

**Isoform-spezifische Funktion und Regulation der  
Proteinkinase-Aktivität G-Protein-regulierter  
Phosphatidylinositol-3-Kinasen**

**Dissertation**  
zur Erlangung des akademischen Grades **doctor rerum naturalium**  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der **Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von **Cornelia Czupalla**  
geboren am **27. August 1970 in Erfurt**

1. Gutachter: Prof. Dr. A.G. Beck-Sickinger (Leipzig)
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg (Düsseldorf)
3. Gutachter: Prof. Dr. R. Wetzker (Jena)

Tag der Disputation: 01.07.2002

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Allgemeine Prinzipien der zellulären Kommunikation</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>G-Protein-abhängige Signaltransduktion</b>	<b>4</b>
1.2.1	Aufbau und Funktion von G-Proteinen	4
1.2.1.1	G $\alpha$ -Untereinheit	4
1.2.1.2	G $\beta$ - und G $\gamma$ -Untereinheit	6
1.2.2	G $\beta\gamma$ -regulierte Effektoren	8
<b>1.3</b>	<b>PI-3-Kinasen</b>	<b>10</b>
1.3.1	Die Familie der PI-3-Kinasen	10
1.3.2	Struktur und Regulation von Klasse I PI-3-Kinasen	11
1.3.3	Zelluläre Effekte der Lipidprodukte von Klasse I PI-3-Kinasen	16
1.3.4	Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen	19
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>22</b>
3.1	Hersteller und Lieferanten	22
3.2	Chemikalien	22
3.3	Enzyme, Proteine, Peptide und andere biologisch aktive Substanzen	24
3.4	Radioaktiv markierte Substanzen	25
3.5	Zellen	25
3.6	Zellkulturmedien und Zusätze	25
3.7	Vektoren	25
3.8	DNA- und Proteinstandards	26
3.9	Reinigungs- und Trennmaterialien	26
3.10	Membranen/Filter	26
3.11	Filmmaterial	26
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>27</b>
4.1.1	Medien für die Bakterienkultur	27
4.1.2	Herstellung des Baculovirus-Transferplasmids für die Hexahistidin-markierte p110 $\beta$ -Untereinheit	28
4.1.3	Ortsgerichtete Mutagenese	28

---

<b>4.2</b>	<b>Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen</b>	<b>29</b>
4.2.1	Transposition und Isolation rekombinanter Bacmid-DNA	31
4.2.2	Kultivierung von <i>Sf9</i> -Zellen	31
4.2.3	Transfektion von <i>Sf9</i> -Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA	32
4.2.4	Amplifikation rekombinanter Viren	32
4.2.5	Titerbestimmung von Viruslösungen	32
4.2.6	Infektion von <i>Sf9</i> -Zellen	33
<b>4.3</b>	<b>Säugerzellkultur und transiente Transfektion</b>	<b>33</b>
4.3.1	HL-60-Zellkultur	33
4.3.2	HEK293-Zellkultur und transiente Transfektion	34
<b>4.4</b>	<b>Bestimmung der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion in HL-60-Zellen</b>	<b>34</b>
<b>4.5</b>	<b>Reinigung rekombinanter Proteine</b>	<b>35</b>
4.5.1	Präparation von Cytosol und Zellmembranen	35
4.5.2	Affinitätschromatographie	35
4.5.2.1	Reinigung rekombinanter Hexahistidin-markierter Gβ <sub>1</sub> γ <sub>2</sub> -Komplexe	35
4.5.2.2	Reinigung rekombinanter Hexahistidin-markierter PI-3-Kinasen	36
4.5.2.3	Reinigung rekombinanter GST-fusionierter PI-3-Kinasen	36
4.5.3	Anionenaustausch-Chromatographie	36
<b>4.6</b>	<b>Immunpräzipitation</b>	<b>36</b>
<b>4.7</b>	<b>Proteinbiochemische Analyse-Methoden</b>	<b>37</b>
4.7.1	Proteinbestimmung	37
4.7.2	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
4.7.3	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	38
4.7.4	Immunoblot	39
<b>4.8</b>	<b>PI-3-Kinase-Funktionsbestimmung</b>	<b>39</b>
4.8.1	Herstellung der Phospholipid-Vesikel	40
4.8.2	Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität	40
4.8.3	Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität	41
<b>4.9</b>	<b>Phosphoaminosäure-Analyse</b>	<b>41</b>
<b>4.10</b>	<b>Massenspektrometrische Methoden</b>	<b>42</b>
4.10.1	Spaltung der Gel-fixierten Proteine	42
4.10.2	Aufreinigung der peptidhaltigen Lösung mittels ZipTip	42
4.10.3	<i>Reversed phase</i> -HPLC	43
4.10.4	MALDI-MS	43
4.10.5	Massenspektrometrische Peptidsequenzierung	43

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase <math>\gamma</math></b>	<b>44</b>
5.1.1	G $\beta\gamma$ -Sensitivität der Autophosphorylierung	44
5.1.2	Stöchiometrie der Autophosphorylierung	46
5.1.3	Einfluß der Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit auf die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase $\gamma$	48
<b>5.2</b>	<b>Identifizierung der Phosphorylierungsstelle der p110<math>\gamma</math>-Untereinheit</b>	<b>49</b>
5.2.1	Phosphoaminosäure-Analyse	49
5.2.2	Identifizierung des phosphorylierten Serin-Restes	50
5.2.2.1	Analyse verschiedener proteolytischer Spaltungen der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit	50
5.2.2.1.1	Proteolytisches Abbaumuster der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit	51
5.2.2.1.2	MALDI-MS-Analyse der Protease-Spaltungen	52
5.2.2.2	Isolierung und MALDI-MS-Analyse von Phosphopeptiden	55
5.2.2.2.1	Effektivität der Gewinnung von Phosphopeptiden nach proteolytischer Spaltung der Gel-fixierten phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit	56
5.2.2.2.2	Isolierung von Phosphopeptiden durch <i>reversed phase</i> -HPLC	58
5.2.2.3	Massenspektrometrische Sequenzierung eines C-terminalen Phosphopeptids der p110 $\gamma$ -Untereinheit	61
5.2.3	Lipid- und Proteinkinase-Aktivität von PI-3-Kinase $\gamma$ -Mutanten	62
<b>5.3</b>	<b>Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase <math>\beta</math></b>	<b>64</b>
5.3.1	Charakterisierung der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase $\beta$	64
5.3.2	Identifizierung der Phosphorylierungsstelle der p110 $\beta$ -Untereinheit	67
5.3.3	Lipid- und Proteinkinase-Aktivität von PI-3-Kinase $\beta$ -Mutanten	70
<b>5.4</b>	<b>Mechanismus der Autophosphorylierung G<math>\beta\gamma</math>-sensitiver PI-3-Kinasen</b>	<b>72</b>
<b>5.5</b>	<b><i>In vivo</i>-Autophosphorylierung der PI-3-Kinase <math>\gamma</math></b>	<b>74</b>
5.5.1	Nachweis der PI-3-Kinase $\gamma$ in HL-60-Zellen	74
5.5.2	Biochemische Charakterisierung der in HL-60-Zellen enthaltenen PI-3-Kinase $\gamma$	76
5.5.3	<i>In vivo</i> -Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase $\gamma$	77
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>81</b>
<b>6.1</b>	<b>Mechanismen der Spezifität PI-3-Kinase-abhängiger Signalwege</b>	<b>81</b>
<b>6.2</b>	<b><i>In vitro</i>-Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen</b>	<b>84</b>
<b>6.3</b>	<b>Mechanismus der Autophosphorylierung</b>	<b>90</b>
<b>6.4</b>	<b>Zellbiologisch-funktionelle Konsequenzen der Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen</b>	<b>92</b>

---

<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>100</b>
	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN</b>	<b>122</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>124</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>125</b>

**ABKÜRZUNGEN, BEGRIFFE**

Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	(engl.) bovine serum albumin; Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-3':5'-monophosphat
Ci	Curie
cpm	(engl.) counts per minute; gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
CTX	Choleratoxin, Exotoxin von <i>Vibrio cholerae</i>
DAG	Diacylglycerol
dbt-cAMP	N <sup>6</sup> ,2'-O-Dibutyryl-3':5'-adenosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	Konzentration eines Wirkstoffs, bei der die Hälfte des maximal möglichen Effektes erreicht wird
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Bakterienzellen
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Bis(aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'-tetraessigsäure
engl.	englisch; Bezeichnung im Englischen
(x) g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GABA	γ-Aminobuttersäure
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
G-Protein	heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	(engl.) hours; Stunden
HEK293-Zellen	humane embryonale Nieren-Zelllinie
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HL-60-Zellen	humane Promyelozytenleukämie-Zelllinie
HPLC	(engl.) high pressure liquid chromatography; Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Lubrol PX	Polyoxyethylen-(9)-laurylether
M	mol pro Liter
MALDI	(engl.) matrix-assisted laser desorption/ionization
min	Minuten
MOI	(engl.) multiplicity of infection; Virus/Zellverhältnis
MS	Massenspektrometrie
nESI-MS/MS	Nanoelektrospray-Tandem-Massenspektrometrie
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Nickel-Nitrilotetraacetat

p85	Prototyp der nicht-katalytischen Untereinheit der Klasse I <sub>A</sub> PI-3-Kinasen $\alpha$ , $\beta$ und $\delta$
p101	nicht-katalytische Untereinheit der Klasse I <sub>B</sub> PI-3-Kinase $\gamma$
p110	katalytische Untereinheit der Klasse I PI-3-Kinasen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	(engl.) phosphate-buffered saline; NaCl/Phosphatpuffer
PCR	(engl.) polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
pfu	Anzahl der Viren, die zur Bildung von Plaques führen (plaque forming unit)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Konzentration in wässriger Lösung
PLC	Phospholipase C
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PSD	(engl.) post-source decay; metastabile Fragmentierung von Ionen in der feldfreien Driftstrecke eines MALDI-TOF-Massenspektrometers
PTX	Pertussistoxin, Exotoxin von <i>Bordetella pertussis</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
s	Sekunden
S.D.	(engl.) standard deviation; Standardabweichung
SDS	(engl.) sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat
Sf9-Zellen	Ovarialzelllinie des Insekts <i>Spodoptera frugiperda</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	(engl.) time of flight; Flugzeit-Massenanalysator
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
TPCK	N-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-monolaurat
Tyr-P-Peptid	aus der p85-Bindungsregion des PDGF-Rezeptors abgeleitetes, zweifach Tyrosin-phosphoryliertes Peptid
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent (Gewicht/Volumen)

Aminosäuren sind im Text im Dreibuchstaben-Code abgekürzt; in Tabellen und Abbildungen wird auch der Einbuchstaben-Code verwendet:

<b>A</b>	<b>Ala</b>	Alanin	<b>C</b>	<b>Cys</b>	Cystein	<b>D</b>	<b>Asp</b>	Asparaginsäure
<b>E</b>	<b>Glu</b>	Glutaminsäure	<b>F</b>	<b>Phe</b>	Phenylalanin	<b>G</b>	<b>Gly</b>	Glycin
<b>H</b>	<b>His</b>	Histidin	<b>I</b>	<b>Ile</b>	Isoleucin	<b>K</b>	<b>Lys</b>	Lysin
<b>L</b>	<b>Leu</b>	Leucin	<b>M</b>	<b>Met</b>	Methionin	<b>N</b>	<b>Asn</b>	Asparagin
<b>P</b>	<b>Pro</b>	Prolin	<b>Q</b>	<b>Gln</b>	Glutamin	<b>R</b>	<b>Arg</b>	Arginin
<b>S</b>	<b>Ser</b>	Serin	<b>T</b>	<b>Thr</b>	Threonin	<b>V</b>	<b>Val</b>	Valin
<b>W</b>	<b>Trp</b>	Tryptophan	<b>Y</b>	<b>Tyr</b>	Tyrosin			



# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Kommunikation**

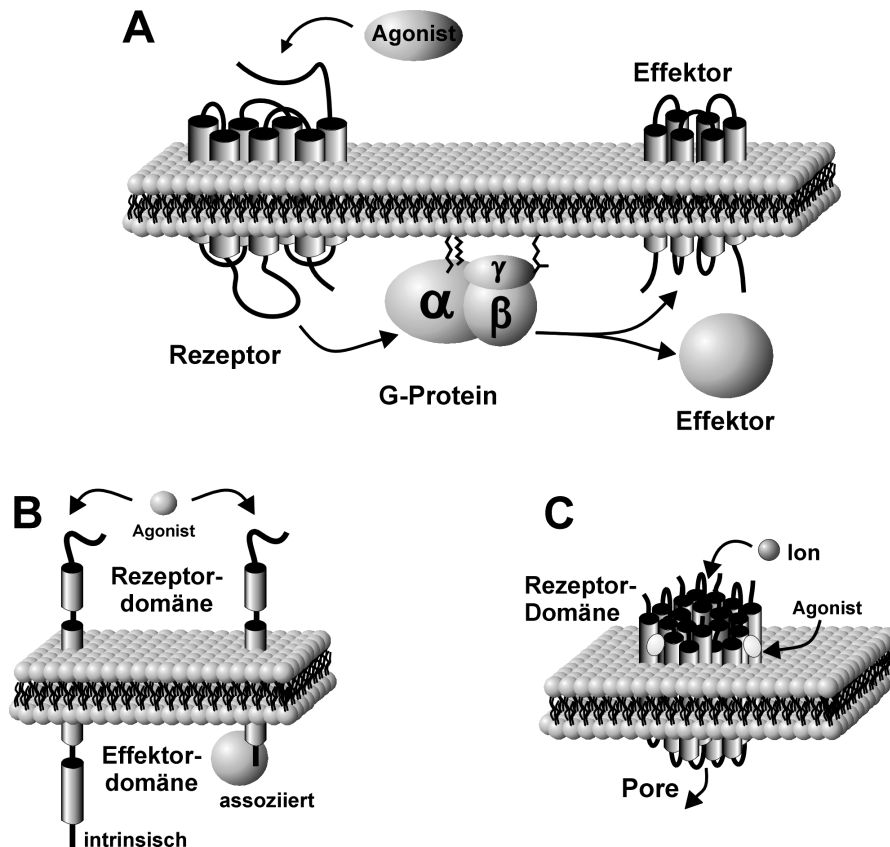
Die Basis für die Funktion vielzelliger Organismen bildet deren Fähigkeit zur Wahrnehmung von Signalen ihrer Umwelt und zum Informationsaustausch zwischen den Zellen des Organismus. Als Informationsträger für die interzelluläre Kommunikation dienen elektrische Signale sowie Hunderte verschiedener Signalmoleküle wie z.B. Proteine, Peptide, Aminosäuren, Zucker, Nukleotide, Steroide, Fettsäurederivate und lösliche Gase wie Stickstoffmonoxid. Diese Signalmoleküle verlassen die signalisierende Zelle über Exocytose bzw. Diffusion durch die Plasmamembran oder bleiben an der Zelloberfläche gebunden und geben das Signal über direkten Kontakt zwischen den Zellen weiter.

Die Signalmoleküle werden durch spezifische Rezeptoren, die sich an der Zelloberfläche oder im Inneren der Zielzelle befinden, gebunden. So sind die Rezeptoren für Schilddrüsen- und Steroidhormone, die aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften die Zellmembran leicht überwinden können, intrazellulär lokalisiert (Evans, 1988, Parker, 1993). Die meisten Signalmoleküle sind jedoch hydrophiler Natur und können daher die Zellmembran nicht überwinden. Die Rezeptoren für diese Liganden sind plasmamembranständig und generieren nach Bindung des Signalmoleküls an den extrazellulären Bereich des Rezeptors u.a. einen sekundären Botenstoff im Inneren der Zelle. Je nach Mechanismus dieser Umwandlung eines extrazellulären in ein intrazelluläres Signal kann man verschiedene Klassen von membranständigen Rezeptoren unterscheiden (Abb. 1).

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind am schnellen synaptischen Signalprozeß zwischen elektrisch erregbaren Zellen beteiligt (siehe Abb. 1C). Sie weisen eine multimere Struktur auf und binden an ihren extrazellulären Bereichen sog. Neurotransmitter, was zu einer kurzzeitigen Veränderung der Permeabilität der Kanalpore für bestimmte Ionen führt. So sind nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren, ionotrope Glutamat-Rezeptoren oder ein Serotonin-Rezeptor (5-HT<sub>3</sub>-R) im aktivierten Zustand für Kationen durchlässig, während die Pore des  $\gamma$ -Aminobuttersäure- (GABA<sub>A</sub>) und des Glycin-Rezeptors nur für Anionen passierbar ist (Kotzyba-Hilbert et al., 1999, MacDermott et al., 1999, Whiting et al., 1999). Die zelluläre Antwort wird durch das veränderte Membranpotential der entsprechenden Ionen ausgelöst.

Enzym-gekoppelte Rezeptoren durchspannen die Zellmembran nur einmal (siehe Abb. 1B) und weisen im intrazellulären Bereich eine Domäne auf, die selbst eine Enzymaktivität besitzt oder lösliche Enzyme rekrutieren kann. Zu dieser Klasse gehören neben Rezeptor-Guanylyl-Cyclasen (Garbers et al., 1994), Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen (ten Dijke et al., 1996) und Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen (Streuli, 1996) auch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, zu denen die meisten Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie der Insulin-, der EGF (*epidermal growth factor*)- oder der PDGF (*platelet derived growth factor*)-Rezeptor zu

rechnen sind (Songyang und Cantley, 1995). Die Signalweiterleitung erfolgt bei diesen Rezeptoren durch Tyrosin-Phosphorylierung spezifischer Proteinsubstrate bzw. durch Bindung von Adaptorproteinen an die phosphorylierten Domänen des Rezeptors. Bei anderen Rezeptoren, wie z.B. dem TNF (*tumor necrosis factor*)-Rezeptor, dessen Rezeptordomäne mit einer intrazellulär lokalisierten Tyrosin-Kinase assoziiert ist (Taniguchi et al., 1995), werden Rezeptor- und Effektorfunktion von zwei verschiedenen Proteinen übernommen.



**Abb. 1: Ausgewählte Prinzipien der Signaltransduktion durch Zelloberflächen-Rezeptoren**

Extrazelluläre Stimuli können über verschiedene Rezeptorklassen intrazelluläre Effekte auslösen. Die Klasse der **G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (A)** benötigt zur Weiterleitung des Signals an Effektoren ein zusätzliches Schaltermolekül, das sog. G-Protein. Die modulierten Effektoren können ihrerseits membranständig oder cytosolisch lokalisiert sein. **Enzym-gekoppelte Rezeptoren (B)** besitzen entweder selbst eine katalytische Aktivität oder sind mit Enzymen assoziiert. Bei **Liganden-gesteuerten Ionenkanälen (C)** bilden die extrazelluläre Rezeptordomäne und die Kanalpore, die durch den Liganden gesteuert wird, prinzipiell eine molekulare Einheit.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bilden die größte Familie integraler Membranproteine, die in die Signaltransduktion involviert ist, und können eine Vielzahl von strukturell sehr divergenten Liganden binden. Diese umfassen neben biogenen Aminen (z.B. Histamin), Aminosäuren (z.B. Glutaminsäure), Peptiden (z.B. fMLP), Nukleotiden (z.B. ADP), Fettsäurederivaten (z.B. Thromboxan A<sub>2</sub>) oder Phospholipidderivaten (z.B. Lysophosphatidsäure) auch externe sensorische Stimuli wie Lichtquanten, die über das am Rhodopsin-Rezeptor

gebundene Retinal aktivierend wirken, sowie Geschmacks- (z.B. Glucose) und Geruchsstoffe (Ji et al., 1998).

Die Vertreter dieser Rezeptorfamilie weisen charakteristische gemeinsame Strukturmerkmale auf. Sie durchspannen die Cytoplasmamembran siebenfach durch  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen und werden daher auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet. Die dreidimensionale Struktur konnte im Rahmen von Röntgenstruktur-Analysen des kristallisierten Rhodopsins in jüngster Zeit aufgeklärt werden (Palczewski et al., 2000). Der strukturell sehr variable N-terminale Abschnitt trägt zur Bildung der extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne bei, während der C-Terminus cytosolisch lokalisiert ist (Unger et al., 1997). Im Gegensatz zu Vertretern anderer Rezeptorklassen besitzen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren keine Effektdomäne. Sie aktivieren stattdessen ein trimeres Guanin-nukleotid-bindendes Regulatorprotein (G-Protein), das seinerseits in der Lage ist, die Aktivität von Effektoren zu modulieren (Gudermann et al., 1995, Wess, 1997). Diese können sowohl membranständig, wie z.B. Ionenkanäle und Adenylyl-Cyclasen, als auch cytosolisch lokalisiert sein, wie z.B. Phospholipase C- (PLC) oder Phosphatidylinositol-3-Kinase- (PI3K) Isoformen (siehe Abb. 1A und Hamm, 1998). Die Modulation dieser Effektorproteine bewirkt eine Konzentrationsänderung der von ihnen gebildeten intrazellulären Botenstoffe, die, wie z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ , cyclisches AMP (cAMP) oder Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ), ins Cytoplasma diffundieren oder, wie z.B. Diacylglycerol (DAG) oder Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat ( $\text{PI-3,4,5-P}_3$ ), in der Membran verbleiben.

Darüber hinaus kann über die Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in andere Rezeptor-vermittelte Signalwege eingegriffen werden („cross-talk“). So erfolgt z.B. eine Liganden-unabhängige Transaktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und damit eine Aktivierung mitogener Signalwege (Liebmann, 2001a). Die Tyrosin-Phosphorylierung und damit Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen kann sowohl über  $\text{G}\alpha_q$ -Untereinheiten als auch über aus  $\text{G}_i$  freigesetzte  $\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt werden (Daub et al., 1997, Herrlich et al., 1998). Mögliche weitere Mediatoren der Rezeptor-Transaktivierung sind die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen Src (Luttrell et al., 1997) und Pyk2 (Dikic et al., 1996). Weiterhin konnte nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren eine Metalloproteinase-abhängige Spaltung von proHB-EGF gezeigt werden (Prenzel et al., 1999), die über die Freisetzung von HB-EGF, einem Mitglied der EGF-Familie, zur Aktivierung von EGF-Rezeptoren benachbarter Zellen führte. Somit können die verschiedenen Familien membranständiger Rezeptoren nicht unabhängig voneinander betrachtet werden, da die von ihnen aktivierten Signalwege ein Netzwerk vielfacher Wechselwirkungen ausbilden.

## 1.2 *G-Protein-abhängige Signaltransduktion*

### 1.2.1 *Aufbau und Funktion von G-Proteinen*

G-Proteine leiten die Signale von heptahelikalen Rezeptoren an Effektoren im Zellinneren weiter und sind an der Innenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert. Sie bestehen aus einer  $G\alpha$ -Untereinheit, die Guaninnukleotide bindet und eine intrinsische GTPase-Aktivität aufweist, und aus einem  $G\beta\gamma$ -Dimer, das unter physiologischen Bedingungen nicht dissoziiert (Sondek et al., 1996, Clapham und Neer, 1997, Sunahara et al., 1997). Im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand liegt das G-Protein als Heterotrimer vor und ist mit dem heptahelikalen Rezeptor assoziiert. Nach der Ligandenbindung an den Rezeptor kommt es infolge einer Konformationsänderung des Rezeptors und des assoziierten G-Proteins zur Öffnung der Guaninnukleotid-Bindungstasche und damit zum Austausch von GDP gegen GTP. Dies bewirkt eine verringerte Affinität von  $G\alpha$  zu  $G\beta\gamma$  und damit die Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in zwei funktionelle Einheiten, die GTP-gebundene  $G\alpha$ -Untereinheit und ein  $G\beta\gamma$ -Dimer (Gilman, 1987). Beide Untereinheiten können nun unabhängig voneinander mit Effektoren wechselwirken und diese modulieren. Eine Modifikation dieses Modells besagt, dass die G-Protein-Untereinheiten auch nach der Aktivierung assoziiert bleiben, aber eine offenere Konformation einnehmen, die Effektorbindungs-Domänen freigibt und damit die Wechselwirkung der  $G\alpha$ -Untereinheit und des  $G\beta\gamma$ -Dimers mit Effektoren ermöglicht (Rebois et al., 1997). Die Terminierung der Signalweitergabe erfolgt durch die Hydrolyse des GTP zu GDP durch die GTPase-Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheit, die durch verschiedene Effektoren sowie RGS (*regulators of G protein signaling*)-Proteine beschleunigt werden kann (Ross und Wilkie, 2000). Die  $G\alpha$ -Untereinheit nimmt ihre ursprüngliche, inaktive Konformation ein, wodurch die Affinität zu den Effektoren sinkt und zu  $G\beta\gamma$  steigt.  $G\alpha$  und  $G\beta\gamma$  reassoziieren zum Heterotrimer. Nach Bindung an den Rezeptor können nun weitere Zyklen durchlaufen werden. Dabei kann ein Agonist-besetzter Rezeptor mehrere G-Proteine aktivieren, wodurch es zu einer Signalverstärkung kommt (Nürnberg et al., 1995). Die Regulation der Aktivität des Liganden-besetzten Rezeptors kann über eine Phosphorylierung des Rezeptors durch eine G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase (GRK) erfolgen, in die  $G\beta\gamma$ -Dimere involviert sind (Pitcher et al., 1992).

#### 1.2.1.1 *$G\alpha$ -Untereinheit*

Die Klassifizierung von G-Proteinen erfolgt anhand von DNA-Sequenzhomologien der  $G\alpha$ -Untereinheit des jeweiligen G-Proteins (Simon et al., 1991, Wilkie et al., 1992). Es werden vier Familien unterschieden, die als  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$  bezeichnet werden (Tab. 1).  $G\alpha$ -Untereinheiten unterscheiden sich sowohl in ihrer molaren Masse (39-52 kDa) als auch in

ihrer Rezeptor- und Effektorspezifität sowie in ihrer Sensitivität gegenüber bakteriellen Toxinen.

G-Proteine der  $G_s$ -Familie stimulieren die Adenylylcyclase (Jones und Reed, 1989, Sunahara et al., 1996, Belluscio et al., 1998) und zeigen eine für diese Familie typische CTX-Sensitivität. Die Familie der  $G_i$ -Proteine ist im wesentlichen PTX-sensitiv und umfaßt neben  $G_i$ - und  $G_o$ -Isoformen auch  $G_z$ , Transduzin-Isoformen und Gustduzin (Kazirot et al., 1991, Exner et al., 1999).

**Tab. 1: Klassifizierung der heterotrimeren G-Proteine nach ihren  $G\alpha$ -Untereinheiten**

Familie	Subtyp <sup>1</sup>	Vorkommen	Effektoren <sup>2</sup>	PTX-/CTX-Sensitivität <sup>3</sup>
<b>G<sub>s</sub></b>	$G_{s(s),s(l)}$	ubiquitär	AC ↑ Ca <sup>2+</sup> -Kanal ↑	CTX
	$G_{s(xl)}$	?	AC ↑	CTX
	$G_{olf}$	olfaktorisches Epithel	AC ↑	CTX
<b>G<sub>i</sub></b>	$G_{t(r,c)}$ <sup>4</sup>	Retina	cGMP-PDE ↑	CTX, PTX
	$G_{gust}$	Geschmacksknospen	cGMP-PDE ↑?	CTX, PTX
	$G_{i1}$	überwiegend neuronal	AC ↓ K <sup>+</sup> -Kanal ↑	PTX, (CTX)
	$G_{i2}, i2(l)$	ubiquitär	AC ↓, PI3K ↑ K <sup>+</sup> -Kanal ↑	PTX <sup>5</sup> , (CTX)
	$G_{i3}$	überwiegend nicht-neuronal	AC ↓, PI3K ↑ K <sup>+</sup> -Kanal ↑	PTX, (CTX)
	$G_{o1}, o2, o3$	neuronal, endokrin	Ca <sup>2+</sup> -Kanal ↓ rap1GAP ↑	PTX, (CTX)
$G_z$	neuronal, endokrin, Thrombozyten	AC ↓? rap1GAP (?)		
<b>G<sub>q</sub></b>	$G_q$	ubiquitär	PLC-β ↑	
	$G_{11}$	nicht-hämatopoetische Zellen	PLC-β ↑	
	$G_{14}$	Hoden, Milz, Nieren	PLC-β ↑	
	$G_{15/16}$ <sup>6</sup>	hämatopoetische Zellen	PLC-β ↑	
<b>G<sub>12</sub></b>	$G_{12}$	ubiquitär	Rho-GEF ↑	
	$G_{13}$	ubiquitär	Rho-GEF ↑	

<sup>1</sup> (s) und (l) bezeichnen kurze bzw. lange Spleißvarianten der entsprechenden  $G\alpha$ -Untereinheit, (xl) bezeichnet eine Variante von  $G\alpha_s$  mit 74 kDa.

