minuten mit 13000 rpm bei Raumtemperatur (Biofuge pico von Heraeus) und Absaugen des Ethanols konnte die DNA bei 65 °C getrocknet und anschließend in 30 bis 100 µl 1x TE gelöst werden, das hier mit 10 µg RNase A pro ml versetzt war, um RNA-Reste zu hydrolysieren.

### **3.8.6.1.2. Isolierung durch DNA-bindende Matrix in Anionenaustausch-Säulen**

Auch hier wurden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgeschlüsselt, die Isolierung der DNA erfolgte allerdings durch Bindung an eine DNA-bindende Anionenaustausch-Säule, von der sie nach dem Waschen der Säule eluiert wurde.

Hierzu wurde das NucleoSpin Plasmid-Kit gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet:

Die Proben wurden für 30 Sekunden mit 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge pico von Heraeus), der Überstand wurde abgesaugt. Die Bakterien wurden in 250 µl Puffer-A1 resuspendiert und mit 250 µl Puffer-A2 lysiert. Nach Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden 300 µl Puffer-A3 zugegeben. Dann erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten mit 13000 rpm bei Raumtemperatur (Biofuge pico von Heraeus). Anschließend wurde der Überstand auf die NucleoSpin-Säule überführt und durch Zentrifugation für eine Minute die DNA daran gebunden. Es folgte ein Waschschriff mit 600 µl Puffer-A4, der innerhalb einer Minute mit 13000 rpm bei Raumtemperatur durch die Säule

zentrifugiert wurde (Biofuge pico von Heraeus). Dann wurde die Säule durch Zentrifugation für 2 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA konnte dann mit 50 µl 1x TE eluiert werden. Dazu wurde die Säule zunächst für eine Minute mit dem TE inkubiert, um die Elution dann durch Zentrifugation für eine Minute bei Raumtemperatur abzuschließen.

### **3.8.6.2. Midiprep**

Midipreps erlauben die Extraktion von größeren DNA-Mengen als Minipreps. Auch hier kam eine modifizierte alkalische Lyse mit anschließender Isolierung der DNA durch eine Anionenaustausch-Säule und alkoholischer Fällung der DNA zum Einsatz. In dieser Arbeit wurde dafür das HiSpeed Plasmid Midi-Kit von Macherey-Nagel (Düren) mit den firmeneigenen Puffern in modifizierter Form verwendet:

Zunächst wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Transformations-Platte (vgl. 3.8.5) abgenommen, in 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium gegeben und mehrere Stunden bei 37°C auf dem Schüttler vermehrt. Anschließend wurden 45 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium zugegeben und die Bakterien für weitere 12 bis 16 Stunden vermehrt. Es folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 8000 rpm (JLA 10.500 von Beckman Coulter), der Überstand wurde abgossen. Die Bakterien wurden in 6 ml Puffer-P1 resuspendiert und anschließend mit 6 ml kaltem Puffer-P2 für fünf Minuten lysiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 6 ml kaltem Puffer-P3 und Inkubation auf Eis für fünf Minuten. Dann erfolgte eine weitere Zentrifugation für fünf Minuten mit 12000 rpm bei Raumtemperatur (JS 13.1 von Beckman Coulter). Anschließend wurde der Überstand auf die HiSpeed Plasmid Midi-Säule überführt, die zuvor mit 4 ml Puffer-QBT equilibriert worden war. Die Bindung der DNA erfolgte während des Durchströmens der Säule. Danach wurde die Säule mit 20 ml Puffer-QC gewaschen. Die DNA konnte mit 5 ml Puffer-QF eluiert und durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt werden. Nach Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine weitere Zentrifugation für sechs Minuten mit 10000 rpm bei Raumtemperatur (JS 13.1 von Beckman Coulter). Der Überstand wurde abgossen und das Pellet zweimal mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend konnte die DNA getrocknet und in 100 µl 1x TE gelöst werden.

### 3.8.6.3. Maxiprep

Maxipreps erlauben die Extraktion von großen DNA-Mengen mit hoher Reinheit. Für diese Arbeit wurde dazu die von Ish-Horowicz und Burke (1981)<sup>115</sup> vorgestellte Methode verwendet:

Zunächst wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Impföse von der Transformations-Platte (vgl. 3.8.5) abgenommen, in 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium gegeben und mehrere Stunden bei 37°C auf dem Schüttler vermehrt. Anschließend wurden 450 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium zugegeben und die Bakterien für weitere 16 Stunden vermehrt. Dann wurden die *Escherichia coli* für fünf Minuten mit 8000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (JLA 10.500 von Beckman Coulter). Der Überstand wurde abgegossen und die Bakterien in 20 ml einer Lösung aus 25 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM Glukose und 10 mM EDTA resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse durch Zugabe von 40 ml 0,2 M NaOH/1 % SDS. Die Neutralisation erfolgte nach fünf Minuten durch Zugabe von 20 ml eiskaltem 5 M Kaliumacetat (pH 4,8). Der Ansatz wurde für fünf Minuten auf Eis stehen gelassen. Nach einer weiteren Zentrifugation für fünf Minuten mit 8000 rpm bei Raumtemperatur (JLA 10.500 von Beckman Coulter) wurde der DNA-haltige Überstand durch ein dünnes Zellstofftuch gefiltert und 0,6 Volumen Isopropanol zur Fällung der DNA zugegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten mit 8000 rpm bei Raumtemperatur (JLA 10.500 von Beckman Coulter). Der Überstand wurde abgegossen, die DNA bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 8 ml 1 x TE und 0,2 ml 0,5 M EDTA gelöst. Verbliebene Säuren wurden anschließend durch Zugabe von 2 M Tris-Base unter ständiger pH-Kontrolle neutralisiert. Dann wurden 10 g CsCl und 1 ml Ethidiumbromid (10mg/ml) zugegeben und für 10 Minuten mit 4000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge von Heraeus). Der Überstand konnte dann mit einer sterilen 20 ml-Spritze in ein NVT65-Zentrifugationsgefäß gegeben und für 15 Stunden mit 50000-55000 rpm ultrazentrifugiert werden (NVT65 von Beckman Coulter). Dabei sammelte sich der Inhalt des Gefäßes entsprechend seiner Dichte in charakteristischen Banden, wobei die DNA-haltige Bande durch das Ethidiumbromid rot gefärbt war. Sie wurde mit einer frischen Spritze entnommen und in ein neues Gefäß überführt. Das Volumen wurde dann durch Zugabe von 1x TE verdoppelt, dann folgte die Extraktion des Ethidiumbromids: Dazu wurde ein Volumen Isoamylalkohol beigemischt. Die obere, Isoamylalkohol-haltige Phase wurde abgesaugt. Dieser Extraktionsschritt wurde so oft wiederholt, bis die untere, wässrige Phase vollständig entfärbt war.

Aus ihr konnte die DNA mit zwei Volumen Ethanol gefällt werden. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten mit 10000 rpm bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgossen, das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend über Nacht in 1x TE gelöst.

### 3.8.7. Sequenzierung

DNA-Abschnitte wurden durch die Firma MWG Biotech AG (Martinsried) sequenziert. Dort wird die Kettenabbruch-Synthese nach Sanger verwendet<sup>214,215</sup>.

### 3.8.8. Herstellung von Expressionskonstrukten

#### pGEX-GS

Nach Aufreinigung der Oligonukleotide GRSRRPSYRL\_fwd und GRSRRPSYRL\_rev über ein Harnstoffgel wurden sie aneinandergelagert, indem ein Wasserbad auf 95 °C erhitzt wurde und anschließend auf Raumtemperatur abkühlte. Darin befand sich ein Reaktionsgefäß mit einer Mischung aus je 5 µl der beiden Oligonukleotide. Die Aneinanderlagerung erfolgte, als während des Abkühlens die optimale Temperatur dazu durchschritten wurde. Anschließend erfolgte ein Verdau mit EcoRI und Bam H1. Das so gewonnene Fragment wurde gelelektrophoretisch gereinigt und anschließend in pGEX 5x1 (x BamH1 x EcoRI) ligiert. Zur Kontrolle wurde eine PCR mit den Primern GRSRRPSYRL\_rev und CDCP1\_ED\_GST\_fwd durchgeführt, die ein 677 bp großes Produkt lieferte.

#### pGEX-GR

Die Herstellung dieses Konstruktes erfolgte analog zu pGEX-GS mit den Primern GRPRTTSFAES\_fwd und GRPRTTSFAES\_rev. Zur Kontrolle wurde eine PCR mit den Primern GRPRTTSFAES\_rev und CDCP1\_ED\_GST\_fwd durchgeführt, die ein 677 bp großes Produkt lieferte.

- pRK5\_Akt1  $\Delta$  NT 20      Eine PCR mit den Primern pRK rev und akt1 fwd aa 21 mit pRKrs\_PKB $\alpha$  als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt von etwa 1500 bp. Dieses wurde mit EcoRI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI) ligiert. Zur Kontrolle wurde ein Verdau mit HindIII durchgeführt, der neben dem Vektor ein Fragment von etwa 400 bp lieferte und so die richtige Orientierung nachwies.
- pRK5\_Akt1  $\Delta$  NT 40      Eine PCR mit den Primern pRK rev und akt1 fwd aa 41 mit pRKrs\_PKB $\alpha$  als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt von etwa 1400 bp. Dieses wurde mit EcoRI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI) ligiert. Zur Kontrolle wurde ein Verdau mit HindIII durchgeführt, der neben dem Vektor ein Fragment von etwa 400 bp lieferte und so die richtige Orientierung nachwies.
- pRK\_Akt1  $\Delta$  NT 42      Eine PCR mit den Primern pRK rev und akt1 fwd 43 mit pRKrs\_PKB $\alpha$  als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt von etwa 1400 bp. Dieses wurde mit EcoRI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI) ligiert. Zur Kontrolle wurde ein Verdau mit Hind III durchgeführt, der neben dem Vektor ein Fragment von etwa 400 bp lieferte und so die richtige Orientierung nachwies.
- pRK\_Akt1  $\Delta$  NT 85      Eine PCR mit den Primern pRK rev und akt1 fwd 86 mit pRKrs\_PKB $\alpha$  als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt von etwa 1250 bp. Dieses wurde mit EcoRI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI) ligiert. Zur Kontrolle wurde ein Verdau mit HindIII durchgeführt, der neben dem Vektor ein Fragment von etwa 400 bp lieferte und so die richtige Orientierung nachwies.

- pRK5\_PKB $\alpha$  (aa 147-480) Eine PCR mit den Primern pRK rev und akt delta NT 147 mit pRKrs\_PKB $\alpha$  als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt von etwa 1100 bp. Dieses wurde mit EcoRI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI) ligiert. Zur Kontrolle wurde ein Verdau mit SacI durchgeführt, der neben dem Vektor Fragmente von 961 bp und 591 bp lieferte.
- pRK5\_PKB $\alpha$  (aa 155-480) Eine PCR mit den Primern pRK rev und akt1 fwd 155 mit pRKrs\_PKB $\alpha$  als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt von etwa 1100 bp. Dieses wurde mit EcoRI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pCR zero blunt ligiert. Dieses Konstrukt wurde anschließend mit EcoRI verdaut. Das entstandene Fragment mit etwa 1100 bp wurde dann in pRK 5 (x EcoRI) ligiert. Zur Kontrolle wurde ein Verdau mit Hind III durchgeführt, der neben dem Vektor ein Fragment von etwa 500 bp lieferte und so die richtige Orientierung nachwies.
- pRK5\_PKB $\alpha$  (aa 178-480) Eine PCR mit den Primern pRK rev und akt1 fwd aa 178 mit pRKrs\_PKB $\alpha$  als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt von etwa 1000 bp. Dieses wurde mit EcoRI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI) ligiert. Zur Kontrolle wurde ein Verdau mit HindIII durchgeführt, der neben dem Vektor ein Fragment von etwa 500 bp lieferte.
- pRK5\_PKB $\alpha$  (aa 200-480) Eine PCR wurde mit den Primern pRK rev und akt1 fwd 200 mit pRKrs\_PKB $\alpha$  als Ausgangs-DNA durchgeführt. Das Produkt wurde mit EcoRI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI) ligiert. Die korrekte Größe wurde durch einen Verdau mit EcoRI, der ein Produkt von etwa 1000 bp lieferte, überprüft. Die korrekte Orientierung wurde durch eine PCR mit den Primern pRK rev und akt1 fwd 200 bestätigt.

- pRK5\_PKB $\alpha$  (aa 260-480) Eine PCR wurde mit den Primern pRK rev und akt1 fwd 260 mit pRKrs\_PKB $\alpha$  als Ausgangs-DNA durchgeführt. Das Produkt wurde mit EcoRI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI) ligiert. Die korrekte Größe wurde durch einen Verdau mit EcoRI, der ein Produkt von etwa 800 bp lieferte, überprüft. Die korrekte Orientierung wurde durch eine PCR mit den Primern pRK rev und akt1 fwd 200 bestätigt.
- pRK5\_PKB $\alpha$  (aa 310-480) Eine PCR wurde mit den Primern pRK rev und akt1 fwd 310 mit pRKrs\_PKB $\alpha$  als Ausgangs-DNA durchgeführt. Das Produkt wurde mit EcoRI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI) ligiert. Die korrekte Größe wurde durch einen Verdau mit EcoRI, der ein Produkt von etwa 700 bp lieferte, überprüft. Die korrekte Orientierung wurde durch eine PCR mit den Primern pRK rev und akt1 fwd 310 bestätigt.
- pRK<sub>RS</sub>\_XAF1\_200\_VSV NT Eine PCR mit den gereinigten Primern XAF1 NT VSV und XAF1-840 rev mit pRK XAF1 als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt mit etwa 645 bp. Dieses wurde mit EcoRI und XhoI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI x XhoI) ligiert.
- pRK<sub>RS</sub>\_XAF1\_225\_VSV NT Eine PCR mit den gereinigten Primern XAF1 NT VSV und XAF1-920 rev mit pRK XAF1 als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt mit etwa 730 bp. Dieses wurde mit EcoRI und XhoI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI x XhoI) ligiert.
- pRK<sub>RS</sub>\_XAF1\_250\_VSV NT Eine PCR mit den gereinigten Primern XAF1 NT VSV und XAF1-992 rev mit pRK XAF1 als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt mit etwa 800 bp. Dieses wurde mit EcoRI und XhoI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI x XhoI) ligiert.



- pRK<sub>RS</sub>\_XAF1  $\Delta$  179-181 Eine PCR wurde mit den Primern pRK 5' PCR und xaf D 179-181 rev, mit pRK XAF1 als Ausgangs-DNA durchgeführt. Eine zweite PCR wurde mit den Primern pRK rev und xaf D 179-181 fwd und mit pRK XAF1 als Ausgangs-DNA durchgeführt. Die Produkte beider PCRs wurden dann für eine Overlap-PCR mit den Primern pRK 5' PCR und pRK rev verwendet. Das etwa 1000 bp große Produkt wurde mit EcoRI und XhoI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI x XhoI) ligiert.
- pRK<sub>RS</sub>\_XAF1 (1-289)\_VSV NT Eine PCR mit den Primern XAF1 NT VSV und XAF1 289 rev mit pRK XAF1 als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt mit etwa 1000 bp. Dieses wurde mit EcoRI und XhoI verdaut. Anschließend wurde das Fragment in pRK 5 (x EcoRI x XhoI) ligiert.
- pRK<sub>RS</sub>\_XIAP myc NT Eine PCR mit den gereinigten Primern XIAP fwd myc und pRK rev mit pRK XIAP als Ausgangs-DNA lieferte ein Produkt mit 1600 bp. Dieses wurde in pCR zero blunt kloniert. Eine Sequenzierung zeigte eine Mutation am 3'-Ende. Um diese zu korrigieren, wurde eine PCR mit den Primern pRK 400 und pRK rep. rev sowie mit pRK rep. fwd und pRK rev durchgeführt. Die Produkte wurden für eine Overlap-PCR mit den Primern pRK 400 und pRK rev verwendet, die ein 1500 bp großes Fragment lieferte. Dieses wurde in pCR zero blunt kloniert. Eine Sequenzierung zeigte, dass die ursprüngliche Mutation korrigiert worden war, allerdings zeigte sich eine neue Mutation im Bereich des 5'-Endes. Um diese zu berichtigen wurde das korrigierte 3'-Ende mit einem Verdau mit BstEII und XhoI isoliert. Ein weiterer Verdau lieferte das 5'-Fragment des ursprünglichen Konstruktes. Er wurde mit den Enzymen BstEII und EcoRI durchgeführt. Beide Fragmente wurden dann in pRK 5 (x EcoRI x XhoI) ligiert. Ein Kontrollverdau zeigte die korrekte Fragmentgröße von etwa 1700 bp.

### **3.9. Zellkultur**

#### **3.9.1. Kultivierung und Bearbeitung von Zellen**

Die Zellen wurden bei 37 °C in einer mit H<sub>2</sub>O gesättigten Atmosphäre und 7 % CO<sub>2</sub> in einem Function-line-Inkubator kultiviert. Alle Arbeiten erfolgten unter den Sterilbänken Herasafe, die der Sicherheitsstufe 2a entsprechen.

Die Zellen wurden in den oben beschriebenen Medien (vgl. 3.2.3) kultiviert und, kurz bevor sie vollständig konfluent waren, passagiert.

Zum Ablösen der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA (für 10 cm Schalen) bei 37 °C inkubiert. Danach konnten die Zellen mit frischem Medium ab gespült und weiter kultiviert werden.

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese durch Trypsin/EDTA von der Schale abgelöst, in Friermedium resuspendiert und in jeweils zwei CryoTubes überführt. Darin wurden sie für mindestens einen Tag bei -80°C gelagert, bevor sie zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff gegeben werden konnten.

Wieder aufgetaut wurden die Zellen, indem das jeweilige CryoTube in ein Wasserbad mit 37 °C gegeben wurde. Anschließend wurde der Inhalt in ein neues Gefäß mit 7 ml Medium überführt, gemischt und eine Minute mit 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge pico von Heraeus). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellen auf eine Schale gegeben.

#### **3.9.2. Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahl wurde mittels eines Hämozytometers nach Neubauer unter dem Mikroskop ermittelt. Darin wurde die Zellzahl in mehreren Kleinquadraten ausgezählt, daraus der Mittelwert errechnet und mit 16 multipliziert, um die Zellzahl für die gesamte Kammer zu erhalten. Dieser Wert wurde dann mit 10<sup>4</sup> multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

#### **3.9.3. Transfektion**

Durch Transfektion kann DNA-Material in eukaryotische Zellen gebracht werden. Die Phase vor dem Abbau der zellfremden DNA durch die Zelle wird transiente Expression genannt.

Wird ein zellfremder DNA-Abschnitt stabil exprimiert, ist dieser Abschnitt in die nukleäre DNA der Zelle integriert worden und kann deshalb nicht mehr abgebaut werden.

### **3.9.3.1. Calcium-Phosphat-Präzipitation**

In dieser Arbeit wurden Zellen mit der Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert, wie sie von Chen und Okayama<sup>53</sup> vorgestellt wurde: Dabei wird DNA an Calcium-Phosphat gebunden und fällt damit aus. Diese Präzipitate werden dann von adhärennten Zellen endozytotisch aufgenommen und die DNA wird transkribiert. Das so transfizierte Plasmid ist für etwa 72 Stunden in der Zelle, bevor es degradiert wird. Die höchste Proteinexpression ist bei der transienten Expression also nach 48-72 Stunden zu erwarten.

20 Stunden vor der Transfektion wurden  $5 \times 10^5$  Zellen (für HEK 293) auf 35-mm-Schalen in einem Volumen von 2 ml ausgesät. Zur Transfektion wurden 4 µg DNA, 10 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> und 86 µl H<sub>2</sub>O vermischt. Anschließend wurden 100 µl BBS zugegeben und der Ansatz dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Danach konnte die Mischung auf die Zellen gegeben werden, die dann bei 37 °C in einer mit H<sub>2</sub>O gesättigten Atmosphäre und 3 % CO<sub>2</sub> in einem Function-line-Inkubator kultiviert wurden. Nach 15 Stunden wurde das Medium abgesaugt und Medium mit 0,5 % FCS zugegeben. Die weitere Inkubation erfolgte dann wieder im Function-line-Inkubator bei 37 °C in einer mit H<sub>2</sub>O gesättigten Atmosphäre und 7 % CO<sub>2</sub>. Eine Lyse konnte nach frühestens 24 weiteren Stunden erfolgen.

### **3.9.3.2. Stabile Transfektion**

Um DNA-Abschnitte linearisiert in die DNA der Wirtszelle zu integrieren, wurden die Zellen zunächst mit der Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert (vgl. 3.9.3.1). Allerdings wurde zusätzlich zum eigentlichen Plasmid ein weiteres Plasmid mit einem Neomycin-Resistenzgen co-transfiziert. Dieses pSV2<sub>neo</sub> wurde im Verhältnis 1 zu 10 beigemischt. 15 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und normales Medium zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen durch Trypsin abgelöst und auf einer 10-cm-Schale ausgesät in 10 ml Medium mit 100µg Geneticin (G418). Nach etwa einer Woche waren mit dem bloßen Auge einzelne Kolonien zu sehen, die mit einer 1000 µl-Pipette in 200 µl Medium abgeschabt und auf eine neue 24-Loch Schale in 1 ml Medium überführt wurden. Wenn die Zellen nach

drei bis fünf Tagen konfluent waren, wurde ein Teil der Zellen auf eine neue Schale überführt, von der sie zur Kontrolle der Expression geerntet werden konnten.

### **3.10. Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.10.1. Herstellung von Fusionsproteinen in Bakterien**

Der pGEX-Vektor erlaubt die Expression von GST-Fusionsproteinen in *Escherichia coli*<sup>234</sup>. Dazu wurde die Sequenz für das gewünschte Protein in den pGEX-Vektor mit der Sequenz für GST ligiert (vgl. 3.8.4.5) und in kompetente *Escherichia coli* BL21 transformiert (vgl. 3.8.5). Eine Kolonie wurden über Nacht in 100 ml Ampicillin-haltigem LB bei 37 °C kultiviert, am nächsten Morgen wurde das Volumen auf 1 l erhöht. Etwa eine Stunde später, wenn die Messung der Extinktion bei  $\lambda = 600$  nm einen Wert von 0,6 bis 0,8 ergab, wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 100  $\mu$ M zugegeben, um den Repressor lac I<sup>q</sup> zu hemmen und damit den Promotor P<sub>tac</sub> zu aktivieren. Somit wurde die Transkription des Gens für das GST-Fusionsprotein gestartet. Nach weiterer Inkubation für drei Stunden auf einem Schüttler bei 37 °C und 150 rpm wurden die Bakterien durch Zentrifugation mit 8000 rpm für fünf Minuten bei Raumtemperatur (JLA 10.500 von Beckman Coulter) konzentriert. Das Pellet wurde in einer Lösung aus 18 ml PBS, 90 mg Lysozym, 1 mM EGTA und 20  $\mu$ l Aprotinin resuspendiert. Nach zehn Minuten bei Raumtemperatur wurden 2 ml Triton-X 100 zugegeben. Dann wurde die Lösung mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut, um die Bakterien zu lysieren. Der Erfolg zeigte sich an einer zunehmenden Viskosität. Durch Zugabe von 0,2 ml 100 mM PMSF und 20  $\mu$ l DNaseI wurde die DNA nach kurzer Zeit bei Raumtemperatur gespalten und so die Viskosität wieder verringert. Überreste der Bakterien wurden durch Zentrifugation für 20 Minuten mit 10000 rpm bei Raumtemperatur (JA-17 von Beckman Coulter) entfernt. Zur Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wurde dieses zusammen mit 1 ml Sepharose-gebundenem Glutathion über Nacht bei 4 °C oder für 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert, um dabei an die Sepharoseperlen gebunden zu werden. Die Sepharose mit dem Fusionsprotein wurden dann auf eine Poly-Prep Chromatographie-Säule überführt und mit 10 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte die Elution mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 5 mM reduziertes Glutathion. Die Menge und Qualität des Proteins wurde durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) (vgl. 3.10.6) zusammen mit Mengenstandards aus 1  $\mu$ g und 2  $\mu$ g BSA sowie HMW-Molekülmarker und anschließender Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau beurteilt.

### 3.10.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte in dieser Arbeit photometrisch nach der von Bradford<sup>42</sup> vorgestellten Methode. Dabei wird die Eigenschaft von Coomassie-Brillant-Blau ausgenutzt, nach Komplexbildung mit Proteinen sein Absorptionsmaximum von 470 nm zu 595 nm zu verschieben. Diese Verschiebung kann im Photometer detektiert werden.

Es wurde der Bio-Rad Protein Assay nach Herstellerangaben verwendet: Die Zelllysate (vgl. 3.10.3) wurden im Verhältnis 1 zu 10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. 10 µl dieser Verdünnungen wurden anschließend mit 790 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl Bio-Rad Protein Assay-Reagenz vermischt und zwei Minuten inkubiert. Dann konnte im UV-Spektrometer die Extinktion bei  $\lambda = 595$  nm gemessen werden. Als Leerwert diente Lysepuffer, als Referenzwert wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA verwendet. Daraus konnte dann die Konzentration berechnet werden.

### 3.10.3. Lyse von Zellen

Zur Analyse von Proteinen wurden die Zellmembranen durch das nicht-denaturierende Detergens Triton-X 100 im Lysepuffer lysiert. Danach waren zytoplasmatische und membrangebundene Proteine gelöst, der Nukleus und das Zytoskelett blieben weitgehend intakt.

Zunächst wurden die Zellen mit Medium von der Platte abgespült. Dann folgte eine Zentrifugation für eine Minute mit 5000 rpm bei Raumtemperatur (Biofuge pico von Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 200 µl eiskaltem Lysepuffer resuspendiert. Nach Inkubation für drei Minuten auf Eis folgte eine weitere Zentrifugation für drei Minuten mit 13000 rpm bei 4 °C (Biofuge fresco von Heraeus), um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und entweder komplett mit Laemmli Puffer versetzt und durch SDS-PAGE (vgl. 3.10.6) aufgetrennt oder aber 20 µl als Expressionskontrolle mit Laemmli Puffer versetzt und der Rest zur Immunpräzipitation (vgl. 3.10.4) verwendet.