<sup>2</sup> AC: Adenylylcyclase; cGMP-PDE: cGMP-spaltende Phosphodiesterase; PLC-β: Phospholipase C-β; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; Rho-GEF: Guaninnukleotid-Austausch-Faktor der monomeren GTPase Rho; ↑ = Stimulation; ↓ = Hemmung.

<sup>3</sup> PTX = Pertussistoxin-sensitiv; CTX = Cholera-toxin-sensitiv; (CTX) = CTX-sensitiv nur in Anwesenheit Agonist-besetzter Rezeptoren.

<sup>4</sup>  $G_{t(r)}$  und  $G_{t(c)}$  bezeichnen Transduzine in Stäbchen- (engl.: „rod“) und Zapfenzellen (engl. „cone“) der Retina.

<sup>5</sup>  $G_{i2(l)}$  zeigt keine Pertussistoxin-Sensitivität.

<sup>6</sup>  $G\alpha_{15/16}$  sind Speziesvarianten von Maus bzw. Mensch.

Während  $G_i$ - und möglicherweise auch  $G_z$ -Proteine die Adenylylcyclase hemmen (Taussig und Gilman, 1995), spielt die  $G_o$ -Subfamilie eine Rolle bei der Hemmung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle und des vesikulären Amintransporters (Kalkbrenner et al., 1996, Ahnert-Hilger et al., 1998) sowie bei der Regulation der monomeren GTPase Rap durch direkte Interaktion mit Rap1GAP (Jordan et al., 1999). Transduzin, das von Licht-aktiviertem Rhodopsin stimuliert wird, aktiviert seinerseits eine cGMP-abhängige Phosphodiesterase (Kaupp und Koch, 1992). Das nahe verwandte Gustduzin vermittelt in olfaktorischen Sinneszellen die Geschmacksqualitäten bitter und süß (Wong et al., 1996). Proteine der  $G_q$ -Familie stimulieren Phospholipasen vom C- $\beta$ -Typ. Daher wird angenommen, dass diese G-Protein-Familie für die PTX-insensitive, durch  $IP_3$ -vermittelte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern verantwortlich ist (Blank et al., 1991, Smrcka et al., 1991, Kozasa et al., 1993, Lee und Rhee, 1995). Beide Mitglieder der  $G_{12}$ -Familie sind ebenfalls PTX-insensitiv und werden zwar ubiquitär, aber nur in geringen Mengen exprimiert (Strathmann und Simon, 1991, Spicher et al., 1994). Funktionell bedeutend für diese G-Protein-Familie sind u.a. die Stimulation des  $Na^+/H^+$ -Austauschers (Dhanasekaran et al., 1994), die Regulation von c-Jun-N-terminalen Kinasen (Prasad et al., 1995) und die Aktivierung von Rho-Proteinen (Gohla et al., 1997, 1998). Direkte Effektoren sind Guaninnukleotid-Austauschfaktoren des Rho, z.B. p115RhoGEF (Chen et al., 2001, Wells et al., 2001). Die aufgeführten Befunde werden auch durch Studien an Gen-deletierten Mäusen bestätigt (Offermanns, 2001).

### **1.2.1.2 $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit**

$G\beta\gamma$ -Komplexe besitzen im Gegensatz zu  $G\alpha$ -Untereinheiten keine intrinsische Enzymaktivität und sind wesentlich lipophiler. Wie bei den  $G\alpha$ -Untereinheiten werden auch bei den  $G\beta$ - und  $G\gamma$ -Untereinheiten verschiedene Isoformen unterschieden, die anhand von DNA-Sequenzhomologien einzelnen Subfamilien zugeordnet werden (Tab. 2).  $G\beta$ -Untereinheiten weisen eine Molmasse von 35-39 kDa auf, während  $G\gamma$ -Untereinheiten mit 6-8 kDa deutlich kleiner sind. Die  $G\beta$ -Familie umfaßt einschließlich Spleißvarianten mittlerweile 7 Mitglieder, während bislang 12 verschiedene  $G\gamma$ -Untereinheiten bekannt sind, deren jüngster Vertreter,  $G\gamma_{13}$ , erst kürzlich kloniert und charakterisiert wurde (Sondek et al., 1996, Huang et al., 1999, Schwindinger und Robishaw, 2001).

Die  $G\beta$ -Isoformen 1-4 weisen eine Aminosäureidentität von 78-88 % auf. Dieser hohe strukturelle Verwandtschaftsgrad äußert sich auch in der Einheitlichkeit ihrer funktionellen Eigenschaften. Bisher konnten keine signifikanten Unterschiede in der Wechselwirkung mit Effektoren,  $G\alpha$ -Untereinheiten oder Rezeptoren festgestellt werden (Gautam et al., 1998). Hingegen zeigt  $G\beta_5$  nur 51-53 % Aminosäureidentität zu den übrigen  $G\beta$ -Isoformen und weist ein restriktiveres Expressionsmuster auf (Watson et al., 1994, Jones et al., 1998, Brunk et al., 1999). Im Vergleich mit den anderen  $G\beta$ -Untereinheiten ist die Assoziation von  $G\beta_5$

mit  $G\gamma$ -Untereinheiten verändert, was sich in einer erhöhten Detergenz-Labilität von  $G\beta_5\gamma$ -Dimeren äußert (Jones et al., 1999). In manchen Geweben ist  $G\beta_5$  auch cytosolisch lokalisiert (Watson et al., 1996).  $G\beta_5$  ist in der Lage, mit bestimmten RGS-Proteinen heterodimere Komplexe zu bilden, wobei die Wechselwirkung über eine sog. GGL-Domäne (*G protein  $\gamma$  subunit like*) des RGS-Proteins erfolgt (Snow et al., 1998, Levay et al., 1999). Derartige  $G\beta_5$ -RGS-Komplexe können die Kinetik der  $G\beta\gamma$ -vermittelten Stimulation von  $K^+$ -Kanälen (GIRKs) modulieren (Kovoor et al., 2000). Daneben werden durch  $G\beta_5\gamma$ -Komplexe bekannte  $G\beta\gamma$ -Effektoren, wie die PLC- $\beta$ , moduliert (Watson et al., 1994, Lindorfer et al., 1998).

**Tab. 2: Bisher bekannte  $G\beta$ - und  $G\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine**

<b><math>G\beta</math>-Untereinheiten</b>			<b><math>G\gamma</math>-Untereinheiten</b>		
<i>Subtyp</i> <sup>1</sup>	<i>Vorkommen</i>		<i>Subtyp</i> <sup>3</sup>	<i>Vorkommen</i>	
<b>Familie I:</b>	$G\beta_1$	ubiquitär	<b>Familie I:</b>	$G\gamma_1$	Retina (Stäbchen)
	$G\beta_2$	ubiquitär		$G\gamma_9$	Retina (Zäpfchen)
	$G\beta_3$	ubiquitär		$G\gamma_{11}$	nicht-neuronal
	$G\beta_{3(s)}$	?	<b>Familie II:</b>	$G\gamma_5$	Plazenta, Leber
	$G\beta_4$	neuronal, Lunge		$G\gamma_{10}$	ubiquitär
<b>Familie II:</b>	$G\beta_5$	neuronal, Pankreas, Herz, Leber, Niere <sup>2</sup>	<b>Familie III:</b>	$G\gamma_2$	ubiquitär
	$G\beta_{5(l)}$	Retina		$G\gamma_3$	neuronal, Hoden
		$G\gamma_4$		verbreitet	
		$G\gamma_7$		weit verbreitet	
		$G\gamma_8$		neuronal, olf. Zilien	
		$G\gamma_{12}$		ubiquitär	
		<b>Familie IV?</b>	$G\gamma_{13}$	Geschmacksknospen	

Die Einteilung in einzelne  $G\beta$ - und  $G\gamma$ -Familien beruht auf DNA-Sequenzhomologie-Untersuchungen.

<sup>1</sup> (s) und (l) bezeichnen kurze („short“) bzw. lange („long“) Spleißvarianten der entsprechenden  $G\beta$ -Untereinheit.

<sup>2</sup> Die Expression von  $G\beta_5$  ist bei der Maus auf neuronales Gewebe beschränkt (Jones et al., 1998).

<sup>3</sup> Bei der Benennung der  $G\gamma$ -Untereinheiten ist die Bezeichnung  $G\gamma_6$  ausgenommen.

$G\gamma$ -Untereinheiten zeigen mit nur 27-76 % Aminosäureidentität eine höhere Strukturdiversität als  $G\alpha$ - und  $G\beta$ -Untereinheiten (Ray et al., 1995, Gautam et al., 1998). Die Klassifizierung erfolgt anhand von Aminosäurehomologien und von Unterschieden in der posttranslationalen Modifikation in derzeit drei Gruppen. Allerdings zeigt das erst Ende 1999 entdeckte  $G\gamma_{13}$  nur eine 24-32 %ige Aminosäureidentität zu allen anderen bekannten Formen, so dass dies der Prototyp einer vierten Subfamilie sein könnte (Huang et al., 1999, siehe Tab. 2).  $G\gamma$ -Untereinheiten werden durch Isoprenylierung eines Cystein-Restes innerhalb des sog. CAAX-Motivs im C-Terminus des Proteins posttranslational modifiziert (Fukada et al., 1990, Casey und Seabra, 1996). Die meisten  $G\gamma$ -Untereinheiten besitzen ein Leucin als C-terminale

Aminosäure des CAAX-Motivs, daher wird das innerhalb des Motivs liegende Cystein mit einem C20-Geranylgeranyl-Rest modifiziert. Ist die letzte Aminosäure ein Serin, wie es bei den  $G\gamma_1$ -,  $G\gamma_9$ - und  $G\gamma_{11}$ -Isoformen der Fall ist, wird die  $G\gamma$ -Untereinheit C15-farnesyliert (Chen et al., 1991, Ray et al., 1995). Nach der Isoprenylierung der  $G\gamma$ -Untereinheit erfolgen die proteolytische Abspaltung des AAX-Restes und die Methylierung des nun C-terminalen Cysteins (Cook et al., 1998). Der Isoprenyl-Rest ist für die Verankerung des  $G\beta\gamma$ -Dimers in der Cytoplasmamembran verantwortlich. Weiterhin scheint die Isoprenylierung der  $G\gamma$ -Untereinheit, obwohl sie für die Assoziation mit  $G\beta$  nicht erforderlich ist, eine Rolle bei der Interaktion des  $G\beta\gamma$ -Dimers mit Rezeptoren und Effektoren zu spielen (Kisselev et al., 1994, 1995, Yasuda et al., 1996, Myung et al., 1999).

### 1.2.2 $G\beta\gamma$ regulierte Effektoren

Lange Zeit wurde angenommen, dass  $G\beta\gamma$ -Komplexe lediglich die  $G\alpha$ -Untereinheit im GDP-gebundenen, inaktiven Zustand stabilisieren und an der Zellmembran verankern (Sternweis, 1986). So führte die Entdeckung, dass aus  $G_i$  freigesetzte  $G\beta\gamma$ -Dimere den stimulierenden Effekt von  $G\alpha_s$  auf die Adenylylcyclase inhibieren können, zu der Annahme, dass die nach Rezeptoraktivierung aus  $G_i$  freigesetzten  $G\beta\gamma$ -Komplexe mit  $G\alpha_s$  das heterotrimere und damit inaktive  $G_s$  bilden (Gilman, 1987). Erste Hinweise auf eine eigenständige Effektor-Modulation durch  $G\beta\gamma$ -Komplexe ergaben sich durch den Befund, dass ein  $K^+$ -Kanal ( $I_{KACH}$ ) in atrialen Myozyten durch muskarinerge Agonisten aktiviert wird (Breitwieser und Szabo, 1985, Kurachi et al., 1986). Die Rezeptor-vermittelte Stimulation des Kanals konnte durch gereinigte  $G\beta\gamma$ -Dimere eindeutig nachgewiesen werden (Logothetis et al., 1987). Seitdem wurde für eine Vielzahl weiterer Effektoren eine Modulation durch  $G\beta\gamma$ -Dimere beschrieben (Tab. 3).

So sind bestimmte Phospholipase C-Isoformen sensitiv gegenüber  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten. Diese Enzym-Familie katalysiert die Spaltung von  $PI-4,5-P_2$  in  $IP_3$  und DAG (Rebecchi und Pentylala, 2000). Während  $IP_3$  eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch dessen Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt, werden durch DAG Proteinkinase C-Isoformen aktiviert (Bootman und Berridge, 1995). Nur die Phospholipase C- $\beta$ -Familie wird durch heterotrimere G-Proteine und hierbei sowohl durch  $G\alpha_q$ -Untereinheiten als auch durch  $G\beta\gamma$ -Komplexe reguliert (Exton, 1997). Durch  $G\alpha_q$ -Untereinheiten werden alle Phospholipase C- $\beta$ -Isoformen mit Ausnahme einer PLC- $\beta_4$ -Spleißvariante stimuliert (Smrcka und Sternweis, 1993, Kim et al., 1998). Die PTX-Sensitivität der  $G\beta\gamma$ -vermittelten Stimulation deutet darauf hin, daß die  $G\beta\gamma$ -Komplexe aus  $G_i$ -Proteinen freigesetzt werden. Während die PLC- $\beta_2$  und PLC- $\beta_3$  eine hohe Sensitivität gegenüber  $G\beta\gamma$ -Komplexen aufweisen, wird die PLC- $\beta_1$  nur schwach aktiviert (Camps et al., 1992, Park et al., 1993). Für die PLC- $\beta_4$ -Isoform konnte bislang keine Aktivierung durch  $G\beta\gamma$ -Dimere nachgewiesen werden (Jiang et al., 1994). Die Sensitivität der Phospho-



lipase C- $\beta$ -Isoformen gegenüber  $G\alpha_q$  bzw.  $G\beta\gamma$  wird bestimmten Enzym-Strukturen zugeordnet. So sind in erster Linie C-terminale Bereiche der Phospholipase C- $\beta$  in die Wechselwirkung mit  $G\alpha_q$ -Untereinheiten involviert (Wang et al., 1999a). Für die Bindung von  $G\beta\gamma$ -Komplexen sollen sowohl größere N-terminale Bereiche, insbesondere die PH-Domäne, als auch Regionen am Beginn der sog. Y-Domäne verantwortlich sein (Kuang et al., 1996, Sankaran et al., 1998, Wang et al., 1999b).

**Tab. 3:  $G\beta\gamma$ -regulierte Effektoren**

Effektor <sup>1</sup>	Modulation	Referenz
Adenylylcyclase <sup>2,3</sup>	↓, ↑	Sunahara et al., 1996
Phosphatidylinositol-3-Kinase	↑	Dekker und Segal, 2000
Phospholipase C- $\beta$	↑	Exton, 1997
Phospholipase A <sub>2</sub>	↑	Jelsema und Axelrod, 1987
$\beta$ -adrenerge Rezeptorkinasen <sup>4</sup>	↑	Pitcher et al., 1998
spannungsabhängige Ca <sup>2+</sup> -Kanäle	↓	Hofmann et al., 1997
K <sup>+</sup> -Kanäle (GIRKs) <sup>5</sup>	↑	Jan und Jan, 1997
Raf-1-Protein-Kinase	↑	Pumiglia et al., 1995
Ras-Austauschfaktor (p140 <sup>Ras-GRF</sup> )	↑	Mattingly und Macara, 1996
Bruton-Tyrosinkinase (Btk)	↑	Tsukada et al., 1995
Tsk-Tyrosinkinase	↑	Langhans-Rajasekaran et al., 1995

↑ = Stimulation; ↓ = Hemmung

<sup>1</sup> Es wurden nur Effektoren berücksichtigt, die direkt mit  $G\beta\gamma$  interagieren sollen.

<sup>2</sup>  $G\beta\gamma$  inhibiert die  $G\alpha_s$ -aktivierten Adenylylcyclase-Isoformen I, V und VI.

<sup>3</sup>  $G\beta\gamma$  stimuliert die  $G\alpha_s$ -aktivierten Adenylylcyclase-Isoformen II und IV.

<sup>4</sup> Zu den  $\beta$ -adrenergen Rezeptorkinasen gehören die G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) 2 und 3.

<sup>5</sup> GIRK: (engl.) *G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup>-channel*; G-Protein-regulierter einwärts gleichrichtender K<sup>+</sup>-Kanal

Spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vom N- sowie P/Q-Typ bilden eine weitere Klasse G-Protein-abhängiger Effektoren. Während auch hier zunächst angenommen wurde, dass der hemmende Effekt durch  $G\alpha$ -Untereinheiten vermittelt wird, konnten Ikeda (1996) sowie Herlitze und Mitarbeiter (1996) zeigen, dass primär  $G\beta\gamma$ -Komplexe die Hemmung der spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle bewirken. Die Interaktion der  $G\beta\gamma$ -Dimere mit der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>-Kanals soll sowohl innerhalb der intrazellulären Schleife zwischen den Transmembran-Segmenten I und II als auch im C-Terminus der  $\alpha_1$ -Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>-Kanals erfolgen (Zhang et al., 1996, De Waard et al., 1997).

### 1.3 PI-3-Kinasen

#### 1.3.1 Die Familie der PI-3-Kinasen

Seit langem ist bekannt, dass Phosphoinositide als Vorläufer sekundärer Botenstoffe dienen und damit in die Signalwege von Zelloberflächen-Rezeptoren involviert sind. So wird PI-4,5-P<sub>2</sub> von verschiedenen Phospholipase C-Isoformen in IP<sub>3</sub> und DAG gespalten (siehe 1.2.2). Phosphatidylinositol-3-Kinasen katalysieren die Übertragung eines Phosphatrestes auf die 3'-Position des Inositolrings von Phosphoinositiden und generieren damit PI-3-P, PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub>. Aufgrund ihrer *in vitro*-Spezifität für bestimmte Phosphoinositid-Substrate können PI-3-Kinasen in verschiedene Klassen unterteilt werden (Tab. 4).

**Tab. 4: Klassifizierung von PI-3-Kinasen und Strukturmerkmale ihrer katalytischen Untereinheiten**

Klasse	strukturelle Merkmale der katalytischen Untereinheit	Untereinheiten		Lipid-Substrate	
		katalytisch	nicht-katalytisch	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
I A		p110α	p50α	PI	PI-4,5-P <sub>2</sub>
		p110β	p55α,γ		
I B		p110δ	p85α,β	PI-4-P	
		p110γ	p101	PI-4,5-P <sub>2</sub>	
II		PI3K-IIα PI3K-IIβ PI3K-IIγ PI3K68D Cpk	?	PI PI-4-P	?
III		Vps34p	p150	PI	PI

● p85-Bindung    ◆ Ras-Bindung    ■ PIK    ● Kinase-Domäne    ■ C2  
 nach Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999, modifiziert

Die heterodimeren Klasse I PI-3-Kinasen bestehen aus einer 110-120 kDa schweren katalytischen Untereinheit (p110) und aus einer 50-101 kDa schweren nicht-katalytischen Untereinheit (p50, p55, p85, p101). *In vitro* katalysieren sie die Phosphorylierung von PI, PI-4-P und PI-4,5-P<sub>2</sub>, während *in vivo* PI-4,5-P<sub>2</sub> das bevorzugte Substrat darstellt (Hawkins et al., 1992).

Klasse II PI-3-Kinasen sind 170-210 kDa schwere Enzyme, die eine charakteristische C-terminale C2-Domäne aufweisen. Sowohl PI als auch PI-4-P dienen als *in vitro*-Substrate dieser PI-3-Kinase-Familie. Im Gegensatz zu den hauptsächlich cytosolisch lokalisierten Klasse I PI-3-Kinasen konnten Klasse II PI-3-Kinasen in partikulären Fraktionen nachgewiesen werden (Arcaro et al., 1998). Obwohl gezeigt werden konnte, dass sowohl Insulin und verschiedene Wachstumsfaktoren als auch das Chemokin MCP-1 (*monocyte chemotactic peptide 1*) die Aktivität von Klasse II PI-3-Kinasen stimulieren können, sind die Mechanismen dieser Aktivierung und die zellulären Funktionen dieser PI-3-Kinase-Familie ungeklärt (Turner et al., 1998, Brown et al., 1999, Arcaro et al., 2000).

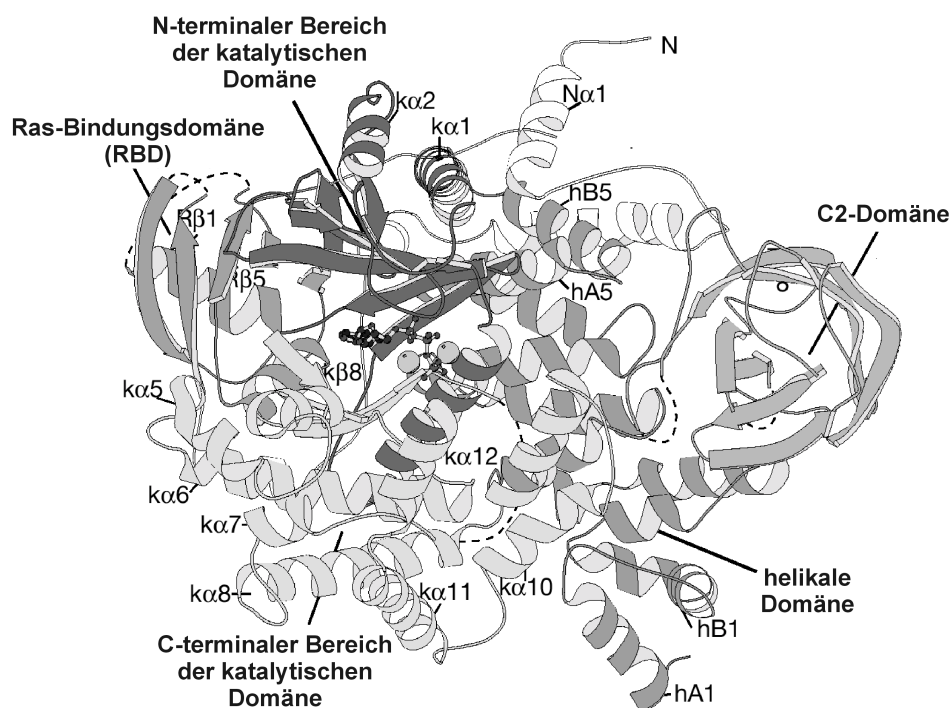
Der Prototyp der Klasse III PI-3-Kinasen, das Protein Vps34p, wurde zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Schu et al., 1993). Ein homologes Protein konnte auch in Säugern nachgewiesen werden (Volinia et al., 1995). Die katalytische Untereinheit der Klasse III PI-3-Kinasen ist mit einer Serin/Threonin-Proteinkinase, Vps15p bzw. p150, assoziiert, die für die Membran-Assoziation von Klasse III PI-3-Kinasen wichtig ist (Panaretou et al., 1997). Vertreter der Klasse III PI-3-Kinasen phosphorylieren ausschließlich PI und spielen eine Rolle bei intrazellulären Transportprozessen und der Phagosomen-Reifung (Wurmser et al., 1999, Vieira et al., 2001).

### 1.3.2 *Struktur und Regulation von Klasse I PI-3-Kinasen*

Alle Klasse I PI-3-Kinasen weisen gemeinsame Strukturmerkmale auf (siehe Tab. 4). Dazu gehören die katalytische Domäne, die sog. PIK-Domäne, die C2-Domäne sowie die Ras-Bindungsdomäne (Zvelebil et al., 1996). Anhand der Kristallstruktur der katalytischen p110 $\gamma$ -Untereinheit konnte gezeigt werden, dass die Teilstrukturen des Enzyms um die als Rückgrat dienende helikale bzw. PIK-Domäne angeordnet sind (Walker et al., 1999, Abb. 2).

Am höchsten konserviert ist die katalytische Domäne der PI-3-Kinasen, die auch als Homologie-Region 1 bezeichnet wird. Im Fall der p110 $\gamma$ -Untereinheit besteht sie aus einem kleineren N-terminalen Bereich, der die Aminosäuren 726-883 umfaßt, sowie aus einem größeren C-terminalen Bereich (Aminosäuren 884-1092). Obwohl die Sequenz-Homologie der PI-3-Kinasen zu den Proteinkinasen gering ist, weist die katalytische Domäne der PI-3-Kinasen Strukturmerkmale auf, wie sie auch in Proteinkinasen zu finden sind (Taylor et al., 1993, Hunter, 1995, Zvelebil et al., 1996). So entspricht ein mit der Sequenz <sup>946</sup>DRHNDN<sup>951</sup> der p110 $\gamma$ -Untereinheit korrespondierendes Motiv der Subdomäne VI<sub>B</sub> der Proteinkinasen. Der zu Asp<sup>946</sup> homologe Rest dient in Proteinkinasen als Base, die die Hydroxyl-Gruppe des Substrats deprotoniert und damit ein Nucleophil generiert, das den  $\gamma$ -Phosphat-Rest des ATP angreift. Aufgrund der Kristallstruktur der p110 $\gamma$ -Untereinheit muß geschlossen werden, daß Asp<sup>946</sup> zu dieser Interaktion jedoch nicht in der Lage ist. Daher wird angenommen, dass entweder eine andere Aminosäure die Funktion der Base übernimmt oder aber ein in erster

Linie dissoziativer Mechanismus, der einen Metaphosphat-Übergangszustand einschließt, bei der enzymatischen Aktivität der PI-3-Kinasen eine Rolle spielt (Walker et al., 1999).



**Abb. 2: Struktur der katalytischen p110 $\gamma$ -Untereinheit**

Die katalytische Domäne, die C2-Domäne sowie die Ras-Bindungsdomäne sind um die als Rückgrat dienende helikale Domäne angeordnet (aus Walker et al., 1999).

Ein zweites Motiv mit der Sequenz  $^{964}\text{DFG}^{966}$  der p110 $\gamma$ -Untereinheit ist ebenfalls in der Subdomäne VII der Proteinkinasen zu finden. Der entsprechende Asparaginsäure-Rest der Proteinkinasen cheliiert  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen und bestimmt die Positionierung des  $\gamma$ -Phosphat-Restes des ATP mit (Hiles et al., 1992). Auch für die p110 $\gamma$ -Untereinheit konnten zwei Metall-Bindungsstellen postuliert werden, neben Asp $^{964}$  werden Asn $^{951}$  sowie Asp $^{836}$  als Bindungspartner diskutiert (Walker et al., 1999). Auffallend ist, dass bei den PI-3-Kinasen das in Proteinkinasen vorhandene Glycin-reiche GXGXXG-Motiv fehlt, das für die Koordination des  $\beta$ -Phosphat-Restes des ATP verantwortlich ist. Stattdessen interagiert Ser $^{806}$  der p110 $\gamma$ -Untereinheit mit dem  $\beta$ -Phosphat-Rest des ATP, während Lys $^{833}$  in Wechselwirkung mit dem  $\alpha$ -Phosphat-Rest des ATP tritt. Lys $^{833}$  ist auch der Angriffsort des aus *Penicillium wortmanni* gewonnenen PI-3-Kinase-Inhibitors Wortmannin, der kovalent an diesen in allen Klasse I PI-3-Kinasen konservierten Lysin-Rest bindet (Walker et al., 2000). Durch Interaktion des Lysin-Restes mit dem Furanring des Wortmannins kommt es zur Ringöffnung unter Bildung eines Enamins, das im tautomeren Gleichgewicht zu einer Schiff'schen Base steht. Das führt zur Hemmung der katalytischen Aktivität der PI-3-Kinasen (Arcaro und Wymann, 1993, Thelen et al., 1994, Wymann et al., 1996, Stoyanova et al., 1997). Weiterhin konnte durch Mutation von Klasse I PI-3-Kinasen gezeigt werden, dass die beiden zu den Proteinkinasen homologen Sequenzmotive sowie der Wortmannin-bindende Lysin-Rest in

den Phosphat-Transfer involviert sind (Dhand et al., 1994, Wymann et al., 1996). Im C-terminalen Bereich der katalytischen Domäne von Klasse I PI-3-Kinasen findet sich ein Sequenzmotiv (Aminosäuren 964-988 der p110 $\gamma$ -Untereinheit), das der Aktivierungsschleife der Proteinkinasen entspricht und für die Substratspezifität der PI-3-Kinasen verantwortlich ist (Bondeva et al., 1998, Pirola et al., 2001). Walker und Mitarbeiter (1999) postulierten aufgrund der Kristallstruktur der p110 $\gamma$ -Untereinheit, dass die Aktivierungsschleife, die katalytische Schleife sowie die C-terminale  $\alpha$ 12-Helix des Enzyms eine Tasche bilden, die bei der Bindung der Kopfgruppe des Phosphoinositids eine Rolle spielt.

Die sog. PIK-Domäne bzw. Homologie-Region 2 wurde zuerst in PI-4-Kinasen gefunden und ist in allen funktionellen Lipidkinasen konserviert (Flanagan et al., 1993). Bei der p110 $\gamma$ -Untereinheit umfasst diese Domäne die Aminosäuren 545-725. Die Funktion der PIK-Domäne konnte bisher nicht bestimmt werden, obwohl gezeigt wurde, dass durch Deletion der Domäne die Lipidkinase-Aktivität von PI-3-Kinasen verloren geht (Molendijk und Irvine, 1998). Möglicherweise ist die PIK-Domäne für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich.

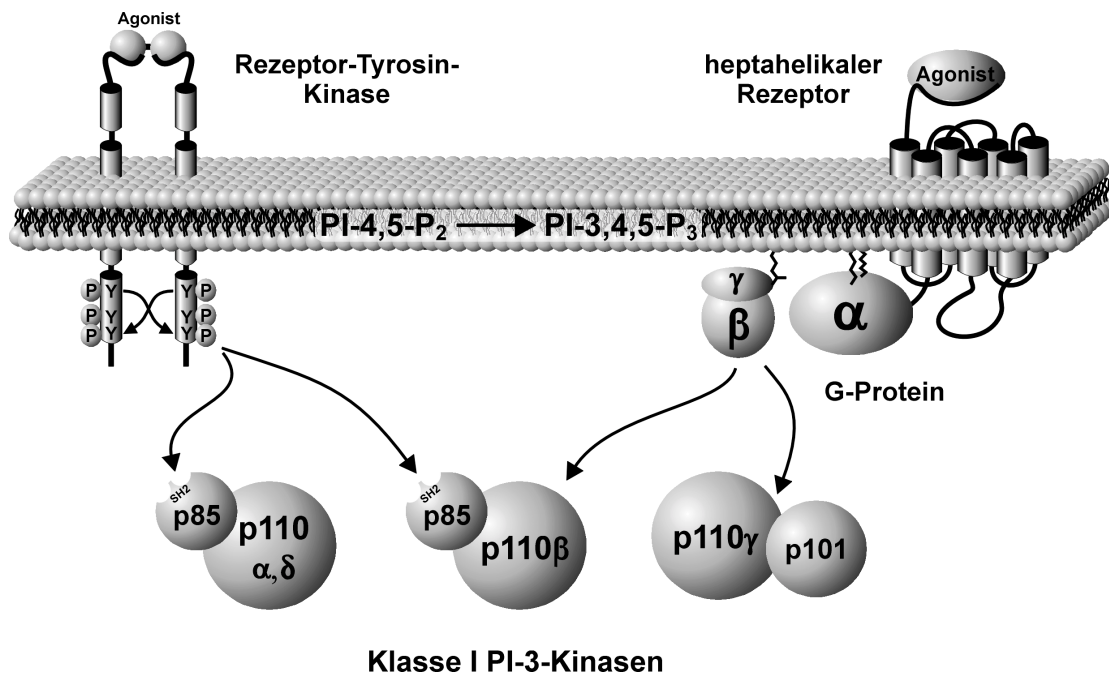
Ein weiteres Strukturmotiv der PI-3-Kinasen ist die C2-Domäne bzw. Homologie-Region 3, die die Aminosäuren 357-522 der p110 $\gamma$ -Untereinheit umfasst. Die Faltung der Domäne entspricht der Typ II C2-Domäne der Phospholipase C- $\delta$ <sub>1</sub> (Essen et al., 1997). C2-Domänen sind häufig in die Ca<sup>2+</sup>-abhängige oder Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Bindung von Proteinen an Phospholipid-Membranen involviert. So konnte für die isolierte C2-Domäne der p110 $\gamma$ -Untereinheit eine Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Interaktion mit Phospholipid-Vesikeln gezeigt werden (Walker et al., 1999).

Die Ras-Bindungsdomäne (Aminosäuren 220-311 der p110 $\gamma$ -Untereinheit) findet sich nur in Klasse I PI-3-Kinasen und zeigt die gleiche Faltung wie die Ras-Bindungsdomänen der Ras-Effektoren Raf und RalGDS (Nassar et al., 1995, Huang et al., 1998, Pacold et al., 2000). Der Kontakt der Ras-Bindungsdomäne zur katalytischen Domäne erfolgt in erster Linie im N-terminalen Bereich und in geringerem Ausmaß im C-terminalen Bereich der katalytischen Domäne. Die Strukturanalyse eines p110 $\gamma$ -H-Ras-Kristalls zeigte interessanterweise, dass die p110 $\gamma$ -Untereinheit mit zwei Regionen von Ras interagiert, die als „switch I“ und „switch II“ bezeichnet werden. Dieser Kontakt wird sowohl über die Ras-Bindungsdomäne als auch über die katalytische Domäne der p110 $\gamma$ -Untereinheit vermittelt (Pacold et al., 2000). Es sind zwei mögliche Mechanismen der Ras-Aktivierung von PI-3-Kinasen denkbar. Zum einen könnte durch Membran-Translokation der PI-3-Kinase durch Ras die enzymatische Aktivität der PI-3-Kinase erhöht werden. Andererseits könnte eine allosterische Wirkung auf die katalytische Domäne durch Ras-Bindung erfolgen (Walker et al., 1999, Pacold et al., 2000). Die physiologische Bedeutung der Interaktion von Ras und Klasse I PI-3-Kinasen ist jedoch noch weitgehend unklar (Rubio et al., 1999, Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999).

Drei der vier Klasse I PI-3-Kinasen besitzen als weiteres Strukturmerkmal eine sog. p85-Bindungsdomäne, über die sie mit einem 50-85 kDa schweren Adaptorprotein konstitutiv

assoziiieren. Aufgrund dieses strukturellen Merkmals werden die PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  zur Klasse I<sub>A</sub> der PI-3-Kinasen zusammengefasst. Im Gegensatz hierzu besitzt die katalytische p110 $\gamma$ -Untereinheit keine p85-Bindungsdomäne und assoziiert stattdessen mit einem 101 kDa schweren regulatorischen Protein, das als p101 bezeichnet wird und keine Homologie zu bekannten Proteinen zeigt (Stephens et al., 1997). Damit bildet die PI-3-Kinase  $\gamma$  als bisher einziges Mitglied die Klasse I<sub>B</sub> der PI-3-Kinasen.

Die Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen schließt die Translokation des Enzyms an Phospholipid-Membranen ein, wodurch die PI-3-Kinase in die Nähe ihres Substrats, in erster Linie PI-4,5-P<sub>2</sub>, gelangt. Dies kann sowohl über die Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) als auch über die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren erfolgen (Abb. 3).



**Abb. 3: Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen**

Klasse I PI-3-Kinasen können durch verschiedene Rezeptorklassen aktiviert werden. Die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  werden durch RTKs direkt aktiviert, wobei dies über die p85-Adaptor-Untereinheit vermittelt wird. Die PI-3-Kinase  $\beta$  kann zusätzlich durch G $\beta\gamma$ -Dimere stimuliert werden, die an der katalytischen Untereinheit angreifen. Wirken beide Signale gleichzeitig, führt dies zu einer synergistischen Aktivierung. Die PI-3-Kinase  $\gamma$  zeigt nur eine Sensitivität gegenüber G $\beta\gamma$ . Der Angriff erfolgt ebenfalls an der katalytischen Untereinheit, während die p101-Untereinheit regulatorisch in die Aktivierung eingreift.

Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen sind sensitiv gegenüber RTK und anderen Tyrosin-Kinasen, wobei die Aktivierung der PI-3-Kinasen über die Adaptor-Untereinheit vermittelt wird. In Säugern werden mindestens sieben verschiedene, 50-85 kDa schwere Adaptor-Untereinheiten exprimiert (siehe Tab. 4), die von drei unterschiedlichen Genen kodiert werden und deren Prototyp die p85-Untereinheit ist (Escobedo et al., 1991, Otsu et al., 1991, Hörsch und Kahn, 1999). Diese bestehen unter anderem aus zwei sog. SH2 (*src homology 2*)-Domänen, die durch eine inter-SH2-Domäne verbunden sind, welche für die Bindung der Adaptor-

Untereinheit an die katalytische p110-Untereinheit verantwortlich ist. Die SH2-Domänen sind in der Lage, spezifisch mit Proteinen zu interagieren, die über ein Tyrosin-phosphoryliertes pYXXM-Motiv verfügen (Nolte et al., 1996, Breeze et al., 1996). Zusätzlich besitzen die p85 $\alpha$ - und p85 $\beta$ -Untereinheit eine SH3 (*src homology 3*)-Domäne, zwei Prolin-reiche Domänen sowie eine BH (*breakpoint cluster region homology*)-Domäne, über die Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen vermittelt werden. Durch Stimulation von RTK erfolgt eine Phosphorylierung von spezifischen Tyrosin-Resten innerhalb eines YXXM-Motivs in intrazellulären Domänen des Rezeptors (z.B. bei Rezeptoren für Wachstumsfaktoren) oder eines Rezeptor-Substrats (z.B. IRS-1/2 im Falle des Insulin-Rezeptors). Diese Tyrosin-phosphorylierten Bereiche dienen als Bindungsstelle für die SH2-Domänen der p85-Untereinheit. Die Aktivierung der PI-3-Kinase erfolgt nun wahrscheinlich über zwei verschiedene Mechanismen. Einerseits wird durch die Rezeptor-Bindung der p85-Untereinheit eine Konformationsänderung bewirkt, welche die vorherige Hemmung der katalytischen Untereinheit durch p85 aufhebt (Yu et al., 1998a, b). Zum anderen gelangt die katalytische Untereinheit durch die p85-vermittelte Assoziation mit dem aktivierten Rezeptor an die Membran und somit in die Nähe ihres Substrats (Klippel et al., 1996).

Zusätzlich zur Aktivierung durch RTK konnte für die PI-3-Kinase  $\beta$  eine direkte Stimulation durch G $\beta\gamma$ -Komplexe gezeigt werden (Kurosu et al., 1997, Maier et al., 1999). Die G $\beta\gamma$ -Stimulation der PI-3-Kinase  $\beta$  erfolgt im Gegensatz zur RTK-Stimulation unabhängig von der p85-Untereinheit (Maier et al., 1999, Macrez et al., 2001). Darüber hinaus können Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen auch durch nicht unmittelbar Rezeptor-abhängige Mechanismen stimuliert werden. So kann die monomere GTPase Ras im GTP-gebundenen Zustand die PI-3-Kinase  $\alpha$  durch direkte Interaktion mit der p110 $\alpha$ -Untereinheit stimulieren (Rodriguez-Viciano et al., 1994, 1996). Weiterhin führt die Interaktion der BH-Domäne der p85-Untereinheit mit monomeren GTPasen der Rho-Familie, z.B. Rac und Cdc42, zur Stimulation der Enzym-Aktivität von Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen (Zheng et al., 1994, Toliaas et al., 1995).

In neutrophilen Granulozyten wurde nach Stimulation des G-Protein-gekoppelten fMLP (*N-formyl-Met-Leu-Phe*)-Rezeptors die rasche und Pertussistoxin-sensitive Bildung von PI-3,4,5-P<sub>3</sub> beobachtet (Traynor-Kaplan et al., 1988). Hierfür ist die Klasse I<sub>B</sub> PI-3-Kinase  $\gamma$  verantwortlich, deren katalytische p110 $\gamma$ -Untereinheit von Stoyanov und Mitarbeitern (1995) erstmals kloniert wurde. Die p110 $\gamma$ -Untereinheit verfügt nicht über eine p85-Bindungsdomäne sondern assoziiert mit der regulatorischen p101-Untereinheit (Stephens et al., 1997). Die Aktivierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  erfolgt durch verschiedene extrazelluläre Stimuli, die an heptahelikale Rezeptoren binden. Vor allem Liganden G<sub>i</sub>- und G<sub>q</sub>-gekoppelter Rezeptoren, wie z.B. muskarinerge Rezeptoren vom M<sub>1</sub>- und M<sub>2</sub>-Typ, scheinen eine Stimulation der PI-3-Kinase  $\gamma$  zu bewirken (Murga et al., 1998). Dieser Effekt wird in erster Linie über die freigesetzten G $\beta\gamma$ -Komplexe vermittelt, während die Aktivierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  durch G $\alpha_i$ -Untereinheiten - wenn überhaupt physiologisch relevant - gering ist

(Stoyanov et al., 1995, Leopoldt et al., 1998). Der Mechanismus der G $\beta\gamma$ -vermittelten Stimulation der PI-3-Kinase  $\gamma$  wurde zunächst kontrovers diskutiert. So betrachten Stephens und Mitarbeiter (1997) die p101-Untereinheit als essentiell für die G $\beta\gamma$ -Stimulation der PI-3-Kinase  $\gamma$  (Krugmann et al., 1999). Andere Arbeitsgruppen fanden hingegen eine direkte Aktivierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit durch G $\beta\gamma$ -Komplexe (Stoyanov et al., 1995, Tang und Downes, 1997, Leopoldt et al., 1998). Leopoldt und Mitarbeiter (1998) konnten durch Deletionsstudien zeigen, dass G $\beta\gamma$ -Komplexe sowohl an N-terminale als auch an C-terminale Bereiche der p110 $\gamma$ -Untereinheit binden können. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die p101-Untereinheit die Substratspezifität der G $\beta\gamma$ -stimulierten PI-3-Kinase  $\gamma$  für PI-4,5-P<sub>2</sub> erhöht, während in Abwesenheit von G $\beta\gamma$  kein Einfluß der p101-Untereinheit auf die Substratspezifität beobachtet wurde (Maier et al., 1999, Pacold et al., 2000). Für die G $\beta\gamma$ -vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  ist sowohl ein allosterischer Effekt als auch die bloße Membran-Translokation des Enzyms vorstellbar. Die zweite Annahme wird unterstützt von dem Befund, dass eine überexprimierte, konstitutiv Membran-assoziierte p110 $\gamma$ -Untereinheit bereits enzymatisch aktiv ist (Bondeva et al., 1998).

In einer *in vitro*-Untersuchung unter Verwendung von Plasmamembranen neutrophiler Granulozyten als Substrat konnte gezeigt werden, dass die monomere GTPase Ras im GTP-gebundenen Zustand die p110 $\gamma$ -Untereinheit aktivieren kann (Pacold et al., 2000). Weiterhin konnten Pacold und Mitarbeiter (2000) nach Transfektion in COS-7-Zellen eine PI-3-Kinase  $\gamma$ -Aktivierung durch Ras nachweisen. Daneben wird auch eine Beeinflussung der Ras-Aktivierung durch die PI-3-Kinase  $\gamma$  diskutiert (Rubio et al., 1999, Rubio und Wetzker, 2000).

### 1.3.3 Zelluläre Effekte der Lipidprodukte von Klasse I PI-3-Kinasen

Infolge der Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen werden die Phosphoinositide PI-3,4,5-P<sub>3</sub> und PI-3,4-P<sub>2</sub>, letzteres in erster Linie durch Abbau von PI-3,4,5-P<sub>3</sub> mittels 5'-Inositol-Phosphatasen wie SHIP (*SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase*), gebildet (Woscholski und Parker, 1997). Diese Lipidprodukte sind in der Lage, Effektoren wie z.B. Tyrosin-Kinasen, Serin/Threonin-Kinasen, Guaninnukleotid-Austauschfaktoren und Phospholipasen zu modulieren. Das führt zu vielfältigen zellulären Antworten, die u.a. eine Hemmung der Apoptose, eine Förderung des Zellwachstums, die Steuerung cytoskelettaler Veränderungen und der Zellmigration sowie die Vesikel-Bildung beeinflussen (Abb. 4).

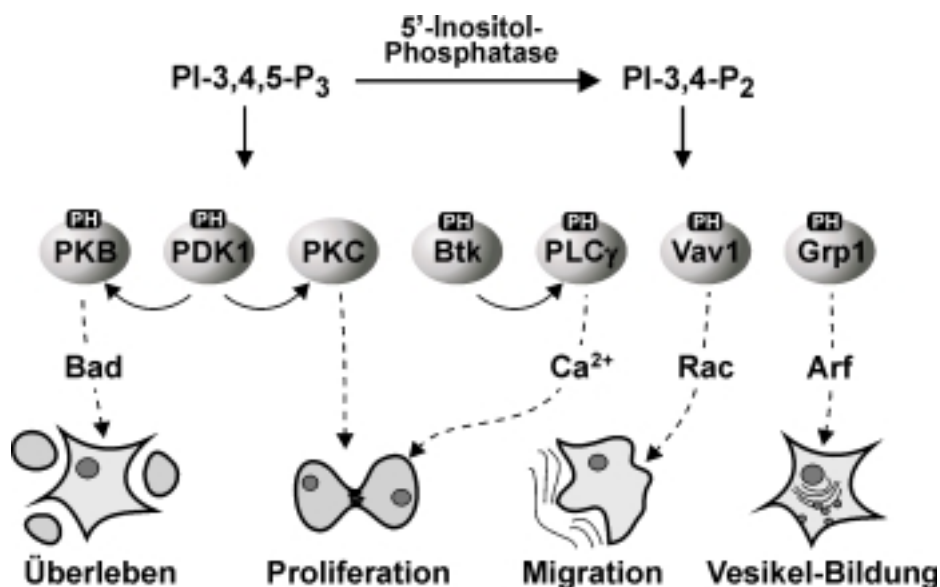
Anhand von Studien an transgenen und Gen-deletierten sog. „Knockout“-Mäusen können einige dieser Effekte bestimmten PI-3-Kinase-Isoformen zugeordnet werden. So führt die Ausschaltung des p85 $\alpha$ -Gens zu einer Beeinträchtigung der B-Zell-Entwicklung, einer verringerten Antikörper-Produktion sowie weiteren Defekten, die dem Phänotyp der immundefizienten Xid (*X-linked immunodeficiency*)-Mäuse gleichen (Fruman et al., 1999b, 2000, Suzuki et al., 1999, Terauchi et al., 1999). Nach Ausschaltung des in geringerer Menge exprimierten p85 $\beta$ -Gens weisen die Tiere eine erhöhte Sensitivität gegenüber Insulin auf, sind



jedoch lebensfähig (Ueki et al., 2002). Nach Gen-Deletion der katalytischen p110 $\alpha$ -Untereinheit zeigen die Tiere starke proliferative Defekte, die eine embryonale Letalität bewirken. Hingegen ist keine verstärkte Apoptose zu beobachten (Bi et al., 1999). Da die entsprechenden Mäuse gleichzeitig eine massive Überexpression der p85-Untereinheit zeigen und nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine trunkierte p110 $\alpha$ -Untereinheit mit veränderten Eigenschaften exprimiert wird, bleibt unklar, ob der Phänotyp der Mäuse ausschließlich auf die Deletion des p110 $\alpha$ -Gens zurückzuführen ist. Ungeachtet dessen kann aus den Befunden auf eine wichtige Rolle von Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen bei der Regulation des Zellwachstums und der Embryonalentwicklung geschlossen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression einer konstitutiv aktiven bzw. dominant-negativen p110 $\alpha$ -Untereinheit in Herzmuskelzellen zu erhöhter bzw. verringerter Herzgröße führt, die auf eine veränderte Größe der einzelnen Myozyten zurückzuführen ist, was die Rolle der PI-3-Kinase  $\alpha$  bei Wachstumsprozessen unterstreicht (Shioi et al., 2000). Nach Ausschaltung des Klasse I<sub>B</sub> p110 $\gamma$ -Gens sind die Mäuse lebensfähig, weisen jedoch Defekte in der Immunabwehr auf. So ist nach Stimulation mit Chemokinen eine verringerte Migration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zu beobachten. Weitere inflammatorische Prozesse und die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion sind gestört (Hirsch et al., 2000, Li et al., 2000, Sasaki et al., 2000a). Sasaki und Mitarbeiter (2000b) beobachteten das Auftreten kolorektaler Karzinome in p110 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen, was sich aber in den durch andere Strategien erzeugten p110 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen nicht bestätigte (Barbier et al., 2001). Weiterhin sind die ADP-vermittelte Plättchen-Aggregation und die Fibrinogenrezeptor-Aktivierung in p110 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Thrombozyten gehemmt, was ein vermindertes Auftreten ADP-induzierter thromboembolischer Ereignisse in p110 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen zur Folge hat. Hingegen bleiben die Thrombin-induzierte Plättchen-Aggregation und die Blutungszeit unbeeinflusst (Hirsch et al., 2001).

Die Wechselwirkung der PI-3-Kinase-Lipidprodukte mit Effektoren erfolgt über PH (*pleckstrin homology*)-Domänen, die eine Bindungsspezifität für PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> aufweisen (Fruman et al., 1999a, siehe Abb. 4). So ist nach einer Stimulation der PI-3,4-P<sub>2</sub>/PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung eine Translokation der PH-Domänen-haltigen Serin/Threonin-Kinase PKB/Akt, eines zellulären Homologs des viralen Onkoproteins v-Akt, an die Cytoplasmamembran zu beobachten. Dort erfolgt die weitere Aktivierung der PKB durch eine PDK1-vermittelte Phosphorylierung an Threonin<sup>308</sup> sowie eine Phosphorylierung an Serin<sup>473</sup>, eventuell über einen Komplex aus PDK1 und PRK2 (*PKC related kinase 2*). PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) weist ebenfalls eine PH-Domäne auf, die PI-3,4,5-P<sub>3</sub> mit hoher Affinität bindet (Stokoe et al., 1997, Stephens et al., 1998). Durch PKB-Aktivierung werden verschiedene Prozesse ausgelöst, die das Überleben der Zelle garantieren. So erfolgen die Phosphorylierung und damit Inaktivierung der proapoptischen Kinase Bad (*Bcl-2 antagonist, causing cell death*) sowie von GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), was eine erhöhte Glykogen- und Proteinsynthese zur Folge hat. Durch eNOS (*endothelial nitric*

*oxide synthase*)-Aktivierung wird die Bildung von NO induziert, was unter anderem einen antiapoptotischen Effekt durch Caspase-Inaktivierung bewirkt (Dimmeler et al., 1999).



**Abb. 4: Zelluläre Effekte der Lipidprodukte von Klasse I PI-3-Kinasen**

PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> können an zahlreiche Effektoren binden und diese modulieren. Die Bindung erfolgt dabei häufig über spezifische Phosphoinositid-Bindungsdomänen (PH). Die modulierten Effektoren können ihrerseits entweder direkt oder über weitere Proteine bestimmte Zellantworten auslösen. Im einzelnen sind: PKB (*Proteinkinase B*), PDK (*phosphoinositide-dependent kinase*), PKC (*Proteinkinase C*), Btk (*bruton's tyrosine kinase*), PLC (*Phospholipase C*), Vav (Guaninnukleotid-Austauschfaktor; Protoonkogen der Vav-Familie), Grp (*general receptor for phosphoinositides*), Rac (monomere GTPase), Arf (*ADP-ribosylation factor*). (nach Rameh und Cantley, 1999)

Durch PDK1 können weitere Serin/Threonin-Kinasen der AGC-Familie, z.B. PKC-Isoformen und p70 S6-Kinasen, phosphoryliert und aktiviert werden, was ein proliferatives Signal für die Zelle darstellt (Dutil et al., 1998, Williams et al., 2000). Auch Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) und weitere Tyrosin-Kinasen der TEC-Familie binden über eine N-terminale PH-Domäne PI-3,4,5-P<sub>3</sub>, wodurch eine Translokation dieser Kinasen an die Cytoplasmamembran eingeleitet wird. Dort erfolgt nach Assoziation mit Src-Kinasen eine Phosphorylierung und damit Aktivierung. Btk ist in die Kontrolle der Aktivität von Phospholipase C- $\gamma$ -Isoformen und somit in Ca<sup>2+</sup>- und PKC-Signalwege involviert (Scharenberg et al., 1998, Schaeffer und Schwartzberg, 2000). Weitere PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-vermittelte zelluläre Effekte wie cytoskelettale Veränderungen und die Steuerung der Vesikel-Bildung werden durch die Aktivierung monomerer GTPasen wie Rac, Rho und Arf ausgelöst (Reif et al., 1996, Arrieumerlou et al., 1998). Hierbei erfolgt eine Wechselwirkung von PI-3,4,5-P<sub>3</sub> mit PH-Domänen von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF). So konnte gezeigt werden, dass PI-3,4,5-P<sub>3</sub> *in vitro* PH-Domänen des Rac-GEF Vav1 bindet, was eine Verstärkung der Src-Kinase-vermittelten Aktivierung von Vav1 und eine nachfolgende Rac-Aktivierung bewirkte (Han et al., 1998).

### 1.3.4 Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen

Neben ihrer Lipidkinase-Aktivität weisen Klasse I PI-3-Kinasen auch eine intrinsische Serin/Threonin-Proteinkinase-Aktivität auf (Carpenter et al., 1993, Hunter, 1995). Für die PI-3-Kinase  $\alpha$  konnte *in vitro* eine  $Mn^{2+}$ -abhängige Autophosphorylierung der regulatorischen p85-Untereinheit an Serin<sup>608</sup> nachgewiesen werden, die eine Hemmung der durch RTK stimulierten Lipidkinase-Aktivität zur Folge haben soll (Dhand et al., 1994). Im Gegensatz hierzu erfolgt die  $Mn^{2+}$ -abhängige *in vitro*-Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\delta$  an der katalytischen p110 $\delta$ -Untereinheit an Serin<sup>1039</sup>, während die regulatorische p85-Untereinheit nicht phosphoryliert werden soll (Vanhaesebroeck et al., 1997, 1999a). Die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\delta$  soll ebenfalls zur autoregulatorischen Hemmung der Stimulierbarkeit ihrer Lipidkinase-Aktivität führen. Für die PI-3-Kinase  $\gamma$  wurde eine  $Mg^{2+}$ -abhängige Autophosphorylierung der katalytischen p110 $\gamma$ -Untereinheit gezeigt, die jedoch nicht zur Beeinflussung der Lipidkinase-Aktivität führen soll (Stoyanova et al., 1997, Maier et al., 1999). Die zunächst überraschende Bifunktionalität der Klasse I PI-3-Kinasen als Lipid- und Proteinkinasen wurde für weitere Vertreter der Phosphatidylinositol-Kinasen beschrieben. So zeigen sowohl Klasse III PI-3-Kinasen als auch PI-4-Kinasen und Typ I Phosphatidylinositolphosphat-Kinasen eine *in vitro*-Autophosphorylierung (Stack und Emr, 1994, Zhao et al., 2000, Itoh et al., 2000). Hingegen besitzen Klasse II PI-3-Kinasen keine intrinsische Proteinkinase-Aktivität. Weiterhin wird die TOR (*target of rapamycin*)-Familie, die ausschließlich eine Serin/Threonin-Proteinkinase-Aktivität aufweist, aufgrund ihrer Homologie zur Kinase-Domäne von PI-3-Kinasen auch als Klasse IV der PI-3-Kinasen bezeichnet (Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999). Neben TOR und FRAP (*FKBP rapamycin-associated protein*) gehören eine DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) sowie ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) zu dieser Proteinkinase-Familie, die keine Lipidkinase-Aktivität besitzt (Hartley et al., 1995). Schließlich wurde auch für die Phosphatase PTEN/MMAC1 anhand ihrer Homologie zu Tyrosin-Phosphatasen eine duale Spezifität für Lipid- und Proteinsubstrate postuliert (Li et al., 1997, Maehama und Dixon, 1998).