### 3.10.4. Co-Immunpräzipitation von Proteinen

Durch Co-Immunpräzipitation können Interaktionen von Proteinen *in vitro* nachgewiesen werden. Dabei wird ein Protein durch einen Antikörper gebunden, alle Interaktionspartner werden über dieses erste Protein mitgebunden. Um die Antikörper zu präzipitieren wird für Maus-Antikörper Sepharose-gebundenes Protein G und für Kaninchen-Antikörper Sepharose-gebundenes Protein A eingesetzt, die beide mit hoher Spezifität die Fc-Region des jeweiligen IgG binden können. Protein G<sup>37</sup> ist ein Membranprotein aus Streptokokken der Lancefield-Gruppe C. Protein A<sup>168</sup> ist ein Membranprotein aus *Staphylococcus aureus*. Durch die Sepharoseperlen wird das an den Antikörper gebundene Protein zusammen mit seinen Interaktionspartnern abzentrifugiert, während alle nicht interagierenden Proteine mit dem Überstand abgesaugt werden. Durch Denaturierung werden die Proteine wieder von den Sepharoseperlen gelöst und können anschließend elektrophoretisch getrennt werden (vgl. 3.10.5).

Für diese Arbeit wurden pro Ansatz 170 µl Zelllysat (vgl. 3.10.3), 200 µl HNTG, 20 µl Protein A- oder G-Sepharose und 2 µg Antikörper in einem Reaktionsgefäß für mindestens drei Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die an Sepharose gebundenen Komplexe durch Zentrifugation mit 5000 rpm bei 4 °C für 30 Sekunden (Biofuge fresco von Heraeus) vom Überstand getrennt. Dieser wurde abgesaugt. Die Sepharose-gebundenen Komplexe wurden dreimal mit je 500 µl HNTG gewaschen. Danach wurden die Proteininteraktionen mittels Denaturierung mit 25 µl Laemmli Puffer und Erhitzen auf 95 °C aufgelöst, um dann elektrophoretisch getrennt zu werden (vgl. 3.10.6).

### 3.10.5. GST-pull-down assay

Auch durch den GST-pull-down assay können Interaktionen von Proteinen *in vitro* nachgewiesen werden. Dazu wurde ein Protein als GST-Fusionsprotein (vgl. 3.10.1) in Bakterien hergestellt. Dieses wurde dann vermischt mit Sepharose-gebundenem Glutathion und dem Zelllysat, das das interagierende Protein enthielt, und für drei Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Dabei entstanden Komplexe aus Glutathion-Sepharose, GST-Fusionsprotein und dem interagierenden Protein. Diese wurden durch Zentrifugation mit 5000 rpm bei 4 °C für 30 Sekunden (Biofuge fresco von Heraeus) vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde abgesaugt. Die Sepharose-gebundenen Komplexe wurden dreimal mit je

500 µl HNTG gewaschen. Danach wurden die Proteininteraktionen mittels Denaturierung mit 30 µl Laemmli Puffer und Erhitzen auf 95 °C aufgelöst, um dann elektrophoretisch getrennt zu werden (vgl. 3.10.6).

### 3.10.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese Methode<sup>132</sup> dient der Trennung von Proteinen im elektrischen Feld nach deren Größe. Das denaturierende, anionische Detergens SDS überdeckt die Ladungsverteilung von Proteinen, weswegen diese Ladung nur wenig Einfluß auf das Laufverhalten im Gel hat. Dieses wird durch die Größe der Proteine und die Konzentration des Polyacrylamidgels bestimmt.

Das Gel aus Acrylamid-Polymeren dient dabei als Matrix, durch welche die jetzt negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld in Richtung der Anode wandern.

Die Elektrophorese wurde in vertikalen Elektrophorese-Kammern durchgeführt. Je nach Größe der Proteine wurden Trenngel mit Acrylamid-Konzentrationen zwischen 8 % und 12 % gefertigt, das Sammelgel enthielt immer 4 % Acrylamid. Nachdem das Gel vollständig polymerisiert war, wurde der Kamm gezogen und das Gel in 1 x TG in die Kammer eingespannt. Die Elektrophorese erfolgte dann mit einer elektrischen Spannung von 80 bis 90 V und einer Stromstärke von 20 mA über Nacht und wurde beendet, wenn das Bromphenolblau des Laemmli Puffers 10 cm weit ins Trenngel gelaufen war.

Zum Abschätzen der Proteingrößen wurde immer der Molekulargewichts-Marker aus eigener Herstellung mit aufgetragen. Er enthält folgende Proteine:

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

### 3.10.7. Western Blot

Durch einen Western Blot werden Proteine aus dem Polyacrylamidgel (vgl. 3.10.6) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Trägermembran übertragen<sup>257</sup>.

Vor dem Aufbau der Blot-Kammern wurde jeweils das Sammelgel des Polyacrylamidgels abgetrennt und nur das Trenngel für fünf Minuten in Transblotpuffer auf einem Rocky shaker geschüttelt. Dieses wurde dann folgendermaßen in eine Semidry-Blot-Kammer eingebracht: Auf die Anode wurden drei Lagen Whatman Papier gelegt, darauf kamen luftblasenfrei die Nitrozellulose-Membran, das Trenngel und drei weitere Lagen Whatman Papier. Alle Lagen wurden vorher in Transblotpuffer getränkt. Die Kammer wurde mit der Kathode im Deckel verschlossen. Die Elektrophorese erfolgte für drei Stunden bei 4 °C mit einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche.

Nach Abschluss des Transfers wurden die Proteine auf der Nitrozellulose mit PonceauS unspezifisch angefärbt. Nach Abschütten der Ponceau Säure wurden Reste davon durch wiederholtes Waschen mit H<sub>2</sub>O entfernt. Der Molekulargewichts-Marker konnte dann mit wasserfestem Kugelschreiber nachgezeichnet werden und die Nitrozellulose wurde zugeschnitten. Anschließend wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran durch einstündiges Schütteln in 1x NET-G blockiert.

Durch die Anlagerung von Gelatine an die freien Bindungsstellen der Membran kann verhindert werden, dass Antikörper dort unspezifisch gebunden werden.

### 3.10.8. Immundetektion von Proteinen und Chemolumineszenz

Um Proteine auf der Nitrozellulose-Membran (vgl. 3.10.7) detektieren zu können, werden diese zunächst vom primären Antikörper erkannt. An die Fc-Region dieses Primär-Antikörpers bindet dann ein Spezies-spezifischer sekundärer Antikörper, an den eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Es entsteht also ein spezifischer Antikörper-Komplex, der die Meerrettich-Peroxidase enthält. Dieses Enzym katalysiert die Chemolumineszenz-Reaktion, durch die ein Film belichtet wird.

Für diese Arbeit wurden die Nitrozellulose-Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer Lösung mit dem primären Antikörper geschüttelt. Diese enthielt jeweils 0,1 bis 0,2 µg Antikörper pro ml 1x NET-G, beziehungsweise eine Verdünnung 1:1000 in 1x NET-G für Seren. Anschließend wurden die Membranen dreimal



für je 10 Minuten bei Raumtemperatur in 1x NET gewaschen. Dann wurden sie mit einer Lösung mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Als sekundäre Antikörper kamen Ziege- $\alpha$ -Maus (POD-konjugiert) und Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (POD-konjugiert) in einer Verdünnung von 1:20000 in NET-G zum Einsatz. Darin wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach folgten drei Waschschrte für je 10 Minuten mit NET.

Anschließend erfolgte die Chemolumineszenz-Reaktion: Die beiden Lösungen des ECL-Kits wurden 1 zu 1 vermischt und die Membran vollständig damit in Kontakt gebracht. Durch die von der Peroxidase am sekundären Antikörper katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion entstand bläuliches Licht. Damit wurde der Film für 15, 45, 215 Sekunden und eine Stunde belichtet und anschließend entwickelt.

### **3.10.9. Stripping von Western-Blots**

Stripping von Western-Blots dient dazu, gebundene Antikörper (vgl. 3.10.8) wieder von der Nitrozellulose-Membran zu lösen und diese somit für andere Antikörper zur Detektion weiterer Proteine frei zu machen.

Die Nitrozellulose-Membran wurde dazu für 30 Minuten in 56 °C warmem Stripping-Puffer geschüttelt. Danach folgten mehrere Waschschrte mit H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die Nitrozellulose-Membran eine Stunde in 1x NET-G geschüttelt. Im Anschluss konnte die Immundetektion (vgl. 3.10.8) mit anderen Antikörpern wiederholt werden.

### **3.11. Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie erlaubt die Sichtbarmachung der intrazellulären Lokalisation von Zellbestandteilen und einzelnen Proteinen. Dazu erfolgte eine Färbung entweder durch fluoreszenz-markierte Antikörper oder durch fluoreszierende Chemikalien, die sich in bestimmten Zellorganellen einlagern. Ein Beispiel für letzteres ist TO-PRO 3<sup>265</sup>: Hierbei handelt es sich um einen Cyanine-Farbstoff, der sich spezifisch an doppelsträngige Nukleinsäuren anlagert und so Zellkerne markiert. Dort emittiert er, nach geeigneter Anregung, Licht mit einer Wellenlänge von 661 nm.

Eine sehr genaue Detektion der intrazellulären Lokalisation wird durch die Verwendung eines Confocal laser scanning Mikroskops ermöglicht<sup>81</sup>: Damit wird, anders als in der

konventionellen Lichtmikroskopie, nicht die Überlagerung eines scharfen Bildes aus der Ebene, auf die fokussiert wurde, mit vielen unscharfen Bildern sichtbar, sondern nur das Bild aus der Fokusebene. Dies gelingt durch die Fokussierung auch des Anregungslichtes auf eine bestimmte Ebene. Zusammen mit der Fokussierung des Detektors wird es dadurch möglich, ein kleines Volumen innerhalb der Zellesichtbar zu machen. Durch Verknüpfung von Informationen aus mehreren aneinandergrenzenden Ebenen wird eine dreidimensionale Rekonstruktion des Zellaufbaus möglich.

Für diese Arbeit wurden 5000-6000 Zellen auf Glasplättchen in 12-Loch-Schalen über Nacht bei 37 °C in einer mit H<sub>2</sub>O gesättigten Atmosphäre und 7 % CO<sub>2</sub> in einem Function-line-Inkubator kultiviert. Zur Fixierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann in 1 ml -20 °C kaltes Methanol gegeben. Es folgte eine Inkubation bei -20 °C für mindestens 30 Minuten. Dann wurde das Methanol abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Um freie Antikörperbindungsstellen zu blockieren, folgte eine einstündige Inkubation in PBS + 10 % FCS. Dann folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern auf einer Parafilm-Folie, die sich auf zwei feuchten Papieren in einer wasserdicht verschlossenen Schale befanden. Eingesetzt wurden jeweils 1-2 ng/μl Antikörper in 40 μl PBS + 10 % FCS. Die Bindung der primären Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden. Danach wurden die Gläschen mit den Zellen dreimal mit PBS + 10 % FCS gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper in einer gleichartig aufgebauten Schale inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper kam in einer Verdünnung von 1:400 in 40 μl PBS + 10 % FCS für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur zum Einsatz. Anschließend wurden die Gläschen mit den Zellen dreimal mit PBS + 10 % FCS gewaschen, danach kurz mit H<sub>2</sub>O abgespült und mit PermaFluor auf Objektträgern fixiert. Nach frühestens 12 Stunden erfolgte die Auswertung mit einem Leica TCS NT/SP Confocal laser scanning Mikroskop mit 63-facher Vergrößerung + Okularvergrößerung und einer Blende zwischen 0,62 und 1,32. Die Bilder wurden mit der TCS-NT Software von Leica aufgenommen und Helligkeit und Kontrast, wenn erforderlich, mit Adobe Photoshop CS 2 angepasst. Mit diesem Programm wurden auch Überlagerungsbilder hergestellt.

### **3.12. Apoptose-Messung**

Die Messung der Zahl lebender Zellen wurde mit dem WST-1-Assay durchgeführt. Dieses beruht darauf, dass ein fast farbloses Tetrazolium-Salz in einer Redox-Reaktion in ein dunkelrotes Formazan umgesetzt wird, dessen Absorption dann im ELISA-Reader bestimmt

werden kann. Die Umsatzrate hängt dabei vor allem von der Aktivität des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette, der NADH-Dehydrogenase, ab.

Für diese Arbeit wurden 5000-6000 Zellen in 100 µl Medium in 96-Loch-Schalen über Nacht bei 37 °C in einer mit H<sub>2</sub>O gesättigten Atmosphäre und 7 % CO<sub>2</sub> in einem Function-line-Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe des jeweiligen Apoptose-Induktors in angegebener Konzentration für die angegebene Zeit (vgl. 4.7). Danach wurden 10 µl der WST-1-Lösung für eine Stunde zugegeben. Im Anschluss erfolgte entweder direkt die Messung der OD im ELISA-Reader oder die Schalen wurden bei -20 °C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt gemessen. Die Messwellenlänge war 450 nm, die Referenzwellenlänge 620 nm, Messwert war die Differenz zwischen beiden. Zusätzlich wurde jeweils eine Messung von Medium und WST-1-Lösung ohne Zellen und Apoptose-Induktor als Leerwert durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2002 SP 3: Alle Messungen wurden in jeweils sechs Nöpfen mit identischem Inhalt durchgeführt, es wurde jeweils der Mittelwert abzüglich des Leerwertes verwendet. Der Mittelwert der Zellen einer Zelllinie ohne Induktion von Apoptose wurde als 100 % definiert, die Messwerte der übrigen Zellen, bei denen Apoptose induziert worden war, wurden dann prozentual darauf bezogen:

$$\text{Überlebende Zellen [\%]} = \text{OD}_{\text{Zellen mit Apoptose-Induktion}} / \text{OD}_{100\%} \times 100$$

Von diesen prozentualen Zellzahlen wurden dann mit Microsoft Excel 2002 SP 3 die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Mit dem Programm GraphPad InStat, Version 3.06 wurden die P-Werte mittels einem ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Mehrfachvergleichstest errechnet. Als signifikant verschieden wurden Werte von  $P < 0,05$  interpretiert.

### **3.13. Präparation polyklonaler Antikörper**

Die Herstellung der Kaninchen-Seren erfolgte durch die Firma Eurogentec S.A. (Seraing, Belgien). Dort wurde Kaninchen 1 mg GST-Fusionsprotein (vgl. 3.10.1) in 0,5 ml PBS zusammen mit 0,5 ml Freud-Adjuvans intradermal injiziert. Diese Immunisierung wurde zweimal wiederholt. Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Kaninchen das Blut entnommen und das Serum abgetrennt.

Zur Vorbereitung der Säule zur Aufreinigung der Antikörper wurden 400 mg CNBr-Sephrose für mindestens 15 Minuten in 1 mM HCl eingeweicht. Danach wurden sie viermal

mit 1 mM HCl und einmal mit Kopplungs-Puffer gewaschen. 5 mg des Fusionsproteins wurden über Nacht gegen Kopplungspuffer dialysiert und danach zusammen mit 2 ml Kopplungspuffer zur CNBr-Sepharose gegeben. Die Bindung erfolgte für zwei Stunden auf einem Drehrad bei 4 °C und wurde danach durch Zugabe von 15 ml Tris-HCl pH 8,0 gestoppt. Durch viermaliges Waschen mit Kopplungspuffer wurde ungebundenes Fusionsprotein entfernt.

Die so an Sepharoseperlen gebundenen Fusionsproteine wurden dann mit 15 ml Kaninchen-Serum für drei Stunden auf einem Drehrad inkubiert, um die spezifischen polyklonalen Antikörper zu binden. Danach wurden diese durch Zentrifugation vom Restserum getrennt und auf eine Poly-Prep Chromatographie-Säule überführt. Diese wurde dann zweimal mit je 10 ml TN-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Elution durch Zugabe 10 ml saurer Lösung, 10 ml basischer Lösung und 10 ml chaotroper Lösung. Die saure Lösung enthielt 100 mM Glycin und 300 mM NaCl und hatte einen pH von 2,5; die basische Lösung enthielt 0,5 M Triethanolamin und hatte einen pH von 10,3; die chaotrope Lösung enthielt 0,5 M NaI.

Die Eluate wurden anschließend über Nacht gegen NET mit einmaligem Pufferwechsel dialysiert. Anschließend wurden sie zusammen mit jeweils 1 ml Protein A Sepharose für zwei Stunden auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert und anschließend auf Poly-Prep Chromatographie-Säulen überführt. Nach Waschen mit 10 ml TN-Puffer erfolgte die Elution durch Zugabe einer Lösung aus 100 mM Glycin und 300 mM NaCl mit einem pH von 2,5. Die Säure im Eluat wurden unter ständiger pH-Kontrolle sofort mit 1 M Tris-HCl pH 8,8 neutralisiert.

Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit dem UV-Spektrometer. Hier wurde die Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm gemessen, wobei 1 OD<sub>280</sub> 0,75 mg/ml entsprach.

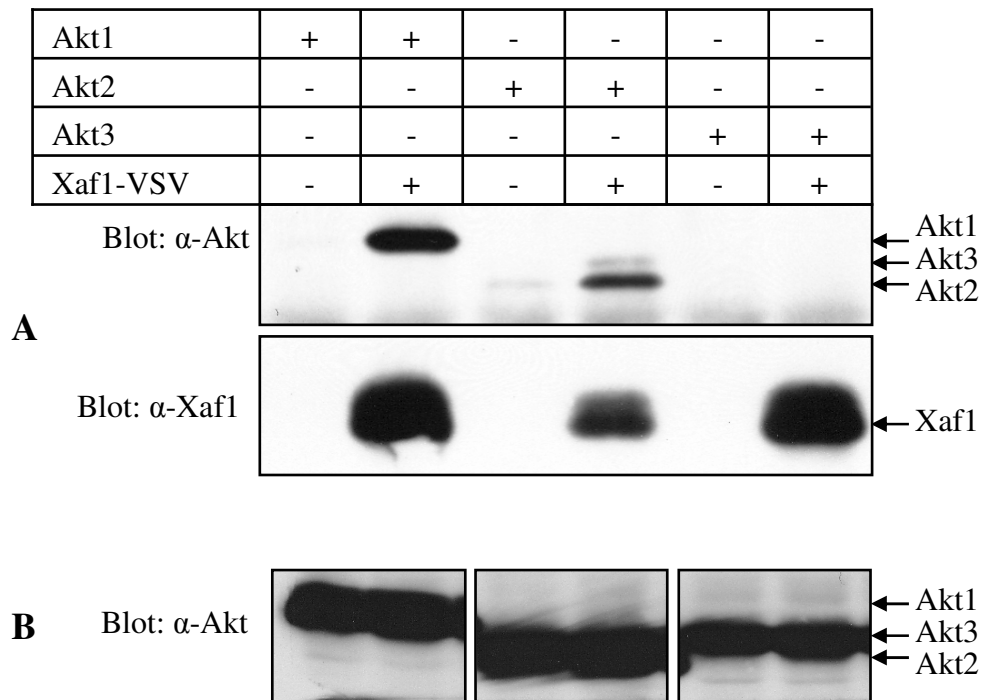
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Interaktion von Xaf1 mit Akt

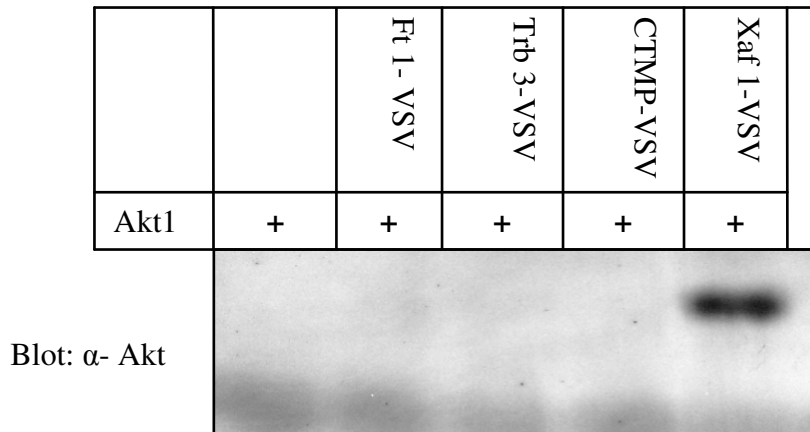
Xaf1 wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Lammers durch ein Yeast-two-hybrid-screening als möglicher Interaktionspartner von Akt1 identifiziert. Um diese Interaktion zu bestätigen und weiter zu charakterisieren, sollte diese auch für andere eukaryotische Zellen überprüft werden. Zudem sollte getestet werden, ob alle Isoformen der Akt-Kinase Xaf1 binden können. In dieser Arbeit wurde für alle Versuche die Xaf1-Isoform 1 verwendet, auf die sich auch alle Aminosäure-Angaben beziehen.

Hierzu wurde in HEK-293-Zellen, die endogen nur wenig Xaf1 exprimieren (vgl. 4.2), Akt1, Akt2 beziehungsweise Akt3 alleine oder zusammen mit VSV-markiertem Xaf1 transient überexprimiert. Die Zellen wurden lysiert und Xaf1-VSV mit  $\alpha$ -VSV-Antikörpern immunpräzipitiert. Sollte eine Akt-Isoform nun mit Xaf1 interagieren, so wird diese im Komplex aus  $\alpha$ -VSV-Antikörper, Xaf1-VSV und Akt co-immunopräzipitiert und nicht wie alle übrigen, nicht Xaf1 bindenden Proteine beim Waschen verloren gehen. Die Analyse der Immunpräzipitate im Westernblot ist in Abbildung 3 gezeigt. Als Negativkontrollen wurde die entsprechende Akt-Isoform jeweils alleine überexprimiert, und dieses Akt wurde nicht immunopräzipitiert. Dies gilt ebenso für die Überexpression von Xaf1 und Akt3. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine starke Bindung in den mit Xaf1 und Akt1 beziehungsweise Akt2 co-transfizierten Zellen. Folglich interagiert Xaf1 auch in eukaryotischen Zellen mit Akt1 und Akt2, nicht aber mit Akt3.

Um die „Stärke“ dieser Bindung abschätzen zu können, wurde die Interaktion von Xaf1 und Akt1 mit der Interaktion von weiteren, bereits publizierten Akt1-bindenden Proteinen verglichen. Dazu wurde Akt1 gemeinsam mit den jeweiligen Proteinen, die ein VSV-Epitop enthielten, in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. Nach Lyse der Zellen wurde mit  $\alpha$ -VSV-Antikörpern immunpräzipitiert. Wie oben beschrieben erfolgte die Analyse mittels Westernblot. Die Ergebnisse eines solchen Versuches zeigt Abbildung 4: Die Interaktion zwischen Akt1 und Xaf1 ist deutlich stärker als die von Akt1 mit den übrigen getesteten Proteinen. Die Analyse mit  $\alpha$ -VSV-Antikörpern ist hier nicht gezeigt.



**Abbildung 3: Xaf1 interagiert in HEK-293-Zellen mit Akt1 und Akt2, aber nicht mit Akt3.** Die in der Tabelle angegebenen Proteine wurden in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. **(A)** Die Zellen wurden lysiert und aus den Lysaten Proteine mit  $\alpha$ -VSV-Antikörpern immunpräzipitiert. Nach der Aufspaltung der Proteinkomplexe durch Denaturierung wurden die Proteine gelelektrophoretisch getrennt und anschließend durch Westernblot auf Nitrocellulose-Membran übertragen. Hier erfolgte die Detektion mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern beziehungsweise im unteren Teil der Abbildung mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern. Diese wurden durch sekundäre Antikörper sichtbar gemacht, an die Peroxidase für die Chemilumineszenz-Reaktion zur Belichtung eines Films gekoppelt war. **(B)** Zur Expressionskontrolle wurden die Gesamtzelllysate analysiert. Die Proteine wurden nach der Denaturierung gelelektrophoretisch getrennt, durch Westernblot auf Nitrocellulose-Membran übertragen und mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern detektiert. Diese wurden durch sekundäre Antikörper sichtbar gemacht, an die Peroxidase für die Chemilumineszenz-Reaktion zur Belichtung eines Films gekoppelt war. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; HEK = human embryonic kidney; VSV = Vesicular stomatitis virus; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.

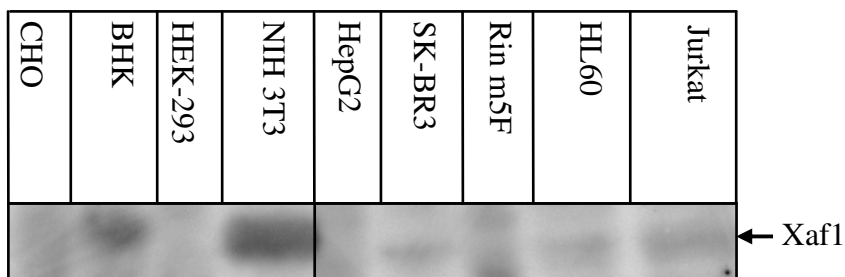


**Abbildung 4: Vergleich der Bindung von Akt an verschiedene Akt-interagierende Proteine.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die in der Tabelle angegebenen Proteine wurden in HEK-293-Zellen transient überexprimiert und mit  $\alpha$ -VSV-Antikörpern immunpräzipitiert. Anschließend wurde im Westernblot Akt mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern detektiert. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; CTMP = Carboxy-terminal modulator protein; Ft = fused toe; Trb3 = Tribbles homolog 3; VSV = Vesicular stomatitis virus; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.

#### 4.2. Expression von Xaf1 in Zelllinien

Um einen Überblick über die endogene Expression von Xaf1 in verschiedenen Zelllinien zu erlangen, wurden Gesamtzelllysate in einem Westernblot untersucht.

Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse eines solchen Versuches. Hier wird Xaf1 endogen von NIH 3T3 und BHK exprimiert. In den übrigen Zelllinien wird Xaf1 nicht oder nur so wenig exprimiert, dass eine Detektion im Westernblot nicht gelingt.



**Abbildung 5: Expression von Xaf1 in verschiedenen Zelllinien.** Aufgetragen wurden die Gesamtzelllysate der angegebenen Zelllinien. Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die Detektion von Xaf1 wurde mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern durchgeführt. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; BHK = Baby hamster kidney; BR = Breast; CHO = Chinese hamster ovary; HEK = human embryonic kidney; Hep = hepatocellular carcinoma; HL = human leukemia; Rin = rat insulinoma; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.

### **4.3. Identifikation des Interaktionsbereiches der Proteine**

Nachdem die Bindung der Proteine bestätigt werden konnte, sollte in weiteren Experimenten der interagierende Abschnitt der beteiligten Proteine definiert und Deletionsmutanten ohne diesen hergestellt werden. Der spezifische Einfluss der jeweiligen Interaktion auf zelluläre Vorgänge kann dann durch den Vergleich solcher Mutanten mit nicht-mutierten Proteinen untersucht werden.

#### **4.3.1. Identifikation des Akt-interagierenden Xaf1-Abschnittes**

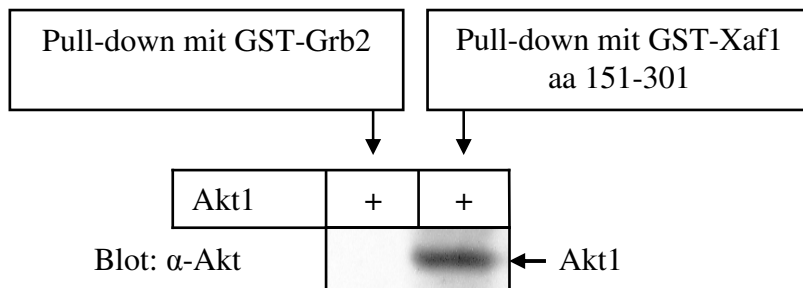
Um den Xaf1-Abschnitt, der für die Bindung von Akt1 verantwortlich ist, einzugrenzen, wurde ein GST-pull-down assay durchgeführt (vgl. 3.10.5). Verwendet wurde hierzu ein GST-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 151-301 von Xaf1, das mit dem Gesamtzelllysat Akt1-überexprimierender HEK-293-Zellen vermischt wurde. Damit konnte bestimmt werden, ob der amino- oder der carboxyterminale Teil von Xaf1 für die Akt-Bindung verantwortlich ist. Als Kontrolle fungierte ein GST-Fusionsprotein mit dem Nicht-Akt-interagierenden Grb2. Das Ergebnis eines solchen Versuches zeigt Abbildung 6. Die Negativkontrolle mit Grb2 zeigte keine Interaktion, die Aminosäuren 151-301 von Xaf1 hingegen interagierten. Somit liegt der Interaktionsbereich von Xaf1 mit Akt im carboxyterminalen Abschnitt von Xaf1.

Zur weiteren Eingrenzung wurden Expressionskonstrukte mit den Aminosäuren 1 bis 200, 1-225 und 1-250 von Xaf1 hergestellt, um sie durch Co-Immunpräzipitation zusammen mit Akt1 zu untersuchen. Da das carboxyterminale Ende variierte, wurde ein aminoterminales VSV-Epitop eingefügt. Ein solcher Versuch ist in Abbildung 7 gezeigt. Hier zeigte sich folgendes Resultat: Außer dem Gesamt-Xaf1 interagierte keines der transfizierten Proteinfragmente mit Akt1. Der Interaktionsbereich liegt also nicht im Bereich der aminoterminalen 250 Aminosäuren, dafür kam somit nur noch der Xaf1-Bereich zwischen Aminosäure 250 und 301 in Frage.

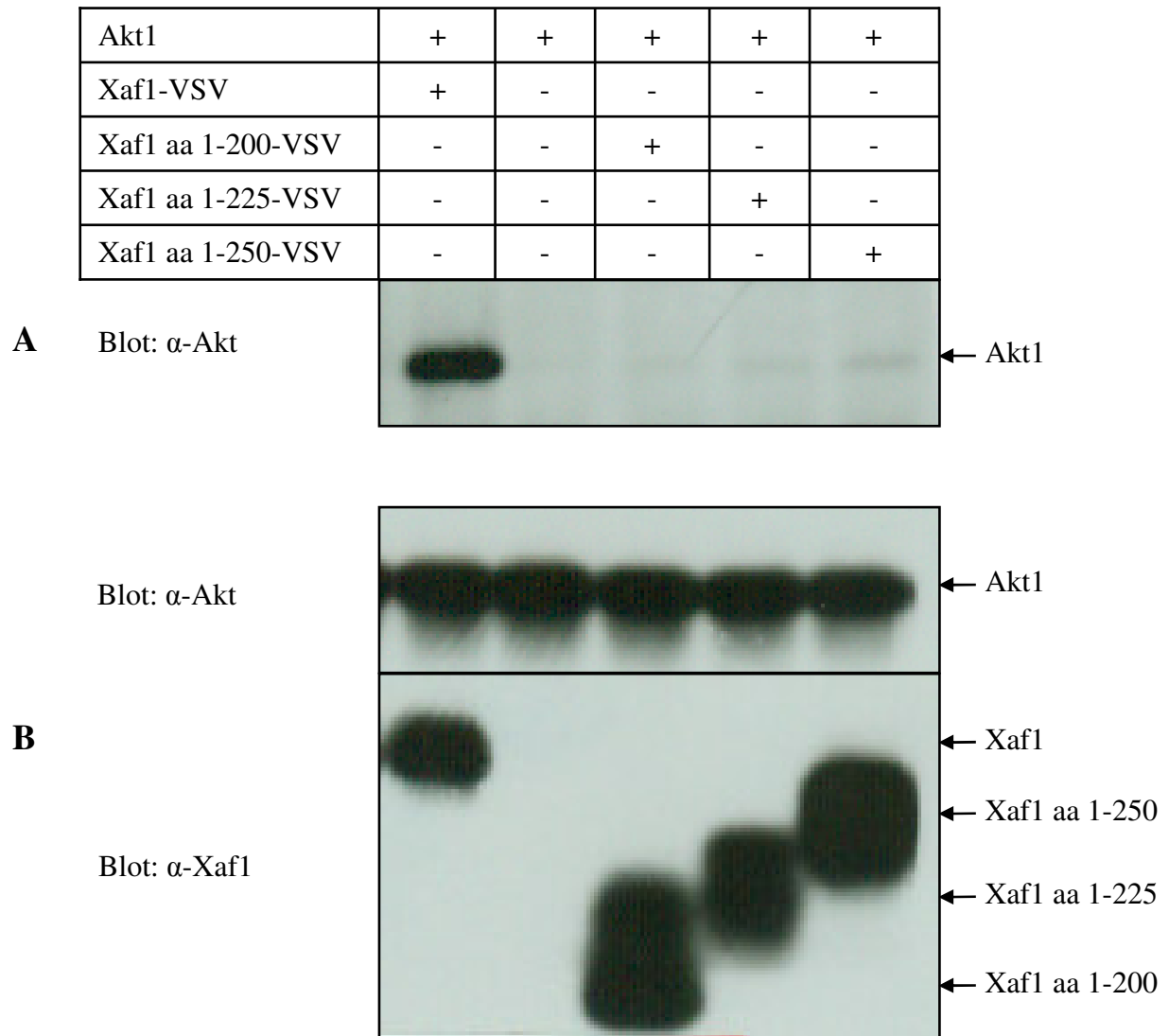
Dieser sollte mit einem Expressionskonstrukt der VSV-markierten Aminosäuren 1-289 von Xaf1 weiter eingegrenzt werden. Das Konstrukt wurde zusammen mit Akt1 exprimiert und durch Co-Immunopräzipitation und anschließenden Westernblot analysiert. Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Abbildung 8 gezeigt. Auch hier bindet das Gesamt-Xaf1 als Positivkontrolle mit Akt1, nicht aber die Aminosäuren 1-289. Folglich sind die



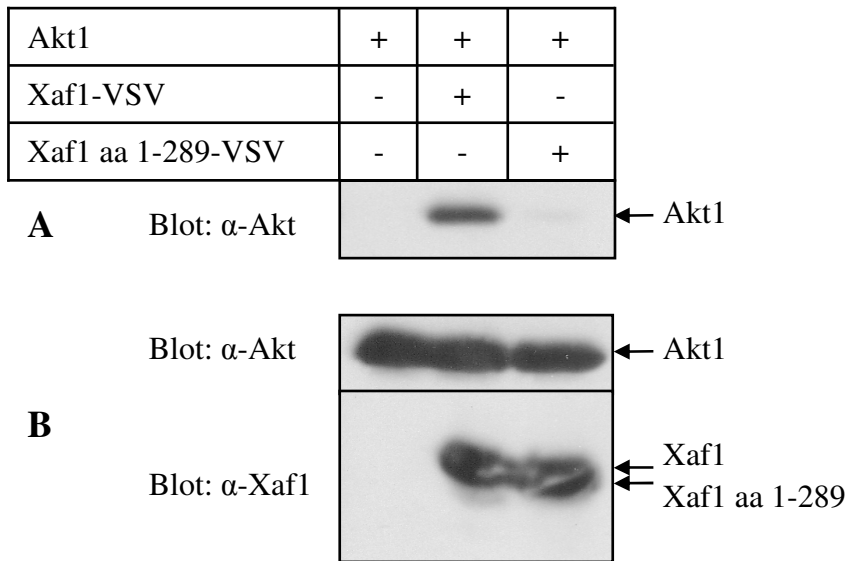
carboxyterminalen 12 Aminosäuren für die Interaktion zwischen Xaf1 und Akt1 verantwortlich.



**Abbildung 6: Akt1 interagiert im GST-pull-down assay mit GST-Xaf1 aa 151-301.** Akt1 wurde in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. GST-Grb2 und GST-Xaf1 aa 151-301 wurden in Escherichia coli BL21 hergestellt. Nach einem pull-down assay mit Sepharose-gebundenem Glutathion wurden die Komplexe wie oben beschrieben durch Western Blot analysiert. Hier erfolgte die Detektion mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; Grb = Growth factor receptor-bound; GST = Glutathion-S-Transferase; HEK = human embryonic kidney; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.



**Abbildung 7: Akt1 interagiert in HEK-293-Zellen nicht mit Xaf1 aa 1-200-VSV, Xaf1 aa 1-225-VSV und Xaf1 aa 1-250-VSV.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die in der Tabelle angegebenen Proteine wurden in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. **(A)** Die Proteine wurden mit  $\alpha$ -VSV-Antikörpern immunpräzipitiert. Anschließend wurde im Westernblot mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern Akt1 detektiert. **(B)** Gesamtzelllysate, Detektion der Proteine mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern beziehungsweise  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; HEK = human embryonic kidney; VSV = Vesicular stomatitis virus; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.



**Abbildung 8: Die carboxyterminalen 12 Aminosäuren von Xaf1 sind für die Interaktion mit Akt1 verantwortlich.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die in der Tabelle angegebenen Proteine wurden in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. **(A)** Die Proteine wurden mit  $\alpha$ -VSV-Antikörpern immunpräzipitiert. Anschließend wurde im Westernblot mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern Akt1 detektiert. **(B)** Gesamtzelllysate, Detektion der Proteine mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern beziehungsweise  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; HEK = human embryonic kidney; VSV = Vesicular stomatitis virus; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.

#### 4.3.2. Identifikation des Xaf1-interagierenden Akt-Abschnittes

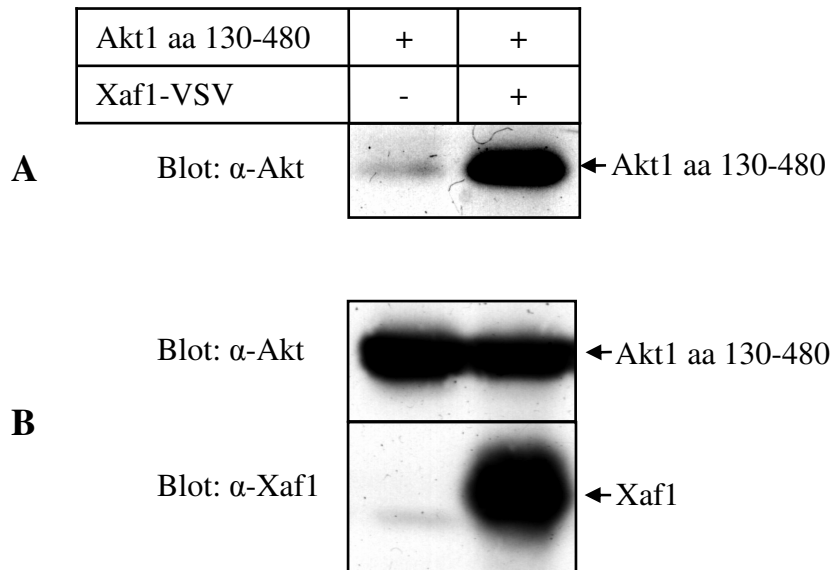
Um den Abschnitt von Akt1 einzugrenzen, der für die Interaktion mit Xaf1 verantwortlich ist, wurde ein Expressionskonstrukt mit den Aminosäuren 130-480 von Akt1 hergestellt. Dieses wurde dann durch Co-Immunpräzipitation mit VSV-markiertem Xaf1 und anschließendem Westernblot untersucht. Das Ergebnis eines solchen Versuches ist in Abbildung 9 gezeigt. Hier zeigte sich eine Interaktion zwischen dem Protein ohne die aminoterminalen 130 Aminosäuren und Xaf1.

Zur weiteren Definition des bindenden Bereiches wurde ein Akt1-Konstrukt mit den Aminosäuren 310 bis 480 hergestellt und durch Co-Immunopräzipitation mit VSV-markiertem Xaf1 analysiert. Die Untersuchung der Präzipitate im Westernblot zeigt Abbildung 10. Der Akt1-Abschnitt mit den Aminosäuren 310-480 interagiert nicht mit Xaf1, folglich sind die carboxyterminalen 170 Aminosäuren ebenfalls nicht für die Bindung verantwortlich.

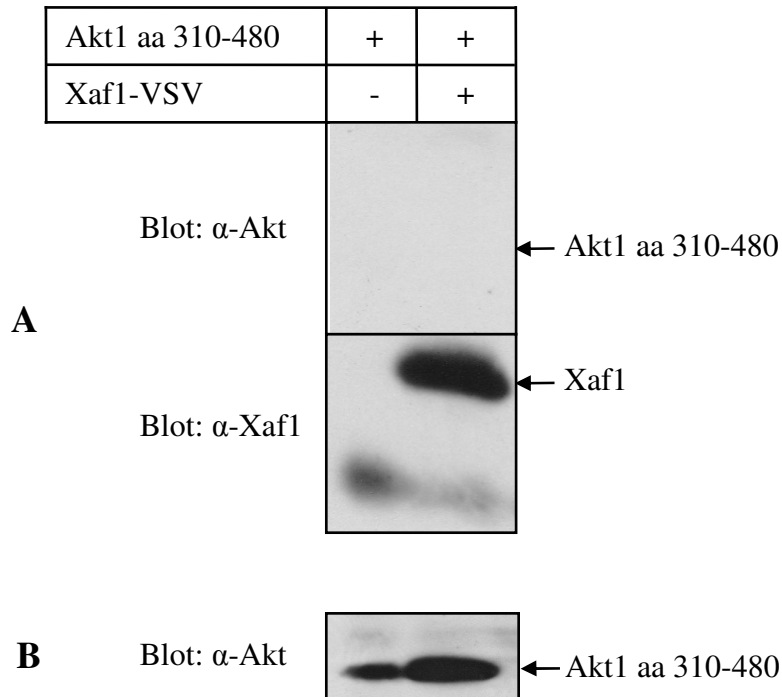
Eine weitere Bestimmung des Interaktionsbereiches sollte mit zwei zusätzlichen Konstrukten mit den Akt1-Aminosäuren 200 bis 480 beziehungsweise 260 bis 480 erfolgen. Auch diese

wurden zusammen mit VSV-markiertem Xaf1 durch Co-Immunpräzipitation untersucht. Der anschließende Westernblot eines solchen Versuches ist in Abbildung 11 zu sehen. Hier binden weder die Aminosäuren 200 bis 480 noch die Aminosäuren 260 bis 480 von Akt1 an Xaf1. Somit muss der interagierende Abschnitt im Bereich der Aminosäuren 130-200 von Akt1 liegen.

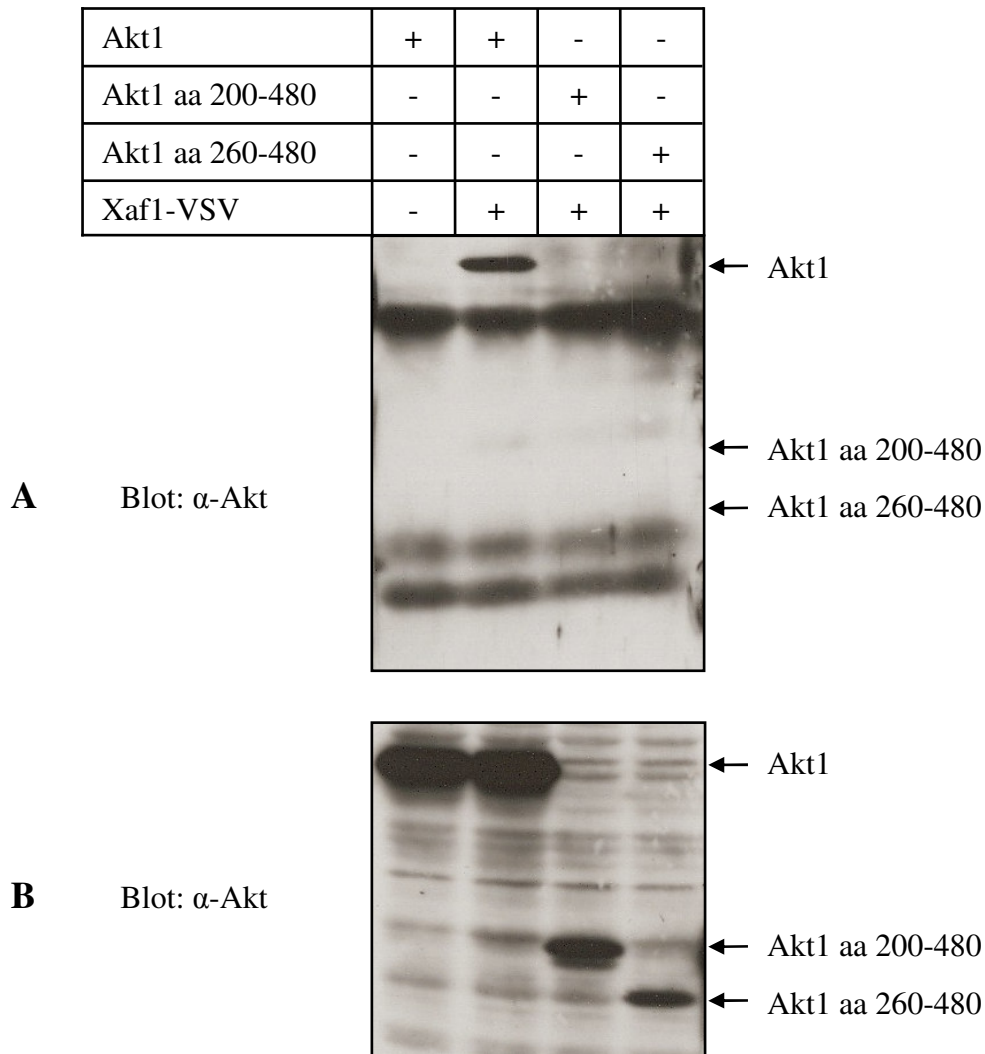
Deswegen wurde dieser Bereich mit weiteren Expressionskonstrukten genauer untersucht. Sie enthalten die Akt1-Aminosäuren 130 bis 480, 147 bis 480, 155 bis 480, 178 bis 480 und 200 bis 480. Abbildung 12 zeigt einen Westernblot nach Co-Immunpräzipitation der entsprechenden Proteinfragmente zusammen mit VSV-markiertem Xaf1. Alle Akt1-Deletionsmutanten, außer der ohne die Aminosäuren 200 bis 480 binden an Xaf1. Die Bindung ist dabei mit den Abschnitten 155 bis 480 und 178 bis 480 deutlich abgeschwächt. Für die Interaktion von Akt1 mit Xaf1 ist demzufolge der Akt1-Abschnitt zwischen den Aminosäuren 178 und 200 verantwortlich, allerdings scheint der Abschnitt ab Aminosäure 155 für eine starke Bindung ebenfalls eine Rolle zu spielen.



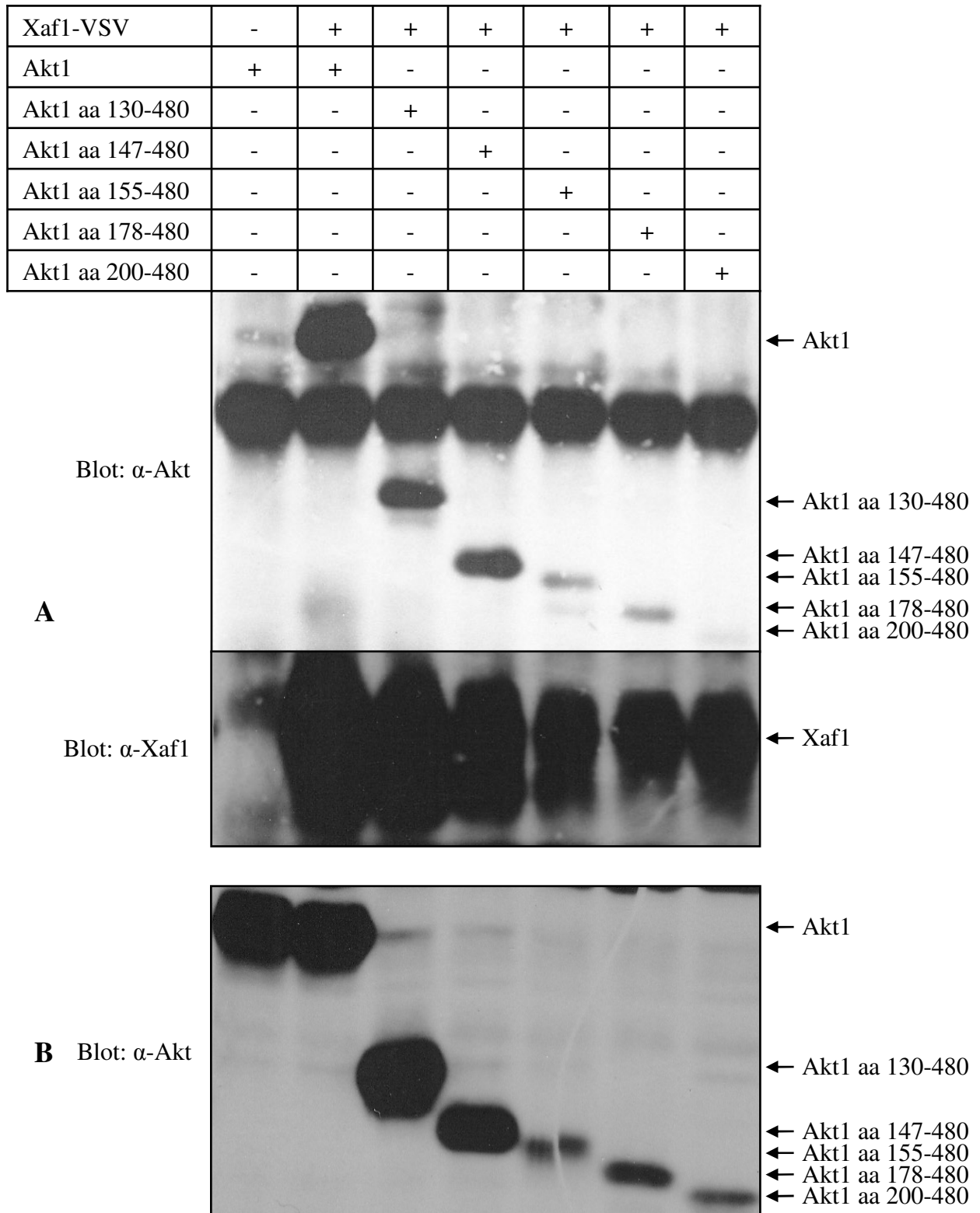
**Abbildung 9: Xaf1 interagiert in HEK-293-Zellen mit Akt1 aa 130-480.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die in der Tabelle angegebenen Proteine wurden in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. **(A)** Die Proteine wurden mit  $\alpha$ -VSV-Antikörpern immunpräzipitiert. Anschließend wurde im Westernblot mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern Akt1 aa 130-480 detektiert. **(B)** Gesamtzelllysate, Detektion der Proteine mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern beziehungsweise  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; HEK = human embryonic kidney; VSV = Vesicular stomatitis virus; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.



**Abbildung 10: Xaf1 interagiert in HEK-293-Zellen nicht mit Akt1 aa 310-480.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die in der Tabelle angegebenen Proteine wurden in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. **(A)** Die Proteine wurden mit  $\alpha$ -VSV-Antikörpern immunpräzipitiert. Xaf1 wurde im Westernblot mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern detektiert, Akt1 aa 130-480 mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern. **(B)** Gesamtzelllysate, Detektion der Proteine mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; HEK = human embryonic kidney; VSV = Vesicular stomatitis virus; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.



**Abbildung 11: Xaf1 interagiert in HEK-293-Zellen weder mit Akt1 aa 200-480 noch mit Akt1 aa 260-480.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die in der Tabelle angegebenen Proteine wurden in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. **(A)** Die Proteine wurden mit  $\alpha$ -VSV-Antikörpern immunpräzipitiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern. **(B)** Gesamtzelllysate, Detektion der Proteine mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; HEK = human embryonic kidney; VSV = Vesicular stomatitis virus; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.