Zusätzlich zur Autophosphorylierung wurde für Klasse I PI-3-Kinasen auch die Phosphorylierung exogener Substrate gezeigt. So konnte sowohl nach Stimulation von Adipozyten mit Insulin als auch nach Behandlung lymphoider Zellen mit Interferon- $\alpha$  eine PI-3-Kinase  $\alpha$ -abhängige Phosphorylierung von IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*) nachgewiesen werden (Lam et al., 1994, Tanti et al., 1994, Uddin et al., 1997). Weiterhin wurden durch Austausch C-terminal des DFG-Motivs (siehe 1.3.2) gelegener basischer Motive der p110 $\alpha$ -Untereinheit durch die homologen Regionen von Klasse II bzw. Klasse III PI-3-Kinasen p110 $\alpha$ -Hybride erzeugt, die trotz Verlust der Fähigkeit zur Phosphorylierung von PI-4,5-P<sub>2</sub> eine erhöhte Phosphorylierung von IRS-1 zeigten (Pirola et al., 2001). Rondinone und Mitarbeiter (2000) beschrieben nach Stimulation von Adipozyten mit Insulin auch eine PI-3-Kinase-abhängige Phosphorylierung der Phosphodiesterase PDE3B. Schließlich gibt es

---

Hinweise, dass die Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-kinasen auch *in vivo* eine Rolle spielt. So konnten Vanhaesebroeck und Mitarbeiter (1999a) in Jurkat-T-Zellen eine Wortmannin-sensitive Phosphorylierung der p110 $\delta$ -Untereinheit nachweisen, die durch CD28 stimulierbar war. Weiterhin scheint die Proteinkinase-Aktivität für die Beeinflussung des MAPK-Signalwegs durch die PI-3-Kinase  $\gamma$  verantwortlich zu sein, da eine Lipidkinase-defiziente p110 $\gamma$ -Mutante keine Aktivierung von PKB/Akt (siehe 1.3.3), jedoch eine Stimulation von ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) bewirkte. Die Lipidkinase-defiziente Mutante wurde hierbei durch Austausch der C-terminal des DFG-Motivs gelegenen basischen Region durch eine homologe Region der Klasse IV PI-3-Kinase FRAP erzeugt (Bondeva et al., 1998). Das direkte Substrat dieser Protein-Phosphorylierung ist nicht bekannt. Da die Proteinkinase-Aktivität der einzelnen Klasse I PI-3-Kinase-Isoformen Unterschiede zeigt, könnte diese Enzymqualität zur Isoform-Spezifität PI-3-Kinase-abhängiger Signalwege beitragen.

## 2 **FRAGESTELLUNG**

Klasse I PI-3-Kinasen sind bifunktionelle Enzyme, die neben der Lipidkinase- auch eine Serin/Threonin-Proteinkinase-Aktivität besitzen. Für die Rezeptor-Tyrosinkinase-regulierten PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  wurde gezeigt, dass durch die Autophosphorylierung der regulatorischen p85-Untereinheit an Serin<sup>608</sup> (PI-3-Kinase  $\alpha$ ) bzw. der katalytischen p110-Untereinheit an Serin<sup>1039</sup> (PI-3-Kinase  $\delta$ ) die Lipidkinase-Aktivität der Enzyme abgeschaltet wird (Dhand et al., 1994, Vanhaesebroeck et al., 1999a). Vergleichbare Untersuchungen zu den G $\beta\gamma$ -sensitiven PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$ , die ebenfalls autophosphoryliert werden, fehlen. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Proteinkinase-Aktivität dieser PI-3-Kinase-Isoformen biochemisch zu charakterisieren, die Phosphorylierungsstellen zu identifizieren sowie mögliche funktionelle Konsequenzen zu beschreiben.

### **3 MATERIALIEN**

#### **3.1 Hersteller und Lieferanten**

- (1) American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA
- (2) Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- (3) Biochrom, Berlin
- (4) Bio-Rad, München
- (5) BioVectra, Charlottetown, Canada
- (6) Biozym Diagnostik, Hameln
- (7) Calbiochem, Frankfurt/Main
- (8) Difco, via Otto Norwald KG, Hamburg
- (9) Gibco BRL, Eggenstein
- (10) ICN Biomedicals, Aurora, USA
- (11) Kodak, Rochester, USA
- (12) Merck, Darmstadt
- (13) Millipore, Eschborn
- (14) New England Biolabs, Schwalbach
- (15) NEN, Zaventem, Belgien
- (16) Pierce, Rockford, USA
- (17) Polaroid, Berlin
- (18) Promega, Mannheim
- (19) Qiagen, Hilden
- (20) Raytest, Straubenhardt
- (21) Roche Diagnostics, Mannheim
- (22) Roth, Karlsruhe
- (23) Santa Cruz, Heidelberg
- (24) Schering, Berlin
- (25) Serva, Heidelberg
- (26) Sigma-Ark, Darmstadt
- (27) Sigma, Deisenhofen
- (28) Stratagene, Heidelberg
- (29) Vydac, Hesperia, USA
- (30) Whatman, Maidstone, UK

#### **3.2 Chemikalien**

Acetonitril	(27)
Acrylamid	(22),(25)
Adenosin-5' -triphosphat (ATP)	(21)
Agar-Agar	(10)
Agarose	(6)
Ameisensäure	(27)
Ammoniumhydrogencarbonat	(27)
Ammoniumperoxodisulfat	(4)
Pierce BCA Protein Assay	(16)

Bromcyan	(27)
5-Bromo-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (Bluo-Gal)	(5)
Bromphenolblau	(25)
Cellfectin	(9)
Coomassie Brilliant Blue G-250	(18)
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylpiperidin-2-sulfonäure	(27)
Cytochalasin B	(27)
Cytochrom c (Typ III, aus Pferdeherz)	(27)
N <sup>6</sup> ,2'-O-Dibutyryl-3':5'-adenosinmonophosphat (dbt-cAMP)	(21)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(12)
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	(27)
Dinatriumhydrogenphosphat	(12)
Dithiothreitol (DTT)	(27)
ECL Western Blotting Detection System	(2)
Essigsäure	(12)
EDTA	(25)
EGTA	(25)
Ethidiumbromid	(12)
Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz	(12)
FuGene 6	(21)
Glutathion	(27)
Glycerin	(12)
$\beta$ -Glycerophosphat	(27)
Glycin	(25)
Guanosin-5'-diphosphat (GDP)	(21)
Hefeextrakt	(7)
HEPES	(12),(27)
Imidazol	(27)
Iodacetamid	(27)
Isopropylthio- $\beta$ -D-galactosid (IPTG)	(22)
Kaliumdihydrogenphosphat	(12)
Lithiumchlorid	(27)
„low-melting“ Agarose	(2)
Lubrol PX	(27)
Magnesiumchlorid	(27)
Manganchlorid	(27)
2-Mercaptoethanol	(27)
N, N'-Methylenbisacrylamid (Bisacrylamid)	(22),(25)
Natriumcholat	(27)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	(27)
Natriumfluorid	(27)
Natriumorthovanadat	(27)
Natriumpyrophosphat	(27)
Ninhydrin	(27)
Nonidet P40	(21)
Oligonukleotide	(26)
Phosphatidylinositol	(27)

Phosphatidylinositol-4-phosphat	(27)
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	(27)
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin	(27)
L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamin	(27)
L- $\alpha$ -Phosphatidylserin	(27)
Ponceau S	(12)
n-Propanol	(22)
Pyridin	(27)
Pyronin Y	(27)
Rinderserum-Albumin (BSA)	(27)
Roti-Block	(22)
Sphingomyelin	(27)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED)	(4)
N-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon (TPCK)	(27)
Trifluoressigsäure	(27)
Tris	(12),(25)
Triton X-100	(25),(27)
Trypton	(7)
Tween 20	(27)

### **3.3 Enzyme, Proteine, Peptide und andere biologisch aktive Substanzen**

anti-p110 $\beta$ -Antikörper	(23)
anti-p85-Antikörper	(23)
AspN	(21)
Benzamidin	(27)
Chymotrypsin	(21)
N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP)	(27)
GluC	(21)
Leupeptin	(27)
LY294002	(24)
LysC	(21)
Meerrettichperoxidase gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG	(27)
Meerrettichperoxidase gekoppelt an Anti-Maus-IgG	(27)
20-Methylwortmannin	(24)
Pefabloc SC	(21)
Pertussistoxin (aus <i>Bordetella pertussis</i> )	(7)
<i>Pfu</i> Turbo-DNA-Polymerase	(28)
phosphoryliertes PDGFR-Peptid (CGGY(P)MDMSKDESVDY(P)VPMLDM)	(24)
Restriktionsendonukleasen	(14)
T4-DNA-Ligase	(18)
Trypsin	(21)
Trypsin-Inhibitor	(21)
Wortmannin	(24)



Die C-terminalen Peptide der p110 $\beta$ - und p110 $\gamma$ -Untereinheit wurden freundlicherweise von Dr. Michael Beyermann (Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) zur Verfügung gestellt.

### 3.4 *Radioaktiv markierte Substanzen*

[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP	(15)
<sup>32</sup> P-Phosphorsäure	(15)

### 3.5 *Zellen*

DH10Bac kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	(9)
Epicurian Coli XL1-Blue kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	(28)
HEK293 / humane embryonale Nieren-Zellen	(1)
HL-60 / humane Leukämie-Zellen	(1)
<i>Sf9</i> / Ovarialzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>	(9)

Zellen zur Produktion der monoklonalen Antikörper gegen p110 $\gamma$  wurden freundlicherweise von Prof. Dr. R. Wetzker (Friedrich-Schiller-Universität, Jena) zur Verfügung gestellt.

### 3.6 *Zellkulturmedien und Zusätze*

Ampicillin	(27)
Folsäure	(27)
fötale Kälberserum	(3),(9)
Gentamicin	(10)
Glutamin (Konz.)	(3)
Grace-Insektenmedium	(9)
Kanamycin	(27)
Lipid Medium Supplement	(3)
MEM-Earle Medium	(9)
nichtessentielle Aminosäuren	(3)
Penicillin/Streptomycin (je 10 000 U/ml)	(3)
RPMI-1640 Medium	(3)
Tetracyclin	(27)
TNM-FH Medium	(27)
Trypsin/EDTA-Lösung	(3)

### 3.7 *Vektoren*

pFastBacHTa	(9)
-------------	-----

### **3.8 DNA- und Proteinstandards**

1kb-DNA-Standard	(9)
LMW Electrophoresis Calibration Kit	(2)

### **3.9 Reinigungs- und Trennmaterialien**

Dünnschichtplatten mit Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator)	(30)
Glutathion Sepharose 4B	(2)
Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	(19)
ProteinA-Sepharose CL-4B	(2)
Qiagen Plasmid Purification Kit	(19)
SourceQ 15	(2)
Tris-HCl Ready Gel	(4)
Vydac C <sub>18</sub> -Säule 218 TP 5115	(29)
ZipTip C <sub>18</sub>	(13)

### **3.10 Membranen/Filter**

Hybond C-extra (Nitrocellulose-Membran)	(2)
Immobilon P (PVDF-Membran)	(13)
Centrikon Ultrazentrifugationsröhrchen 10, 30	(13)

### **3.11 Filmmaterial**

Röntgenfilm (CRT7, R, X-OMAT)	(11)
Polaroid-Filmkassetten Nummer 553	(17)
Fuji-Imaging-Patten	(20)

Alle hier nicht aufgeführten Substanzen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) bzw. Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad pro analysi bezogen.

Verschiedene im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte rekombinante Baculoviren erhielten wir von Dr. T. Hanck, Magdeburg, Prof. Dr. M. Lohse, Würzburg, Dr. K. Spicher, Berlin, Dr. B. Vanhaesebroeck, London, und Prof. Dr. R. Wetzker, Jena.

## 4 **METHODEN**

### 4.1 **Molekularbiologische Methoden**

Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte molekularbiologische Standardmethoden sind in folgenden Quellen ausführlich beschrieben.

Restriktionsanalyse	Sambrook und Russell, 2001
Agarosegelelektrophorese	Aaij und Borst, 1972
Herstellung kompetenter Zellen	Inoue et al., 1990
Ligation von DNA-Fragmenten	Sambrook und Russell, 2001
Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	Cohen et al., 1972
Plasmidpräparation aus Bakterienzellen	Sambrook und Russell, 2001; Qiagen, 1993
DNA-Sequenzierung	Sanger et al., 1977; Amersham, 1994
Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	Sambrook und Russell, 2001
PCR	Sambrook und Russell, 2001

#### 4.1.1 **Medien für die Bakterienkultur**

<u>LB-Flüssigmedium</u>	pH 7,4	<u>SOB-Flüssigmedium</u>	pH 7,0
Trypton	10 g/l	Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l	Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l	NaCl	0,5 g/l
		KCl	0,2 g/l
<u>LB-Agarplatten</u>		<u>SOC-Medium</u>	
Agar-Agar	1,5 % (w/v)	nach Hitzesterilisation wurden zu 500 ml	
	in LB-Flüssigmedium	SOB-Flüssigmedium zugesetzt:	
		5 ml 2 M MgCl <sub>2</sub> , steril, in H <sub>2</sub> O	
		10 ml 1 M Glucose, steril, in H <sub>2</sub> O	

Den hitzesterilisierten Medien wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

### 4.1.2 Herstellung des Baculovirus-Transferplasmids für die Hexahistidin-markierte p110 $\beta$ -Untereinheit

Das Expressionsplasmid p110 $\beta$ -pEYFP-C1 stellte freundlicherweise Carsten Brock aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung. Aufgrund ungünstiger Restriktionsschnittstellen wurde folgende Klonierungsstrategie gewählt: Die für den C-terminalen Bereich der p110 $\beta$ -Untereinheit kodierende Sequenz wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bst*XI und *Sal*I aus dem pEYFP-C1-Vektor ausgeschnitten. Zur Erzeugung der für den N-Terminus kodierenden Sequenz bis zur *Bst*XI-Schnittstelle wurde ein Adaptor verwendet, der aus den Oligonukleotiden p110 $\beta$ Ada-for und p110 $\beta$ Ada-rev hybridisiert wurde und zusätzlich eine *Nco*I-Schnittstelle enthielt. Beide DNA-Fragmente wurden über die *Nco*I- und die *Sal*I-Schnittstelle in den Baculovirus-Transfervektor pFastBacHTa eingefügt, der bereits eine die Hexahistidin-Markierung kodierende Sequenz enthielt.

**Tab. 5: Oligonukleotide zur Generierung des N-terminalen Adaptors**

Primer	Sequenz 5'-3'
p110 $\beta$ Ada-for	CATGTGCTTCAGTTTCATAATGCCTCCTGCTATGGCAGAC ATCCTTGACATCTGGGCGGTGGATTCACAGATAGCATCTG ATGGCTCCATACCT
p110 $\beta$ Ada-rev	ATGGAGCCATCAGATGCTATCTGTGAATCCACCGCCCAGA TGCAAGGATGTCTGCCATAGCAGGAGGCATTATGAAACT GAAGCA

### 4.1.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Das Einfügen von Mutationen in die katalytischen Untereinheiten der PI-3-Kinasen erfolgte durch ortsgerechte Mutagenese. Als Matrize für die Mutations-PCR dienten Baculovirus-Transferplasmide, welche die Sequenz für die Hexahistidin-markierte p110 $\beta$ -Untereinheit (4.1.2) bzw. p110 $\gamma$ -Untereinheit enthielten. Das letztgenannte Plasmid wurde freundlicherweise von Andreas Schulz aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Für die PCR wurden zwei die gewünschte Mutation enthaltende, komplementäre Primer verwendet. Die Verlängerung dieser Primer erfolgte mit Hilfe der aus *Pyrococcus furiosus* klonierten DNA-Polymerase *PfuTurbo*, welche eine hohe Präzision der DNA-Synthese gewährleistete. Da das die Mutation enthaltende PCR-Produkt im Gegensatz zur parentalen DNA nicht methyliert war, konnte im Anschluß an die PCR mit der Methylierungs-spezifischen Restriktionsendonuklease *Dpn*I das Ausgangsplasmid abgebaut werden.

Tab. 6: Mutationsprimer

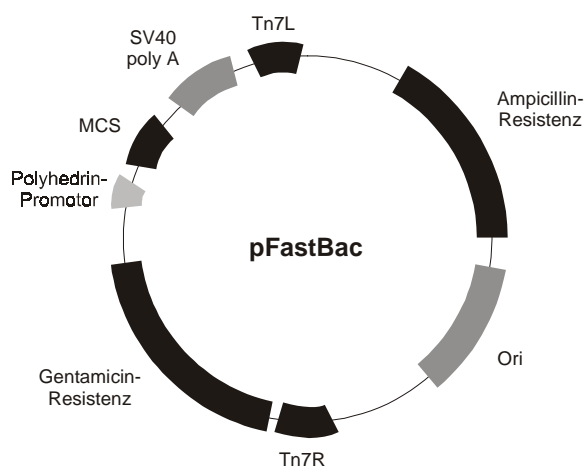
Primer	Sequenz 5'-3'
p110 $\beta$ Ala-for	GGAAAGACTACAGAGCTTAAGCTGCAGTCG
p110 $\beta$ Ala-rev	CGACTGCAGCTTAAGCTCTGTAGTCTTTCC
p110 $\beta$ Asp-for	GGAAAGACTACAGAGATTAAGCTGCAGTCG
p110 $\beta$ Asp-rev	CGACTGCAGCTTAAT <b>T</b> CTCTGTAGTCTTTCC
p110 $\beta$ Glu-for	GGAAAGACTACAGAG <b>A</b> GTAAGCTGCAGTCG
p110 $\beta$ Glu-rev	CGACTGCAGCTT <b>A</b> CTCTCTGTAGTCTTTCC
p110 $\gamma$ Ala-for	GGCATCAAACAAGGAGAGAAACATGCAGCCTAATACTTTAGG CTAGAATC
p110 $\gamma$ Ala-rev	GATTCTAGCCTAAAGTATTAGGCTGCATGTTTCTCTCCTTGT TTGATGCC
p110 $\gamma$ Asp-for	GGCATCAAACAAGGAGAGAAACAT <b>G</b> ACGCCTAATACTTTAGG CTAGAATC
p110 $\gamma$ Asp-rev	GATTCTAGCCTAAAGTATTAGG <b>C</b> GTCATGTTTCTCTCCTTGT TTGATGCC
p110 $\gamma$ Glu-for	GGCATCAAACAAGGAGAGAAACAT <b>G</b> AAGCCTAATACTTTAGG CTAGAATC
p110 $\gamma$ Glu-rev	GATTCTAGCCTAAAGTATTAGGCT <b>T</b> CATGTTTCTCTCCTTGT TTGATGCC

**Fett** markierte Buchstaben in der Primersequenz stellen die eingeführten Mutationen dar.

## 4.2 Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen

Eine der am häufigsten verwendeten Insektenzelllinien zur Expression rekombinanter Säuger-Proteine sind *Sf9*-Zellen. Dabei handelt es sich um Ovarienzellen von *Spodoptera frugiperda*. Für die Expression rekombinanter Proteine werden diese Zellen mit lytischen Baculoviren wie dem AcNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) infiziert. Dies sind doppelsträngige zirkuläre DNA-Viren, die bevorzugt Insektenzellen befallen.

Da das Baculovirus-Genom sehr groß ist (AcNPV: ca. 130 kb) und Restriktionsendonukleasen Mehrfachschnittstellen aufweisen, werden rekombinante Baculoviren in Mehrschritt-Verfahren konstruiert. Bei der hier verwendeten Methode wird das zu exprimierende Gen zunächst in einen Baculovirus-Transfektor innerhalb eines mini-Tn7-Elements hinter einen Baculovirus-Promotor, üblicherweise den Polyhedrin-Promotor, eingefügt (4.1 und Abb. 5).



**Abb. 5: Der Baculovirus-Transfervektor pFastBac**

Das mini-Tn7-Element enthält eine Expressionskassette, die aus einem Gentamicin-Resistenzgen, dem Baculovirus-spezifischen Polyhedrin-Promotor, einem multiplen Klonierungsbereich und dem SV40-poly(A)-Signal besteht. Weiterhin weist der pFastBac-Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen auf. Der Replikationsstartpunkt („origin of replication“, Ori) erlaubt die Vermehrung des klonierten Plasmids in *E. coli*-Zellen.

Dann erfolgt eine ortsspezifische Transposition in das Baculovirus-Genom (Bacmid), welches in *E. coli*-Zellen vermehrbar ist. Das Bacmid enthält unter anderem einen Kanamycin-Resistenz-Marker sowie ein DNA-Segment, das für das lacZ $\alpha$ -Peptid kodiert. Im N-terminalen Bereich des lacZ $\alpha$ -Gens ist ein kurzes Segment eingefügt, welches eine Bindungsregion für das bakterielle Transposon Tn7 (mini-attTn7) aufweist. Rekombinante Viren entstehen nun durch Transposition des mini-Tn7-Elements aus dem Baculovirus-Transferplasmid in die mini-attTn7-Bindungsregion des Bacmids unter Zuhilfenahme eines Helferplasmids, welches für eine Transposase kodiert und eine Tetracyclin-Resistenz enthält. Ist das mini-Tn7-Element in die mini-attTn7-Bindungsregion des Bacmids eingebaut, kann keine Expression des lacZ $\alpha$ -Peptids erfolgen. Somit bleiben *E. coli*-Kolonien, die das rekombinante Bacmid enthalten, in Gegenwart eines chromogenen Substrats (z.B. Bluo-Gal) und des Induktors IPTG weiß, während Kolonien mit dem unveränderten Bacmid blau erscheinen. Aus ausgewählten Kolonien erfolgt die Isolation rekombinanter Bacmid-DNA, welche zur Transfektion von *Sf9*-Zellen verwendet wird.

Der Vorteil der Expression von Proteinen in *Sf9*-Zellen gegenüber Bakterienzellen ist die korrekte posttranslationale Prozessierung und Faltung der exprimierten Proteine, was für Funktionsuntersuchen von Säugerproteinen wichtig ist. Gegenüber Säuger-Transfektions-Systemen haben *Sf9*-Zellen den Vorzug, daß man in ihnen leicht auch präparative Mengen an rekombinanten Proteinen exprimieren kann, da sie Verdopplungszeiten von weniger als einem Tag aufweisen und darüber hinaus große Volumina in Suspension kultiviert werden können. Die hier beschriebene Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen wurde in Anlehnung an Methoden der Laborhandbücher von King und Possee (1992) bzw. O'Reilly und Mitarbeiter (1992) durchgeführt.

### 4.2.1 *Transposition und Isolation rekombinanter Bacmid-DNA*

Kompetente DH10Bac-Zellen (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit etwa 1 ng Baculovirus-Transferplasmid gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 s auf 42 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen erfolgten die Zugabe von 900 µl SOC-Medium und eine vierstündige Inkubation bei 37 °C unter Schütteln. Verschiedene Mengen des Transpositionsansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit Zusatz von 7 µg/ml Gentamicin, 50 µg/ml Kanamycin, 10 µg/ml Tetracyclin, 100 µg/ml Bluo-Gal und 40 µg/ml IPTG ausgestrichen und 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Weiße Kolonien wurden zur Bestätigung ihres Phänotyps erneut auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 3 ml LB-Medium (mit 7 µg/ml Gentamicin, 50 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml Tetracyclin) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 14.000 x g für 5 min wurde der Überstand entfernt und das Bakteriensediment in 300 µl Resuspensionspuffer (15 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Nach Zugabe von 300 µl Lysispuffer (0,2 N NaOH, 1 % SDS) erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 300 µl Neutralisationspuffer (3 M K-Acetat, pH 5,5) zugegeben. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurde die Probe für 15 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein mit 800 µl Isopropanol gefülltes Eppendorfgefäß überführt, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 14.000 x g wurde der Überstand entfernt, die präzipitierte Bacmid-DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und konnte bei 4 °C gelagert werden.

### 4.2.2 *Kultivierung von Sf9-Zellen*

*Sf9*-Zellen wurden sowohl adhärenent als auch in Suspension bei 27 °C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Für die adhärenente Aufzucht in Zellkulturschalen (175 cm<sup>2</sup>) wurde TNM-FH-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Antibiotika-Zusätzen (Penicillin/Streptomycin) verwendet. Die Zellen in Suspensionskultur wurden im gleichen Medium gehalten, das jedoch mit 1 % Lipid Medium Supplement ergänzt wurde, um die Zellmembranen gegen die Scherkräfte in der Schüttelkultur zu schützen.

Zellen in adhärenenter Kultur wurden abhängig von der Zelldichte alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:4 umgesetzt. Schüttelkulturen wurden in einer Zelldichte von 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml angesetzt und durch regelmäßiges Verdünnen mit frischem Medium bis zu einer Zelldichte von 2,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml gehalten. Unter diesen Bedingungen sollte sich die Zahl der *Sf9*-Zellen innerhalb von 18-24 Stunden verdoppeln.

### **4.2.3 Transfektion von Sf9-Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA**

Es wurden  $0,9 \times 10^5$  Zellen in Zellkulturschalen ( $10 \text{ cm}^2$ ) ausgesetzt und eine Stunde inkubiert, damit die Zellen adhären konnten. Inzwischen wurden für jeden Transfektionsansatz  $5 \mu\text{l}$  Bacmid-DNA in  $100 \mu\text{l}$  Grace-Insektenmedium (ohne Antibiotikazusatz) sowie  $5 \mu\text{l}$  Cellfectin in  $100 \mu\text{l}$  Grace-Insektenmedium gelöst. Nach dem Mischen beider Lösungen erfolgte eine 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die adhären Zellen wurden mit  $1 \text{ ml}$  Grace-Insektenmedium gewaschen, mit dem Transfektionsgemisch sowie  $800 \mu\text{l}$  Grace-Insektenmedium überschichtet und für  $5 \text{ h}$  bei  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dem Ersetzen des Transfektionsgemisches durch  $2 \text{ ml}$  Medium mit Antibiotikazusätzen folgte eine Inkubation bei  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  für  $72 \text{ h}$ . Der virushaltige Überstand wurde abgenommen, zur Abtrennung von Zelltrümmern für  $5 \text{ min}$  bei  $500 \times \text{g}$  zentrifugiert und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Üblicherweise wies dieser Virusstock einen Titer von  $2\text{-}4 \times 10^7$  pfu/ml auf (4.2.5) und konnte bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  unter Lichtschutz aufbewahrt werden.

Zur Identifizierung rekombinanter Baculoviren wurde eine Zellrasenanalyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach dem Abnehmen des virushaltigen Überstands in  $400 \mu\text{l}$  Probenpuffer nach Lämmli (4.7.2) resuspendiert und eine Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt (4.7.2). Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte Sf9-Zellen. Durch Immunoblot-Analyse (4.7.4) mit spezifischen Antisera konnten rekombinante Proteine in den Zellhomogenaten nachgewiesen werden. Die rekombinanten Viren wurden durch Schüttelamplifikation vermehrt.

### **4.2.4 Amplifikation rekombinanter Viren**

Für die Amplifikation rekombinanter Viren wurden Sf9-Zellen in einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml mit entsprechenden rekombinanten Baculoviren ( $\text{MOI} = 0,1$ ) versetzt und  $48 \text{ h}$  inkubiert. Anschließend wurden Zellen und Zellfragmente bei  $7500 \times \text{g}$  ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $20 \text{ min}$ ) abzentrifugiert. Der virushaltige Überstand diente nach Titerbestimmung zur Infektion von Sf9-Zellen für die Gewinnung rekombinanter Proteine.