**Abbildung 12: Die Aminosäuren 178 bis 200 von Akt1 sind für die Interaktion von Xaf1 in HEK-293-Zellen verantwortlich.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die in der Tabelle angegebenen Proteine wurden in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. **(A)** Die Proteine wurden mit  $\alpha$ -VSV-Antikörpern immunpräzipitiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern beziehungsweise  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern. **(B)** Gesamtzelllysate, Detektion der Proteine mit  $\alpha$ -Akt-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; HEK = human embryonic kidney; VSV = Vesicular stomatitis virus; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.

### 4.3.3. Identifikation des XIAP-interagierenden Xaf1-Abschnittes

Die Interaktion von Xaf1 mit XIAP ist schon länger bekannt<sup>152</sup>, der dafür verantwortliche Abschnitt von Xaf1 wurde allerdings bisher nicht näher eingegrenzt. Mit einem GST-pull-down assay sollte dies begonnen werden. Verwendet wurde dazu ein GST-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 151-301 von Xaf1, das mit dem Gesamtzelllysate von HEK-293-Zellen vermischt wurde, die MYC-markiertes XIAP exprimieren. Als Kontrolle fungierte ein GST-Fusionsprotein mit Grb2, einem nicht XIAP-interagierenden Protein. Das Ergebnis eines solchen Versuches zeigt Abbildung 13. Die Negativkontrolle mit Grb2 zeigte keine Bindung, die Aminosäuren 151-301 von Xaf1 hingegen interagierten. Der Interaktionsbereich von Xaf1 und XIAP liegt also zwischen den Aminosäuren 151 und 301 von Xaf1.

Als nächster Schritt wurden Expressionskonstrukte mit den Aminosäuren 1 bis 200 und 1 bis 250 von Xaf1 eingesetzt und durch Co-Immunopräzipitation mit MYC-markiertem XIAP analysiert. Abbildung 14 zeigt die Untersuchung im Westernblot: Die Expression von XIAP war in den Zellen, die das gesamte Xaf1-Protein beziehungsweise die Aminosäuren 1 bis 250 von Xaf1 coexprimierten, nur relativ gering. Trotzdem gelang die Co-Immunopräzipitation in allen drei Zelllysaten. Der interagierende Bereich muss folglich zwischen den Aminosäuren 150 und 200 von Xaf1 liegen.

Zur genaueren Definition dieses bindenden Bereiches wurden zwei Konstrukte mit carboxyterminalen Abschnitten von Xaf1 hergestellt. Sie enthielten die Aminosäuren 166 bis 301 beziehungsweise 182 bis 301. Auch hier erfolgte eine Analyse der Co-Immunpräzipitate mit MYC-markiertem XIAP durch Westernblot. Das Ergebnis einer solchen Analyse zeigt Abbildung 15. Hier zeigte sich eine Bindung der Aminosäuren 166 bis 301 von Xaf1, die Aminosäuren 182 bis 301 banden nicht. Durch dieses Experiment konnte der Interaktionsbereich auf die Aminosäuren 166 bis 182 von Xaf1 eingegrenzt werden.

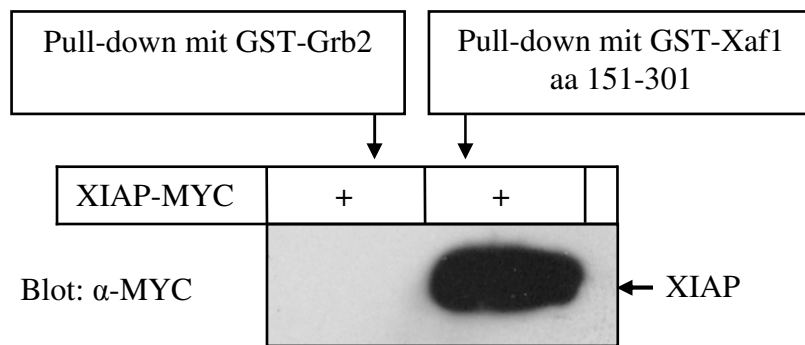
Um ihn noch genauer zu definieren, wurde ein Xaf1-Expressionskonstrukt ohne die Aminosäuren 179 bis 181 hergestellt und durch Co-Immunopräzipitation mit MYC-markiertem XIAP auf Bindung getestet. Die Untersuchung der Präzipitate im Westernblot zeigt Abbildung 16. Hier bindet das Gesamt-Xaf1 als Positivkontrolle, nicht aber die Deletionsmutante ohne die Aminosäuren 179 bis 181. Der leichte Rest einer Bande in der Co-Immunopräzipitation von Akt1 mit Xaf1  $\Delta$  aa 179-181 kann wahrscheinlich durch unspezifische Bindungskräfte erklärt werden. Er ist im Vergleich zur Bande des Gesamtproteins sehr viel schwächer, obwohl das Gesamtzelllysate zeigt, dass beide



Proteinvarianten etwa gleich stark exprimiert wurden. Warum das Xaf1-Expressionskonstrukt ohne die drei Aminosäuren im Gel langsamer läuft, ist dabei unklar.

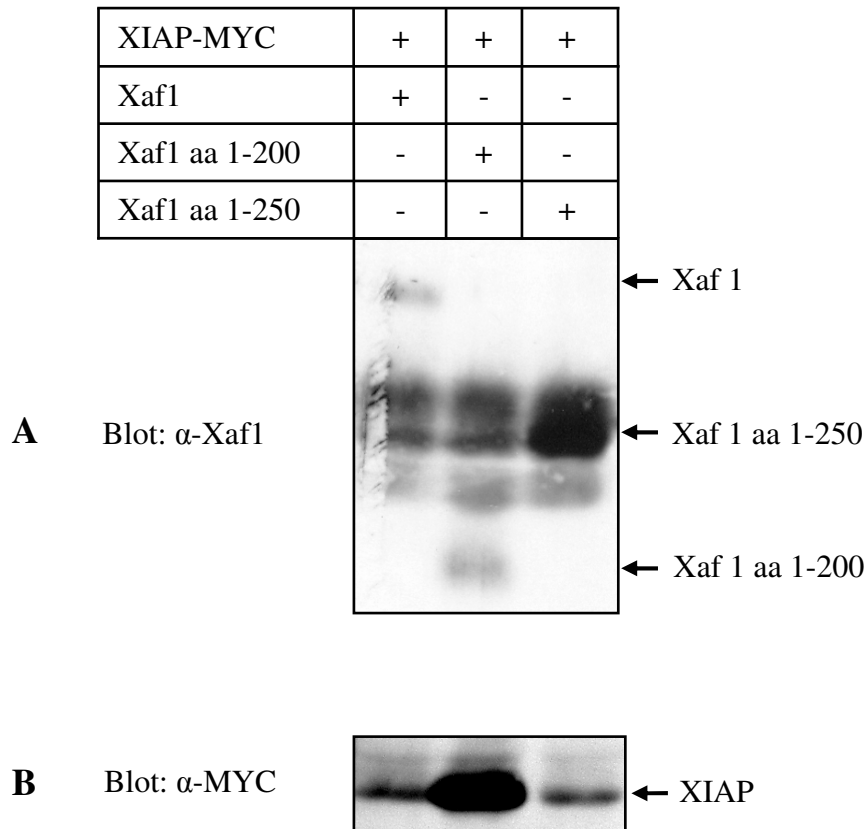
Die drei Aminosäuren 179 bis 181 sind folglich für die Interaktion von Xaf1 mit XIAP verantwortlich.

Es konnten also die Interaktionsbereiche zwischen Akt1 und Xaf1, zwischen Xaf1 und Akt1 und zwischen XIAP und Xaf1 identifiziert werden. Anschließend wurden Deletionsmutanten ohne die interagierenden Bereiche hergestellt. Um mit diesen Effekte der Interaktion zwischen den Proteinen weiter untersuchen zu können, wurden anschließend Zelllinien mit den Proteinen stabil transfiziert. Stabile transfizierte Zellen wurden deshalb verwendet, weil sie im Gegensatz zu transienten transfizierten Zellen deutlich geringere Proteinkonzentrationen exprimieren und dadurch einem physiologischen Zustand näher kommen.

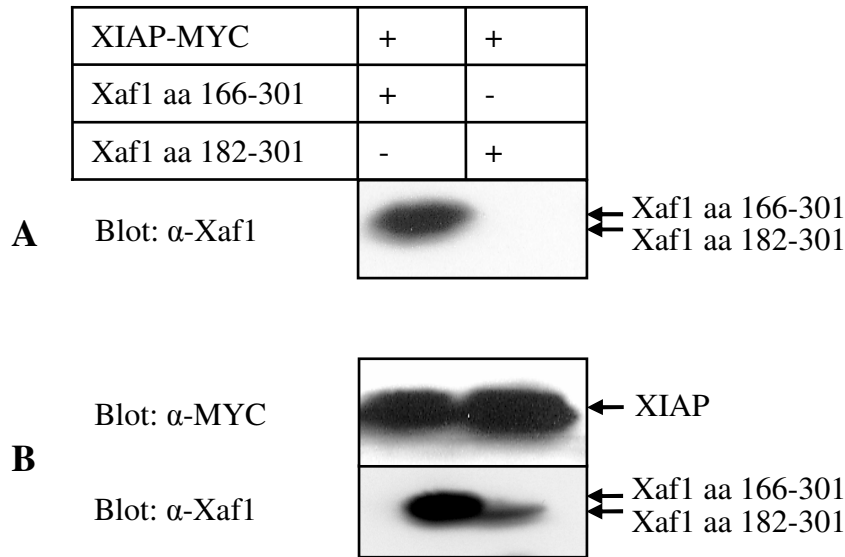


**Abbildung 13: XIAP-MYC interagiert im GST-pull-down assay mit GST-Xaf1 aa 151-301.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 6 beschrieben. XIAP-MYC wurde in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. GST-Grb2 und GST-Xaf1 aa 151-301 wurden in *Escherichia coli* BL21 hergestellt. Nach einem pull-down assay mit Sepharose-gebundenem Glutathion wurde XIAP-MYC im Westernblot mit  $\alpha$ -MYC-Antikörpern detektiert.

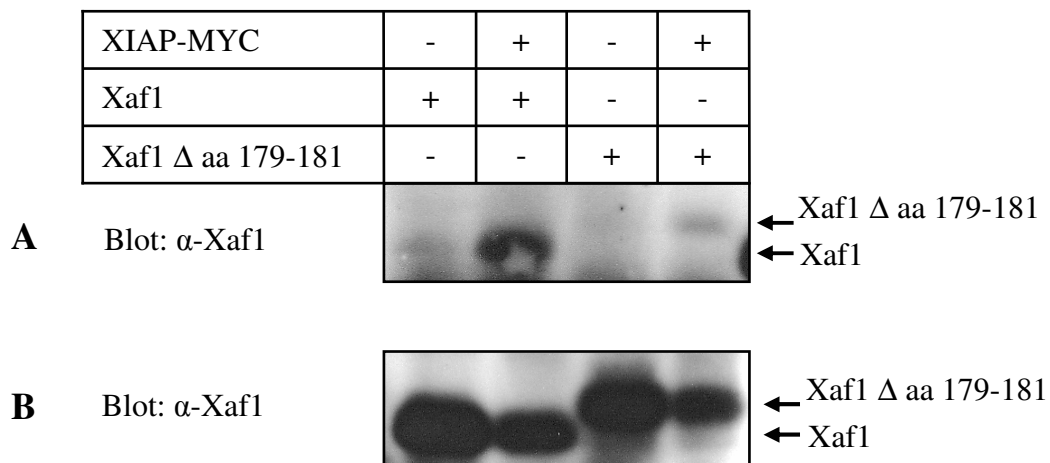
*Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; Grb = Growth factor receptor-bound protein; GST = Glutathion-S-Transferase; HEK = human embryonic kidney; MYC = myelocytomatosis viral oncogene homolog; XIAP = X-linked inhibitor of apoptosis.



**Abbildung 14: XIAP-MYC interagiert in HEK-293-Zellen mit Xaf1 aa 1-200 und Xaf1 aa 1-250.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die in der Tabelle angegebenen Proteine wurden in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. **(A)** Die Proteine wurden mit  $\alpha$ -MYC-Antikörpern immunpräzipitiert. Xaf1, Xaf1 aa 1-200 und Xaf1 aa 1-250 wurden im Westernblot mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern detektiert. **(B)** Gesamtzelllysate, Detektion der Proteine mit  $\alpha$ -MYC-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; HEK = human embryonic kidney; MYC = myelocytomatosis viral oncogene homolog; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor, XIAP = X-linked inhibitor of apoptosis.



**Abbildung 15: XIAP-MYC interagiert in HEK-293-Zellen mit Xaf1 aa 166-301, nicht aber mit Xaf1 aa 182-301.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die in der Tabelle angegebenen Proteine wurden in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. **(A)** Die Proteine wurden mit  $\alpha$ -MYC-Antikörpern immunpräzipitiert. Xaf1, Xaf1 aa 166-301 und Xaf1 aa 182-301 wurden im Westernblot mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern detektiert. **(B)** Gesamtzelllysate, Detektion der Proteine mit  $\alpha$ -MYC- beziehungsweise  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; HEK = human embryonic kidney; MYC = myelocytomatosis viral oncogene homolog; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor, XIAP = X-linked inhibitor of apoptosis.



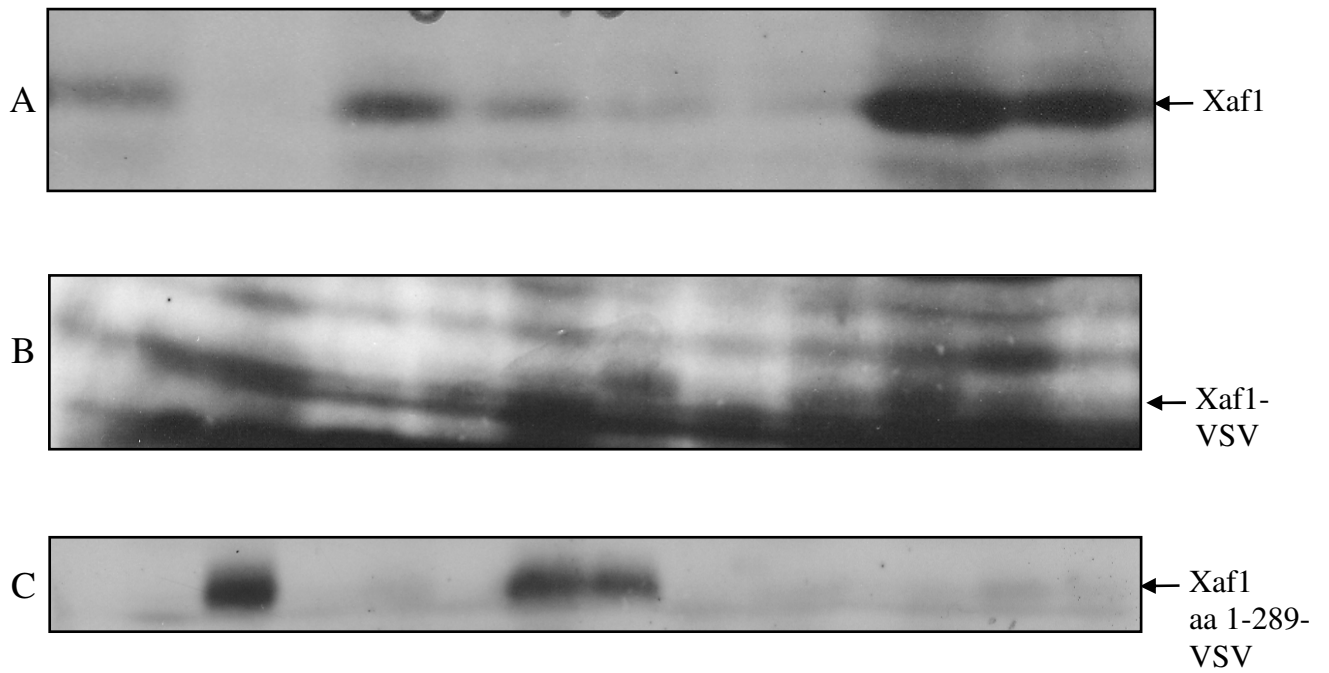
**Abbildung 16: Die Aminosäuren 179 bis 181 von Xaf1 sind für die Interaktion mit XIAP verantwortlich.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die in der Tabelle angegebenen Proteine wurden in HEK-293-Zellen transient überexprimiert. **(A)** Die Proteine wurden mit  $\alpha$ -MYC-Antikörpern immunpräzipitiert. Xaf1 wurde im Westernblot mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern detektiert. **(B)** Gesamtzelllysate, Detektion der Proteine mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren;  $\Delta$  = Deletion von Aminosäuren; HEK = human embryonic kidney; MYC = myelocytomatosis viral oncogene homolog; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor; XIAP = X-linked inhibitor of apoptosis.

#### 4.4. Stabil transfizierte Zelllinien

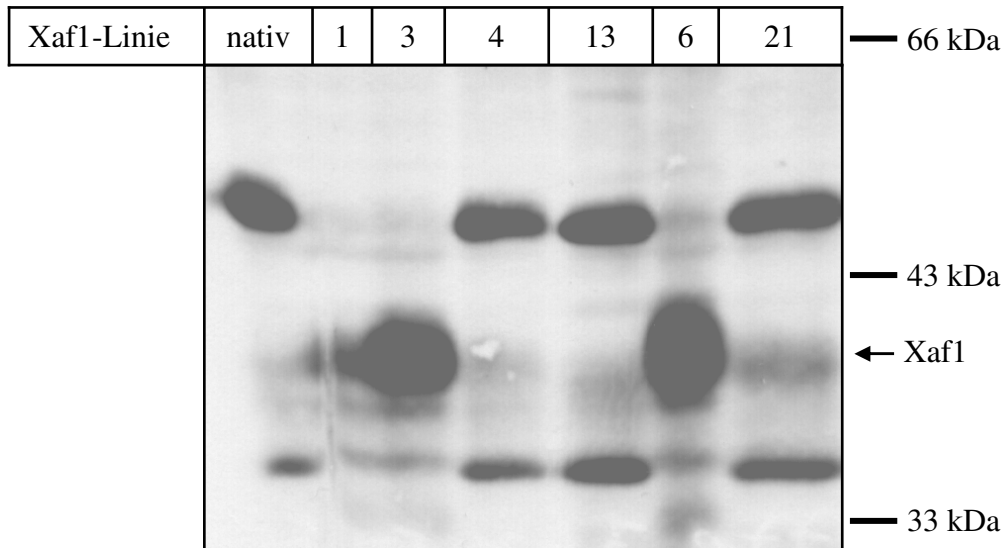
Um den spezifischen Einfluss der Proteininteraktion auf zelluläre Vorgänge untersuchen zu können, wurden stabil transfizierte Zelllinien hergestellt: Diese exprimierten entweder das gesamte Protein Xaf1 oder aber Deletionsmutanten ohne den Akt1- beziehungsweise XIAP-interagierenden Bereich. Das Vorgehen erfolgte wie unter 3.9.3.2 beschrieben. Die Expression so transfizierter C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen zeigt Abbildung 17; Abbildung 19 zeigt ebenso transfizierte HeLa-Zellen. Die Unterschiede in der Blotqualität können durch verschiedenen alte Blotlösungen erklärt werden und wurden in dieser Arbeitsgruppe schon öfter beobachtet.

Nach den Untersuchungen der Expression der jeweiligen transfizierten Proteine wurden Zelllinien mit hoher Expression weiter expandiert, um damit Experimente durchzuführen (siehe unten). Anschließend wurden die Zellen abermals auf die Expression der Proteine hin untersucht. Das Ergebnis einer solchen Analyse der Xaf1-Expression in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen ist in Abbildung 18 dargestellt. Hier zeigte sich, dass von sieben untersuchten Zelllinien alle außer zweien die Überexpression von Xaf1 im Verlauf der Expansion verloren haben. Diese Beobachtung könnte als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass Xaf1-Überexpression einen Selektionsnachteil darstellt.

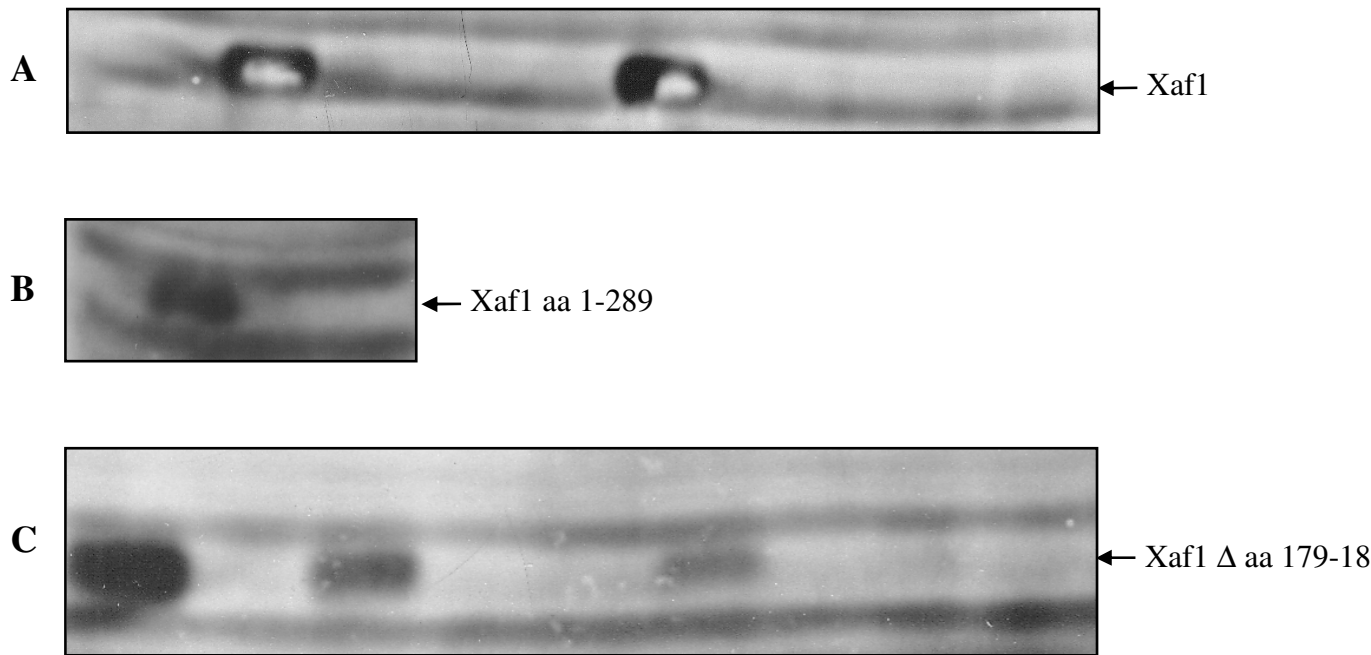
Interessanterweise tauchen in den Zelllinien ohne Xaf1-Überexpression im Westernblot zwei zusätzliche Banden auf, die in den Linien mit Xaf1 nicht vorhanden sind. Die erste Bande läuft im Bereich von etwa 50 kDa, die zweite im Bereich von etwa 35 kDa. Beide könnten durch Xaf1-ähnliche Proteine entstehen, deren Expression durch Xaf1 unterdrückt wird.



**Abbildung 17: Stabile Expression von Xaf1, Xaf1-VSV und Xaf1 aa 1-289-VSV in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. **A** zeigt Xaf1 transfizierte Zellen, **B** Xaf1-VSV transfizierte Zellen und **C** zeigt Xaf1 aa 1-289-VSV transfizierte Zellen. Aufgetragen wurden jeweils die Gesamtzellysate, die Detektion erfolgte mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; VSV = Vesicular stomatitis virus; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.



**Abbildung 18: Die Expression von Xaf1 in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen ist während der Expansion wenig stabil.** Nach der Untersuchung auf die Expression von Xaf1 in stabil transfizierten C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen (vgl. Abbildung 17) wurden Xaf1-exprimierende Zelllinien auf einer 10 cm-Schale weiter expandiert, um damit weitere Experimente durchzuführen (vgl. Abbildungen 20 und 21). Anschließend wurden die Zellen abermals auf die Expression von Xaf1 hin untersucht. Das Ergebnis einer solchen Analyse ist hier gezeigt. Vorgegangen wurde dabei wie bei Abbildung 3 beschrieben. Nach der Lyse der Zellen wurde die Proteinkonzentration bestimmt und jeweils gleiche Mengen des Gesamtzelllysates auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; kDa = Kilodalton; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.



**Abbildung 19: Stabile Expression von Xaf1, Xaf1 aa 1-289 und Xaf1 Δ aa 179-181 in HeLa-Zellen.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. **A** zeigt Xaf1 transfizierte Zellen, **B** Xaf1 aa 1-289 transfizierte Zellen. **C** zeigt Xaf1 Δ aa 179-181 transfizierte Zellen. Aufgetragen wurden jeweils die Gesamtzellysate, die Detektion erfolgte mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; aa = Aminosäuren; VSV = Vesicular stomatitis virus; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.

#### 4.5. Einfluß von Xaf1 auf die Akt-Phosphorylierung

Nachdem die Bindung von Akt1 und Xaf1 gezeigt wurde (vgl. 4.1), stellte sich die Frage, ob diese Interaktion einen Einfluß auf die Aktivität der beiden Proteine hat. Zuerst wurde der Einfluß von Xaf1 auf die Phosphorylierung der Akt-Kinase -und damit auf deren Aktivität- im Westernblot untersucht. Verwendet wurden dazu Antikörper, die spezifisch phosphorylierte Aminosäuren detektieren konnten. Um die Akt-Kinase zu aktivieren, wurden die Zellen zehn Minuten vor der Ernte mit ansteigenden Insulin-Konzentrationen stimuliert.

Ein solcher Versuch mit C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen ist in Abbildung 20 dargestellt. Verwendet wurden stabil transfizierte Zellen, deren Xaf1-Expression zuvor untersucht worden war (vgl. 4.4 und Abbildungen 17 und 18). Um die unphysiologischen Effekte von starker Protein-Überexpression zu minimieren, wurden Zelllinien mit nur geringer Xaf1-Überexpression ausgewählt. Detektiert wurde jeweils die Phosphorylierung von Threonin 308 in Akt1, die als Anzeiger für Akt-Aktivität gilt. Teil A zeigt nicht-transfizierte Zellen; Teil B zeigt eine Linie,

die überexprimiertes Xaf1 wieder verloren hatte und Teil C eine Linie, die wenig Xaf1 exprimierte.

In den in A und B gezeigten Linien ist eine Insulindosis-abhängige Zunahme der Akt-Phosphorylierung erkennbar. In der Linie mit wenig Xaf1-Expression (C) wird Akt1-Threonin 308 bereits ohne Stimulation mit Insulin phosphoryliert. Selbst unter maximaler Insulin-Dosis ist eine weitere Steigerung nicht mehr möglich.

Schon eine geringe Expression von Xaf1 führt also zu einer maximalen Phosphorylierung von Akt1-Threonin 308 unabhängig von einer Stimulation durch Insulin.

In einem weiteren Versuch wurden mit Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpern andere Proteine untersucht, deren Phosphorylierungsstatus durch Insulin-Stimulation beeinflusst wird. Da die Antikörper weder spezifisch für eine bestimmte Position von Tyrosin noch für das Vorkommen in einem bestimmten Protein sind, konnten in einem Western-Blot alle prominent Tyrosin-phosphorylierten Proteine dargestellt werden.

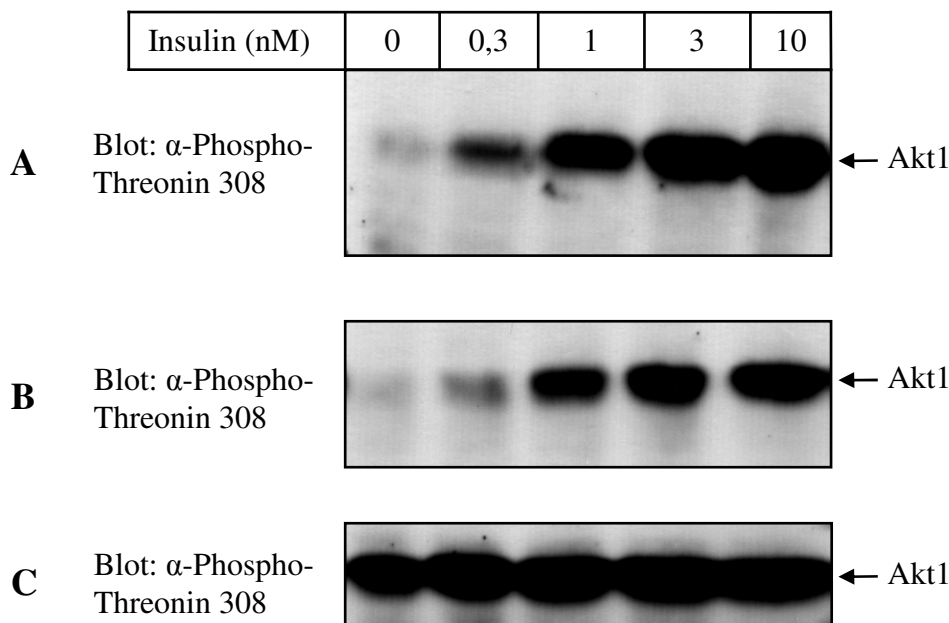
Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Abbildung 21 dargestellt: Verwendet wurden die stabil transfizierten C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen, deren Akt-Phosphorylierung zuvor untersucht worden war ((wie auf den Abbildungen 17 und 19 dargestellt). Teil A zeigt nicht-transfizierte Zellen; Teil B zeigt eine Linie, die überexprimiertes Xaf1 wieder verloren hat und Teil C eine Linie, die wenig Xaf1 exprimierte. Die Zellen wurden zehn Minuten vor der Ernte mit ansteigenden Insulin-Konzentrationen stimuliert.

In den in A und B gezeigten Linien ist eine Insulin-Dosis-abhängige Zunahme der Phosphorylierung eines Proteins, das aufgrund seiner Laufposition im Gel IRS 1 sein dürfte, sichtbar. In geringem Maße scheint auch ein Protein, das vermutlich der  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors entspricht, phosphoryliert zu sein. Eine Zunahme der Phosphorylierung nach Insulin-Stimulation ist nicht sichtbar. Ein Protein bei ca. 120 kDa ist sehr stark phosphoryliert und könnte die Tyrosinkinase Fak darstellen, die in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen konstitutiv stark phosphoryliert ist. In der Linie mit wenig Xaf1-Expression (C) ist sowohl IRS 1 als auch die  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors bereits ohne Insulin-Stimulation deutlich phosphoryliert. Die Phosphorylierung scheint bei beiden Proteinen schon ohne Insulin so stark zu sein, wie sie in den nicht Xaf1-exprimierenden Linien erst nach maximaler Insulin-Stimulation wird. Das Phosphorylierungsniveau beider Proteine kann durch Insulin noch weiter gesteigert werden. Die Fak-Phosphorylierung ist im Vergleich zu den beiden Zelllinien ohne Xaf1-Expression deutlich reduziert. Hier zeigt sich auch nach Insulin-Stimulation keine Änderung. Die beiden in der Signaltransduktion Akt1 vorgelagerten Regulatoren Insulinrezeptor und IRS 1 werden also ebenfalls Insulin-unabhängig nach Xaf1-Überexpression aktiviert. Ihre

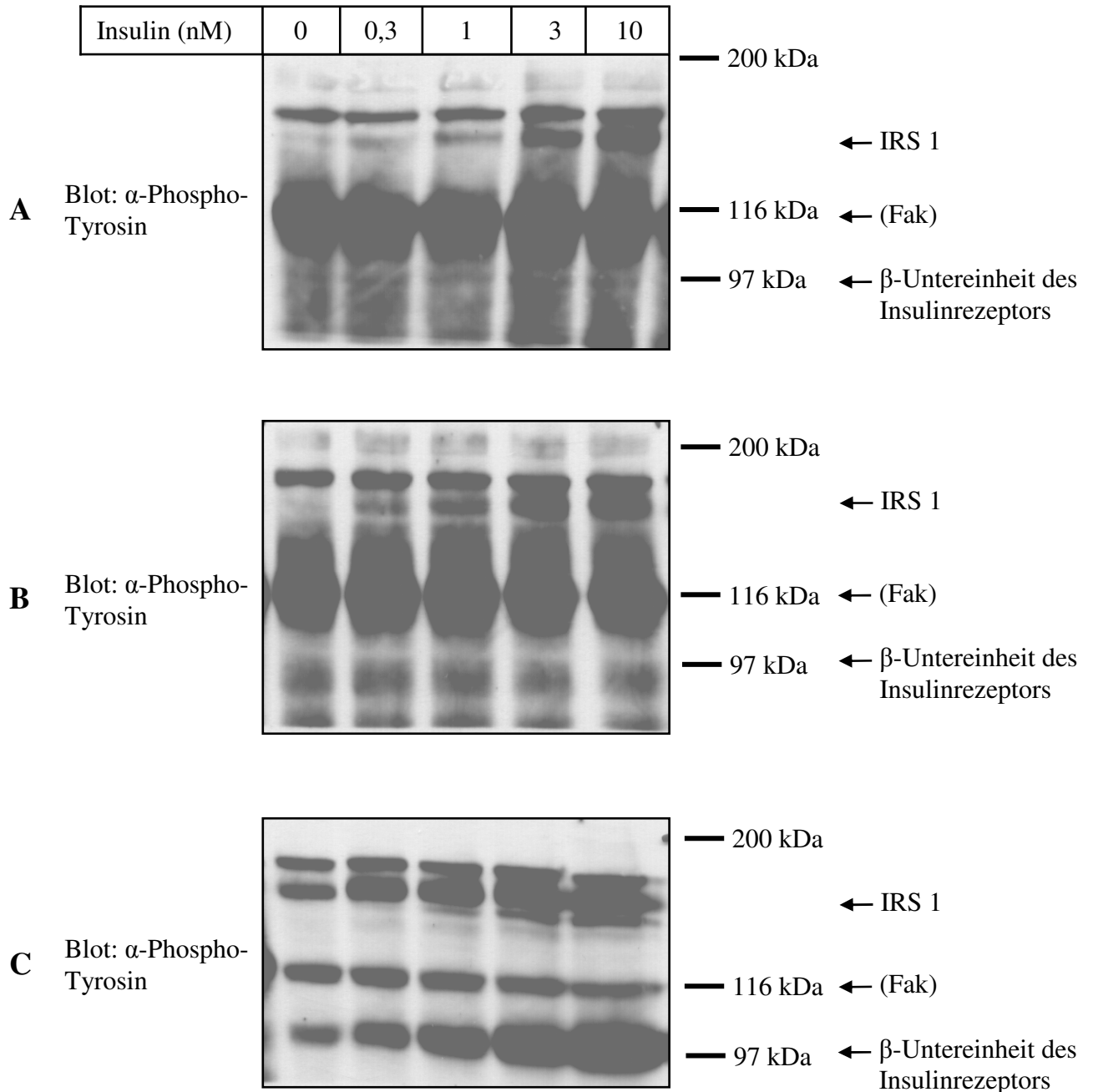


Phosphorylierung kann -im Gegensatz zu der von Akt1- durch Insulin-Stimulation noch weiter gesteigert werden. In den Xaf1-exprimierenden Zellen ist die Fak-Phosphorylierung verringert.

Die Überexpression von Xaf1 führt also zu einer konstitutiven Phosphorylierung von Threonin 308 in Akt1 und Tyrosin in weiteren Proteinen. Diese anderen Proteine könnten IRS-1, Fak und der  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors entsprechen. Xaf1 beeinflusst folglich die Expression des Insulinrezeptors und seine Phosphorylierung, und damit die Phosphorylierung und Aktivierung von IRS-1 und Akt1.



**Abbildung 20: Xaf1-Überexpression verstärkt die Phosphorylierung von Akt1-Threonin 308 in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die Zellen wurden vor der Ernte für zehn Minuten mit Insulin in der angegebenen Konzentration stimuliert. Nach der Lyse der Zellen wurde die Proteinkonzentration bestimmt und jeweils gleiche Proteinmengen auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. **A** zeigt nicht transfizierte C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen, **B** zeigt die Xaf1-Zelllinie 4 (vgl. Abbildung 18), in der die Xaf 1-Expression wieder verloren gegangen ist und **C** die Xaf1-Zelllinie 1 (vgl. Abbildung 18), die wenig Xaf1 exprimiert. Die Detektion erfolgte mit  $\alpha$ -Phospho-Threonin 308-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.



**Abbildung 21: Xaf1-Überexpression verursacht Änderungen in der Tyrosinphosphorylierung insulinstimulierter C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 3 beschrieben. Die Zellen wurden vor der Ernte für zehn Minuten mit Insulin in der angegebenen Konzentration stimuliert. Nach der Lyse der Zellen wurde die Proteinkonzentration bestimmt und jeweils gleiche Proteinmengen auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. **A** zeigt nicht transfizierte C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen, **B** zeigt die Xaf1-Zelllinie 4 (vgl. Abbildung 18, in der die Xaf 1-Expression wieder verloren gegangen ist) und **C** zeigt die Xaf1-Zelllinie 1 (vgl. Abbildung 18), die wenig Xaf1 exprimiert. Die Detektion erfolgte mit  $\alpha$ -Phospho-Tyrosin-Antikörpern. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; Fak = focal adhesion kinase; kDa = Kilodalton; IRS = insulin receptor substrate; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.

#### 4.6. Intrazelluläre Lokalisation

In einer weiteren Versuchsreihe sollte nun untersucht werden, ob die Überexpression der untersuchten Proteine alleine oder in Kombination zu einer Änderung ihrer intrazellulären Lokalisation und damit eventuell auch zu einer Änderung ihrer Funktion führt. Dazu wurden die jeweiligen Proteine in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen transient überexprimiert und dann, nach Aufarbeitung der Proben, mit entsprechenden Antikörpern in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie detektiert (vgl. 3.11). Gezeigt ist hier jeweils ein für die Proteinverteilung repräsentativer Ausschnitt aus mehreren Experimenten. In allen Experimenten wurde nur ein kleiner Teil der Zellen transfiziert. Diese Zellen waren jeweils von untransfizierten Zellen umgeben, die aber in den Abbildungen nur selten sichtbar sind, da sich in ihnen die Antikörper zur Detektion kaum anlagerten und Ausschnitte mit wenig untransfizierten Zellen gewählt wurden.

Um später eine Änderung der Lokalisation feststellen zu können, wurden die beteiligten Proteine zunächst alleine untersucht. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse eines Versuches mit Xaf1: Im Fusionsbild (C) aus der Detektion von Xaf1 (A) und der Kernfärbung mit TO-PRO 3 (B) ist eine Ablagerung von Xaf1 in Aggregaten um den Zellkern herum sichtbar. Das übrige Zytoplasma ist hier nahezu vollständig frei von Xaf1. Auch im Nukleus befindet sich fast kein Xaf1. Die beiden Rot-Signale, die sich über den Zellkern projizieren, entstehen vermutlich durch zufällige Überlagerung, da die Aufnahme sehr nahe am oberen Rand des Nukleus angefertigt wurde.

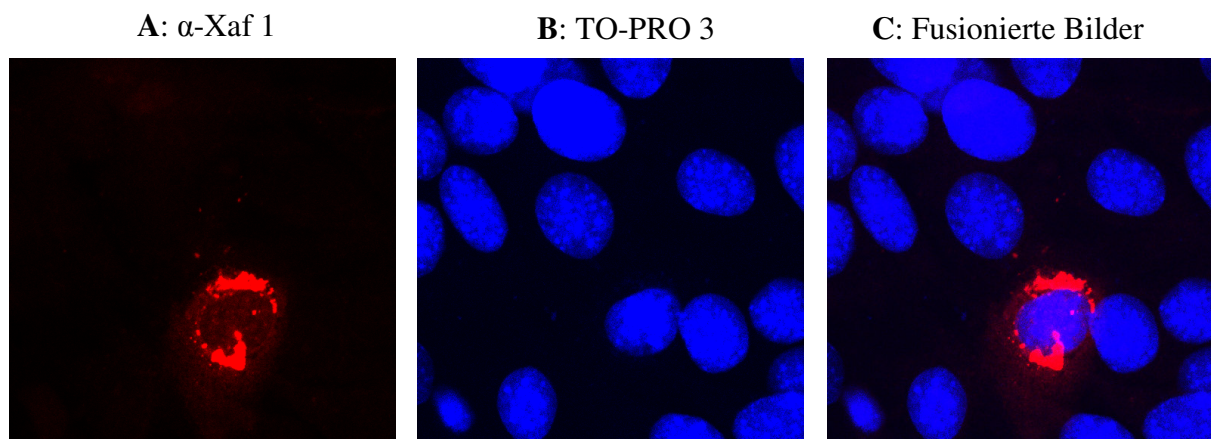
Ein ähnliches Experiment mit XIAP-MYC ist in Abbildung 23 dargestellt: Auch hier zeigt (C) ein Fusionsbild. Dieses wurde aus der Detektion von MYC (A) und der Kernfärbung mit TO-PRO 3 (B) erzeugt. Darauf lässt sich die Lokalisation von XIAP-MYC in Aggregaten im gesamten Zytoplasma erkennen. Im Zellkern kommt kein XIAP-MYC zur Darstellung. Die beiden Grün-Signale im Bereich des Nukleus sind vermutlich wieder auf Überlagerung zurückzuführen.

Um Änderungen im Verteilungsmuster erkennen zu können, wurde dieses bei gleichzeitiger Überexpression beider Proteine analysiert. Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse eines solchen Experimentes, bei dem sowohl Xaf1 als auch MYC-markiertes XIAP transient überexprimiert wurden. Das Fusionsbild (C) wurde aus der Detektion von Xaf1 (A) und MYC (B) erzeugt. Wenn die beiden Proteine co-lokalisiert sind, stellen sie sich in der Überlagerung gelb dar. In diesem Versuch verlagerten sich die Proteine gemeinsam in spiralförmige Aggregate im Zytoplasma, die keinem bekannten Zellorganell zugeordnet werden können, und in Aggregate im Bereich des Nukleus. Die Interaktion von Xaf1 mit XIAP-MYC führt also zu einer

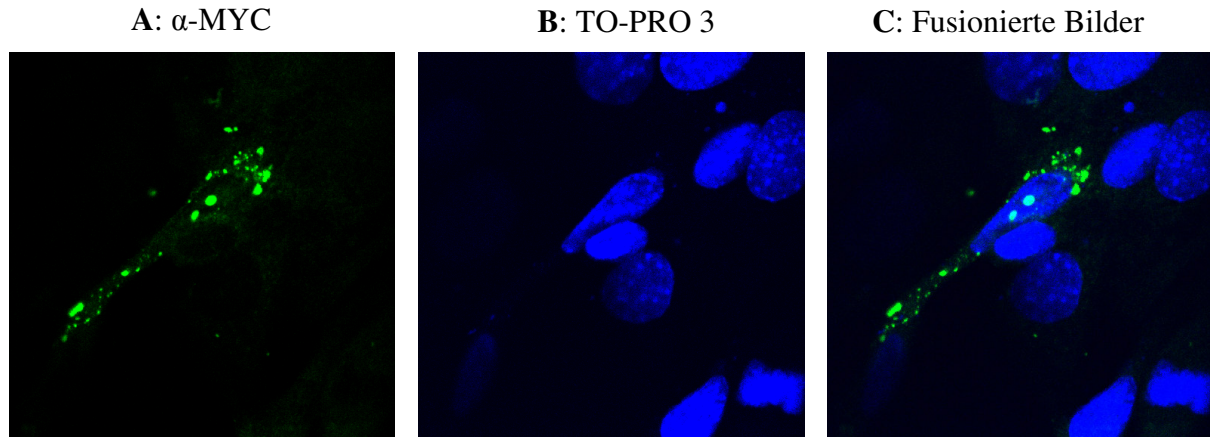
Änderung der intrazellulären Lokalisation beider Partner: Xaf1 wird teilweise aus Aggregaten um den Zellkern herum in spiralförmige Formationen im Zytoplasma verlagert. Hier ist es gemeinsam mit XIAP-MYC nachweisbar. Dieses wiederum verschiebt sich aus Ablagerungen, die im gesamten Zytoplasma verteilt sind, in die spiralförmigen Aggregate im Zytoplasma und um den Nukleus.

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse eines ähnlichen Experimentes, bei dem Xaf1 und MYC-markiertes Akt1 gemeinsam transient überexprimiert wurden. Das Fusionsbild (C) ist durch Überlagerung der Darstellungen von Xaf1 (A) und MYC (B) entstanden. Co-lokalisierte Proteine stellen sich wieder gelb dar. In diesem Versuch wird Xaf1 gleichmäßig in das gesamte Zytoplasma verlagert. Auch die Interaktion von Xaf1 mit Akt1-MYC führt folglich zu einer Veränderung der Lokalisation von Xaf1. Dieses lagert sich nicht in Aggregaten um den Zellkern herum und kommt nun gemeinsam mit Akt1 im gesamten Zytoplasma vor.

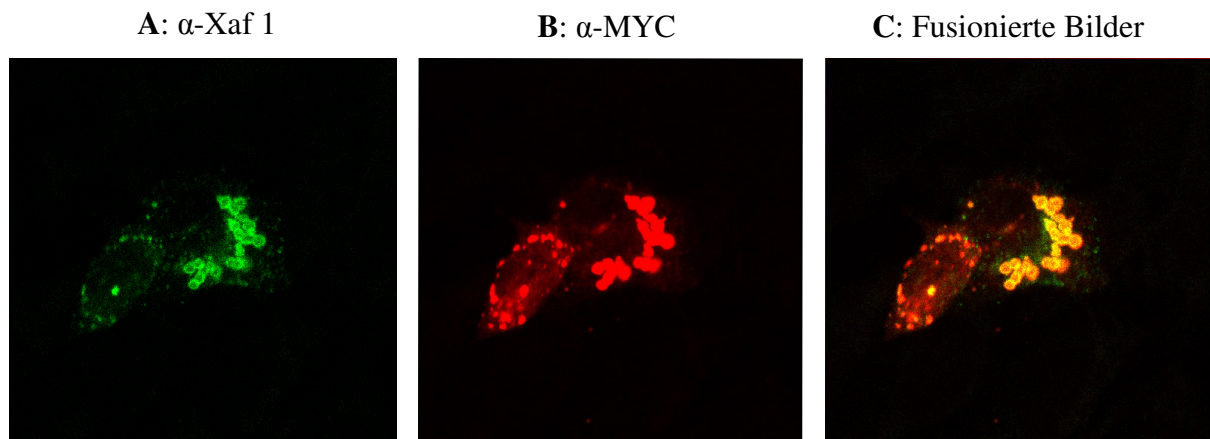
In C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen lagert sich alleine überexprimiertes Xaf1 um den Zellkern herum an. Überexprimiertes XIAP kommt in Aggregaten im Zytoplasma vor. Bei Überexpression beider Proteine finden sich spiralförmige Aggregate im Zytoplasma und Aggregate um den Zellkern. Die Überexpression von Akt1 mit Xaf1 führt zu einer Verteilung von Xaf1 im gesamten Zytoplasma.



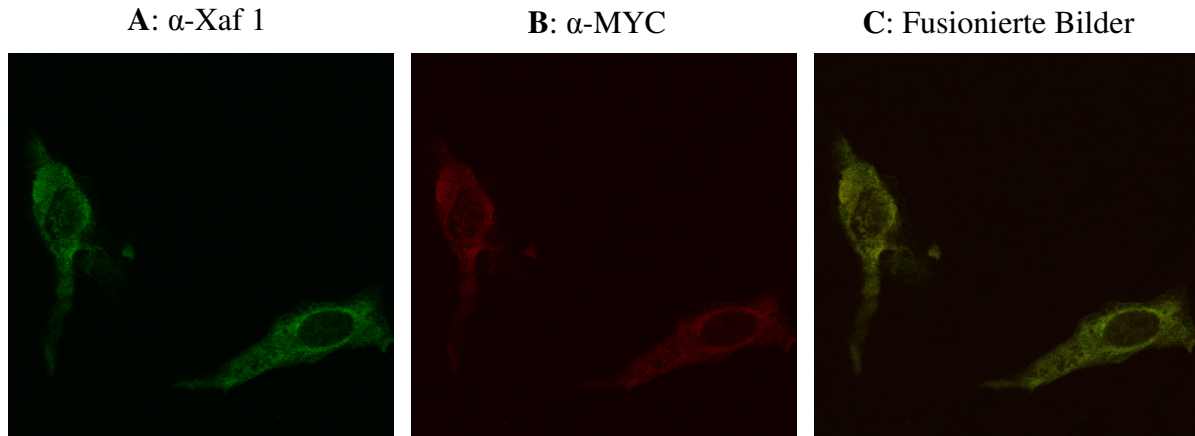
**Abbildung 22: Überexprimiertes Xaf1 ist in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen um den Zellkern lokalisiert.** Xaf1 wurde in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen transient überexprimiert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert, nach Bindung der angegebenen Antikörper erfolgte die Aufnahme der Bilder mit dem Confocal laser scanning Mikroskop. (A) Xaf1 wurde mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern als primärem Antikörper und Rabbit IgG Alexa 588 (rot) als sekundärem Antikörper detektiert. (B) Durch Färbung mit TO-PRO 3 wurde Doppelstrang-DNA im Zellkern sichtbar gemacht. (C) Fusionsbild, das durch Überlagerung von A und B erzeugt wurde. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; IgG = Immunglobulin G; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.



**Abbildung 23: In  $C_2C_{12}$ -Zellen ist überexprimiertes XIAP-MYC in Aggregaten im Zytoplasma lokalisiert.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 22 beschrieben. MYC-markiertes XIAP wurde in  $C_2C_{12}$ -Zellen transient überexprimiert. (A) XIAP-MYC wurde mit  $\alpha$ -MYC-Antikörpern als primärem Antikörper und Mouse IgG Alexa 546 (grün) als sekundärem Antikörper detektiert. (B) Durch Färbung mit TO-PRO 3 wurde Doppelstrang-DNA im Zellkern sichtbar gemacht. (C) Fusionsbild, das durch Überlagerung von A und B erzeugt wurde. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; IgG = Immunglobulin G; MYC = myelocytomatosis viral oncogene homolog; XIAP = X-linked inhibitor of apoptosis.



**Abbildung 24: Gemeinsame Überexpression von Xaf1 und XIAP-MYC in  $C_2C_{12}$ -Zellen führt zu einer Verlagerung beider Proteine in spiralförmige Aggregate im Zytoplasma und in Aggregate um den Zellkern.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 22 beschrieben. Xaf1 und MYC-markiertes XIAP wurde in  $C_2C_{12}$ -Zellen transient überexprimiert. (A) Xaf1 wurde mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörpern als primärem Antikörper und Rabbit IgG Alexa 546 (grün) als sekundärem Antikörper detektiert. (B) XIAP-MYC wurde mit  $\alpha$ -MYC-Antikörpern als primärem Antikörper und Mouse IgG Alexa 588 (rot) als sekundärem Antikörper detektiert. (C) Fusionsbild, das durch Überlagerung von A und B entstand. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; IgG = Immunglobulin G; MYC = myelocytomatosis viral oncogene homolog; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor; XIAP = X-linked inhibitor of apoptosis.