### **4.2.5 Titerbestimmung von Viruslösungen**

Es wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in Zellkulturschalen ( $10 \text{ cm}^2$ ) ausgesetzt und  $1 \text{ h}$  bis zur Adhärenz inkubiert. In der Zwischenzeit wurden Verdünnungen ( $10^{-3}$ - $10^{-8}$ ) der virushaltigen Überstände (4.2.4) hergestellt. Nachdem nicht-adhären Zellen abgesaugt waren, wurden die adhären Zellen mit  $1 \text{ ml}$  der jeweiligen Virusverdünnung überschichtet und eine Stunde bei  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Eine sterile Agarose-Lösung mit niedrigem Schmelzpunkt ( $2,5 \text{ } \%$  (w/v) "low-melting agarose" in Wasser) wurde durch Erwärmen verflüssigt und nach Temperieren auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  mit Medium im Verhältnis  $1:2$  gemischt. Der virushaltige Überstand wurde abge-



saugt und die Zellen mit 2 ml der Agarose/Medium-Mischung überschichtet. Um ein Austrocknen während der folgenden vier- bis zehntägigen Inkubationszeit bei 27 °C zu verhindern, wurden die Ansätze mit 2 ml Medium überschichtet. Während dieser Zeit vermehrten sich die Viren und bildeten - im Falle einer ausreichend großen Verdünnung des Virusüberstandes - gegeneinander abgrenzbare Plaques, die nach dem Anfärben mit MTT sichtbar waren. Diese Plaques wurden nun für die Bestimmung des Virustiters herangezogen. Dieser wird als "plaque forming units" (pfu/ml) angegeben und entspricht der Konzentration der Viren in der entsprechenden Lösung. Er berechnet sich wie folgt:

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{eingesetztes Volumen der Virusverdünnung (ml)}}$$

Durch Kenntnis des Titers war es möglich, die Infektion der *Sf9*-Zellen in einem bestimmten Virus/Zell-Verhältnis, der "multiplicity of infection" (MOI) durchzuführen.

#### **4.2.6 Infektion von *Sf9*-Zellen**

Zur Gewinnung präparativer Mengen rekombinanter Proteine wurden *Sf9*-Zellen in Schüttelkultur bei einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml mit den berechneten Virusmengen infiziert. Bei Koinfektionen von mehreren G-Protein- bzw. PI-3-Kinase-Untereinheiten wurde jeder einzelne Virus mit einer MOI von 1,0 - 5,0 zugegeben. Nach einer für das jeweilige Protein optimierten Infektionszeit (36-60 h) wurden die Zellen abzentrifugiert und mit eiskaltem PBS (12 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 120 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen. Die so erhaltenen Zellsedimente wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

### **4.3 Säugerkultivierung und transiente Transfektion**

#### **4.3.1 HL-60-Zellkultur**

Für die Kultur von HL-60-Zellen bei 37 °C und 7 %  $\text{CO}_2$  wurde RPMI-1640 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 % nichtessentiellen Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin, 40 µg/ml Folsäure, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen durch Zugabe von frischem Medium auf eine Dichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt. Unter diesen Bedingungen sollte sich die Zahl der HL-60-Zellen innerhalb von 24-36 Stunden verdoppeln. Zur Differenzierung in Richtung Granulozyt wurden die HL-60-Zellen in einer Dichte von  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml mit 0,2 mM dbt-cAMP versetzt (Chaplinski und Niedel, 1982) und für 48 h kultiviert. Die Behandlung der HL-60-Zellen mit Pertussis-

toxin erfolgte für 24 h bei einer Toxinkonzentration von 200 ng/ml (Wenzel-Seifert und Seifert, 1990). Zur Markierung mit  $^{32}\text{P}$ -Phosphat wurden differenzierte HL-60-Zellen durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt, in 1 ml Markierungspuffer (2,7 mM HEPES, pH 7,4, 137 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) aufgenommen und für 2 h bei 37 °C mit 1 mCi  $^{32}\text{P}$ -Phosphat inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Markierungspuffer gewaschen.

#### 4.3.2 *HEK293-Zellkultur und transiente Transfektion*

HEK293-Zellen wurden in MEM-Earle Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert und alle 3-4 Tage nach Ablösen mit Trypsin/EDTA-Lösung im Verhältnis 1:10 mit Medium verdünnt und in neue Zellkulturflaschen überführt. Zur transienten Expression von PI-3-Kinasen wurden die HEK293-Zellen in 6 cm-Kulturschalen ausgesetzt und am nächsten Tag mit jeweils 4 µg Plasmid-DNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels des Transfektions-Reagenz FuGene 6 (Roche) nach Angaben des Herstellers. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet.

#### 4.4 *Bestimmung der $\text{O}_2^-$ -Produktion in HL-60-Zellen*

Die Bestimmung der  $\text{O}_2^-$ -Produktion in dbt-cAMP-differenzierten HL-60-Zellen wurde nach der von Markert und Mitarbeitern (1984) beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wird Ferricytochrom c durch  $\text{O}_2^-$  zu Ferrocycytochrom c reduziert, das monochromatisches Licht bei 550 nm absorbiert. Anhand der gemessenen Absorptionzunahme bei 550 nm kann die  $\text{O}_2^-$ -Bildung quantifiziert werden.

Differenzierte HL-60-Zellen wurden durch zehnmünütige Zentrifugation bei 250 x g vom Medium abgetrennt und in einer Dichte von 2-4 x  $10^7$  Zellen/ml in  $\text{O}_2^-$ -Puffer (20 mM HEPES, pH 7,4, 138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5,5 mM Glucose) aufgenommen. Für Inhibitionsmessungen mit Wortmannin bzw. LY294002 wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit den Inhibitoren inkubiert. Zur Messung der  $\text{O}_2^-$ -Produktion wurden 5 x  $10^6$  Zellen verwendet, die in einer Küvette mit 100 µM Cytochrom c, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 µg/ml Cytochalasin B (zur Potenzierung der rezeptorvermittelten  $\text{O}_2^-$ -Produktion, Jesaitis et al., 1986) in 1 ml  $\text{O}_2^-$ -Puffer gemischt wurden. Nach einer dreiminütigen Präinkubation bei 37 °C erfolgte die Zugabe von fMLP. Nun wurde die Zunahme der Absorption bei 550 nm ( $\Delta A$ ) im Doppelstrahlphotometer (Uvikon 810, Kontron, Eching) für 15 min gemessen, als Referenzwert diente die Absorption bei 550 nm vor Zugabe von fMLP. Zur Quantifizierung des gebildeten  $\text{O}_2^-$  diente folgende Formel:

$$\text{O}_2^- \text{ (nmol)} = 47,7 \times \Delta A$$

## **4.5 Reinigung rekombinanter Proteine**

### **4.5.1 Präparation von Cytosol und Zellmembranen**

*Sf9*-Zellsedimente (4.2.6) wurden in eiskaltem Bombenpuffer (50 mM HEPES, pH 8,0 (für  $G\beta\gamma$ -Komplexe) bzw. 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 (für PI-3-Kinasen) sowie 150 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -ME, 0,2 mM Pefabloc SC, 50  $\mu$ g/ml Benzamidin, 10  $\mu$ g/ml Trypsin-Inhibitor, 10  $\mu$ g/ml TPCK) resuspendiert und durch  $N_2$ -Überdruck in einer Parr-Bombe (25 bar, 4 °C, 30 min) aufgeschlossen. Zur Abtrennung der Zellkerne wurde das so erhaltene Zellysat bei 800 x g für 2 min zentrifugiert, anschließend folgte ein Ultrazentrifugationsschritt (100.000 x g, 4 °C, 40 min) zur Gewinnung von Zellmembranen und Cytosol. Das Membransediment wurde in Waschpuffer (50 mM HEPES, pH 8,0, 50 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -ME, 0,2 mM Pefabloc SC, 50  $\mu$ g/ml Benzamidin, 10  $\mu$ g/ml Trypsin-Inhibitor, 10  $\mu$ g/ml TPCK) resuspendiert.

### **4.5.2 Affinitätschromatographie**

Rekombinante Proteine können mit bestimmten zusätzlichen Peptidmotiven, den Affinitätsmarkierungen, versehen werden, die eine reversible Bindung an spezielle chromatographische Medien (Affinitätsmatrix) und damit eine schnelle und effiziente Reinigung ermöglichen. Hier wurden Hexahistidin-markierte und Glutathion-S-Transferase-(GST)-fusionierte rekombinante Proteine verwendet.

#### **4.5.2.1 Reinigung rekombinanter Hexahistidin-markierter $G\beta_1\gamma_2$ -Komplexe**

Die membranständigen Proteine wurden mit 0,5 % Natriumcholat solubilisiert. Der entstandene Extrakt wurde durch Ultrazentrifugation (100.000 x g, 4 °C, 40 min) geklärt, in Puffer A (20 mM HEPES, pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,1 % Lubrol PX, 20 mM Imidazol, 10 mM  $\beta$ -ME) auf das fünffache Volumen verdünnt und auf eine  $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose-Säule geladen. Anschließend wurde die Säule mit Puffer A und zur Entfernung endogener *Sf9*- $G\alpha$ -Untereinheiten mit AMF-Puffer (20 mM HEPES, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 % Natriumcholat, 10 mM NaF, 50  $\mu$ M  $AlCl_3$ , 10  $\mu$ M GDP, 50 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $\beta$ -ME) gewaschen. Nach dem Waschen mit Puffer B (20 mM HEPES, pH 8,0, 25 mM NaCl, 0,1 % Lubrol PX, 10 mM  $\beta$ -ME) wurden die  $G\beta_1\gamma_2$ -His-Komplexe mit Puffer C (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 25 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 0,1 % Lubrol PX, 10 mM  $\beta$ -ME) eluiert.

#### **4.5.2.2 Reinigung rekombinanter Hexahistidin-markierter PI-3-Kinasen**

Die cytosolische Fraktion (4.5.1) wurde mit 4-10 mM Imidazol versetzt und auf eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säule geladen. Nach dem Waschen der Säule mit Puffer D (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 4-10 mM Imidazol, 10 mM  $\beta$ -ME) wurden die gebundenen Proteine mit Puffer E (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 10 mM  $\beta$ -ME) eluiert.

#### **4.5.2.3 Reinigung rekombinanter GST-fusionierter PI-3-Kinasen**

Die cytosolische Fraktion (4.5.1) wurde langsam auf eine Glutathion-Sepharose-Säule geladen, um eine hohe Bindung zu erreichen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Puffer F (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -ME) entfernt. Die gebundenen GST-Fusionsproteine wurden mit 10 mM Glutathion in Puffer F eluiert.

#### **4.5.3 Anionenaustausch-Chromatographie**

Auf die affinitätschromatographische Reinigung der Proteine (4.5.2) folgte die Anionenaustausch-Chromatographie, um störende Pufferbestandteile zu entfernen und die Proteine zu konzentrieren. Hierfür wurden die Eluate (4.5.2) mit Puffer G (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM  $\beta$ -ME sowie 0,1 % Lubrol PX für Membranproteine) auf das fünffache Volumen verdünnt und auf eine Resource Q15-Säule (1 ml) geladen. Nach dem Waschen der Säule mit Puffer G wurden die Proteine entsprechend ihrer steigenden negativen Nettoladung mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten (0-500 mM in Puffer G,  $\Delta c_{(\text{NaCl})}/\Delta V = 25 \text{ mM/ml}$ ) eluiert und fraktioniert. Die gereinigten Proteine wurden durch ihre Immunreaktivität (4.7.4) identifiziert und durch Coomassie-Färbung nach gelelektrophoretischer Auftrennung (4.7.1) quantifiziert. Sofern die Proteine nicht unmittelbar zum Einsatz kamen, wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

### **4.6 Immunpräzipitation**

Differenzierte HL-60-Zellen (4.3.1) bzw. transfizierte HEK293-Zellen (4.3.2) wurden nach Abtrennen des Mediums in Lysispuffer (50 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 2 mM  $\beta$ -ME, 1 % Nonidet P40, 2 mM Pyrophosphat, 2 mM Orthovanadat, 0,2 mM Pefabloc SC, 50  $\mu\text{g/ml}$  Benzamidin, 10  $\mu\text{g/ml}$  Trypsin-Inhibitor, 10  $\mu\text{g/ml}$  TPCK) resuspendiert und durch Homogenisieren mit einer Injektionskanüle (26 G) abgeschlossen. Zur Gewinnung des Zellextrakts erfolgte eine Ultrazentrifugation (100.000 x g, 4 °C, 30 min). Inzwischen wurde der anti-p110 $\gamma$ -Antikörper an ProteinA-Sepharose gebunden. Die Zellextrakte wurden mit Präzipitationspuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 7,2,

150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM NaF, 1 % Nonidet P40, 2 mM Pyrophosphat, 2 mM Orthovanadat, 0,2 mM Pefabloc SC, 50 µg/ml Benzamidin) verdünnt und mit Antikörperhaltiger bzw. Antikörper-freier ProteinA-Sepharose über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Sepharose (1000 x g, 2 min) wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen mit Präzipitationspuffer entfernt. Es folgten Waschschritte mit 1 M LiCl in 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 und mit Vesikelpuffer (4.8.1). Die so vorbereiteten Proben wurden zur Bestimmung der Lipid- bzw. Proteinkinase-Aktivität (4.8) eingesetzt oder zur Identifizierung der gebundenen Proteine mit Probenpuffer nach Lämmli (4.7.2) resuspendiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt (4.7.2) und durch ihre Immunoreaktivität (4.7.4) identifiziert.

## **4.7 Proteinbiochemische Analyse-Methoden**

### **4.7.1 Proteinbestimmung**

Die Konzentration der eingesetzten Proteine wurde durch verschiedene Methoden bestimmt, die alle auf der Bildung eines farbigen Komplexes in Abhängigkeit vom Proteingehalt beruhen.

Die BCA-Methode ("Pierce BCA Protein Assay") wurde zur Konzentrationsbestimmung von Proteinpräparationen eingesetzt, die keine Detergenzien enthielten. Dabei reagiert das Protein mit  $\text{Cu}^{2+}$  und Bicinchoninsäure in alkalischer Lösung zu einem  $\text{Cu}^+$ -Bicinchoninsäurekomplex. Dieser Komplex kann spektrophotometrisch nachgewiesen werden. Für detergenzhaltige Präparationen kam die Methode nach Lowry und Mitarbeitern (1951), teilweise modifiziert nach Peterson (1983), zum Einsatz. Diese beruht auf der Reduktion von Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz durch Proteine, wobei ein farbiger Komplex entsteht, dessen Intensität von der eingesetzten Proteinkonzentration abhängig ist.

Als weitere Bestimmungsmethode wurde die Färbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue herangezogen (4.7.3). Dazu wurden die Proteine SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt (4.7.2) und durch Coomassie-Lösung angefärbt. Die mit 10 %iger Essigsäure entfärbten Gele wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners digitalisiert und mit der Auswertungssoftware TINA 2.09f (Raytest, Straubenhardt) densitometrisch quantifiziert.

Bei allen drei Methoden wurde Rinderserum-Albumin als Mengenstandard verwendet.

### **4.7.2 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer relativen Molekülmasse wurde ein von Lämmli (1970) entwickeltes, denaturierendes, diskontinuierliches Elektrophorese-System verwendet. Dazu werden die Proben in Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl, 10 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -ME, 2 % (w/v) SDS und 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Die

Spaltung von Disulfidbrücken durch  $\beta$ -Mercaptoethanol verhindert eine Zusammenlagerung einzelner Untereinheiten zu multimeren Proteinen. SDS, ein anionisches, hydrophiles Detergenz, denaturiert die Proteine und verleiht ihnen durch Anlagerung an ihre Oberfläche eine negative Ladung. Dadurch können die Proteine nahezu unabhängig von ihrer eigentlichen Ladung und Faltung entsprechend ihrer Molmasse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Elektrophorese wurde in einem Puffer aus 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS durchgeführt. Zur Konzentrierung der Proteine bei einer Spannung von 100 V diente ein relativ großporiges Sammelgel, während die Auftrennung bei 150 V in einem kleinporigen Trenngel erfolgte.

	<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel</u>
Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	4,5 % (w/v)	10 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
APS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
TEMED	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
Tris/HCl	125 mM, pH 6,8	375 mM, pH 8,8

Zur gelelektrophoretischen Trennung von Peptiden nach enzymatischem Verdau der p110 $\gamma$ -Untereinheit (4.10.1) wurden kommerzielle Polyacrylamidgele der Fa. Bio-Rad verwendet. Dabei handelt es sich um ein Tris/Tricin/SDS-Gelsystem mit einem kontinuierlichen Polyacrylamidgradienten von 4 - 20 %, das eine hohe Auflösung im Molekulargewichtsbereich von < 10 kDa ermöglicht. Die Proben wurden in einem mitgelieferten Probenpuffer entsprechend den Angaben des Herstellers aufgenommen.

### **4.7.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen**

Die über SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennten Proteine (4.7.2) konnten durch Färbung mit 1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde mit der Coomassie-Lösung mindestens 20 min gefärbt und anschließend mit einem Gemisch aus 5 % Methanol und 10 % Essigsäure entfärbt, wobei Methanol den Farbstoff aus dem Gel herauslöst und Essigsäure den farbigen Proteinkomplex stabilisiert. Die Proteine waren nach Entfärbung des Gels als blaue Banden sichtbar. Für die kolorimetrische Quantifizierung von Proteinbanden (4.7.1) wurde 10 %ige Essigsäure ohne Methanolzusatz zum Entfärben eingesetzt.

#### 4.7.4 Immunoblot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (4.7.2) wurden durch dieses Verfahren auf Nitrocellulose-Membranen übertragen (Towbin et al., 1976) und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Leopoldt et al., 1997, Viard et al., 1999, Macrez et al., 2001). Der Proteintransfer (Minigel, 8 x 10 cm) erfolgte für 90 min bei 250 mA mit 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,02 % (w/v) SDS in 20 % (v/v) Methanol. Die Nitrocellulose-Streifen wurden mit Ponceau S-Lösung angefärbt und der überschüssige Farbstoff dann durch Spülen mit demineralisiertem H<sub>2</sub>O entfernt. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden dabei durch Bindung des roten Farbstoffs reversibel sichtbar gemacht. Um den Proteinen später eine Molmasse zuordnen zu können, wurde die Position der Standardproteine auf den Membranen markiert. Dann wurden die Membranen bei Raumtemperatur für 1 h in einer 10 %igen Lösung von Roti-Block geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluß daran folgte eine einstündige Inkubation mit Antisera (Verdünnungen 1:150 - 1:2000), die gegen bestimmte Peptidsequenzen der nachzuweisenden Proteine gerichtet waren.

Nach mehrmaligem Waschen der Nitrocellulose-Streifen mit TBST-Puffer wurden diese für 1 h mit einem 1:1000 verdünnten Peroxidase-konjugierten Anti-Immunglobulin-Antikörper inkubiert (Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-IgG). Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden nach erneutem Waschen der Membranen mit TBST-Puffer über die Peroxidase-Aktivität durch Chemolumineszenz nachgewiesen (ECL-Kit, Amersham Buchler, Braunschweig).

##### TBST-Puffer (Tris-buffered-saline-Tween)

Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
NaCl	150 mM
Tween	0,05 % (v/v)

#### 4.8 PI-3-Kinase-Funktionsbestimmung

Klasse I PI-3-Kinasen zeigen sowohl eine Lipid- als auch eine Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität (Hunter, 1995). Zur Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität wurde die Fähigkeit der Klasse I PI-3-Kinasen untersucht, Phosphoinositide in der 3'-Position des Inositolrings unter Übertragung der  $\gamma$ -ständigen Phosphatgruppe von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP zu phosphorylieren (Stoyanov et al., 1995). Die dabei entstandenen <sup>32</sup>P-markierten 3'-phosphorylierten Produkte wurden isoliert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und quantifiziert (4.8.2). Die Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen wurde als Autophosphorylierung gemessen (Maier et al., 1999). Die gebildeten <sup>32</sup>P-markierten Produkte wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt (4.7.2) und quantifiziert (4.8.3).

### **4.8.1 Herstellung der Phospholipid-Vesikel**

Zur Herstellung der Lipidvesikel wurden 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Chloroform ausgespült und die folgenden Lipid-Lösungen in den angegebenen Mengen gemischt: 22,5 µl Phosphatidylethanolamin (10 mg/ml), 21 µl Phosphatidylserin (10 mg/ml), 9,6 µl Phosphatidylcholin (10 mg/ml), 10,5 µl Sphingomyelin (2 mg/ml) und für Lipidkinase-Aktivitäts-Untersuchungen zusätzlich 30 µl PI-4,5-P<sub>2</sub> (1 mg/ml) oder 20 µl PI (10 mg/ml). Die Lipidmischung wurde im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet und der entstandene Lipidfilm in 900 µl Vesikelpuffer (40 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM β-Glycerophosphat und 0-10 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. MnCl<sub>2</sub>) aufgenommen. Die Eppendorfgefäße wurden im Ultraschallbad bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich der Lipidfilm vollständig von der Gefäßwandung unter Bildung einer leicht trüben Suspension gelöst hatte.

### **4.8.2 Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität**

Die Lipidkinase-Aktivität wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl bestimmt (Maier et al., 1999). Dazu wurden 30 µl Phospholipid-Vesikel (4.8.1) mit 3 µl BSA (1 %) und den jeweiligen Stimuli (Gβγ-Komplexe und/oder p85-Bindungspeptid) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Für die Messung der Gβγ-stimulierten Lipidkinase-Aktivität wurden die einzelnen Versuchsansätze mit Hilfe von Gβγ-Trägerpuffer auf die gleiche Detergenz-Konzentration eingestellt. Anschließend wurden 20-100 ng PI-3-Kinase β bzw. 2-10 ng PI-3-Kinase γ zugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Reaktionspuffer (40 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM β-Glycerophosphat, 0,1 % BSA, 40 µM ATP, 1 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP und 0-10 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. MnCl<sub>2</sub>) gestartet und nach 15minütiger Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von 150 µl 1 N HCl gestoppt.

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden zur Vermeidung von hydrolytischen Dephosphorylierungen auf Eis durchgeführt. Die Extraktion der Lipide erfolgte mit 500 µl Chloroform/Methanol (1:1) durch Vortexen (30 s), anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation (1000 x g, 1 min, 4 °C) wieder getrennt. Von der unteren organischen Phase wurden 150 µl abpipettiert und in ein Eppendorfgefäß überführt, in welchem 150 µl 1 N HCl vorgelegt waren. Der Waschschritt wurde wiederholt. Anschließend wurde die organische Phase dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

Hierzu wurde eine 20 x 20 cm Dünnschichtplatte (Kieselgel 60) mit Kaliumoxalat (1 % in 40 % Methanol) vorentwickelt, anschließend zunächst an der Luft und unmittelbar vor Gebrauch für mindestens 1 h bei 80 °C getrocknet. Von der gewaschenen organischen Phase wurden 40-100 µl auf die Platte aufgetragen und mit einem Gemisch aus 35 ml 2 N Essigsäure und 65 ml n-Propanol entwickelt (2,5 h, ca. 15 cm). Die Platten wurden getrocknet und autoradiographisch mit Hilfe eines Phosphor-Imagers ausgewertet.



### 4.8.3 Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität

Die Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität erfolgte prinzipiell wie die Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität (4.8.2). Es wurden Phosphoinositid-freie Phospholipid-Vesikel verwendet und das Probenvolumen betrug 25  $\mu\text{l}$  (Maier et al., 1999, 2000). 15  $\mu\text{l}$  Phospholipid-Vesikel wurden mit 1,5  $\mu\text{l}$  BSA (1%) und den jeweiligen Stimuli (G $\beta\gamma$ -Komplexe und/oder p85-Bindungspeptid) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 20-50 ng PI-3-Kinase zugegeben und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Angleichung der G $\beta\gamma$ -Puffermengen erfolgte analog zur Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität. Nach Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer (wie in 4.8.2, jedoch 80  $\mu\text{M}$  ATP und 2  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP) wurde der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  vierfach konzentriertem Probenpuffer nach Lämmli (4.7.2) gestoppt. 25  $\mu\text{l}$  der Probe wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt (4.7.2) und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (4.7.4). Die quantitative Auswertung der getrockneten Blot-Streifen erfolgte mit einem Phosphor-Imager.

Zur Protein-Phosphorylierung für massenspektrometrische Untersuchungen wurden 20-50  $\mu\text{g}$  PI-3-Kinase in einem Reaktionsvolumen von 1500  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Auf den Zusatz von BSA zum Reaktionsgemisch wurde verzichtet. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Zugabe von 0,5 % Natriumcholat, um die Lipidvesikel zu solubilisieren. Anschließend wurde die Probe mit Hilfe von Centrikon Ultrazentrifugationsröhrchen konzentriert, SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel mit Coomassie-Lösung gefärbt. Zur Quantifizierung der Autophosphorylierung wurde ein Phosphor-Imager benutzt.

## 4.9 Phosphoaminosäure-Analyse

Zur Bestimmung der phosphorylierten Aminosäure wurde eine zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese nach saurer Hydrolyse des Proteins durchgeführt (Boyle et al., 1991). Hierfür wurde das mit radioaktiv markiertem ATP phosphorylierte Protein gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Immobilon P) transferiert. Die radioaktiv markierte Proteinbande wurde ausgeschnitten und in 6 M HCl für 1 h bei 110 °C hydrolysiert. Nach dem Einengen der Probe in einer Vakuumzentrifuge wurde diese in Puffer I (pH 1,9) aufgenommen. Die Probe sowie Phosphoaminosäure-Standards (1 mg/ml Phosphoserin, Phosphothreonin, Phosphotyrosin) wurden auf eine Cellulose-Dünnschichtplatte aufgebracht und in der ersten Dimension für 60 min bei 550 V in Puffer I (pH 1,9) aufgetrennt. Nach Trocknung der Platte wurde diese um 90 ° gegen den Uhrzeigersinn gedreht und in der zweiten Dimension für 50 min bei 500 V in Puffer II (pH 3,5) entwickelt. Zur Sichtbarmachung der Phosphoaminosäure-Standards wurde die getrocknete Dünnschichtplatte mit 0,2 % Ninhydrin in Aceton besprüht und erhitzt, bis die Standards als violette Flecken sichtbar wurden. Anschließend wurde die Dünnschichtplatte zur Detektion der Radioaktivität

auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Anhand der gefärbten Phosphoaminosäure-Standards konnten die radioaktiv markierten Phosphoaminosäuren zugeordnet werden.

<u>Puffer I (pH 1,9)</u>		<u>Puffer II (pH 3,5)</u>	
88 % Ameisensäure	50 ml	Pyridin	10 ml
Eisessig	156 ml	Eisessig	100 ml
H <sub>2</sub> O	1794 ml	H <sub>2</sub> O	1890 ml

## 4.10 *Massenspektrometrische Methoden*

### 4.10.1 *Spaltung der Gel-fixierten Proteine*

Die Coomassie-gefärbte Proteinbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, in Würfel von ca. 1 mm Kantenlänge geteilt und zur Entfernung des SDS mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgten ein Waschschrift mit 50 % (v/v) Acetonitril in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> und das Schrumpfen der Gelstückchen mit Acetonitril. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurden die Gelstückchen für 45 min bei 55 °C mit 10 mM DTT in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> inkubiert. Anschließend erfolgte die Alkylierung von Cystein-Resten durch Zugabe von 55 mM Iodacetamid in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Nach 20minütiger Inkubation bei 25 °C im Dunklen wurden die Gelstückchen mit 50 % (v/v) Acetonitril in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gewaschen, durch Zugabe von Acetonitril dehydratisiert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Es folgten die Rehydratisierung der Gelstückchen mit den entsprechenden Protease-lösungen (1-3 µg Enzym) und eine Inkubation bei 37 °C (Trypsin, LysC, AspN, Chymotrypsin) bzw. 25 °C (GluC) über Nacht. Zur Extraktion der Peptide wurde 0,5 % (v/v) TFA in Acetonitril zugegeben und die Probe für 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Die peptidhaltige Lösung wurde vorsichtig in der Vakuumzentrifuge eingengt.

Zur nicht-enzymatischen Spaltung der Proteine wurden die Gelstückchen mit Bromcyan-Lösung (10 mg/ml in 50 % (v/v) TFA) rehydratisiert und über Nacht bei 25 °C inkubiert. Die Extraktion der Peptide erfolgte mit Acetonitril. Zur Entfernung der TFA wurde die peptidhaltige Lösung mehrfach mit H<sub>2</sub>O aufgenommen und in der Vakuumzentrifuge eingengt.