**Abbildung 25: Gemeinsame Überexpression von Xaf1 und Akt1-MYC in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen führt zu einer Verschiebung von Xaf1 ins gesamte Zytoplasma durch Zusammenlagerung mit Akt1.** Das Vorgehen erfolgte wie bei Abbildung 22 beschrieben. Xaf1 und MYC-markiertes Akt1 wurde in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen transient überexprimiert. **(A)** Xaf1 wurde mit  $\alpha$ -Xaf1-Antikörper als primärem Antikörper und Rabbit IgG Alexa 546 (grün) als sekundärem Antikörper detektiert. **(B)** Akt1-MYC wurde mit  $\alpha$ -MYC-Antikörper als primärem Antikörper und Mouse IgG Alexa 588 (rot) als sekundärem Antikörper detektiert. **(C)** Fusionsbild, das durch Überlagerung von A und B gewonnen wurde. *Abkürzungen:*  $\alpha$  = Anti; IgG = Immunglobulin G; MYC = myelocytomatosis viral oncogene homolog; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.

#### 4.7. Einfluß auf die Apoptose

Da sowohl Akt1 als auch Xaf1 eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielen (vgl. 2.3.4.2 und 2.4.4), sollten in dieser Arbeit auch Effekte auf den programmierten Zelltod untersucht werden. Zunächst wurden dazu verschiedene Zelllinien und mehrere Apoptose-Induktoren auf ihre Eignung für weitere Experimente getestet (Daten nicht gezeigt). Am praktikabelsten erwies sich dabei die Kombination von HeLa-Zellen mit Staurosporin-Behandlung. Diese wurde deshalb für die weiteren Versuche verwendet.

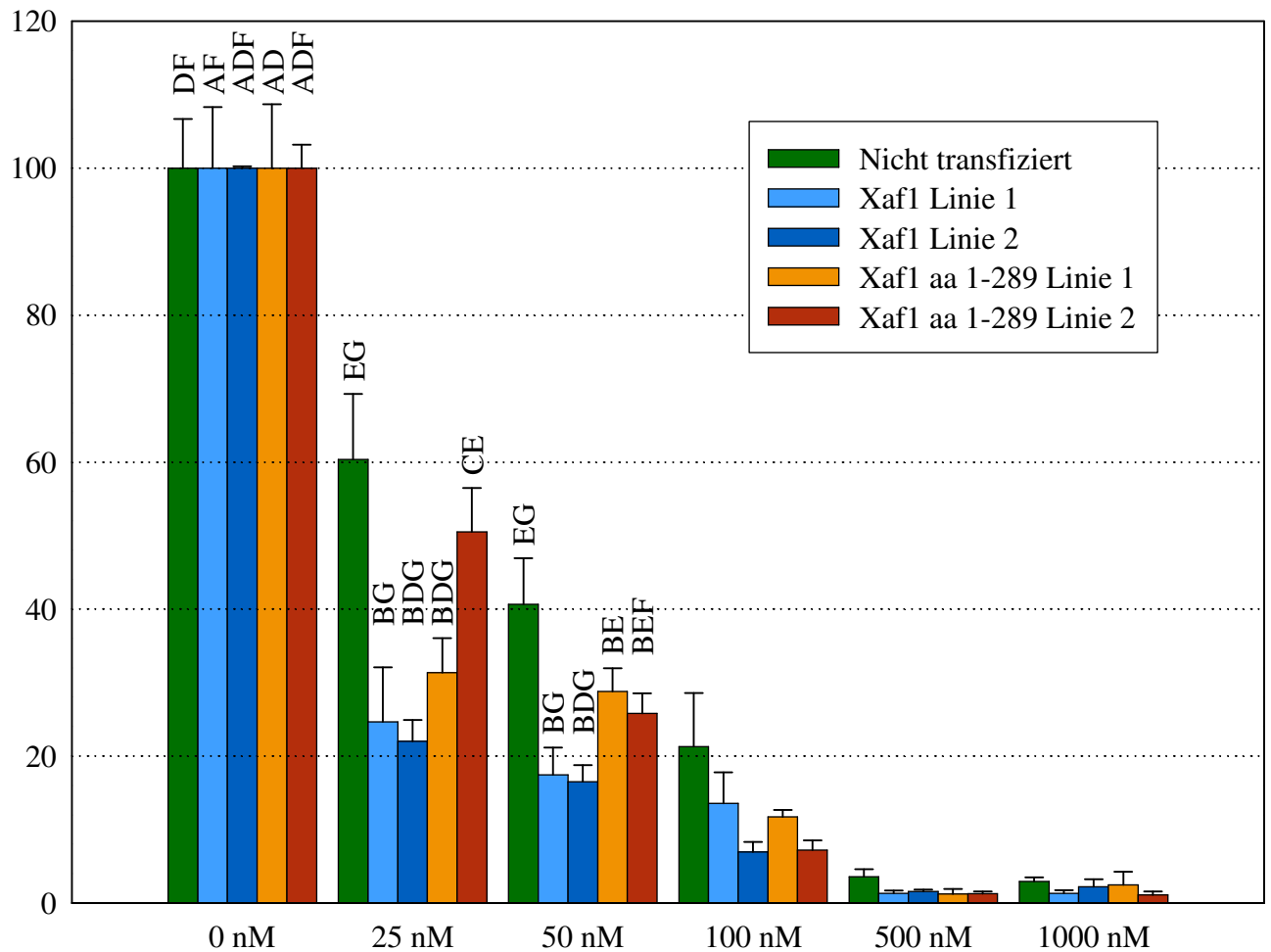
Um den Einfluss der Akt1 - Xaf1-Interaktion auf die Apoptose zu untersuchen, wurden native und stabil mit Xaf1, Xaf1 aa 1-289 transfizierte HeLa-Zellen ausgesät (vgl.4.4). Xaf1 aa 1-289 kann dabei nicht mehr mit Akt1 interagieren. Von jeder Zelllinie wurden für jede Staurosporine-Konzentration sechs Näpfe verwendet. Nach dem Anwachsen über Nacht waren die Zellen noch nicht konfluent. Sie wurden dann für 22 Stunden mit ansteigenden Staurosporine-Konzentrationen behandelt. Danach wurden die Zellzahlen mit einem WST-1-Assay ermittelt. Mit der unter 3.12 angegebenen Formel konnten sie in prozentuale Angaben

umgerechnet werden. Dann wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet. Die P-Werte wurden mit einem ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Mehrfachvergleichstest errechnet. Sie sind in Tabelle 6 einzeln aufgeführt. Als signifikant verschieden wurden Werte von  $P < 0,05$  interpretiert.

Abbildung 26 und die dazugehörige Tabelle 6 zeigen Ergebnisse eines solchen Versuches. In allen Zelllinien konnte dosisabhängig Apoptose ausgelöst werden. Xaf1-überexprimierende Zellen starben dabei deutlich schneller als die nativen Zellen. Dieser Effekt war in den Zellen mit Xaf1 ohne den Akt1-interagierenden Anteil teilweise aufgehoben. Die Interaktion zwischen den beiden Proteinen verstärkt in HeLa-Zellen Apoptose.

Allerdings konnten nicht bei allen Staurosporine-Konzentrationen signifikante Unterschiede erreicht werden. Bei 25 nM Staurosporine zeigt sich bei Xaf1 aa 1-289 Linie 1 lediglich ein Trend, die übrigen Ergebnisse sind signifikant. Bei 50 nM sind alle Unterschiede signifikant. Bei den höheren Staurosporine-Konzentrationen überleben weniger als 20 % der Zellen. Deswegen ist hier eine Auswertung und Interpretation der Daten nicht mehr sinnvoll.

Die Überexpression von Xaf1 verstärkt also die Apoptose. Dieser Effekt ist bei Verwendung eines Proteinteiles ohne den Akt-interagierenden Bereich verringert.



**Abbildung 26: Aufgehobene Interaktion von Xaf1 mit Akt1 verringert die Xaf1-vermittelte Apoptose-Verstärkung in HeLa-Zellen.** Native und stabil mit Xaf1, Xaf1 aa 1-289 transfizierte HeLa-Zellen wurden für 22 Stunden mit den angegebenen Staurosporine-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden mit einem WST-1-Assay die Zellzahlen ermittelt. Mit der unter 3.12 angegebenen Formel konnten sie dann in prozentuale Angaben umgerechnet werden. Die hier angegebenen Werte sind jeweils der Mittelwert aus sechs verschiedenen Messungen. Die P-Werte wurden mit einem ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls- Mehrfachvergleichstest errechnet. Sie sind in Tabelle 6 einzeln aufgeführt. Als signifikant verschieden wurden Werte von  $P < 0,05$  interpretiert.

*Abkürzungen:* aa = Aminosäuren; ANOVA = analysis of variance; nM = Nanomol; Xaf = XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-associated factor.

A = nicht signifikant verschieden von Nicht-transfiziert ( $P > 0,05$ );

B = signifikant verschieden von Nicht-transfiziert ( $P < 0,001$ );

C = signifikant verschieden von Nicht-transfiziert ( $P < 0,05$ );

D = nicht signifikant verschieden von Xaf1 Linie 1 ( $P > 0,05$ );

E = signifikant verschieden von Xaf1 Linie 1 ( $P < 0,001$ );

F = nicht signifikant verschieden von Xaf1 aa 1-289 Linie 1 ( $P > 0,05$ );

G = signifikant verschieden von Xaf1 aa 1-289 Linie 1 ( $P < 0,001$ )



**Tabelle 6: P-Werte des Versuches, der in Abbildung 24 dargestellt ist.** (Einzelheiten siehe Text). Errechnet wurden diese Werte mittels eines ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Mehrfachvergleichstest. Als signifikant verschieden wurden Werte von  $P < 0,05$  interpretiert.

Staurosporine Konzentration	Vergleich der Zelllinien	P-Wert
0 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 Linie 1	$P > 0,5$
0 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 Linie 2	$P > 0,5$
0 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	$P > 0,5$
0 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	$P > 0,5$
0 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 Linie 2	$P > 0,5$
0 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	$P > 0,5$
0 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	$P > 0,5$
0 nM	Xaf1 Linie 2 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	$P > 0,5$
0 nM	Xaf1 Linie 2 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	$P > 0,5$
0 nM	Xaf1 aa 1-289 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	$P > 0,5$
25 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 Linie 1	$P < 0,001$
25 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 Linie 2	$P < 0,001$
25 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	$P < 0,001$
25 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	$P < 0,05$
25 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 Linie 2	$P > 0,05$
25 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	$P > 0,05$
25 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	$P < 0,001$
25 nM	Xaf1 Linie 2 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	$P < 0,05$
25 nM	Xaf1 Linie 2 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	$P < 0,001$
25 nM	Xaf1 aa 1-289 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	$P < 0,001$
50 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 Linie 1	$P < 0,001$
50 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 Linie 2	$P < 0,001$
50 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	$P < 0,001$
50 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	$P < 0,001$
50 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 Linie 2	$P > 0,05$
50 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	$P < 0,001$
50 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	$P < 0,01$
50 nM	Xaf1 Linie 2 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	$P < 0,001$

50 nM	Xaf1 Linie 2 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	P < 0,001
50 nM	Xaf1 aa 1-289 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	P > 0,05
100 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 Linie 1	P < 0,01
100 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 Linie 2	P < 0,001
100 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	P < 0,001
100 nM	Nicht-transfiziert vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	P < 0,001
100 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 Linie 2	P < 0,05
100 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	P > 0,05
100 nM	Xaf1 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	P < 0,05
100 nM	Xaf1 Linie 2 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 1	P > 0,05
100 nM	Xaf1 Linie 2 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	P > 0,05
100 nM	Xaf1 aa 1-289 Linie 1 vs Xaf1 aa 1-289 Linie 2	P > 0,05

## 5. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Interaktion zwischen Xaf1 und Akt zu bestätigen und Effekte dieser Interaktion zu untersuchen. Dadurch sollten Hinweise auf die Bedeutung für physiologische und pathologische Stoffwechselwege erlangt werden.

### 5.1. Interaktion von Xaf1 mit Akt

Die durch Yeast-two-hybrid-screening neu gefundene Interaktion von Xaf1 mit Akt wurde in humanen Zellen überprüft. Dies erschien notwendig, da Interaktionen in Hefe oft nicht auf Proteinebene in Eukaryonten übertragen werden können.

In dieser Arbeit konnte die Interaktion für Akt1 und Akt2 nachgewiesen werden, nicht jedoch für Akt3. Dieser Befund könnte ein weiterer Hinweis auf Unterschiede in der Funktion der drei Akt-Isoformen sein. Im nächsten Schritt wurde die Interaktion von Akt mit Xaf1 und drei weiteren Akt-interagierenden Proteinen untersucht. Dabei war Xaf1 das deutlich stärkste Akt-interagierende Protein. Der Nachweis der Akt-Xaf1-Interaktion in Hefen gemeinsam mit der starken, Isoform-spezifischen Interaktion in humanen Zellen lässt eine Interaktion auch *in vivo* wahrscheinlich erscheinen.

Bei der Untersuchung der Expression von Xaf1 in verschiedenen Zelllinien wurde das Protein nur in zwei von neun Linien nachgewiesen, in NIH 3T3 und BHK. Bei NIH 3T3 handelt es sich um eine relativ wenig transformierte Zelllinie, während die übrigen untersuchten stärker transformiert sind. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Erkenntnis anderer, dass in Tumorzellen Xaf1 nicht oder nur wenig exprimiert wird<sup>92,193</sup>. BHK-Zellen hingegen sind stärker transformiert (geringe Kontaktinhibition), exprimieren aber trotzdem Xaf1. Dies widerspricht der Theorie einer mit stärkerer Transformation abnehmenden Xaf1-Expression. Möglicherweise ist in dieser Zelllinie ein bisher noch nicht bekannter anti-apoptotischer Mechanismus aktiviert, welcher Effekte der Xaf1-Expression ausgleichen kann.

## **5.2. Interaktionsbereiche der Proteine**

### **5.2.1. Der Akt-interagierende Xaf1-Bereich**

Als Akt1-interagierender Abschnitt von Xaf1 wurden in dieser Arbeit die carboxyterminalen zwölf Aminosäuren der Isoform 1 von Xaf1 identifiziert (Aminosäuren 289 bis 301).

Interessanterweise ist dieser Abschnitt in den humanen Xaf1 Isoformen 3, 4 und 5 nicht enthalten<sup>6</sup>. Über die Funktion und Expression der meisten Isoformen ist bisher nichts bekannt. Allerdings wird ein verändertes Expressionsmuster in Tumoren diskutiert<sup>193,291</sup>. Die meisten Untersuchungen widmeten sich dabei jedoch der Analyse von Isoform 2<sup>87,227</sup>, in der ja der Akt1-interagierende Abschnitt enthalten ist. Es ist also weitere Forschung notwendig, um eventuell vorhandene Veränderungen in der Expression von nicht-Akt-interagierenden Isoformen zu detektieren.

Der Vergleich der humanen Xaf1-Isoform 1 mit Xaf1 von Rind<sup>4</sup> und Maus<sup>5</sup> zeigt, dass der Akt1-interagierende Abschnitt im bovinen Xaf1 mit Ausnahme der letzten vier Aminosäuren identisch ist. In der Maus sind lediglich vier von zwölf Aminosäuren identisch. Dazu ist allerdings anzumerken, dass Maus-Xaf1 auch im übrigen Protein nur eine geringe Übereinstimmung mit humanem Xaf1 hat. Der Akt1 interagierende Abschnitt ist also über die Artgrenze zum Rind hin konserviert. Daher muss die Frage gestellt werden, ob das als Homolog bezeichnete Nager-Protein bei deutlichen Unterschieden in Sequenz und Molekulargewicht wirklich ein solches darstellt.

### **5.2.2. Der Xaf1-interagierende Akt-Bereich**

Als Xaf1-interagierender Abschnitt von Akt1 wurde in dieser Arbeit ein zentraler Abschnitt von Akt1 identifiziert. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren 178 bis 200; darüber hinaus sind die Aminosäuren 155 bis 178 für eine starke Bindung der beiden Proteine erforderlich.

Xaf1 interagiert mit Akt also direkt im Bereich der zentralen katalytischen Domäne von Akt1 (Aminosäuren 150 bis 408)<sup>2</sup>. In dem Xaf1 interagierenden Abschnitt befindet sich auch die ATP-Bindungsstelle (Aminosäuren 156 bis 164). Ob und wie die Xaf1-Interaktion dadurch die Aktivität der Akt-Kinasen verändert, muss noch untersucht werden.

Die drei Isoformen von Akt unterscheiden sich in diesem Bereich nur in wenigen Aminosäuren<sup>2,3,7</sup>. Akt3 hat dabei an den divergierenden Positionen immer dieselbe Aminosäure wie mindestens eine der beiden anderen Isoformen. Die Feststellung, dass Akt3

nicht von Xaf1 gebunden werden kann (vgl. 5.1), lässt sich also nicht durch Sequenz-Unterschiede in diesem Abschnitt erklären. Verantwortlich dafür müssen folglich andere Abschnitte außerhalb des eigentlichen Bindungsbereichs oder weitere, bisher nicht identifizierte, Proteine sein.

Auf die Herstellung einer Deletionsmutante von Akt1 ohne den Bindungsbereich wurde verzichtet, weil Deletionen im Bereich der zentralen katalytischen Domäne die Kinase-Aktivität zerstören würden. Dann wären keine sinnvollen Untersuchungen hinsichtlich der Funktion mehr möglich.

### **5.2.3. Der XIAP-interagierende Xaf1-Bereich**

In dieser Arbeit konnte die Interaktion von Xaf1 mit XIAP in HEK-293-Zellen bestätigt werden. Als XIAP-interagierender Abschnitt von Xaf1 wurden die drei Aminosäuren 179 bis 181 von Xaf1 identifiziert.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion von Xaf1 mit Akt und XIAP zwei unterschiedliche Abschnitte von Xaf1 verantwortlich sind (vgl. 5.2.1). Diese Feststellung läßt eine mögliche Konkurrenz von Akt1 und XIAP um die Xaf1-Bindung unwahrscheinlich erscheinen.

Wie der Akt1-bindende Abschnitt ist auch der XIAP-bindende Abschnitt in den humanen Xaf1 Isoformen 3, 4, und 5 nicht enthalten<sup>6</sup>, wobei auch hier die Bedeutung bisher unklar bleibt.

### **5.3. Einfluß von Xaf1 auf die Akt-Phosphorylierung**

Nachdem der Bindungsbereich von Xaf1 im Bereich der katalytischen Domäne von Akt1 gefunden wurde, stellte sich die Frage nach dem Einfluss auf die Kinase-Aktivität von Akt. Um erste Hinweise auf diese zu erhalten, wurde als Marker für die Aktivität von Akt der Phosphorylierungsstatus von Threonin 308 in stabilen Zelllinien untersucht. Der Versuch lieferte ein überraschendes Ergebnis: Im Gegensatz zu nativen Zellen ist Threonin 308 in Xaf1-überexprimierenden Zellen bereits ohne Insulin-Stimulation maximal phosphoryliert. Überexpression des pro-apoptotischen Proteins Xaf1 scheint also die Phosphorylierung der eigentlich anti-apoptotischen<sup>164,165</sup> Akt-Kinase zu steigern.

Ähnliches wurde 2005 bei einem anderen Akt-interagierenden Protein beschrieben, dem *Akt-phosphorylation enhancer* (APE) / Girdin<sup>12</sup>. Auch dieses Protein steigert bei Überexpression die Phosphorylierung von Akt<sup>79</sup>. Ein molekularer Mechanismus dafür wäre eine Verlängerung von Effekten der PI-3-Kinase<sup>12</sup>.

Diese Phosphorylierung der Akt-Kinase steigert ihre Kinase-Aktivität, die Phosphorylierung von GSK3 und damit auch die Glykogensynthese<sup>79</sup>. Auch Apoptose wird durch die Interaktion von Akt und APE beeinflusst. Allerdings führt die gesteigerte Phosphorylierung von Akt nicht zwangsläufig zu einer verminderten Apoptose-Rate der Zellen. Je nach Verhältnis der beiden Proteine wurden teilweise trotz verstärkter Akt-Phosphorylierung proapoptische Effekte nachgewiesen<sup>12</sup>. Darüber hinaus werden noch mehrere andere zelluläre Funktionen beeinflusst<sup>83,84,127</sup>. Im Gegensatz zu Xaf1 beinhaltet APE auch selbst eine Akt-Phosphorylierungsstelle<sup>83</sup>. Vermutlich entfaltet APE seinen maximalen Akt-phosphorylierenden Effekt erst, wenn diese Stelle phosphoryliert ist<sup>79</sup>, so dass hier ein positiver Rückkoppelungsmechanismus diskutiert wird.

Mögliche Hinweise auf die Mechanismen der gesteigerten Akt1-Phosphorylierung durch Xaf1 lieferte ein weiterer Versuch, bei dem die unspezifische Tyrosin-Phosphorylierung detektiert wurde: Es zeigten sich drei prominent Tyrosin-phosphorylierte Proteinbanden, die vermutlich IRS, der  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors und *focal adhesion kinase* (Fak) entsprechen. Fak ist eine zytoplasmatische Protein-Tyrosin-Kinase, die neben der Integrin-Signaltransduktion in weiteren Prozessen wie der Zellmigration und Anti-Apoptose eine wichtige Rolle spielt<sup>189</sup>. Die Rolle von Fak in der Insulin-Signaltransduktion ist komplex und bisher nur unvollständig erforscht. Neben der Rolle als Akt-Substrat kann Fak-Aktivierung in manchen Zellen auch die Akt-Kinase-Aktivität, die Synthese von Glykogen<sup>111</sup> und die Translokation von GLUT-4<sup>36</sup> steigern. Veränderungen in der Fak-Phosphorylierung nach Stimulation mit Insulin sind abhängig davon, ob Zellen suspendiert sind oder ob sie sich im Zellverband befinden: In suspendierten Zellen steigert Insulin-Stimulation die Fak-Phosphorylierung, während bei intaktem Zellverband die Fak-Phosphorylierung nach Insulin-Stimulation abnimmt<sup>28</sup>. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen wurden vor der Lyse im Zellverband belassen, wo sie bei geringer Aktivität des *PI-3-Kinase-Signalweges* eine starke Phosphorylierung zeigten.

Das Experiment zeigte in Xaf1-überexprimierenden Zellen im Gegensatz zu nativen Zellen eine gesteigerte Phosphorylierung der beiden im Signalweg Akt vorgelagerten Proteine Insulinrezeptor und IRS sowie eine reduzierte Phosphorylierung von Fak. Diese Reduktion deutet auf eine hohe Akt-Aktivität hin.

Xaf1, das selbst keine Kinase-Domäne besitzt, steigert also die Akt1-Phosphorylierung. Es bewirkt dies wahrscheinlich nicht direkt, sondern führt zu einer verstärkten Expression des Insulinrezeptors und erhöht dadurch die Aktivität des Upstream-Proteins IRS. Wie Xaf1 diese erreicht und ob weitere zwischengeschaltete Proteine eine Rolle spielen, muss noch näher untersucht werden.

Außerdem ist noch offen, ob die verstärkte Akt-Phosphorylierung wirklich zu einer gesteigerten Funktion dieser Kinase führt. Es ist nämlich auch denkbar, dass die Xaf1-Bindung im aktiven Zentrum der Kinase die Aktivität von Akt hemmt. Zelluläre Rückkoppelungsmechanismen würden dann versuchen, diese verringerte Akt-Aktivität durch Aktivierung vorgelagerter Proteine auszugleichen. Diese vorgelagerten Proteine bewirken eine gesteigerte Phosphorylierung von Akt. Zu ihnen gehören unter anderem Insulinrezeptor und IRS, deren Tyrosinphosphorylierung in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Eine alternative Erklärungsmöglichkeit für die verstärkte Phosphorylierung sowohl von Akt als auch von weiteren Proteinen wäre ein unspezifischer phosphorylierender Effekt durch den CMV-Promotor des Xaf1-Konstruktes. Um dies auszuschließen und damit die tatsächliche Rolle von Xaf1 für die Akt-Phosphorylierung zu untermauern, müssen die in dieser Arbeit gezeigten Versuche mit einem anderen Xaf1-Expressionskonstrukt mit anderem Promotor wiederholt werden.

#### **5.4. Intrazelluläre Lokalisation der Proteine**

Die intrazelluläre Lokalisation von Xaf1 und XIAP wurde in dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen mit transienter Protein-Überexpression untersucht. Die Lokalisation von Akt1 wurde nicht nochmals analysiert, da aus der Literatur<sup>16,190</sup> ein hauptsächliches Vorkommen der nicht-aktivierten Kinase im gesamten Zytoplasma bekannt ist.

Alleine überexprimiertes Xaf1 findet sich nach dieser Arbeit in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen um den Zellkern herum. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur zellulären Lokalisation von Xaf1. So wird in transient überexprimierenden HeLa-Zellen Xaf1 im Nukleus gefunden<sup>152</sup>. In transient überexprimierenden Trophoblastenzellen aus dem ersten Trimester zeigt sich Xaf1 im gesamten Zytoplasma und in den Mitochondrien<sup>294</sup>. Im Rattengehirn findet sich beim gesunden Tier Xaf1 im Zytoplasma<sup>232</sup>. Die intrazelluläre Lokalisation von Xaf1 ist wahrscheinlich zelltyp- oder zellzyklusspezifisch oder aber durch die starke Überexpression

verändert. Die Ergebnisse dieser Arbeit und Angaben aus der Literatur müssen deswegen nicht unbedingt den Verhältnissen *in vivo* entsprechen.

Die Untersuchung der Lokalisation von alleine überexprimiertem XIAP zeigte in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen Protein-Aggregate im Zytoplasma. Dies ist in der Literatur in anderen Zellen ähnlich beschrieben: So ist XIAP in einer humanen *follikuläres Lymphom*-Zelllinie, die XIAP transient überexprimiert, in zytoplasmatischen Aggregaten<sup>184</sup> zu finden. HeLa Zellen mit transienter XIAP-Überexpression haben das Protein im gesamten Zytosol<sup>152</sup>. Auch in transient überexprimierenden Trophoblastenzellen aus dem ersten Trimester zeigt sich XIAP nur im Zytoplasma<sup>294</sup>. Im Rattengehirn befindet sich beim gesunden Tier XIAP im gesamten Zytoplasma und akzentuiert um den Nukleus<sup>232</sup>. In normalem humanem Ösophagus- und Bronchialepithel findet sich XIAP in Granula im Zytoplasma<sup>271</sup>. Die Lokalisation von XIAP scheint also in verschiedenen Zelllinien und Geweben im Zytoplasma zu sein.

Interessante Ergebnisse lieferte die gemeinsame transiente Überexpression von Xaf1 und XIAP in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen: Beide wurden in gemeinsame spiralförmige Aggregate im Zytoplasma und um den Zellkern herum verlagert. Die Ablagerungen um den Nukleus könnten der Lokalisation von Xaf1 bei alleiniger Überexpression dieses Proteins entsprechen. Die Gebilde im Zytoplasma entstehen neu und können bisher keinem bekannten Zellorganell zugeordnet werden. Die Angaben für die Lokalisation der beiden Proteine bei gemeinsamer Überexpression sind in der Literatur uneinheitlich: In transient überexprimierenden HeLa-Zellen werden beide Proteine in den Zellkern hinein verlagert<sup>152</sup>. Dieses Verhalten findet sich auch im ischämischen Rattengehirn, allerdings verbleiben hier auch größere Proteinanteile im Zytosol<sup>232</sup>. Im Gegensatz dazu gibt es in anderen transient überexprimierenden Zelllinien Hinweise auf eine andere Lokalisation: In humanen Melanomzellen<sup>141</sup> und humanen Harnblasenkarzinom-Zellen<sup>143</sup> befindet sich Xaf1 zwar auch im Nukleus, XIAP bleibt aber ausschließlich im Zytosol. In Trophoblastenzellen aus dem ersten Trimester zeigt sich Xaf1 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, XIAP aber ausschließlich im Zytoplasma<sup>294</sup>. Die intrazelluläre Lokalisation bei gemeinsamer Überexpression beider Proteine ist wahrscheinlich zelltyp- oder zellzyklusspezifisch oder sie wird durch die starke Überexpression verändert. Hier bleiben die Verhältnisse *in vivo* zunächst ebenfalls unklar.

Die Untersuchung von C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen, in denen Akt1 mit Xaf1 gemeinsam transient überexprimiert wurde, zeigt eine gleichmäßige Verschiebung von Xaf1 ins gesamte Zytoplasma, wo es mit Akt1 zusammengelagert wird. Im Nukleus befindet sich keines der beiden Proteine. Da es zu dieser Konstellation in der Literatur bisher keine Daten gibt, ist eine Beurteilung schwierig.



Allerdings läßt sich zusammenfassend Folgendes feststellen: Auch wenn unter den experimentellen Bedingungen der Überexpression keine spezifische physiologische Lokalisierung der Proteine zu erwarten ist, entsteht aus der gemeinsamen Überexpression zweier Proteine jeweils eine Lokalisierung, die anders ist als bei singulärer Expression. Dies unterstützt die Befunde der Proteininteraktionen von Xaf1 mit Akt und Xaf1 mit XIAP aus dem Western Blot.

## **5.5. Einfluß auf die Apoptose**

In dieser Arbeit wurde des Weiteren der Einfluss der Proteininteraktion von Xaf1 mit Akt1 auf die Apoptose in HeLa-Zellen untersucht. In diesen wurde entweder das gesamte Xaf1 oder die Deletionsmutante ohne den Akt1-interagierenden Abschnitt stabil überexprimiert. Die Apoptose-Induktion erfolgte mit Staurosporine. In allen Zelllinien konnte damit dosisabhängig Apoptose ausgelöst werden. Xaf1-überexprimierende Zellen starben dabei deutlich schneller als die nativen Zellen. Dieser Effekt war in den Zellen mit Xaf1 ohne den Akt1-interagierenden Anteil teilweise aufgehoben.

Die bereits aus der Literatur bekannte<sup>152,193</sup> Apoptose-verstärkende Wirkung von Xaf1 wird durch diese Daten bestätigt. Da ohne Bindung mit Akt1 dieser Effekt teilweise aufgehoben ist, scheint die Apoptose durch die Interaktion von Xaf1 mit Akt1 gesteigert zu werden. Auf welche Weise dies geschieht, ist bisher unklar und muss noch weiter untersucht werden.

Selbst wenn Xaf1 nicht an Akt1 binden kann, hat es noch eine schwache pro-apoptotische Wirkung. Dies deutet darauf hin, dass neben der Xaf1-Akt1-Interaktion noch weitere Prozesse zur Apoptose-Regulation durch Xaf1 eine Rolle spielen. Von diesen sind schon mehrere beschrieben (vgl. 2.4.4). Die Bedeutung der Akt1-Xaf1-Interaktion im Vergleich zu diesen anderen Vorgängen und ein eventuelles Zusammenwirken muß ebenfalls noch erforscht werden.

## 6. Zusammenfassung

Im Hefe-2-Hybrid-System wurde XIAP-associated factor 1 (Xaf1) als Interaktionspartner von Akt gefunden.

Bei Xaf1 handelt es sich um ein Protein, das über verschiedene Mechanismen pro-apoptotisch wirkt. Die Akt-Kinase ist hingegen anti-apoptotisch und spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Insulin-Signaltransduktion und weiteren zellulären Funktionen.

Die Interaktion von Xaf1 wurde in humanen Zellen für Akt 1 und Akt 2 bestätigt, nicht aber für Akt 3. Im Vergleich zu anderen Akt-interagierenden Proteinen war Xaf1 ein starker Bindungspartner. Weiter konnten die Interaktionsbereiche von Xaf1, Akt1 und XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) definiert und Expressionskonstrukte ohne die interagierenden Bereiche hergestellt werden. Diese Konstrukte wurden anschließend in Zellen stabil überexprimiert. Darin führte Xaf 1 zu einer verstärkten Phosphorylierung von Akt und von weiteren Proteinen des Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3-Kinase)-Stoffwechselweges. Die Interaktion bewirkte außerdem eine Veränderung der intrazellulären Lokalisation der Proteine. Zudem erhöhte die Akt-Xaf1-Interaktion die Apoptoserate.

Die funktionelle Charakterisierung lieferte also Hinweise auf eine Bedeutung dieser Protein-Interaktion für den *PI-3-Kinase-Akt-Signalweg*, die intrazelluläre Lokalisation der Proteine und die Apoptose.

## 7. Literatur

1. UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/P98170>) (Zugriff am 8. Juli 2008).
2. UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/P31749>) (Zugriff am 8. Juli 2008).
3. UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/P31751>) (Zugriff am 8. Juli 2008).
4. UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q58DH1>) (Zugriff am 8. Juli 2008).
5. UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q5NBU8>) (Zugriff am 8. Juli 2008).
6. UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6GPH4>) (Zugriff am 8. Juli 2008).
7. UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y243>) (Zugriff am 8. Juli 2008).
8. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979, 282 [5739]: 615-616.
9. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N: Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998, 392 [6671]: 86-89.
10. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P: Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$ . *Curr Biol* 1997, 7 [4]: 261-269.
11. Altieri DC: The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol* 2006, 18 [6]: 609-615.
12. Anai M, Shojima N, Katagiri H, Ogihara T, Sakoda H, Onishi Y, Ono H, Fujishiro M, Fukushima Y, Horike N, Viana A, Kikuchi M, Noguchi N, Takahashi S, Takata K, Oka Y, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T: A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J Biol Chem* 2005, 280 [18]: 18525-18535.
13. Anckar J, Sistonen L: Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv Exp Med Biol* 2007, 594 78-88.
14. Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, Hawkins PT: Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* 1998, 8 [12]: 684-691.

15. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA: Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997, 272 [50]: 31515-31524.
16. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA: Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997, 272 [50]: 31515-31524.
17. Arends MJ, Wyllie AH: Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991, 32 223-254.
18. Arora V, Cheung HH, Plenchette S, Micali OC, Liston P, Korneluk RG: Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *J Biol Chem* 2007, 282 [36]: 26202-26209.
19. Asano T, Fujishiro M, Kushiyama A, Nakatsu Y, Yoneda M, Kamata H, Sakoda H: Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation on insulin action and its alteration in diabetic conditions. *Biol Pharm Bull* 2007, 30 [9]: 1610-1616.
20. Assuncao GC, Linden R: Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 2004, 271 [9]: 1638-1650.
21. Atkinson EA, Barry M, Darmon AJ, Shostak I, Turner PC, Moyer RW, Bleackley RC: Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *J Biol Chem* 1998, 273 [33]: 21261-21266.
22. Bachelder RE, Ribick MJ, Marchetti A, Falcioni R, Soddu S, Davis KR, Mercurio AM: p53 inhibits alpha 6 beta 4 integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB. *J Cell Biol* 1999, 147 [5]: 1063-1072.
23. Bachelder RE, Wendt MA, Fujita N, Tsuruo T, Mercurio AM: The cleavage of Akt/protein kinase B by death receptor signaling is an important event in detachment-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001, 276 [37]: 34702-34707.
24. Badock V, Steinhilber U, Bommert K, Wittmann-Liebold B, Otto A: Apoptosis-induced cleavage of keratin 15 and keratin 17 in a human breast epithelial cell line. *Cell Death Differ* 2001, 8 [3]: 308-315.
25. Bai Y, Ahmad U, Wang Y, Li JH, Choy JC, Kim RW, Kirkiles-Smith N, Maher SE, Karras JG, Bennett CF, Bothwell AL, Pober JS, Tellides G: Interferon-gamma induces X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 and Noxa expression and potentiates human vascular smooth muscle cell apoptosis by STAT3 activation. *J Biol Chem* 2008, 283 [11]: 6832-6842.
26. Bailyes EM, Nave BT, Soos MA, Orr SR, Hayward AC, Siddle K: Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J* 1997, 327 ( Pt 1) 209-215.
27. Balsinde J, Perez R, Balboa MA: Calcium-independent phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1761 [11]: 1344-1350.

28. Baron V, Calleja V, Ferrari P, Alengrin F, Van Obberghen E: p125Fak focal adhesion kinase is a substrate for the insulin and insulin-like growth factor-I tyrosine kinase receptors. *J Biol Chem* 1998, 273 [12]: 7162-7168.
29. Barry M, Bleackley RC: Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002, 2 [6]: 401-409.
30. Barry M, Heibein JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, Bleackley RC: Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 2000, 20 [11]: 3781-3794.
31. Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, Bickel PE, Pessin JE, Saltiel AR: CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* 2000, 407 [6801]: 202-207.
32. Becker AB, Roth RA: Insulin receptor structure and function in normal and pathological conditions. *Annu Rev Med* 1990, 41 99-115.
33. Bhathena SJ, Awoke S, Voyles NR, Wilkins SD, Recant L, Oie HK, Gazdar AF: Insulin, glucagon, and somatostatin secretion by cultured rat islet cell tumor and its clones. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984, 175 [1]: 35-38.
34. Birnboim HC: A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 1983, 100 243-255.
35. Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979, 7 [6]: 1513-1523.
36. Bisht B, Goel HL, Dey CS: Focal adhesion kinase regulates insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetologia* 2007, 50 [5]: 1058-1069.
37. Bjorck L, Kronvall G: Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol* 1984, 133 [2]: 969-974.
38. Blau HM, Pavlath GK, Hardeman EC, Chiu CP, Silberstein L, Webster SG, Miller SC, Webster C: Plasticity of the differentiated state. *Science* 1985, 230 [4727]: 758-766.
39. Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T: The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* 1998, 8 [13]: 779-782.
40. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS: A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 2003, 11 [2]: 529-541.
41. Bots M, Medema JP: Granzymes at a glance. *J Cell Sci* 2006, 119 [Pt 24]: 5011-5014.
42. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72 248-254.

43. Brodbeck D, Hill MM, Hemmings BA: Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem* 2001, 276 [31]: 29550-29558.
44. Brode S, Macary PA: Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew! *Immunology* 2004, 112 [3]: 345-351.
45. Browne KA, Johnstone RW, Jans DA, Trapani JA: Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J Biol Chem* 2000, 275 [50]: 39262-39266.
46. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME: Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999, 96 [6]: 857-868.
47. Byun DS, Cho K, Ryu BK, Lee MG, Kang MJ, Kim HR, Chi SG: Hypermethylation of XIAP-associated factor 1, a putative tumor suppressor gene from the 17p13.2 locus, in human gastric adenocarcinomas. *Cancer Res* 2003, 63 [21]: 7068-7075.
48. Byun Y, Chen F, Chang R, Trivedi M, Green KJ, Cryns VL: Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 2001, 8 [5]: 443-450.
49. Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE: Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 2003, 278 [28]: 25323-25330.
50. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC: Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998, 282 [5392]: 1318-1321.
51. Chan TO, Tsichlis PN: PDK2: a complex tail in one Akt. *Sci STKE* 2001, 2001 [66]
52. Chang HY, Yang X: Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, 64 [4]: 821-846.
53. Chen C, Okayama H: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987, 7 [8]: 2745-2752.
54. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N: Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* 2001, 15 [17]: 2203-2208.
55. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM: FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996, 271 [9]: 4961-4965.

56. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, III, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ: Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 2001, 292 [5522]: 1728-1731.
57. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ: Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 2001, 276 [42]: 38349-38352.
58. Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Tokier A: Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* 1998, 8 [19]: 1069-1077.
59. Chung CT, Miller RH: A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res* 1988, 16 [8]: 3580-
60. Chung CT, Niemela SL, Miller RH: One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86 [7]: 2172-2175.
61. Chung SK, Lee MG, Ryu BK, Lee JH, Han J, Byun DS, Chae KS, Lee KY, Jang JY, Kim HJ, Chi SG: Frequent alteration of XAF1 in human colorectal cancers: implication for tumor cell resistance to apoptotic stresses. *Gastroenterology* 2007, 132 [7]: 2459-2477.
62. Clarke PG: Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 1990, 181 [3]: 195-213.
63. Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE: Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 1977, 270 [5635]: 347-349.
64. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ: Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99 [9]: 6252-6256.
65. Croft DR, Coleman ML, Li S, Robertson D, Sullivan T, Stewart CL, Olson MF: Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J Cell Biol* 2005, 168 [2]: 245-255.
66. Crook NE, Clem RJ, Miller LK: An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993, 67 [4]: 2168-2174.
67. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995, 378 [6559]: 785-789.
68. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995, 378 [6559]: 785-789.

69. Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang HG, Tsang BK, Cheng JQ: Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* 2004, 279 [7]: 5405-5412.
70. Degtarev A, Yuan J: Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9 [5]: 378-390.
71. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G: Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997, 278 [5338]: 687-689.
72. Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO: Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 279 [3]: L429-L438.
73. Doble BW, Woodgett JR: GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 2003, 116 [Pt 7]: 1175-1186.
74. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X: Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000, 102 [1]: 33-42.
75. Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M: TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 2003, 300 [5625]: 1574-1577.
76. Dummler B, Hemmings BA: Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans* 2007, 35 [Pt 2]: 231-235.
77. Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T, Ludwig T, Efstratiadis A, Birnbaum MJ: Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol* 2005, 25 [5]: 1869-1878.
78. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL: Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 2006, 7 [10]: 988-994.
79. Eckert F: Charakterisierung des neuen Akt-interagierenden Proteins AIP. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin. Tübingen 2008
80. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP: Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999, 283 [5407]: 1544-1548.
81. Emptage NJ: Fluorescent imaging in living systems. *Curr Opin Pharmacol* 2001, 1 [5]: 521-525.
82. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998, 391 [6662]: 43-50.



83. Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M: Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell* 2005, 9 [3]: 389-402.
84. Enomoto A, Ping J, Takahashi M: Girdin, a novel actin-binding protein, and its family of proteins possess versatile functions in the Akt and Wnt signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1086 169-184.
85. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM: Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998, 101 [4]: 890-898.
86. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992, 148 [7]: 2207-2216.
87. Fang X, Liu Z, Fan Y, Zheng C, Nilson S, Egevad L, Ekman P, Xu D: Switch to full-length of XAF1 mRNA expression in prostate cancer cells by the DNA methylation inhibitor. *Int J Cancer* 2006, 118 [10]: 2485-2489.
88. Fantin VR, Sparling JD, Slot JW, Keller SR, Lienhard GE, Lavan BE: Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 1998, 273 [17]: 10726-10732.
89. Farese RV: Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002, 283 [1]: E1-11.
90. Farese RV, Sajan MP, Standaert ML: Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005, 230 [9]: 593-605.
91. Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA: Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci* 2005, 118 [Pt 24]: 5675-5678.
92. Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, St Jean M, Craig C, Korneluk RG: Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* 2000, 70 [1]: 113-122.
93. Frame S, Cohen P: GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001, 359 [Pt 1]: 1-16.
94. Frattali AL, Treadway JL, Pessin JE: Transmembrane signaling by the human insulin receptor kinase. Relationship between intramolecular beta subunit trans- and cis-autophosphorylation and substrate kinase activation. *J Biol Chem* 1992, 267 [27]: 19521-19528.
95. Fritsche L, Weigert C, Haring HU, Lehmann R: How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver--implications for health and disease. *Curr Med Chem* 2008, 15 [13]: 1316-1329.

96. Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R: Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979, 54 [3]: 713-733.
97. Gao T, Furnari F, Newton AC: PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 2005, 18 [1]: 13-24.
98. Gao X, Pan D: TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev* 2001, 15 [11]: 1383-1392.
99. Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, McNeish JD, Coleman KG: Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 2003, 112 [2]: 197-208.
100. Gey G.O, Coffman W.D., Kubicek M.T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 1952, 12 264-265.
101. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977, 36 [1]: 59-74.
102. Greagg MA, Fogg MJ, Panayotou G, Evans SJ, Connolly BA, Pearl LH: A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-strand uracil. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96 [16]: 9045-9050.
103. Greene MW, Garofalo RS: Positive and negative regulatory role of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) serine/threonine phosphorylation. *Biochemistry* 2002, 41 [22]: 7082-7091.
104. Gross DN, van den Heuvel AP, Birnbaum MJ: The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene* 2008, 27 [16]: 2320-2336.
105. Gustafson TA, He W, Craparo A, Schaub CD, O'Neill TJ: Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol* 1995, 15 [5]: 2500-2508.
106. Harris SJ, Parry RV, Westwick J, Ward SG: Phosphoinositide lipid phosphatases: natural regulators of phosphoinositide 3-kinase signaling in T lymphocytes. *J Biol Chem* 2008, 283 [5]: 2465-2469.
107. Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Maundrell K, Castilla J, Soto C: Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J* 2003, 22 [20]: 5435-5445.

108. Hinds MG, Norton RS, Vaux DL, Day CL: Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol* 1999, 6 [7]: 648-651.
109. Holcik M, Gibson H, Korneluk RG: XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 2001, 6 [4]: 253-261.
110. Hresko RC, Mueckler M: mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2005, 280 [49]: 40406-40416.
111. Huang D, Cheung AT, Parsons JT, Bryer-Ash M: Focal adhesion kinase (FAK) regulates insulin-stimulated glycogen synthesis in hepatocytes. *J Biol Chem* 2002, 277 [20]: 18151-18160.
112. Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H: Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 2001, 104 [5]: 781-790.
113. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM: Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002, 109 [1]: 41-50.
114. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL: TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002, 4 [9]: 648-657.
115. Ish-Horowicz D, Burke JF: Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 1981, 9 [13]: 2989-2998.
116. Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ: Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 1969, 4 [5]: 549-553.
117. Jiang ZY, Zhou QL, Coleman KA, Chouinard M, Boese Q, Czech MP: Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100 [13]: 7569-7574.
118. Kalkhoven E: CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* 2004, 68 [6]: 1145-1155.
119. Kasuya J, Paz IB, Maddux BA, Goldfine ID, Hefta SA, Fujita-Yamaguchi Y: Characterization of human placental insulin-like growth factor-I/insulin hybrid receptors by protein microsequencing and purification. *Biochemistry* 1993, 32 [49]: 13531-13536.
120. Kato M, Fukuda H, Nonaka T, Imajoh-Ohmi S: Cleavage of nonmuscle myosin heavy chain-A during apoptosis in human Jurkat T cells. *J Biochem* 2005, 137 [2]: 157-166.
121. Katome T, Obata T, Matsushima R, Masuyama N, Cantley LC, Gotoh Y, Kishi K, Shiota H, Ebina Y: Use of RNA interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/protein kinase B isoforms in insulin actions. *J Biol Chem* 2003, 278 [30]: 28312-28323.

122. Kempkensteffen C, Hinz S, Schrader M, Christoph F, Magheli A, Krause H, Schostak M, Miller K, Weikert S: Gene expression and promoter methylation of the XIAP-associated Factor 1 in renal cell carcinomas: correlations with pathology and outcome. *Cancer Lett* 2007, 254 [2]: 227-235.
123. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994, 73 [8]: 2013-2026.
124. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26 [4]: 239-257.
125. Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV: Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2001, 21 [3]: 893-901.
126. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995, 14 [22]: 5579-5588.
127. Kitamura T, Asai N, Enomoto A, Maeda K, Kato T, Ishida M, Jiang P, Watanabe T, Usukura J, Kondo T, Costantini F, Murohara T, Takahashi M: Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat Cell Biol* 2008, 10 [3]: 329-337.
128. Kloetzel PM: The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1695 [1-3]: 225-233.
129. Ku NO, Liao J, Omary MB: Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem* 1997, 272 [52]: 33197-33203.
130. Kumar CC, Madison V: AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* 2005, 24 [50]: 7493-7501.
131. Kuo YC, Huang KY, Yang CH, Yang YS, Lee WY, Chiang CW: Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem* 2008, 283 [4]: 1882-1892.
132. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227 [5259]: 680-685.
133. Larsson M, Fonteneau JF, Bhardwaj N: Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol* 2001, 22 [3]: 141-148.
134. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S: Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 2004, 14 [3]: 277-287.
135. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S: Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 2003, 113 [6]: 717-730.

136. Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE: The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997, 272 [17]: 11439-11443.
137. Lavrik I, Golks A, Krammer PH: Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005, 118 [Pt 2]: 265-267.
138. Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ: Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 1998, 281 [5385]: 2042-2045.
139. Le Pecq JB, Paoletti C: A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem* 1966, 17 [1]: 100-107.
140. Leaman DW, Chawla-Sarkar M, Jacobs B, Vyas K, Sun Y, Ozdemir A, Yi T, Williams BR, Borden EC: Novel growth and death related interferon-stimulated genes (ISGs) in melanoma: greater potency of IFN-beta compared with IFN-alpha2. *J Interferon Cytokine Res* 2003, 23 [12]: 745-756.
141. Leaman DW, Chawla-Sarkar M, Vyas K, Reheman M, Tamai K, Toji S, Borden EC: Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002, 277 [32]: 28504-28511.
142. Lee J, Pilch PF: The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol* 1994, 266 [2 Pt 1]: C319-C334.
143. Lee MG, Huh JS, Chung SK, Lee JH, Byun DS, Ryu BK, Kang MJ, Chae KS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG, Chi SG: Promoter CpG hypermethylation and downregulation of XAF1 expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses. *Oncogene* 2006, 25 [42]: 5807-5822.
144. Lee YH, White MF: Insulin receptor substrate proteins and diabetes. *Arch Pharm Res* 2004, 27 [4]: 361-370.
145. Lehr S, Kotzka J, Herkner A, Sikmann A, Meyer HE, Krone W, Muller-Wieland D: Identification of major tyrosine phosphorylation sites in the human insulin receptor substrate Gab-1 by insulin receptor kinase in vitro. *Biochemistry* 2000, 39 [35]: 10898-10907.
146. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998, 94 [4]: 491-501.
147. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997, 91 [4]: 479-489.
148. Li T, Chen CL, Wang JD, Cui SD, Cui DY, Guo W: [Expression of HSF1 and XAF1 in gastro-intestinal cancer]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007, 27 [9]: 1447-1450.

149. Li T, Chen CL, Wang JD, Cui SD, Cui DY, Guo W: [Expression of heat-shock transcription factor 1 and X-linked inhibitor of apoptosis protein-associated factor-1 in gastrointestinal cancer]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2008, 28 [3]: 487-490.
150. Li X, Yang Y, Ashwell JD: TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 2002, 416 [6878]: 345-347.
151. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM: PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002, 8 [10]: 1153-1160.
152. Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG: Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* 2001, 3 [2]: 128-133.
153. Liston P, Fong WG, Korneluk RG: The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 2003, 22 [53]: 8568-8580.
154. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG: Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996, 379 [6563]: 349-353.
155. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW: Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 2000, 408 [6815]: 1004-1008.
156. Louis N, Eveleigh C, Graham FL: Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 1997, 233 [2]: 423-429.
157. Lu M, Lin SC, Huang Y, Kang YJ, Rich R, Lo YC, Myszka D, Han J, Wu H: XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol Cell* 2007, 26 [5]: 689-702.
158. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X: Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998, 94 [4]: 481-490.
159. Luthi AU, Martin SJ: The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2007, 14 [4]: 641-650.
160. Ma TL, Ni PH, Zhong J, Tan JH, Qiao MM, Jiang SH: Low expression of XIAP-associated factor 1 in human colorectal cancers. *Chin J Dig Dis* 2005, 6 [1]: 10-14.
161. MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM: Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem* 2002, 277 [39]: 36611-36616.

162. Macpharson I, Stoker M: Polyoma transformation of hamster cell clones-an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 1962, 16 147-151.
163. Manning BD, Cantley LC: Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci* 2003, 28 [11]: 573-576.
164. Manning BD, Cantley LC: AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007, 129 [7]: 1261-1274.
165. Marte BM, Downward J: PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 1997, 22 [9]: 355-358.
166. Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC, Green DR: Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 1995, 270 [12]: 6425-6428.
167. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995, 182 [5]: 1545-1556.
168. McDowell G, Grov A, Oeding P: Reaction of staphylococcal protein A with rabbit immunoglobulins. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* 1971, 79 [6]: 794-800.
169. Medema JP, Toes RE, Scaffidi C, Zheng TS, Flavell RA, Melief CJ, Peter ME, Offringa R, Krammer PH: Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 1997, 27 [12]: 3492-3498.
170. Micali OC, Cheung HH, Plenchette S, Hurley SL, Liston P, LaCasse EC, Korneluk RG: Silencing of the XAF1 gene by promoter hypermethylation in cancer cells and reactivation to TRAIL-sensitization by IFN-beta. *BMC Cancer* 2007, 7 52-
171. Miller AD, Rosman GJ: Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 1989, 7 [9]: 980-6, 989.
172. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S: Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002, 21 [17]: 2613-2622.
173. Morishima N: Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action. *Genes Cells* 1999, 4 [7]: 401-414.
174. Murphy TM, Perry AS, Lawler M: The emergence of DNA methylation as a key modulator of aberrant cell death in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008, 15 [1]: 11-25.