### 4.10.2 *Aufreinigung der peptidhaltigen Lösung mittels ZipTip*

Sollte eine MALDI-MS-Analyse der unseparierten Peptid-Lösung erfolgen, wurde die Probe mittels ZipTip C<sub>18</sub> aufgereinigt, um störende Salze abzutrennen (Kusmann et al., 1997). Hierfür wurde die eingengte Probe (4.10.1) in 10 µl 0,1 % (v/v) TFA/ 5 % (v/v) Acetonitril aufgenommen und an eine C<sub>18</sub>-reversed phase-Minisäule gebunden, die zuvor mit 0,1 % (v/v) TFA equilibriert worden war. Es folgten ein Waschschrift mit 0,1 % (v/v) TFA und die

Elution der Peptide mit 2,5 µl ACHC-Matrix-Lösung (8 mg/ml  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure in 0,3 % TFA/ 70 % (v/v) Acetonitril) direkt auf die Probenplatte.

#### **4.10.3 Reversed phase-HPLC**

Zur Auftrennung der Peptide wurde eine *reversed phase*-HPLC an einer C<sub>18</sub>-Säule (Vydac 218 TP 5115, 150 x 1,0 mm, Partikelgröße 5 µm) durchgeführt. Hierfür wurde die eingengte Probe (4.10.1) in 5 µl 0,1 % (v/v) Ameisensäure aufgenommen und auf die Säule geladen, die zuvor mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure equilibriert worden war. Die Elution der Peptide erfolgte mit einem linearen Acetonitril-Gradienten (4-64 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 60 min, 64 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 5 min, 64-4 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 2 min) mit einem Fluß von 30 µl/min in Fraktionen á 30 µl. Durch Messung der Cerenkov-Strahlung in einem Flüssigkeits-szintillations-Spektrometer konnten radioaktive Fraktionen identifiziert werden, die in der Vakuumzentrifuge eingengt wurden. Von diesen Proben wurde 1 µl mit 1 µl ACHC-Matrix-Lösung (4.10.2) gemischt und auf die Probenplatte aufgebracht.

#### **4.10.4 MALDI-MS**

Die nach 4.10.2 bzw. 4.10.3 aufbereiteten Proben wurden in einem MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight*)-Spektrometer der Firma Perseptive Biosystems, Inc. (Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation) analysiert. Die Messungen wurden im Reflektions-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV, 70 % Gitterspannung und einer Verzögerung von 200 ns sowie im Linear-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV, 94 % Gitterspannung und einer Verzögerung von 200 ns durchgeführt. Für jedes Spektrum wurde der Mittelwert aus 256 Laser-Impulsen gebildet. Zur Interpretation der Spektren wurden die Programme MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msfit.htm>) und FindMod (<http://expasy.ch/tools/findmod>) verwendet.

#### **4.10.5 Massenspektrometrische Peptidsequenzierung**

Zur Sequenzierung von Peptiden mittels Nanoelektrospray-Ionisierungs-Tandemmassenspektrometrie (nESI-MS/MS) wurden 5 µl der Peptidmischung (4.10.3) lyophilisiert und in 5 µl 0,5 % Ameisensäure in 50 % (v/v) Methanol aufgenommen. Die MS/MS-Messung wurde mit einem Nanoelektrospray-Hybrid-Quadrupol-Massenspektrometer Q-TOF (Micromass, Manchester, UK) durchgeführt. Als Kollisionsgas diente Argon bei einem Druck von  $6,0 \times 10^{-5}$  mbar in der Kollisionszelle.

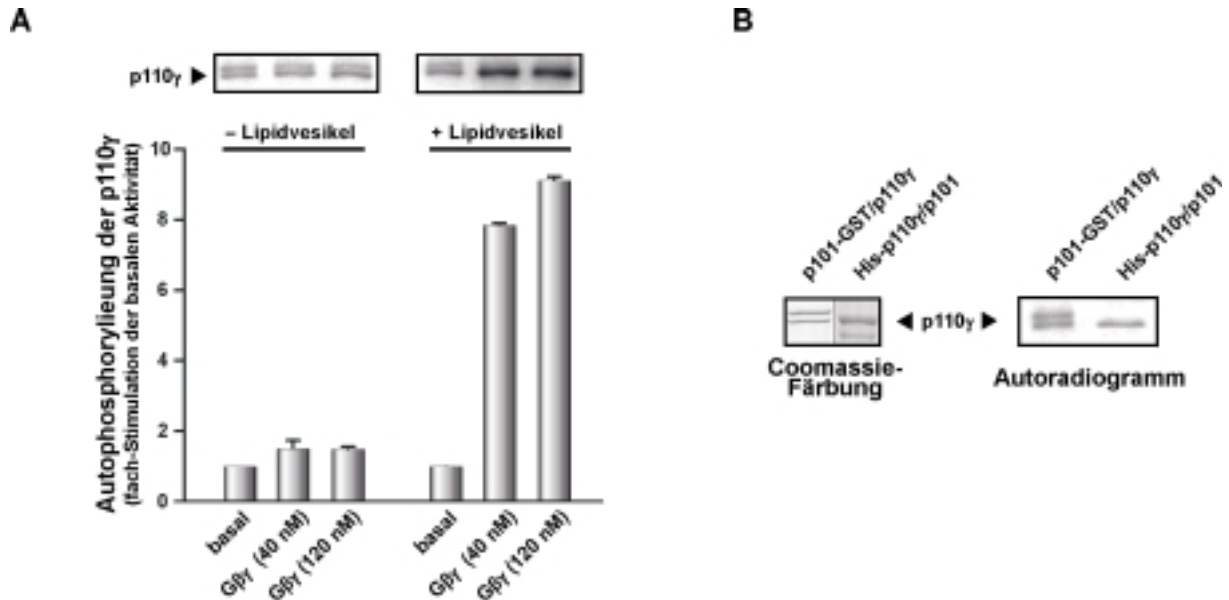
## 5 **ERGEBNISSE**

### 5.1 **Charakterisierung der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase $\gamma$**

#### 5.1.1 **G $\beta\gamma$ -Sensitivität der Autophosphorylierung**

Ein wichtiges Charakteristikum aller Klasse I PI-3-Kinasen ist ihre intrinsische Serin/Threonin-Proteinkinase-Aktivität (Hunter, 1995). So konnten Stoyanova und Mitarbeiter (1997) erstmals die Autophosphorylierung der monomeren p110 $\gamma$ -Untereinheit zeigen. In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen zur Proteinkinase-Aktivität der gereinigten heterodimeren PI-3-Kinase  $\gamma$  ergaben ebenfalls eine Phosphorylierung der katalytischen p110 $\gamma$ -Untereinheit, die Mg<sup>2+</sup>-abhängig war und durch Zugabe von G $\beta\gamma$ -Komplexen gesteigert werden konnte (Maier et al., 1999). Weiterhin beschrieben Bondev und Mitarbeiter (1999) am gereinigten Enzym auch eine Phosphorylierung der p101-Untereinheit. Zusätzlich hatten in dieser Untersuchung G $\beta\gamma$ -Komplexe in höherer Konzentration einen hemmenden Effekt auf die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$ . Um die Befunde einordnen und verstehen zu können, sollte die G $\beta\gamma$ -Sensitivität der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht werden. Ein Unterschied in den Versuchsansätzen bestand in der Verwendung von Phosphoinositid-freien Phospholipid-Vesikeln durch Maier und Mitarbeiter (1999), während in der Arbeit von Bondev und Mitarbeitern (1999) auf eine lipophile Umgebung verzichtet wurde. Daher untersuchten wir zunächst die G $\beta\gamma$ -stimulierte Autophosphorylierung der rekombinant gereinigten PI-3-Kinase  $\gamma$  (p101-GST/p110 $\gamma$ ) in An- und Abwesenheit von Phospholipid-Vesikeln (Abb. 6A). In Abwesenheit der Vesikel hatten G $\beta\gamma$ -Komplexe keinen Einfluß auf die Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit, während in Anwesenheit der Vesikel eine Stimulation der Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit durch G $\beta\gamma$  beobachtet werden konnte. Ein Grund für die Notwendigkeit von Phospholipid-Vesikeln für die G $\beta\gamma$ -Stimulation der Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit könnte darin liegen, dass die Vesikel für die korrekte Faltung des Enzyms erforderlich sind und eine Präorientierung der Interaktionspartner auf der Oberfläche der Vesikel zu einer verbesserten Wechselwirkung führt. Allerdings wurde eine in Abwesenheit von G $\beta\gamma$ -Komplexen beobachtete Phosphorylierung der p101-Untereinheit durch Zugabe von G $\beta\gamma$  auch in Anwesenheit von Phospholipid-Vesikeln nicht verstärkt. Diese fehlende Regulierbarkeit deutet möglicherweise auf eine unspezifische Phosphorylierung hin. Da die p101-Untereinheit mit dem Enzym Glutathion-S-Transferase fusioniert war, ist auch nicht auszuschließen, dass die Phosphorylierung in diesem Bereich des Fusionsproteins stattfand. Daher sollte ein Enzym mit veränderter Affinitätsmarkierung (His-p110 $\gamma$ /p101) auf seine Proteinkinase-Aktivität untersucht werden. Wie in Abb. 6B gezeigt, war auch bei Verwendung des Hexahistidin-markierten Heterodimers eine

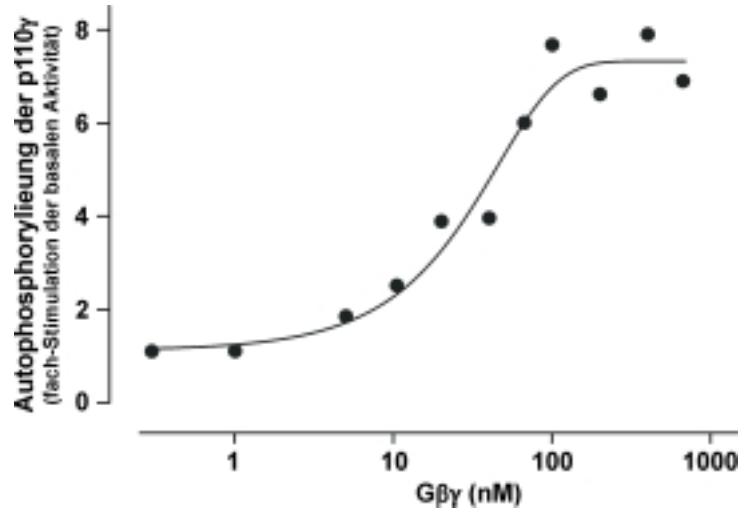
Phosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit zu beobachten, während die p101-Untereinheit nicht phosphoryliert wurde. Daher kam für alle weiteren *in vitro*-Untersuchungen dieses Heterodimer zum Einsatz.



**Abb. 6: G $\beta$  $\gamma$ -Stimulation der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  in An- und Abwesenheit von Phospholipid-Vesikeln**

**A** Gereinigte heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$  (p101-GST/p110 $\gamma$ ) wurde auf den Einbau von radioaktiv markiertem  $^{32}$ P-Phosphat in An- und Abwesenheit von Phospholipid-Vesikeln sowie unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von rekombinanten G $\beta$  $\gamma$  $_{2}$ -His-Komplexen untersucht. Die Messungen wurden entsprechend den Angaben in den Methoden durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Autoradiogramme nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine und anschließendem Transfer auf Nitrocellulose-Membranen (oben) und die Mittelwerte ( $\pm$  S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen (unten). Man beachte, dass die GST-fusionierte p101-Untereinheit ein größeres Molekulargewicht aufweist als die p110 $\gamma$ -Untereinheit. **B** Die Proteinkinase-Aktivität der gereinigten heterodimeren PI-3-Kinase  $\gamma$  (p101-GST/p110 $\gamma$  bzw. His-p110 $\gamma$ /p101) wurde in Anwesenheit von Phospholipid-Vesikeln bestimmt. Gezeigt sind ein Coomassie-gefärbtes Gel der gereinigten Proteine (links) sowie ein typisches Autoradiogramm (rechts).

Als nächstes wurde untersucht, ob das Hexahistidin-markierte Heterodimer (His-p110 $\gamma$ /p101) die gleiche Stimulierbarkeit durch G $\beta$  $\gamma$ -Komplexe zeigt wie das bisher in unserer Arbeitsgruppe verwendete GST-Fusionsprotein (p101-GST/p110 $\gamma$ ). Die entsprechende Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist in Abb. 7 dargestellt. G $\beta$  $\gamma$  $_{2}$ -His-Komplexe stimulierten hierbei die Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit mit einem EC $_{50}$ -Wert von ca. 30 nM. Dies entsprach den früher mit dem p101-GST/p110 $\gamma$ -Heterodimer ermittelten Werten (Maier et al., 2000).



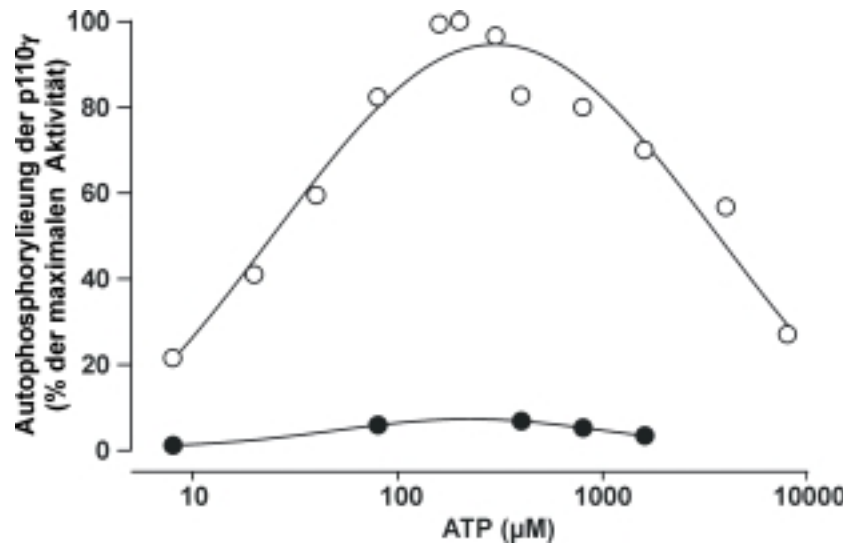
**Abb. 7: Sensitivität des p110 $\gamma$ -His/p101-Heterodimers gegenüber G $\beta\gamma$**

Die Proteinkinase-Aktivität der heterodimeren PI-3-Kinase  $\gamma$  (His-p110 $\gamma$ /p101) wurde mit steigenden Konzentrationen von rekombinantem G $\beta_1\gamma_2$ -His stimuliert. Es wurde der Einbau von  $^{32}\text{P}$ -markiertem Phosphat in die katalytische p110 $\gamma$ -Untereinheit als Vielfaches des Basalwertes gemessen. Gezeigt ist ein typisches von drei unabhängigen Experimenten.

### 5.1.2 Stöchiometrie der Autophosphorylierung

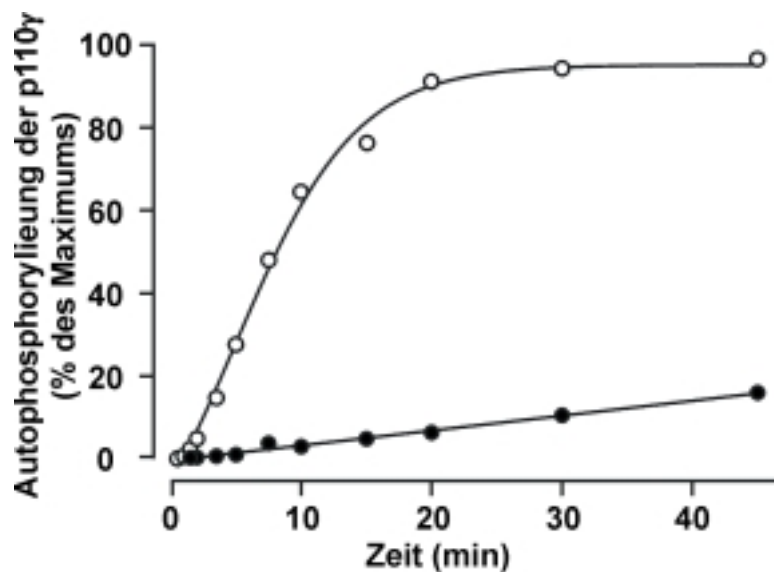
Bei den in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten initialen Untersuchungen zur Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit betrug die Stöchiometrie des Phosphat-Einbaus etwa 0,6 mol Phosphat pro mol p110 $\gamma$  (Maier et al., 1999). Das lässt die Vermutung zu, dass unter optimalen Bedingungen genau eine Aminosäure phosphoryliert wird. Um dies zu prüfen, sollten nun Versuchsparameter optimiert werden. Dafür wurde zunächst der Einfluß der ATP-Konzentration auf die basale und G $\beta\gamma$ -stimulierte Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit untersucht (Abb. 8). In Anwesenheit von G $\beta\gamma$ -Komplexen wurde eine maximale Autophosphorylierung bei einer ATP-Konzentration von etwa 200  $\mu\text{M}$  erreicht. Bei höheren ATP-Konzentrationen nahm die Effizienz der Phosphorylierungsreaktion wieder ab. Für die basale Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  ergab sich bei einem wesentlich geringeren Ausmaß der Phosphorylierung ein ähnliches Bild.

Weiterhin wurde der Zeitverlauf der Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit untersucht (Abb. 9). Unter basalen Bedingungen fand nur ein geringer Phosphat-Einbau in die p110 $\gamma$ -Untereinheit statt, der zeitabhängig zunahm. Im Gegensatz dazu wurde die Reaktion durch Zugabe von G $\beta\gamma$ -Komplexen stark beschleunigt. Nach etwa 30 min war der maximale Phosphat-Einbau erreicht.



**Abb. 8: Einfluß der ATP-Konzentration auf die Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit**

Die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  wurde unter Basalbedingungen (●) sowie in Gegenwart von 120 nM  $G\beta_1\gamma_2$ -His (○) unter Verwendung steigender ATP-Konzentrationen bestimmt. Es wurde der Einbau von  $^{32}P$ -markiertem Phosphat in die katalytische p110 $\gamma$ -Untereinheit gemessen, bezogen auf den maximalen Phosphat-Einbau. Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten.



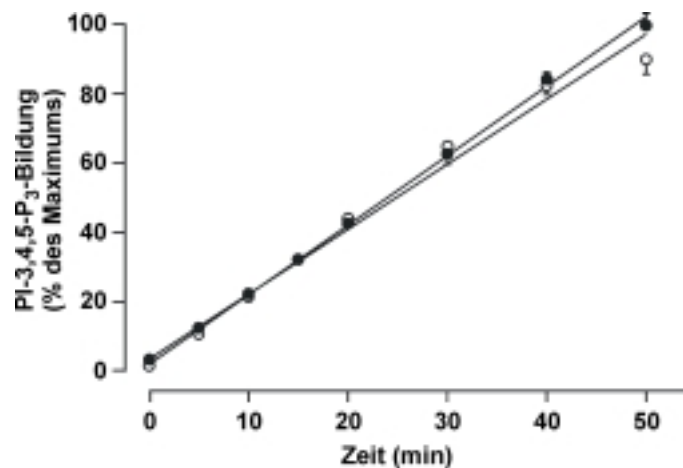
**Abb. 9: Zeitverlauf der Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit**

Die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  wurde in Ab- (●) bzw. Anwesenheit (○) von 120 nM  $G\beta_1\gamma_2$ -His bestimmt. Die Reaktion wurde entsprechend den Angaben in den Methoden durchgeführt und nach den angegebenen Zeiten abgestoppt. Die Messwerte sind bezogen auf die maximale Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit nach  $G\beta_1\gamma_2$ -Stimulation. Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten.

Unter den optimierten Versuchsbedingungen wurde in fünf unabhängigen Experimenten eine Stöchiometrie des Phosphat-Einbaus von  $0,94 \pm 0,04$  mol Phosphat pro mol p110 $\gamma$  ermittelt. Das deutet darauf hin, dass genau eine Aminosäure phosphoryliert wird.

### 5.1.3 Einfluß der Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit auf die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase $\gamma$

Für die Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  wurde berichtet, dass durch eine Mn<sup>2+</sup>-abhängige Autophosphorylierung der regulatorischen p85-Untereinheit (PI-3-Kinase  $\alpha$ ) bzw. der katalytischen p110-Untereinheit (PI-3-Kinase  $\delta$ ) die Aktivierung der Lipidkinase-Aktivität durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) gehemmt wird (Dhand et al., 1994, Vanhaesebroeck et al., 1999a). Hingegen soll die Mg<sup>2+</sup>-abhängige Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit zu keiner Beeinflussung der Lipidkinase-Aktivität führen (Stoyanova et al., 1997). Dieser letzte Befund sollte für die Hexahistidin-markierte, heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$  überprüft werden. Dazu wurde eine Probe der PI-3-Kinase  $\gamma$  in Gegenwart von G $\beta$  $\gamma$ -Komplexen präphosphoryliert, während eine zweite Probe unter den gleichen Bedingungen, jedoch in Abwesenheit von ATP, inkubiert wurde. Die mit ATP versetzte Probe war nach 30 min vollständig phosphoryliert (nicht gezeigt). Anschließend wurde die Lipidkinase-Aktivität beider Proben in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt (Abb. 10).



**Abb. 10: Einfluß der Autophosphorylierung auf die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$**

Gereinigte heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$  wurde in Gegenwart von 120 nM G $\beta$  $\gamma$ <sub>2</sub>-His und Phosphoinositid-freien Phospholipid-Vesikeln in An- (●) oder Abwesenheit (○) von ATP für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe von PI-4,5-P<sub>2</sub>-haltigen Phospholipid-Vesikeln und <sup>32</sup>P-markiertem ATP sowie die Angleichung der ATP-Konzentration in der nicht präphosphorylierten Probe. Die Reaktion wurde nach den angegebenen Zeiten abgestoppt und die Bildung von PI-3,4,5-P<sub>3</sub> entsprechend den Angaben in den Methoden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (± S.D.) aus drei Experimenten.

Die präphosphorylierte und die nicht präphosphorylierte PI-3-Kinase  $\gamma$  katalysierten in gleicher Weise die Bildung von PI-3,4,5-P<sub>3</sub>, wobei die Reaktion in beiden Fällen über mindestens 50 min linear verlief. Daraus lässt sich schließen, dass die Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit keinen Einfluß auf die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  hat.

Die unterschiedliche Regulation der Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase-Isoformen  $\gamma$  und  $\delta$  durch die Autophosphorylierung der katalytischen p110-Untereinheiten ließ uns vermuten, dass die Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit in einer anderen Region

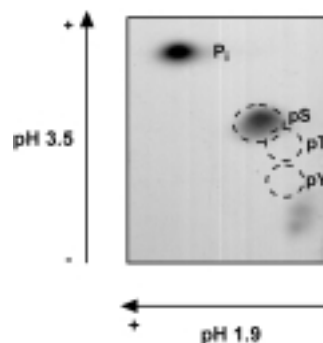


des Proteins erfolgt als bei der p110 $\delta$ -Untereinheit. Daher sollte im Folgenden die Phosphorylierungsstelle der p110 $\gamma$ -Untereinheit bestimmt werden.

## 5.2 Identifizierung der Phosphorylierungsstelle der p110 $\gamma$ -Untereinheit

### 5.2.1 Phosphoaminosäure-Analyse

Untersuchungen zur Proteinkinase-Aktivität von Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen hatten ergeben, dass die *in vitro*-Autophosphorylierung an Serin-Resten stattfindet (Dhand et al., 1994, Vanhaesebroeck et al., 1997). Weiterhin konnten Dhand und Mitarbeiter (1994) Serin<sup>608</sup> der p85-Untereinheit als die Aminosäure identifizieren, die durch die intrinsische Proteinkinase-Aktivität der p110 $\alpha$ -Untereinheit phosphoryliert wird. Für die Autophosphorylierung der p110 $\delta$ -Untereinheit wurde Serin<sup>1039</sup> als Substrat identifiziert (Vanhaesebroeck et al., 1999a). Daher stellte sich die Frage, ob auch die G $\beta\gamma$ -stimulierbare Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit an einem Serin-Rest erfolgt. Um die phosphorylierte Aminosäure zu charakterisieren, wurde eine Phosphoaminosäure-Analyse durchgeführt (Abb. 11).



**Abb. 11: Phosphoaminosäure-Analyse der p110 $\gamma$ -Untereinheit**

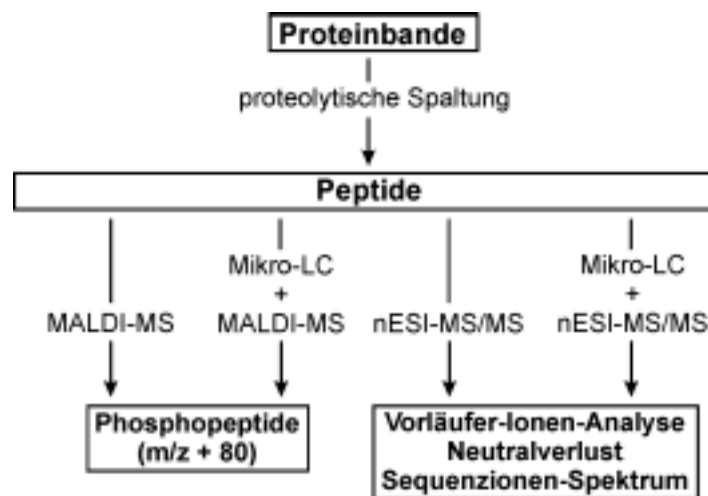
Gereinigte heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$  (200 pmol) wurde in Anwesenheit von 400 nM G $\beta\gamma$  mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP phosphoryliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach dem Ausschneiden der radioaktiv markierten p110 $\gamma$ -Bande erfolgten der hydrolytische Abbau und die dünnschichtelektrophoretische Auftrennung entsprechend den Angaben in den Methoden. Auf dem Autoradiogramm sind die Phosphoaminosäure-Standards (pS – Phosphoserin, pT – Phosphothreonin, pY – Phosphotyrosin) markiert. P<sub>i</sub> bezeichnet die Laufhöhe von abgespaltenem Phosphat.

Die radioaktiv markierte Phosphoaminosäure, die durch hydrolytischen Abbau aus der p110 $\gamma$ -Untereinheit freigesetzt wurde, zeigte bei dünnschichtelektrophoretischer Auftrennung ein zu Phosphoserin identisches chromatographisches Verhalten. Dieser Befund lässt den Schluß zu, dass die G $\beta\gamma$ -stimulierte Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit *in vitro* an Serin-Resten erfolgt.

## 5.2.2 Identifizierung des phosphorylierten Serin-Restes

### 5.2.2.1 Analyse verschiedener proteolytischer Spaltungen der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit

Zur Bestimmung der Position des phosphorylierten Serin-Restes der p110 $\gamma$ -Untereinheit sind vor allem massenspektrometrische Methoden geeignet (McLachlin und Chait, 2001). Hierbei können nach der Ionisierung von Proteinen bzw. Peptiden deren Molekülmassen anhand des Masse/Ladungs-Verhältnisses der erzeugten Molekülionen bestimmt werden. Nach enzymatischer Spaltung eines Proteins mit spezifischen Endoproteinasen kann eine Massendifferenz von 80 Da zwischen der theoretischen und der tatsächlich bestimmten Masse der entstandenen Peptide als Hinweis auf das Vorhandensein von Phosphopeptiden dienen (Zhang et al., 1998). Weiterhin können in Peptidgemischen, die aus der proteolytischen Spaltung eines Proteins resultieren, mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) durch Vorläufer-Ionen-Analyse (Nachweis von PO<sub>3</sub><sup>-</sup> (79 Da) generierenden Peptiden) und Neutralverlust-Analyse (Detektion von Phosphoserin bzw. Phosphothreonin enthaltenden Peptiden, die H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (98 Da) abspalten) Phosphopeptide identifiziert und anschließend sequenziert werden (Abb. 12, Wilm et al., 1996).