175. Myers MG, Jr., Mendez R, Shi P, Pierce JH, Rhoads R, White MF: The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. *J Biol Chem* 1998, 273 [41]: 26908-26914.
176. Nagai H, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H: Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* 2007, 40 [1]: 1-6.
177. Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, III, Arden KC, Accili D: The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 2003, 4 [1]: 119-129.
178. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000, 403 [6765]: 98-103.
179. Nakajima W, Tanaka N: Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma. *J Nippon Med Sch* 2007, 74 [2]: 148-157.
180. Nakano K, Vousden KH: PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001, 7 [3]: 683-694.
181. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D: The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 2006, 31 [1]: 137-155.
182. Ng KC, Campos EI, Martinka M, Li G: XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2004, 123 [6]: 1127-1134.
183. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K: The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999, 398 [6724]: 252-256.
184. Nowak D, Boehrer S, Brieger A, Kim SZ, Schaaf S, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E, Chow KU: Upon drug-induced apoptosis in lymphoma cells X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) translocates from the cytosol to the nucleus. *Leuk Lymphoma* 2004, 45 [7]: 1429-1436.
185. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N: Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000, 288 [5468]: 1053-1058.
186. Orlinick JR, Vaishnaw AK, Elkon KB: Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol* 1999, 18 [4]: 293-308.
187. Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM: The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* 1996, 271 [28]: 16443-16446.
188. Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A: Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem* 2002, 277 [42]: 39684-39695.



189. Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA: Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 2000, 19 [49]: 5606-5613.
190. Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, Bichi R, Tresini M, Malstrom S, Russo G, Tschlis P, Croce CM: Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97 [7]: 3028-3033.
191. Perrelet D, Ferri A, Liston P, Muzzin P, Korneluk RG, Kato AC: IAPs are essential for GDNF-mediated neuroprotective effects in injured motor neurons in vivo. *Nat Cell Biol* 2002, 4 [2]: 175-179.
192. Peter ME, Krammer PH: The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003, 10 [1]: 26-35.
193. Plenchette S, Cheung HH, Fong WG, LaCasse EC, Korneluk RG: The role of XAF1 in cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2007, 8 [6]: 469-476.
194. Potter CJ, Pedraza LG, Xu T: Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 2002, 4 [9]: 658-665.
195. Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A: Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 1958, 108 [6]: 945-956.
196. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM: Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 2003, 423 [6939]: 550-555.
197. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A: The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 1999, 3 [3]: 287-296.
198. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A: Bim: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 2001, 293 [5536]: 1829-1832.
199. Qiao L, Gu Q, Dai Y, Shen Z, Liu X, Qi R, Ma J, Zou B, Li Z, Lan HY, Wong BC: XIAP-Associated Factor 1 (XAF1) Suppresses Angiogenesis in Mouse Endothelial Cells. *Tumour Biol* 2008, 29 [2]: 122-129.
200. Rao L, Perez D, White E: Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 1996, 135 [6 Pt 1]: 1441-1455.
201. Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS: Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 2001, 104 [5]: 791-800.
202. Riedl SJ, Salvesen GS: The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8 [5]: 405-413.

203. Riedl SJ, Shi Y: Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5 [11]: 897-907.
204. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV: The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995, 83 [7]: 1243-1252.
205. Russell JC, Whiting H, Szufliata N, Hossain MA: Nuclear translocation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) determines cell fate after hypoxia ischemia in neonatal brain. *J Neurochem* 2008,
206. Russell JH, Ley TJ: Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002, 20 323-370.
207. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, 239 [4839]: 487-491.
208. Sakahira H, Enari M, Nagata S: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998, 391 [6662]: 96-99.
209. Sakemi R, Yano H, Ogasawara S, Akiba J, Nakashima O, Fukahori S, Sata M, Kojiro M: X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and XIAP-associated factor-1 expressions and their relationship to apoptosis in human hepatocellular carcinoma and non-cancerous liver tissues. *Oncol Rep* 2007, 18 [1]: 65-70.
210. Sakurai H, Miyoshi H, Mizukami J, Sugita T: Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett* 2000, 474 [2-3]: 141-145.
211. Sale EM, Sale GJ: Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65 [1]: 113-127.
212. Samuel T, Welsh K, Lober T, Togo SH, Zapata JM, Reed JC: Distinct BIR domains of cIAP1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases. *J Biol Chem* 2006, 281 [2]: 1080-1090.
213. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM: PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 2007, 25 [6]: 903-915.
214. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M: Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977, 265 [5596]: 687-695.
215. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, 74 [12]: 5463-5467.
216. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005, 307 [5712]: 1098-1101.

217. Savill J, Fadok V: Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000, 407 [6805]: 784-788.
218. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO: Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 1953, 97 [5]: 695-710.
219. Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000, 103 [2]: 211-225.
220. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G: Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 1977, 19 [5]: 621-626.
221. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA: Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004, 75 [2]: 163-189.
222. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME: Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998, 254 [3]: 439-459.
223. Scorrano L, Korsmeyer SJ: Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 304 [3]: 437-444.
224. Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Ratus M, Salvesen GS: XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J* 2005, 24 [3]: 645-655.
225. Shaulian E, Karin M: AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002, 4 [5]: E131-E136.
226. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K: Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 1998, 333 ( Pt 3) 471-490.
227. Shibata T, Mahotka C, Wethkamp N, Heikaus S, Gabbert HE, Ramp U: Disturbed expression of the apoptosis regulators XIAP, XAF1, and Smac/DIABLO in gastric adenocarcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2007, 16 [1]: 1-8.
228. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL: PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002, 8 [10]: 1145-1152.
229. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y: Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 2003, 11 [2]: 519-527.
230. Shiozaki EN, Shi Y: Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci* 2004, 29 [9]: 486-494.

231. Shiraishi H, Okamoto H, Yoshimura A, Yoshida H: ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci* 2006, 119 [Pt 19]: 3958-3966.
232. Siegelin M, Touzani O, Toutain J, Liston P, Rami A: Induction and redistribution of XAF1, a new antagonist of XIAP in the rat brain after transient focal ischemia. *Neurobiol Dis* 2005, 20 [2]: 509-518.
233. Silke J, Vaux DL: Two kinds of BIR-containing protein - inhibitors of apoptosis, or required for mitosis. *J Cell Sci* 2001, 114 [Pt 10]: 1821-1827.
234. Smith DB, Johnson KS: Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988, 67 [1]: 31-40.
235. Smith MI, Deshmukh M: Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis requires bax for commitment and Apaf-1 for execution in primary neurons. *Cell Death Differ* 2007, 14 [5]: 1011-1019.
236. Soos MA, Whittaker J, Lammers R, Ullrich A, Siddle K: Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem J* 1990, 270 [2]: 383-390.
237. Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H: Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J* 2002, 21 [17]: 4520-4530.
238. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES: Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998, 1 [7]: 949-957.
239. Srinivasula SM, Ashwell JD: IAPs: what's in a name? *Mol Cell* 2008, 30 [2]: 123-135.
240. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES: A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001, 410 [6824]: 112-116.
241. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW: Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998, 95 [1]: 29-39.
242. Stauber RH, Mann W, Knauer SK: Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Res* 2007, 67 [13]: 5999-6002.
243. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K: The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000, 191 [3]: 411-416.

244. Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT: Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 1997, 277 [5325]: 567-570.
245. Storz P, Toker A: 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in PI 3-kinase signaling. *Front Biosci* 2002, 7 d886-d902.
246. Straszewski-Chavez SL, Visintin IP, Karassina N, Los G, Liston P, Halaban R, Fadiel A, Mor G: XAF1 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and X-linked inhibitor of apoptosis cleavage by acting through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2007, 282 [17]: 13059-13072.
247. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF: Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991, 352 [6330]: 73-77.
248. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Jr., Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF: Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 1995, 377 [6545]: 173-177.
249. Sun Y, Qiao L, Xia HH, Lin MC, Zou B, Yuan Y, Zhu S, Gu Q, Cheung TK, Kung HF, Yuen MF, Chan AO, Wong BC: Regulation of XAF1 expression in human colon cancer cell by interferon beta: activation by the transcription regulator STAT1. *Cancer Lett* 2008, 260 [1-2]: 62-71.
250. Sun Y, Qiao L, Zou B, Xia HH, Gu Q, Ma J, Lin MC, Zhu Q, Zhu S, Dai Y, Wong BC: Interactions between XIAP associated factor 1 and a nuclear co-activator, CBP, in colon cancer cells. *Digestion* 2008, 77 [2]: 79-86.
251. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R: Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98 [15]: 8662-8667.
252. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A: Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 1010 186-194.
253. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR: Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7 [2]: 85-96.
254. Tautz D, Renz M: An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem* 1983, 132 [1]: 14-19.
255. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ: Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9 [3]: 231-241.
256. Thomas CC, Deak M, Alessi DR, van Aalten DM: High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr Biol* 2002, 12 [14]: 1256-1262.

257. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76 [9]: 4350-4354.
258. Tracey L, Spiteri I, Ortiz P, Lawler M, Piris MA, Villuendas R: Transcriptional response of T cells to IFN-alpha: changes induced in IFN-alpha-sensitive and resistant cutaneous T cell lymphoma. *J Interferon Cytokine Res* 2004, 24 [3]: 185-195.
259. Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME: The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* 2003, 2003 [172]: RE5-
260. Treadway JL, Morrison BD, Soos MA, Siddle K, Olefsky J, Ullrich A, McClain DA, Pessin JE: Transdominant inhibition of tyrosine kinase activity in mutant insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88 [1]: 214-218.
261. Trempe GL: Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res* 1976, [57]: 33-41.
262. Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J, Hemmings BA: Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 2005, 132 [13]: 2943-2954.
263. Ueki K, Kondo T, Kahn CR: Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 2004, 24 [12]: 5434-5446.
264. Van Damme P, Martens L, Van Damme J, Hugelier K, Staes A, Vandekerckhove J, Gevaert K: Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis. *Nat Methods* 2005, 2 [10]: 771-777.
265. Van Hooijdonk CA, Glade CP, Van Erp PE: TO-PRO-3 iodide: a novel HeNe laser-excitable DNA stain as an alternative for propidium iodide in multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 1994, 17 [2]: 185-189.
266. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD: Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 2001, 70 535-602.
267. Vaux DL, Silke J: IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6 [4]: 287-297.
268. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tschlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M: Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002, 8 [10]: 1136-1144.
269. Vinciguerra M, Foti M: PTEN and SHIP2 phosphoinositide phosphatases as negative regulators of insulin signalling. *Arch Physiol Biochem* 2006, 112 [2]: 89-104.

270. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR: Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1999, 103 [7]: 931-943.
271. Vischioni B, van d, V, Span SW, Kruyt FA, Rodriguez JA, Giaccone G: Expression and localization of inhibitor of apoptosis proteins in normal human tissues. *Hum Pathol* 2006, 37 [1]: 78-86.
272. Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002, 2 [7]: 489-501.
273. Vo N, Goodman RH: CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2001, 276 [17]: 13505-13508.
274. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I: Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997, 390 [6658]: 350-351.
275. Vucic D, Fairbrother WJ: The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13 [20]: 5995-6000.
276. Vucic D, Franklin MC, Wallweber HJ, Das K, Eckelman BP, Shin H, Elliott LO, Kadkhodayan S, Deshayes K, Salvesen GS, Fairbrother WJ: Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP. *Biochem J* 2005, 385 [Pt 1]: 11-20.
277. Walczak H, Haas TL: Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex. *Methods Mol Biol* 2008, 414 221-239.
278. Wang J, He H, Yu L, Xia HH, Lin MC, Gu Q, Li M, Zou B, An X, Jiang B, Kung HF, Wong BC: HSF1 down-regulates XAF1 through transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2006, 281 [5]: 2451-2459.
279. Wang J, Peng Y, Sun YW, He H, Zhu S, An X, Li M, Lin MC, Zou B, Xia HH, Jiang B, Chan AO, Yuen MF, Kung HF, Wong BC: All-trans retinoic acid induces XAF1 expression through an interferon regulatory factor-1 element in colon cancer. *Gastroenterology* 2006, 130 [3]: 747-758.
280. Wang KK, Posmantur R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, Talanian RV, Glantz SB, Morrow JS: Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* 1998, 273 [35]: 22490-22497.
281. White MF: The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog Horm Res* 1998, 53 119-138.
282. White MF: The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998, 182 [1-2]: 3-11.
283. White MF: Insulin signaling in health and disease. *Science* 2003, 302 [5651]: 1710-1711.

284. Widmann C, Gibson S, Johnson GL: Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* 1998, 273 [12]: 7141-7147.
285. Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M: Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* 2004, 432 [7020]: 1027-1032.
286. Wu CJ, Conze DB, Li X, Ying SX, Hanover JA, Ashwell JD: TNF-alpha induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO J* 2005, 24 [10]: 1886-1898.
287. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN: TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006, 124 [3]: 471-484.
288. Wyllie AH: Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997, 53 [3]: 451-465.
289. Xia Y, Novak R, Lewis J, Duckett CS, Phillips AC: Xaf1 can cooperate with TNFalpha in the induction of apoptosis, independently of interaction with XIAP. *Mol Cell Biochem* 2006, 286 [1-2]: 67-76.
290. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD: Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 2000, 288 [5467]: 874-877.
291. Yin W, Cheepala S, Clifford JL: Identification of a novel splice variant of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 339 [4]: 1148-1154.
292. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M: Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 2001, 276 [17]: 13935-13940.
293. Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA, Backer JM: Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 1998, 18 [3]: 1379-1387.
294. Yu LF, Wang J, Zou B, Lin MC, Wu YL, Xia HH, Sun YW, Gu Q, He H, Lam SK, Kung HF, Wong BC: XAF1 mediates apoptosis through an extracellular signal-regulated kinase pathway in colon cancer. *Cancer* 2007, 109 [10]: 1996-2003.
295. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ: Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996, 87 [4]: 619-628.
296. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC: Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001, 3 [3]: 245-252.



297. Zou B, Chim CS, Zeng H, Leung SY, Yang Y, Tu SP, Lin MC, Wang J, He H, Jiang SH, Sun YW, Yu LF, Yuen ST, Kung HF, Wong BC: Correlation between the single-site CpG methylation and expression silencing of the XAF1 gene in human gastric and colon cancers. *Gastroenterology* 2006, 131 [6]: 1835-1843.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungen

α-	Anti-
aa	Aminosäuren
AG	Arbeitsgruppe
ANOVA	analysis of variance
AP-1	Activator protein 1
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
APE	Akt-phosphorylation enhancer
aPKC	atypische Proteinkinase C
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	BCL-2-associated death promoter
BAK	BCL-2-antagonist/killer-1
BAX	BCL-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BES	Bisaminoethanesulfon acid-buffered saline
BH	BCL-2 Homology
BHK	Baby hamster kidney Zellen
BID	BH-3 interacting domain death agonist
BIR	Baculovirus IAP (inhibitor of apoptosis) repeat
BIRC	BIR-containing protein
BMP	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAD	caspase-activated deoxyribonuclease
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma- protooncogene product

CBP	CREB-binding protein
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinese hamster ovary Zellen
c-IAP	cellular IAP (inhibitor of apoptosis)
CNBr	Cyanogenbromid
CREB	cAMP response element binding protein
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CsCl	Caesiumchlorid
CTMP	Carboxy-terminal modulator protein
Δ	Deletion von Aminosäuren
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
FADD	Fas-associated death domain protein
Fak	focal adhesion kinase
Fc	fragment crystallizable
FCS	fetales Kälberserum
FOX	forkhead box protein
Ft	fused toe
g	Gramm

G	Gauge
GLUT-4	Glukosetransporter Typ 4
Grb	Growth factor receptor-bound protein
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
HEK	human embryonic kidney Zellen
HeLa	Henrietta Lacks
Hep	Hepatocellular carcinoma
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HSE	heat-shock element
HSF1	heat-shock transcription factor 1
HL	human leukemia
HMW	high molecular weight
H <sub>2</sub> O	Wasser
IAP	inhibitor of apoptosis
ICAD	inhibitor of CAD
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IgG	Immunglobulin G
IκB	inhibitor of κB
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRF	Interferon regulatory factor
IRS	Insulin receptor substrate
ISG	Interferon stimulated gene
ISRE	interferon stimulated response element
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB	lysogeny broth
LPC	Lysophosphatidylcholin
M	Mol
mA	Milliampère

MAP-Kinase	Mitogen-activated protein-Kinase
$\mu\text{Ci}$	Mikrocurie
$\text{Mg}^{2+}$	Magnesium
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex
$\mu\text{l}$	Mikroliter
ml	Milliliter
ML-IAP	melanoma IAP (inhibitor of apoptosis)
$\mu\text{M}$	Mikromol
$\mu\text{mol}$	Mikromolar
mM	Millimol
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC	mTOR complex
MYC	myelocytomatosis viral oncogene homolog
NaCl	Natriumchlorid
NADH	reduziertes Nikotin-Adenin-Dinukleotid
NaI	Natriumiodid
NAIP	neuronal apoptosis inhibitor protein
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	Natriumpyrophosphat
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natronlauge
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	Natriumorthovanadat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
NF- $\kappa\text{B}$	nuclear factor- $\kappa\text{B}$
NIH	National Institutes of Health
NK-Zelle	Natural killer-Zelle
nM	Nanomol
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK	3'-Phosphoinositide-dependent Kinase

Pfx	Pyrococcus furiosus
PgE <sub>2</sub>	Prostaglandin-E <sub>2</sub>
pH	potentia hydrogenii (H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration)
PH	Pleckstrin homology
PI-3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol (4',5')-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3',4',5')-Trisphosphat
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PKB	Protein Kinase B
pmol	pikomolar
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PS	Phosphatidylserin
PTB	Phosphotyrosin-binding
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
Pwo	Pyrococcus woesei
Ras	rat sarcoma
rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
Rin	rat insulinoma
RING	really interesting new gene
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	Src-homology-2
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspases
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SOS	son-of-sevenless
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAB1	TAK1-binding protein-1
TAK1	TGF- $\beta$ activated kinase-1
Taq	Thermus aquaticus

TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TRAF	TNF-receptor-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
Trb3	Tribbles homolog 3
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan-hydrochlorid
TSC	tuberous sclerosis complex
U	Units
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
vs	versus
VSV	vesicular stomatitis virus
v/v	volume for volume
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight
Xaf	XIAP-associated factor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

## 8.2. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### 8.2.1. Abbildungen

Abbildung 1	Übersicht über die Insulin-Signaltransduktion.	8
Abbildung 2	Übersicht über die Apoptose.	12
Abbildung 3	Xaf1 interagiert in HEK-293-Zellen mit Akt1 und Akt2, aber nicht mit Akt3.	70
Abbildung 4	Vergleich der Bindung von Akt an verschiedene Akt-interagierende Proteine.	71
Abbildung 5	Expression von Xaf1 in verschiedenen Zelllinien.	71
Abbildung 6	Akt1 interagiert im GST-pull-down assay mit GST-Xaf1 aa 151-301.	73
Abbildung 7	Akt1 interagiert in HEK-293-Zellen nicht mit Xaf1 aa 1-200-VSV, Xaf1 aa 1-225-VSV und Xaf1 aa 1-250-VSV.	74
Abbildung 8	Die carboxyterminalen 12 Aminosäuren von Xaf1 sind für die Interaktion mit Akt1 verantwortlich.	75
Abbildung 9	Xaf1 interagiert in HEK-293-Zellen mit Akt1 aa 130-480.	76
Abbildung 10	Xaf1 interagiert in HEK-293-Zellen nicht mit Akt1 aa 310-480.	77
Abbildung 11	Xaf1 interagiert in HEK-293-Zellen weder mit Akt1 aa 200-480 noch mit Akt1 aa 260-480.	78
Abbildung 12	Die Aminosäuren 178 bis 200 von Akt1 sind für die Interaktion von Xaf1 in HEK-293-Zellen verantwortlich.	79
Abbildung 13	XIAP-MYC interagiert im GST-pull-down assay mit GST-Xaf1 aa 151-301.	81
Abbildung 14	XIAP-MYC interagiert in HEK-293-Zellen mit Xaf1 aa 1-200 und Xaf1 aa 1-250.	82
Abbildung 15	XIAP-MYC interagiert in HEK-293-Zellen mit Xaf1 aa 166-301, nicht aber mit Xaf1 aa 182-301.	83
Abbildung 16	Die Aminosäuren 179 bis 181 von Xaf1 sind für die Interaktion mit XIAP verantwortlich.	83
Abbildung 17	Stabile Expression von Xaf1, Xaf1-VSV und Xaf1 aa 1-289-VSV in C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -Zellen.	85
Abbildung 18	Die Expression von Xaf1 in C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -Zellen ist während der Expansion wenig stabil.	86
Abbildung 19	Stabile Expression von Xaf1, Xaf1 aa 1-289 und Xaf1 $\Delta$ aa 179-181 in HeLa-Zellen.	87
Abbildung 20	Xaf1-Überexpression verstärkt die Phosphorylierung von Akt1-Threonin 308 in C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -Zellen.	89
Abbildung 21	Xaf1-Überexpression verursacht Änderungen in der Tyrosinphosphorylierung insulinstimulierter C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -Zellen.	90
Abbildung 22	Überexprimiertes Xaf1 ist in C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -Zellen um den Zellkern lokalisiert.	92
Abbildung 23	In C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -Zellen ist überexprimiertes XIAP-MYC in Aggregaten im Zytoplasma lokalisiert.	93
Abbildung 24	Gemeinsame Überexpression von Xaf1 und XIAP-MYC in C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -Zellen führt zu einer Verlagerung beider Proteine in spiralförmige Aggregate im Zytoplasma und in Aggregate um den Zellkern.	93



Abbildung 25	Gemeinsame Überexpression von Xaf1 und Akt1-MYC in C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> -Zellen führt zu einer Verschiebung von Xaf1 ins gesamte Zytoplasma durch Zusammenlagerung mit Akt1.	94
Abbildung 26	Aufgehobene Interaktion von Xaf1 mit Akt1 verringert die Xaf1-vermittelte Apoptose-Verstärkung in HeLa-Zellen.	96

### 8.2.2. Tabellen

Tabelle 1	Oligonukleotide	37
Tabelle 2	Expressionskonstrukte	39
Tabelle 3	Vektoren	41
Tabelle 4	Zelllinien	41
Tabelle 5	Bakterienstämme	42
Tabelle 6	P-Werte des Versuches, der in Abbildung 24 dargestellt ist.	97

### 8.3. Danksagungen

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die diese Promotionsarbeit mit Rat, durch fachkundige Diskussion und hilfreiche Unterstützung gefördert haben.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn PD Dr. rer. nat. Reiner Lammers** für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die hervorragende Betreuung und für seine Unterstützung, die er mir in jeder Phase der Arbeit breitwillig gewährte.

**Herrn Prof. Dr. med. Hans-Ulrich Häring** danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die guten Arbeitsbedingungen, den interessanten Forschungsschwerpunkt und das angenehme Klima in seiner Abteilung der Medizinischen Klinik.

Bei **Herrn Dr. med. Peter Weyrich** bedanke ich mich herzlich für Anregungen, motivierende Gespräche und Unterstützung bei der statistischen Analyse. Den Wissenschaftlern aus den Nachbarlabors **Herrn Dr. med. Karsten Müssig**, **Herrn PD Dr. rer. nat. Harald Staiger** und **Frau Dr. med. Katrin Staiger** möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft danken.

**Frau Prof. Dr. med. Reinhild Klein** danke ich für interessante Gespräche und Anregungen und für die Möglichkeit, Geräte in ihrem Labor verwenden zu können.

Weiter möchte ich mich bei den Mitarbeitern im Labor, **Martina Melzer**, **Mary-Ann Schneider** und **Dorothee Neuscheler** herzlich für Anregungen und Hilfe bedanken.

Danken möchte ich auch den anderen Studenten im Labor **Sandra Beck**, **Marc Becker**, **Hendrik Fiedler**, **Angelika Hartung**, **Xuehui He**, **Anna-Maria Kovacs**, **Jan Niederländer**, **Angela Queisser**, **Vera Sippel** und **Annika Sunnanväder** für gegenseitige Unterstützung, Ratschläge und die gute Stimmung.

Nicht zuletzt danke ich dem **DFG-Graduiertenkolleg 794** „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ für die freundliche Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

**Meiner Familie und meinen Freunden bin ich sehr dankbar für ihr Verständnis und ihre Unterstützung. Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mir mein Studium und die Promotion ermöglicht haben und mich immer in allem unterstützen.**

## 8.4. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Martin Heni  
 Geburtsdatum / -ort: 26.01.1981 in Schwäbisch Hall

### Schulische Ausbildung:

1987-1991 Grund- und Hauptschule Gerabronn  
 1991-1992 Gymnasium Gerabronn  
 1992-1997 Realschule Blaufelden, 1997 Mittlere Reife  
 1997-2000 Ev. kirchl. Aufbaugymnasium Michelbach/Bilz, 2000 Abitur

### Zivildienst:

2000-2001 Paul-Lechler-Krankenhaus/DIfäM in Tübingen

### Studium:

2001-2003 Vorklinischer Studienabschnitt der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald, 2003 Physikum  
 2003-2008 Klinischer Studienabschnitt der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen  
 8.5.2008 Ärztliche Prüfung  
 2008 Approbation als Arzt

### Weiterbildung:

seit 2008 Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik IV, Universitätsklinikum Tübingen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Häring)