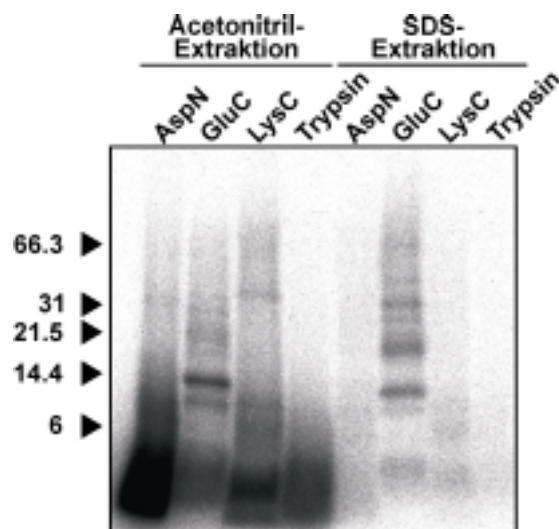


**Abb. 12: Massenspektrometrische Methoden zur Detektion von Phosphopeptiden**

Nach proteolytischer Spaltung eines phosphorylierten Proteins kann das resultierende Peptidgemisch mittels MALDI-MS oder Nanoelektrospray-Ionisierungs-Tandem-Massenspektrometrie (nESI-MS/MS) analysiert werden. Bei der MALDI-MS-Analyse deutet eine Massendifferenz von 80 Da zur theoretischen Peptidmasse auf eine Phosphorylierung hin. Bei der nESI-MS/MS-Analyse können durch Vorläufer-Ionen- und Neutralverlust-Analyse (Details siehe Text) Hinweise auf Phosphopeptide gewonnen werden. Die phosphorylierte Aminosäure kann durch Sequenzierung des Phosphopeptids mittels nESI-MS/MS identifiziert werden. Durch eine Auftrennung des Peptidgemisches mittels Mikro-Flüssigkeitschromatographie (Mikro-LC) vor der massenspektrometrischen Analyse kann die Detektion von Phosphopeptiden erleichtert werden.

### 5.2.2.1.1 Proteolytisches Abbaumuster der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit

Damit Peptide anhand ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses massenspektrometrisch identifiziert und gegebenenfalls sequenziert werden können, sollte ihre Masse etwa 600-3000 Da betragen (Powell et al., 2000, Andreeva et al., 2001). Daher wurde zunächst untersucht, inwieweit nach Spaltung der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit mit verschiedenen Proteasen Phosphopeptide entsprechender Größe entstanden. Die Spaltung mit den Endoproteinasen Trypsin, LysC, GluC und AspN erfolgte im Gel nach einer Methode von Shevchenko und Mitarbeitern (1996). Diese Proteasen katalysieren spezifisch die Hydrolyse von Peptidbindungen C-terminal von Lysin und Arginin (Trypsin), C-terminal von Lysin (LysC), C-terminal von Glutaminsäure (GluC) sowie N-terminal von Asparagin- und Cysteinsäure (AspN). Auf die Verwendung von Chymotrypsin wurde verzichtet, da diese Protease Peptidbindungen nicht nur C-terminal von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, sondern teilweise auch C-terminal von Leucin, Methionin, Alanin, Asparagin- und Glutaminsäure spaltet und aufgrund dieses komplexen Spaltungsmusters die Zuordnung der Massen sehr schwierig ist. Die nach Protease-Spaltung entstandenen Peptide wurden gelelektrophoretisch mit Hilfe eines Tris/Tricin/SDS-Gelsystems aufgetrennt (Abb. 13).



**Abb. 13: Gelelektrophoretische Charakterisierung von Phosphopeptiden nach Protease-Spaltung der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit**

Gereinigte heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$  (200 pmol) wurde in Anwesenheit von 400 nM G $\beta\gamma$  mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Proteolyse der Gel-fixierten p110 $\gamma$ -Untereinheit mit den aufgeführten Proteasen (1 - 3  $\mu$ g) entsprechend den Angaben in den Methoden. Die entstandenen Peptide wurden nach Zugabe von Acetonitril aus dem Gel extrahiert, und die peptidhaltige Lösung wurde nach dem Einengen in der Vakuumzentrifuge mit Probenpuffer nach Lämmli aufgenommen („Acetonitril-Extraktion“). Weiterhin wurden die Gelstückchen mit Probenpuffer nach Lämmli versetzt („SDS-Extraktion“). Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung der Peptide mit Hilfe eines Tris/Tricin/SDS-Gradientengels (4 - 20 % Polyacrylamid). Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Bildrand markiert.

Da keine Proteinbanden mit einer Größe von 110 kDa zu detektieren waren, kann geschlossen werden, dass die phosphorylierte p110 $\gamma$ -Untereinheit mit allen verwendeten Proteasen

gespalten wurde. Nach Spaltung mit Trypsin, LysC und AspN waren keine distinkten, radioaktiv markierten Peptidbanden zu erkennen. Die breiten radioaktiven Banden im unteren Bereich des Gels deuteten darauf hin, dass mehrere kleine Phosphopeptide, vermutlich mit Fehlsplaltungen, entstanden. Hierbei wurde die p110 $\gamma$ -Untereinheit an bestimmten Stellen nicht gespalten, obwohl die entsprechenden Aminosäuren, z.B. Lysin bzw. Arginin im Falle einer Trypsin-Spaltung, vorlagen. Dies könnte einerseits auf die schlechte Zugänglichkeit dieser Bereiche des Proteins zurückzuführen sein, andererseits wird die Kinetik einer proteolytischen Spaltung auch durch die unmittelbar vor und nach der Spaltungsstelle liegenden Aminosäuren beeinflusst. Beispielsweise erfolgt eine Trypsin-Spaltung nicht, wenn auf Lysin bzw. Arginin die Aminosäure Prolin folgt. Die nach Trypsin-, LysC- und AspN-Spaltung entstandenen Phosphopeptide waren gut aus dem Gel extrahierbar, so dass die Extraktion der Gelstückchen mit SDS-haltigem Puffer keine zusätzliche Rückgewinnung von Phosphopeptiden erbrachte. Im Gegensatz dazu entstanden nach Spaltung mit GluC größere Phosphopeptide, eine distinkte Peptidbande bei etwa 14 kDa ist hier zu erwähnen. Ein größerer Anteil der Radioaktivität verblieb nach der Extraktion mit Acetonitril im Gel und konnte teilweise mit SDS-haltigem Puffer herausgelöst werden.

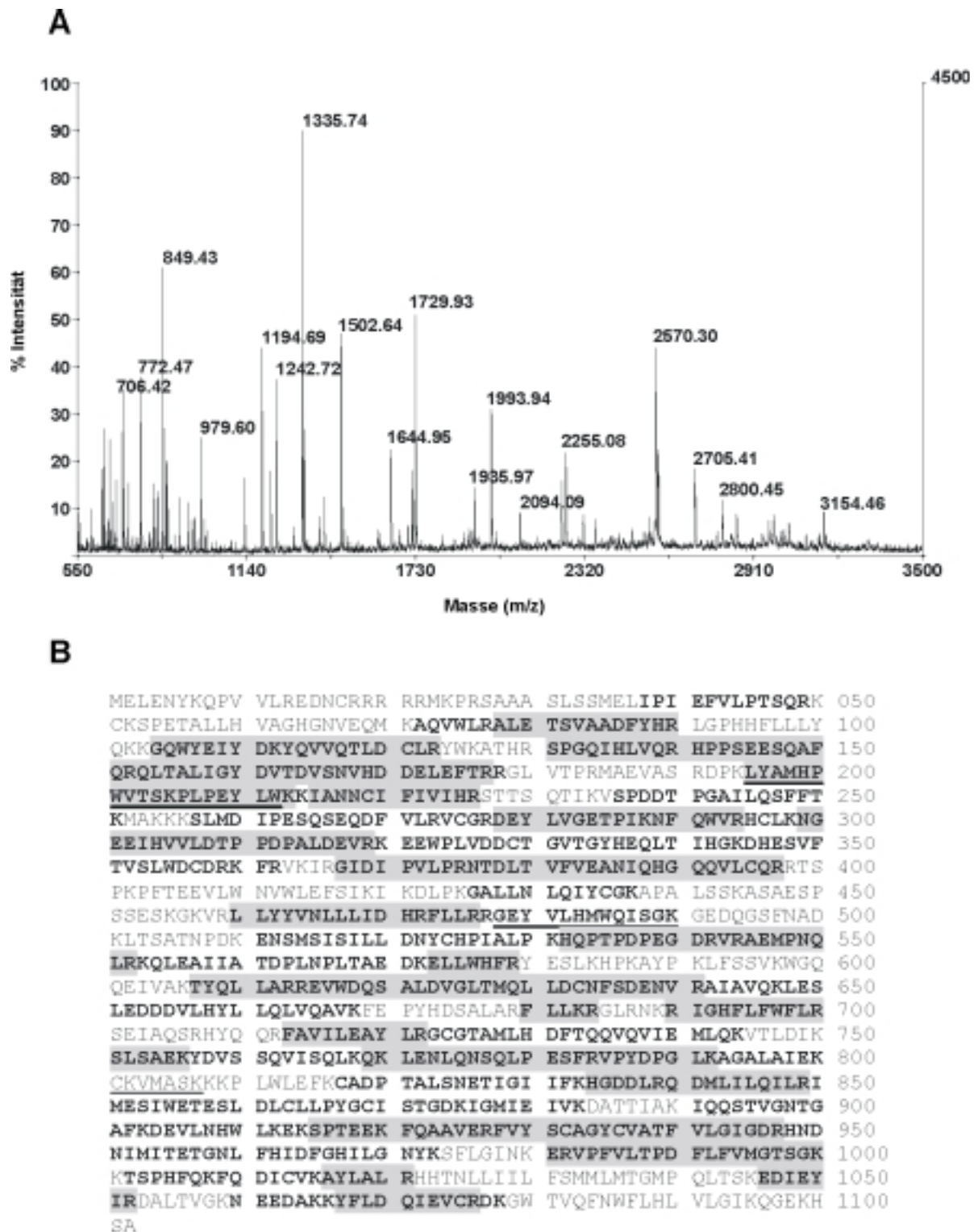
#### 5.2.2.1.2 MALDI-MS-Analyse der Protease-Splaltungen

Parallel zur Abschätzung der Größe der Phosphopeptide wurde eine Peptidkartierung mittels MALDI-MS durchgeführt, um zu ermitteln, welche Sequenzbereiche der p110 $\gamma$ -Untereinheit mit den verschiedenen Protease-Splaltungen abgedeckt wurden, und gegebenenfalls erste Hinweise auf phosphorylierte Peptide zu erhalten. Dafür wurden die nach der proteolytischen Spaltung entstandenen Peptide mit Hilfe eines MALDI-TOF-Massenspektrometers analysiert. Bei dieser massenspektrometrischen Methode werden die mit einer UV-absorbierenden Matrix (z.B.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure) kokristallisierten Peptide durch UV-Laser-Pulse ionisiert. Anschließend werden die entstandenen Ionen im elektrischen Feld auf eine definierte kinetische Energie beschleunigt und im Flugzeit-Analysator in einer feldfreien Röhre aufgetrennt. Über die Flugzeit kann das Masse/Ladungs-Verhältnis für die einzelnen Ionen ermittelt und bestimmten Peptiden zugeordnet werden. Üblicherweise werden MALDI-MS-Spektren von Peptiden als Positiv-Ionen-Spektren aufgenommen, d.h. nach der Ionisierung der Moleküle werden durch Anlegen einer negativen Gitterspannung an die Beschleunigungselektrode positive Ionen von der Probenoberfläche in Richtung des Analysators beschleunigt und anschließend detektiert. Für die Peptidkartierung wurden zunächst Spektren im Reflektions-Modus aufgenommen. Hierbei werden die Ionen in einem an die Driftstrecke anschließenden elektrischen Gegenfeld umgelenkt, es erfolgt eine Energiefokussierung, die eine höhere Auflösung und Massengenauigkeit der erhaltenen Massenspektren zur Folge hat. Eine Zuordnung der Massen ist so mit größerer Sicherheit möglich. Ein Nachteil dieser Methode ist der Empfindlichkeitsverlust, da während der Flugphase fragmentierte Ionen nicht

erfasst werden, was insbesondere Peptide größerer Masse betrifft. Um diese zu detektieren, wurden auch Messungen im Linear-Modus durchgeführt. Hierbei werden durch Ausschalten des elektrischen Gegenfeldes und Detektion der Ionen in linearer Anordnung zur Ionenquelle alle Ionen, die beschleunigt wurden, erfasst, was eine erhöhte Empfindlichkeit der Messung bedingt. Das hat allerdings eine geringere Auflösung und Massengenauigkeit zur Folge. Die Zuordnung der Massen war daher mit einem größeren Fehler behaftet, was bei der Bewertung der erhobenen Daten berücksichtigt werden musste. Bei der Aufnahme von Positiv-Ionen-Spektren werden Phosphopeptide im Vergleich zu nicht phosphorylierten Peptiden schlechter ionisiert und sind daher im Massenspektrum unterrepräsentiert (Janek et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch Messung im Negativ-Ionen-Modus eine verbesserte Detektion von Phosphopeptiden erzielt werden kann. Hierbei werden durch Anlegen einer positiven Gitterspannung an die Beschleunigungselektrode negative Ionen beschleunigt und anschließend detektiert. Die entsprechenden Messungen wurden im Linear-Modus durchgeführt.

In Abb. 14 sind ein typisches MALDI-MS-Spektrum im Reflektions-Modus nach Trypsin-Spaltung der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit sowie die Sequenzabdeckung mit Messungen im Reflektions- und im Linear-Modus (Positiv- und Negativ-Ionen-Modus) dargestellt. Insgesamt konnten 60-70 % der entstandenen Peptide massenspektrometrisch nachgewiesen werden, wobei der N- und C-Terminus des Proteins nicht erfasst wurden (siehe Abb. 14B). Nach Spaltung mit LysC ergab sich eine vergleichbare Sequenzabdeckung, wohingegen nach Spaltung mit GluC und AspN nur 40-50 % der Sequenz erfasst wurden (nicht gezeigt). Hinweise auf Phosphopeptide gab es nach Spaltung mit den genannten Proteasen nur bei Messungen im Linear-Modus anhand einer Massendifferenz von 80 Da zur theoretischen Masse der Peptide. Dabei wurden Serin-Reste in Position 257, 513, 515, 517, 853, 859, 871, 915, 974 und 1101 der p110 $\gamma$ -Untereinheit nach Spaltung mit mehreren Proteasen als mögliche Phosphorylierungsstellen erfasst. Die Signalintensität der entsprechenden Peptide war für eine Messung im Reflektions-Modus zu gering. Messungen im Negativ-Ionen-Modus erbrachten keine zusätzlichen Hinweise auf Phosphopeptide. Daher war eine weitere Charakterisierung dieser Peptide durch Sequenzierung mittels MALDI-PSD (*post-source decay*, siehe 5.3.2) nicht möglich.

Die Schwierigkeiten bei der Detektion der Phosphopeptide können durch die Komplexität des Peptidgemisches bedingt sein, die Diskriminierungseffekte während des Ionisierungsprozesses bewirkt (Cohen und Chait, 1996, Kratzer et al., 1998). Zusammen mit der im Vergleich zu nicht phosphorylierten Peptiden schlechten Ionisierbarkeit von Phosphopeptiden können diese Diskriminierungseffekte die geringe Signalintensität von Phosphopeptiden im MALDI-MS-Spektrum bewirken. Um die Detektion der Phosphopeptide zu verbessern, war daher deren Isolierung aus dem nach der Protease-Spaltung vorliegenden Peptidgemisch notwendig.

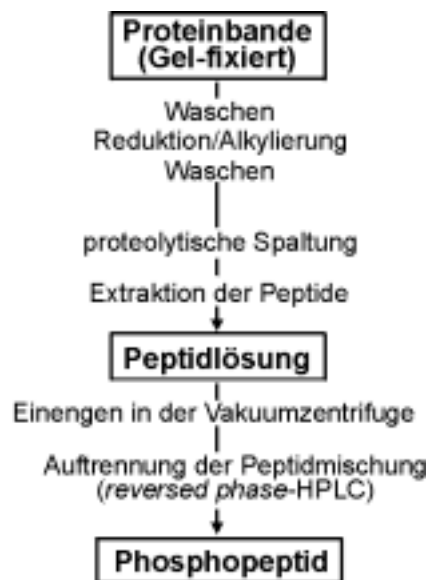


**Abb. 14: Sequenzabdeckung nach Spaltung der p110 $\gamma$ -Untereinheit mit Trypsin**

**A** MALDI-MS-Spektrum der tryptischen Peptide der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit im Reflektions-Modus. Die proteolytische Spaltung, die Extraktion der Peptide aus dem Gel, die Aufreinigung des Peptidgemisches mittels ZipTip und die MALDI-MS-Analyse wurden entsprechend den Angaben in den Methoden durchgeführt. **B** Bereiche der Aminosäuresequenz der p110 $\gamma$ -Untereinheit, die mit tryptischen Peptiden abgedeckt wurden. Für die fett markierten Sequenzabschnitte konnten Peptide, deren Masse im Linear-Modus detektiert wurde, zugeordnet werden. Eine graue Schattierung bedeutet die Detektion von Peptidmassen im Reflektions-Modus. Für unterstrichene Sequenzabschnitte konnten im Linear-Modus Massen nachgewiesen werden, die im Vergleich zur theoretischen Peptidmasse um 80 Da erhöht waren, was auf eine mögliche Phosphorylierung hindeutet. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs von drei.

### 5.2.2.2 Isolierung und MALDI-MS-Analyse von Phosphopeptiden

In Vorversuchen konnte eine selektive Anreicherung von Phosphopeptiden mittels Affinitätschromatographie an  $\text{Fe}^{3+}$ -NTA-Material (Zhou et al., 2000, Stensballe et al., 2001) nicht erreicht werden. Daher sollte nach der proteolytischen Spaltung der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit eine *reversed phase*-HPLC zur Isolierung Phosphopeptid-haltiger Fraktionen erfolgen, die anhand einer Markierung mit  $^{32}\text{P}$ -Phosphat identifiziert werden sollten. Es gibt Berichte darüber, dass abhängig von der Probenbearbeitung bei der Protease-Spaltung Gel-fixierter Proteine unterschiedlich große Verluste auftreten können (Speicher et al., 2000). Weiterhin hatten unsere Untersuchungen gezeigt, dass nach der Spaltung der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit mit verschiedenen Proteasen eine unterschiedliche Rückgewinnung von Phosphopeptiden aus dem Gel möglich war (siehe 5.2.2.1.1). Um eine Optimierung der proteolytischen Spaltungen und der Peptidextraktion zu ermöglichen, sollte daher die radioaktive Markierung der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit zur Quantifizierung von Verlusten bei allen Schritten der Probenbearbeitung (Abb. 15) sowie zur Bestimmung der Effektivität der Rückgewinnung von Phosphopeptiden nach Spaltungen mit verschiedenen Proteasen genutzt werden. Dafür erfolgte nach jedem Schritt der Probenbearbeitung eine Messung der Cerenkov-Strahlung der verwendeten Lösungen und der Gelstückchen.



**Abb. 15: Übersicht über die proteolytische Spaltung Gel-fixierter Proteine**

Zur Entfernung von SDS und Coomassie-Farbstoff wurde die in Gelstückchen zerteilte Proteinbande mit Wasser, Acetonitril-haltigem Puffer sowie Acetonitril gewaschen. Es folgten die Reduktion von Disulfidbrücken und die Alkylierung von Cystein-Resten sowie weitere Waschschrte zur Entfernung der Reduktions- und Alkylierungs-Reagenzien. Anschließend wurden die Gelstückchen mit Protease-Lösung versetzt, die Spaltung erfolgte über Nacht. Zur Extraktion der Peptide wurde 0,5 % (v/v) TFA in Acetonitril zugesetzt. Die Peptidlösung wurde zur Entfernung des Lösungsmittels in der Vakuumzentrifuge eingedunstet. Anschließend erfolgte die Auftrennung des Peptidgemisches durch *reversed phase*-HPLC (Details siehe Methodenteil).

### 5.2.2.2.1 Effektivität der Gewinnung von Phosphopeptiden nach proteolytischer Spaltung der Gel-fixierten phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit

Zunächst wurden die der eigentlichen Protease-Spaltung vorangehenden Wasch-, Reduktions- und Alkylierungsschritte untersucht (siehe Abb. 15 und Tab. 7).

**Tab. 7: Radioaktivitätsverlust während der Reduktion und Alkylierung der Gel-fixierten phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit vor der Protease-Spaltung**

<b>Probenbearbeitung</b>	<b>Radioaktivitätsverlust</b>
Waschschritt mit 50 % (v/v) Acetonitril in 25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,30 ± 0,10 %
Waschschritt mit Acetonitril	0,05 ± 0,00 %
Reduktion von Disulfidbrücken mit 10 mM DTT in 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,45 ± 0,05 %
Alkylierung von Cys mit 55 mM Iodacetamid in 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,30 ± 0,10 %
Waschschritt mit 50 % (v/v) Acetonitril in 25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,35 ± 0,15 %
Waschschritt mit Acetonitril	0,10 ± 0,05 %

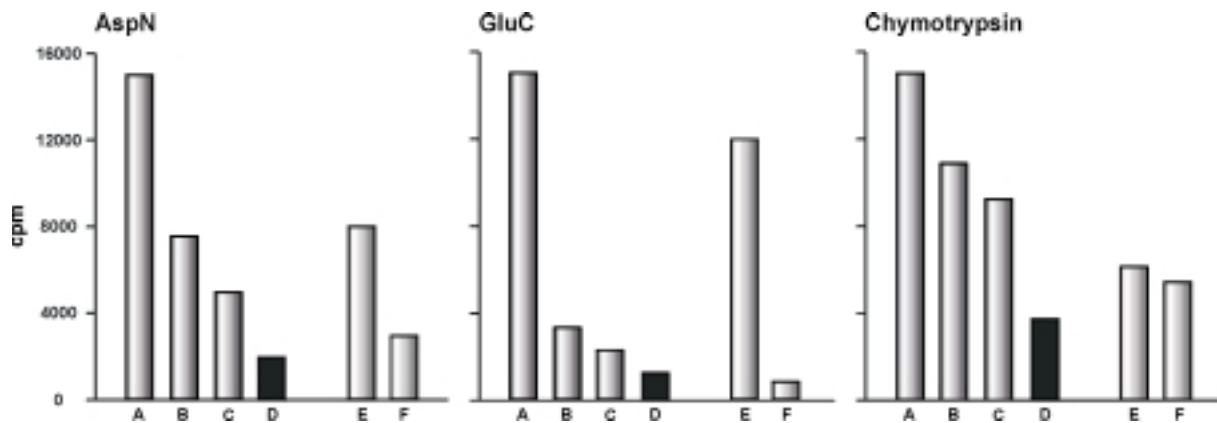
Die Cerenkov-Strahlung der jeweiligen Lösungen wurde gemessen, die Ausgangsaktivität der Gelstückchen betrug 100 %. Nach den Probenbearbeitungsschritten betrug die Aktivität der Gelstückchen 94,45 ± 1,20 % der Ausgangsaktivität. Aufgeführt sind Mittelwerte (± S.D.) aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei diesen Operationen kaum Radioaktivität aus dem Gel herausgelöst wurde, d.h. mehr als 90 % des radioaktiv markierten Proteins verblieben im Gel. Da abgespaltenes Phosphat leicht löslich sein sollte, war eine Dephosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit während der Reduktion und Alkylierung unwahrscheinlich. Nun erfolgten die Protease-Spaltung mit den Endoproteinasen LysC, GluC und AspN und die Extraktion der Phosphopeptide aus dem Gel (Abb. 16). Auf die Verwendung von Trypsin wurde verzichtet, da die entstehenden Peptide im Vergleich zu LysC durch zusätzliche Spaltungen, die C-terminal von Arginin-Resten stattfinden, noch kleiner wären und anhand der Auftrennung im Tris/Tricin/SDS-Gradientengel (siehe 5.2.2.1.1) schon nach Spaltung mit LysC eher kleine Phosphopeptide zu erwarten wären.

Nach der Spaltung mit AspN und GluC konnten radioaktiv markierte Peptide in unterschiedlichem Ausmaß aus dem Gel extrahiert werden (siehe Abb. 16 links und Mitte). Während nach der AspN-Spaltung durch Extraktion der Gelstückchen mit 0,5 % (v/v) TFA in Acetonitril etwa 50 % der Radioaktivität gewonnen wurden (siehe Abb. 16 links, B), verblieben nach Spaltung mit GluC mehr als 75 % der Radioaktivität im Gel (siehe Abb. 16 Mitte, B). Das könnte durch die Entstehung großer Phosphopeptide bedingt sein, wie schon in Abb. 13 gezeigt wurde. Unklar blieb, ob es sich bei den nicht extrahierbaren Phosphopeptiden um unvollständig gespaltene Peptide handelte, die dasselbe Phosphoserin enthielten wie die extrahierten Phosphopeptide, oder ob zusätzliche Phosphopeptide aus einem anderen



Sequenzbereich der p110 $\gamma$ -Untereinheit auftraten. Eine Extraktion der Gelstückchen mit 0,1 % (w/v) SDS erbrachte keine verbesserte Rückgewinnung von phosphorylierten Peptiden (nicht gezeigt).



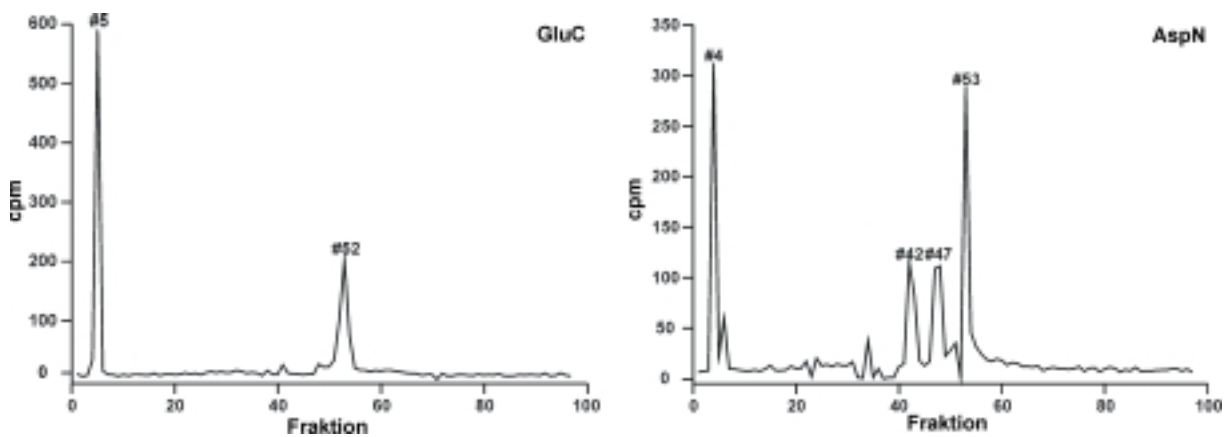
**Abb. 16: Rückgewinnungseffizienz radioaktiv markierter Peptide nach Spaltung der Gel-fixierten phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit**

Die Spaltung der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit wurde mit den aufgeführten Proteasen über Nacht durchgeführt. Anschließend erfolgte die Extraktion der Peptide entsprechend den Angaben in den Methoden. Die Cerenkov-Strahlung der jeweiligen Lösungen sowie der Gelstückchen wurde gemessen. **A** Gelstückchen vor Zugabe der Protease, **B** Extrakt mit 0,5 % (v/v) TFA in Acetonitril, **C** Acetonitril-Extrakt nach dem Einengen in der Vakuumzentrifuge, **D** Differenz zwischen C und F (entspricht der Radioaktivität, die auf die HPLC-Säule gelangte), **E** in den Gelstückchen nach Extraktion verbliebene Radioaktivität, **F** im Reaktionsgefäß verbliebene Radioaktivität nach Entnahme der Peptidlösung.

Problematisch waren Verluste an radioaktiv markierten Peptiden während des Einengens in der Vakuumzentrifuge sowie durch Adsorption an den Wänden des Reaktionsgefäßes (siehe Abb. 16 B, C, F), so dass nur 25-45 % (siehe Abb. 16 D) der extrahierten Radioaktivität auf die HPLC-Säule geladen werden konnten. Eine Extraktion der Peptide mit einem kleinen Volumen einer wässrigen Lösung wie es Speicher und Mitarbeiter (2000) vorschlugen, um die genannten Verluste zu vermeiden, erschien uns nicht zweckmäßig, da so die Adsorption an Oberflächen eher erhöht würde und eine Extraktion hydrophober Peptide kaum gelänge. Ein Einengen der peptidhaltigen Lösung war nicht zu vermeiden, da die Entfernung von Acetonitril notwendig war und nur sehr kleine Probenvolumina auf die HPLC-Säule geladen werden konnten. Die Ergebnisse zeigten, dass durch unvollständige Extraktion der Peptide und Verluste bei der Aufarbeitung der Extrakte höchstens 10-20 % der nach der Spaltung im Gel vorliegenden Peptide einer chromatographischen Auftrennung und anschließenden massenspektrometrischen Analyse zugänglich waren. Daher musste eine entsprechend hohe Ausgangsmenge der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit (ca. 100-150 pmol) eingesetzt werden, um eine für die massenspektrometrische Analyse ausreichende Menge an phosphorylierten Peptiden auf die HPLC-Säule laden zu können.

### 5.2.2.2.2 Isolierung von Phosphopeptiden durch reversed phase-HPLC

Die extrahierten Peptide wurden mit Hilfe einer *reversed phase*-HPLC aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen auf Radioaktivität untersucht. Während nach Spaltung mit LysC die gesamte Radioaktivität im Durchlauf erschien (nicht gezeigt), konnten nach Spaltung mit GluC und AspN radioaktiv markierte Phosphopeptide auf der Säule retiniert werden, die in späteren Fraktionen eluierten (Abb. 17). Allerdings war dies nicht quantitativ, denn auch hier band ein großer Teil der Radioaktivität nicht an die C<sub>18</sub>-Säule. Bei der nicht gebundenen Radioaktivität könnte es sich um sehr kleine, hydrophile Peptide handeln (Neubauer und Mann, 1999).

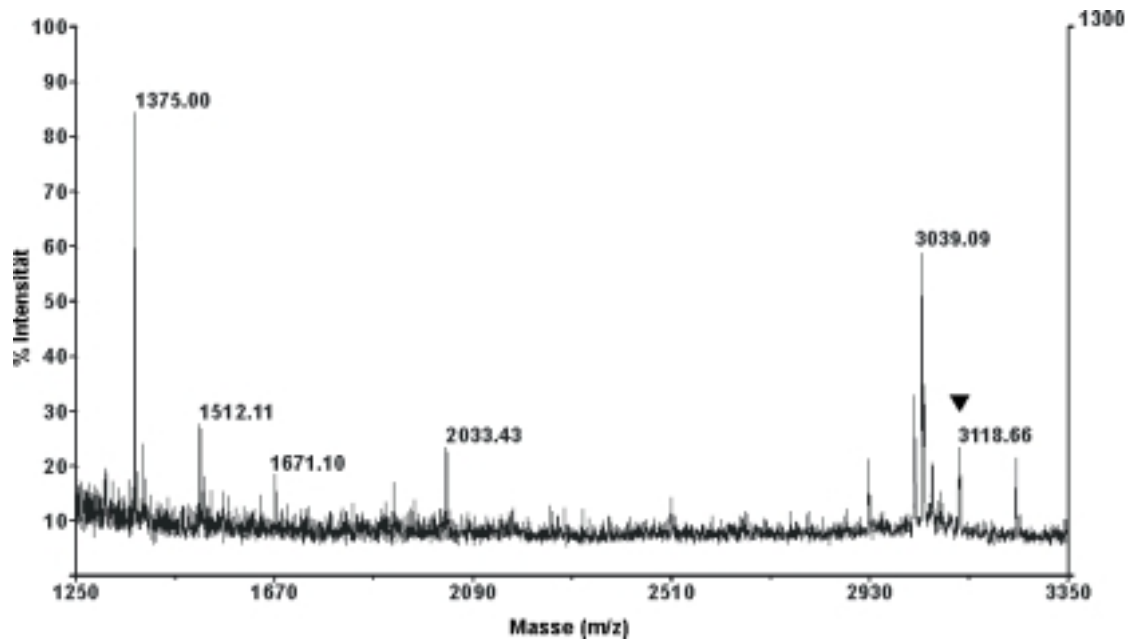


**Abb. 17: Auftrennung der nach Protease-Spaltung entstandenen Peptidgemische mittels *reversed phase*-HPLC**

Die nach der Protease-Spaltung mit 0,5 % (v/v) TFA in Acetonitril aus dem Gel extrahierten Peptide wurden auf eine C<sub>18</sub>-Säule (Vydac 218 TP 5115, 150 x 1,0 mm, 5 µm) geladen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Acetonitril-Gradienten (4-76 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 90 min, 76 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 5 min, 76-4 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 2 min) mit einem Fluß von 30 µl/min in Fraktionen á 30 µl. Die Cerenkov-Strahlung der einzelnen Fraktionen wurde gemessen.

Von den Radioaktivität enthaltenden Fraktionen wurden MALDI-MS-Spektren aufgenommen. Nach GluC-Spaltung konnte in Fraktion 52 (siehe Abb. 17 links) im Linear-Modus ein 3536,45 Da schweres Peptid nachgewiesen werden (nicht gezeigt), dessen Masse mit einer Abweichung von 0,46 Da dem phosphorylierten C-Terminus der p110 $\gamma$ -Untereinheit entsprach (<sup>1074</sup>VCRDKGWTVQFNWFLHLVGLIKQGEKHS<sup>1102</sup>, eine Fehlsplaltung). Das C-terminale Phosphopeptid ohne Fehlsplaltung (<sup>1099</sup>KHS<sup>1102</sup>, m/z (kalkuliert) 522,24 Da) war zu klein, um mittels MALDI-MS erfassbar zu sein. Vermutlich war auch die Hydrophobie dieses Peptids für eine Bindung an die C<sub>18</sub>-Säule zu gering. Das könnte den großen Anteil an Radioaktivität im Durchlauf erklären (siehe Abb. 17 links).

Nach AspN-Spaltung konnte außer im Durchlauf ein großer Teil der Radioaktivität in Fraktion 53 nachgewiesen werden (siehe Abb. 17 rechts). Ein MALDI-MS-Spektrum dieser Fraktion im Reflektions-Modus ist in Abb. 18 dargestellt.

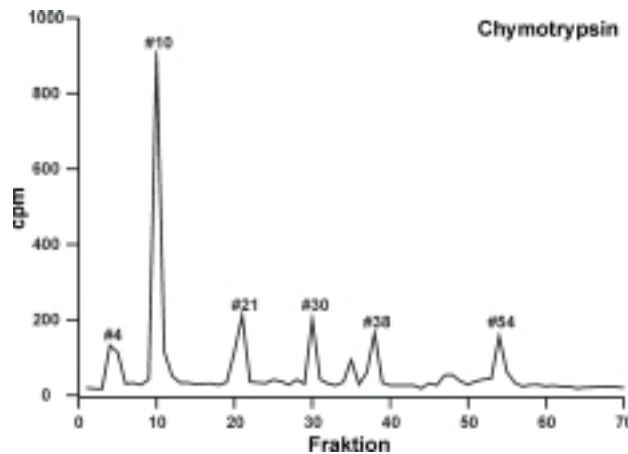


**Abb. 18: MALDI-MS-Spektrum nach Spaltung der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit mit AspN**

Die nach AspN-Spaltung und Auftrennung des Peptidgemisches mittels *reversed phase*-HPLC identifizierte, Radioaktivität enthaltende Fraktion 53 wurde in der Vakuumzentrifuge auf ca. 1  $\mu$ l eingengt und mit 1  $\mu$ l ACHC-Matrix-Lösung (8 mg/ml  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure in 0,3 % TFA/ 70 % (v/v) Acetonitril) vermischt direkt auf die Probenplatte gebracht. Dargestellt ist ein MALDI-MS-Spektrum im Reflektions-Modus. Die dem phosphorylierten C-Terminus der p110 $\gamma$ -Untereinheit entsprechende Masse ist markiert.

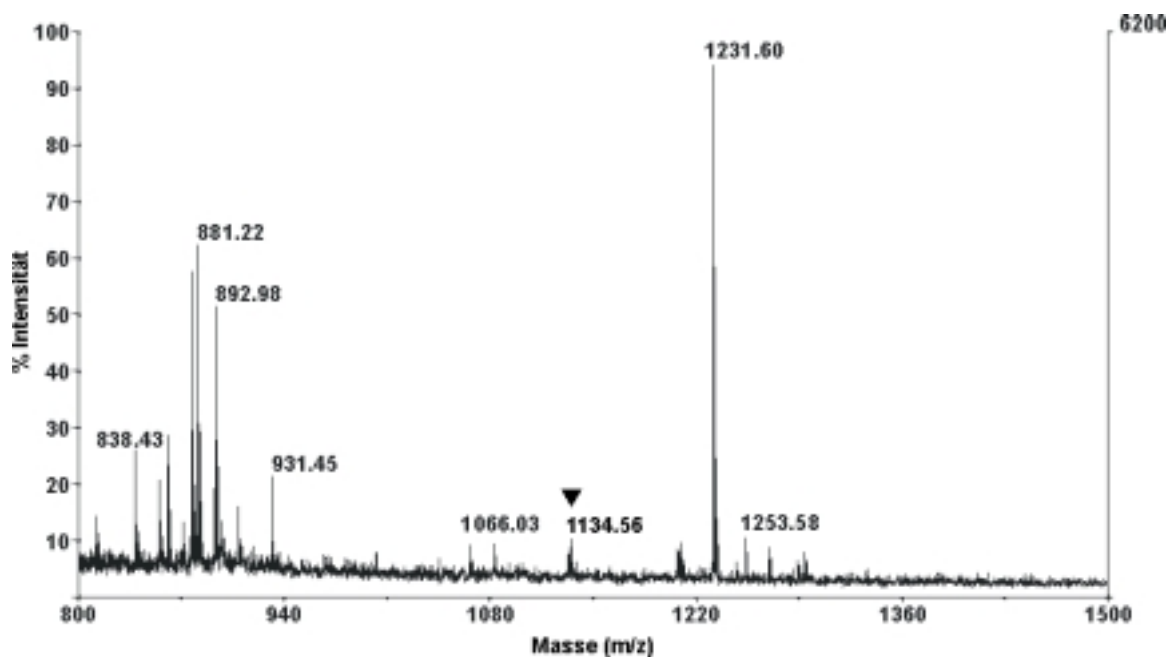
Ein 3118,66 Da schweres Peptid entsprach wiederum dem phosphorylierten C-Terminus der p110 $\gamma$ -Untereinheit ( $^{1077}$ DKGWTVQFNWFLHLV $^{1093}$ GIKQGEK $^{1102}$ HSA, ohne Fehlsplaltung, m/z (kalkuliert) 3118,60 Da). Dieses Peptid konnte auch im Linear-Modus nachgewiesen werden. Anhand der Größe des Phosphopeptids werden die Verluste während der Extraktion der Peptide aus dem Gel und der Aufarbeitung des Extrakts verständlich, da große Peptide stärker an Oberflächen adsorbieren. Wegen der Größe des Peptids war eine Sequenzierung und damit Identifizierung der phosphorylierten Aminosäure nicht möglich.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die phosphorylierte p110 $\gamma$ -Untereinheit mit Chymotrypsin gespalten, da hierbei ein kleineres C-terminales Fragment ( $^{1093}$ GIKQGEK $^{1102}$ HSA, m/z des Phosphopeptids (kalkuliert) 1134,56 Da) entstehen würde, was eine Sequenzierung des Peptids erleichtern würde. Die entstandenen Phosphopeptide konnten leicht extrahiert werden (siehe Abb. 16 rechts) und wurden mit Hilfe einer *reversed phase*-HPLC aufgetrennt (Abb. 19). Im Gegensatz zu den Spaltungen mit LysC, GluC und AspN erschien nach Spaltung mit Chymotrypsin nur wenig Radioaktivität im Durchlauf. Dies ließ darauf schließen, dass die Phosphopeptide für die Retention auf dem gewählten Säulenmaterial eine hinreichende Größe und Hydrophobie aufwiesen. Der Hauptteil der Radioaktivität konnte in Fraktion 10 nachgewiesen werden. Im MALDI-MS-Spektrum dieser Fraktion (Abb. 20) konnte ein 1134,56 Da schweres Peptid detektiert werden, was dem phosphorylierten C-Terminus der p110 $\gamma$ -Untereinheit entsprach.



**Abb. 19: Auftrennung des nach Chymotrypsin-Spaltung entstandenen Peptidgemisches mittels *reversed phase*-HPLC**

Die nach der Protease-Spaltung mit 0,5 % (v/v) TFA in Acetonitril aus dem Gel extrahierten Peptide wurden auf eine C<sub>18</sub>-Säule (Vydac 218 TP 5115, 150 x 1,0 mm, 5 µm) geladen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Acetonitril-Gradienten (4-64 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 60 min, 64 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 5 min, 64-4 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 2 min) mit einem Fluß von 30 µl/min in Fraktionen á 30 µl. Die Cerenkov-Strahlung der einzelnen Fraktionen wurde gemessen.



**Abb. 20: MALDI-MS-Spektrum nach Spaltung der p110 $\gamma$ -Untereinheit mit Chymotrypsin**

Die nach Chymotrypsin-Spaltung und Auftrennung des Peptidgemisches mittels *reversed phase*-HPLC identifizierte, Radioaktivität enthaltende Fraktion 10 wurde in der Vakuumzentrifuge auf ca. 1 µl eingengt und mit 1 µl ACHC-Matrix-Lösung vermischt direkt auf die Probenplatte gebracht. Dargestellt ist ein MALDI-MS-Spektrum im Reflektions-Modus. Die dem phosphorylierten C-Terminus der p110 $\gamma$ -Untereinheit entsprechende Masse ist markiert.

In den ebenfalls Radioaktivität enthaltenden Fraktionen 21 und 30 wurden Peptide mit Massen nachgewiesen, die den Massen phosphorylierter C-terminaler Peptide mit Fehlsplaltungen entsprachen (Tab. 8). In den später eluierenden Fraktionen, die Radioaktivität enthielten, konnten keine weiteren Phosphopeptide identifiziert werden. Die Ursache hierfür könnte in der Größe dieser Peptide liegen, die eine schlechte massenspektrometrische Detek-

tierbarkeit bedingt. Zusammen enthielten die Fraktionen 10, 21 und 30 mehr als 80 % der von der HPLC-Säule eluierten Radioaktivität. Dies macht die Existenz einer zweiten Phosphorylierungsstelle wenig wahrscheinlich.

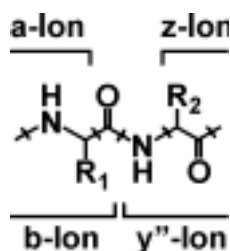
**Tab. 8: C-terminale Phosphopeptide der p110 $\gamma$ -Untereinheit nach Chymotrypsin-Spaltung**

Fraktion	m/z (kalkuliert)	m/z (bestimmt)	Peptidsequenz	Fehlspaltungen
10	1134,56 Da	1134,56 Da	<sup>1093</sup> GIKQGEKHS <sup>1102</sup>	0
21	1346,72 Da	1346,75 Da	<sup>1091</sup> VLGIKQGEKHS <sup>1102</sup>	1
30	1709,94 Da	1709,92 Da	<sup>1088</sup> LHLVLGIKQGEKHS <sup>1102</sup>	3

Somit konnten nach Spaltung der phosphorylierten p110 $\gamma$ -Untereinheit mit GluC, AspN und Chymotrypsin verschiedene Peptide nachgewiesen werden, die in ihrer Masse phosphorylierten C-terminalen Fragmenten der p110 $\gamma$ -Untereinheit entsprachen. Da in diesem Sequenzabschnitt der p110 $\gamma$ -Untereinheit ein Serin-Rest nur in Position 1101 vorhanden ist (siehe Tab. 8), kann vermutet werden, dass die Phosphorylierung an Serin<sup>1101</sup> erfolgt. Zur Überprüfung dieser Annahme sollte das 1134,56 Da schwere chymotryptische Peptid sequenziert werden.

### 5.2.2.3 Massenspektrometrische Sequenzierung eines C-terminalen Phosphopeptids der p110 $\gamma$ -Untereinheit

Die Sequenzierung erfolgte mittels des in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich angewandten Verfahrens der Nanoelektrospray-Ionisierungs-Tandem-Massenspektrometrie (nESI-MS/MS, Exner et al., 1999). Bei dieser Methode werden die durch Elektrospray-Ionisierung gebildeten Primärionen, die häufig mehrfach geladen sind, durch Kollision mit Argon-Atomen an ihren Peptidbindungen gespalten (Abb. 21, Roepstorff und Fohlmann, 1984).

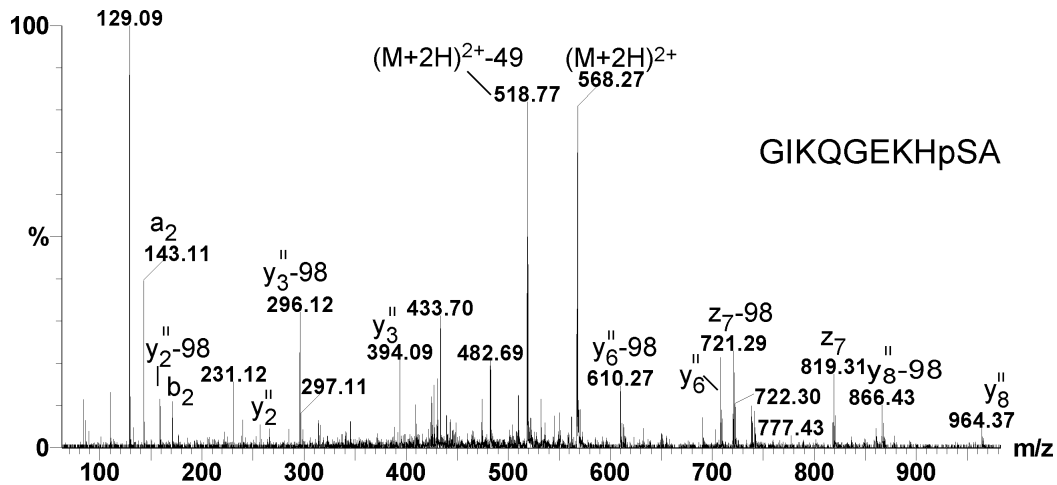


**Abb. 21: Fragmentationen**

Fragmentierungen treten hauptsächlich an den Peptidbindungen entlang der Peptidkette auf. Verbleibt die Ladung an den Fragmenten der N-terminalen Serie, werden diese als a- bzw. b-Ionen bezeichnet, während die Fragmentationen der C-terminalen Serie als y'- bzw. z-Ionen bezeichnet werden. Ein zusätzlicher Index gibt die Zahl der im Fragment enthaltenen Aminosäure-Reste an (Roepstorff und Fohlmann, 1984, Biemann und Scoble, 1987).

Anhand der Größe dieser Fragmentationen kann auf die Sequenz des Peptids geschlossen werden. Charakteristische Differenzen zwischen bestimmten Fragmentmassen weisen dabei auf Modifizierungen hin. So kann aus Peptiden, die an Serin- oder Threonin-Resten phosphoryliert sind, unter Bildung von Dehydroaminosäuren H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> abgespalten werden, was eine Massendifferenz von 98 Da zwischen dem Phosphat-haltigen und dem Dehydroaminosäure-

Fragment zur Folge hat (Annan et al., 2001). Das nESI-MS/MS-Spektrum des 1134,56 Da schweren C-terminalen chymotryptischen Peptids aus Fraktion 10 des HPLC-Laufs ist in Abb. 22 dargestellt.



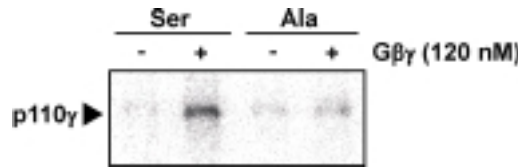
**Abb. 22:** nESI-MS/MS-Spektrum des Phosphopeptids GIKQGEKHpSA

Das 568,27 Da schwere Fragment konnte dem zweifach geladenen C-terminalen Phosphopeptid  $^{1093}\text{GIKQGEKHpSA}^{1102}$  zugeordnet werden. Die  $y''$ -Ionen des Spektrums sind durch aufeinanderfolgende Fragmentierungsreaktionen mit Spaltung der Amid-Bindung und Neutralverlust von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  entstanden.

Das 568,27 Da schwere Ion entsprach in seiner Masse dem zweifach geladenen C-terminalen Phosphopeptid  $^{1093}\text{GIKQGEKHpSA}^{1102}$ . Durch Abspaltung von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (98 Da) aus diesem Peptid entstand das entsprechende, zweifach geladene Dehydroaminosäure-Fragment (518,77 Da). Dies zeigte, dass es sich bei dem untersuchten Peptid tatsächlich um ein Phosphopeptid handelte. Anhand der Fragmentationen vom  $y''$ - und  $z$ -Typ konnte geschlossen werden, dass die Sequenz des untersuchten Peptids dem C-Terminus der  $p110\gamma$ -Untereinheit entsprach. Weiterhin wurde aus allen nachgewiesenen C-terminalen Fragmentationen ( $y_2''$ ,  $y_3''$ ,  $y_6''$ ,  $z_7$ ,  $y_8''$ , siehe Abb. 22)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  abgespalten. Da somit auch das  $y_2''$ -Fragmentation ( $^{1101}\text{SA}^{1102}$ ) einen Phosphat-Rest enthielt, konnte Serin $^{1101}$  als Substrat für die Autophosphorylierung der  $p110\gamma$ -Untereinheit identifiziert werden.

### 5.2.3 Lipid- und Proteinkinase-Aktivität von PI-3-Kinase $\gamma$ -Mutanten

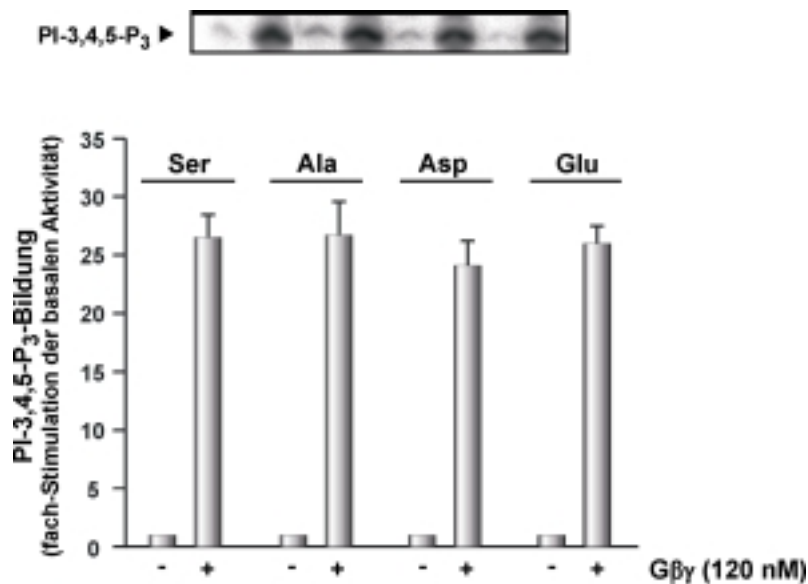
Um die durch massenspektrometrische Analyse gefundene Phosphorylierung der  $p110\gamma$ -Untereinheit an Serin $^{1101}$  zu überprüfen, wurde eine Mutante erzeugt, bei der Serin $^{1101}$  durch Alanin ersetzt wurde und die daher an dieser Stelle nicht mehr phosphoryliert werden konnte. Die Proteinkinase-Aktivität dieser Mutante wurde im Vergleich zur nicht modifizierten PI-3-Kinase  $\gamma$  bestimmt (Abb. 23). Nach Austausch des Serin-Restes gegen Alanin konnte keine Stimulation der Autophosphorylierung der  $p110\gamma$ -Untereinheit durch  $G\beta\gamma$ -Komplexe beobachtet werden. Das lässt den Schluß zu, dass die  $G\beta\gamma$ -stimulierte Autophosphorylierung der  $p110\gamma$ -Untereinheit an Serin $^{1101}$  erfolgt.



**Abb. 23: Proteinkinase-Aktivität der p110γS1101A-Mutante**

Gereinigte heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$ , die entweder die unmodifizierte p110γ-Untereinheit (Ser) oder eine p110γS1101A-Untereinheit (Ala) enthielt, wurde auf den Einbau von radioaktiv markiertem  $^{32}\text{P}$ -Phosphat in An- (+) und Abwesenheit (-) von 120 nM  $\text{G}\beta_1\gamma_2\text{-His}$  untersucht. Die Messungen wurden entsprechend den Angaben in den Methoden durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm.

Weiterhin wurden p110γ-Mutanten erzeugt, die anstelle von Serin<sup>1101</sup> die negativ geladenen Aminosäuren Asparagin- bzw. Glutaminsäure enthielten. Diese Substitution sollte den Effekt einer Phosphorylierung an dieser Position des Proteins nachahmen (Vanhaesebroeck et al., 1999a). Die basale sowie die  $\text{G}\beta\gamma$ -stimulierte Lipidkinase-Aktivität der Aspartat-, Glutamat- und Alanin-Mutanten wurde im Vergleich zur Wildtyp-PI-3-Kinase  $\gamma$  bestimmt (Abb. 24).



**Abb. 24: Lipidkinase-Aktivität von p110γS1101-Mutanten**

Die Lipidkinase-Aktivität der gereinigten heterodimeren PI-3-Kinase  $\gamma$ , die entweder die unmodifizierte p110γ-Untereinheit (Ser) oder eine mutierte p110γ-Untereinheit (p110γS1101A = Ala, p110γS1101D = Asp, p110γS1101E = Glu) enthielt, wurde in An- (+) und Abwesenheit (-) von 120 nM  $\text{G}\beta_1\gamma_2\text{-His}$  untersucht. Die Isolation, Trennung und Quantifizierung von  $^{32}\text{P}$ -markiertem PI-3,4,5-P<sub>3</sub> wurde entsprechend den Angaben in den Methoden durchgeführt. Gezeigt sind ein repräsentatives Autoradiogramm sowie die Mittelwerte ( $\pm$  S.D.) aus drei Experimenten.

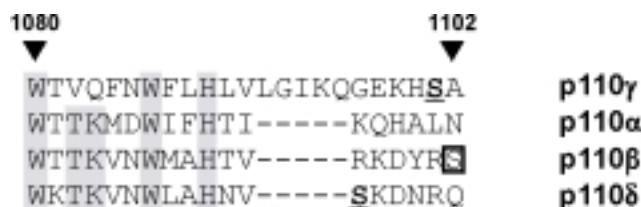
Sowohl das unveränderte Protein als auch die Alanin-Mutante zeigten dieselbe Lipidkinase-Aktivität, was den Schluß zulässt, dass Serin<sup>1101</sup> für die katalytische Aktivität der p110γ-Untereinheit nicht essentiell ist. Weiterhin wurde deutlich, dass durch Austausch des Serin-Restes gegen Asparagin- bzw. Glutaminsäure weder die basale noch die  $\text{G}\beta\gamma$ -stimulierte Lipidkinase-Aktivität des Enzyms beeinflusst wurde. Das bestätigte und erweiterte den durch Präphosphorylierung der unmodifizierten PI-3-Kinase  $\gamma$  erhobenen Befund (siehe 5.1.3).

Beim Vergleich der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase-Isoformen  $\gamma$  (hier untersucht) und  $\delta$  (Vanhaesebroeck et al., 1999a) läßt sich feststellen, dass die Autophosphorylierung an einem Serin-Rest im extremen C-Terminus der p110-Untereinheit offenbar unterschiedliche Effekte auf die Lipidkinase-Aktivität des Enzyms haben kann. Dies veranlasste uns, die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\beta$  näher zu untersuchen, die eine große strukturelle Ähnlichkeit zur PI-3-Kinase  $\delta$  aufweist, deren Lipidkinase-Aktivität jedoch nicht nur durch RTKs, sondern auch, wie bei der PI-3-Kinase  $\gamma$ , durch G $\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert werden kann (Maier et al., 1999).

### 5.3 Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase $\beta$

#### 5.3.1 Charakterisierung der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase $\beta$

Über die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  ist wenig bekannt. Roche und Mitarbeiter (1998) konnten nach Zugabe eines großen Überschusses der gereinigten p85-Untereinheit zur PI-3-Kinase  $\beta$  eine Phosphorylierung der p85-Untereinheit beobachten. Auch nach Expression der PI-3-Kinase  $\beta$  in HEK293-Zellen konnte eine *in vitro*- und *in vivo*-Phosphorylierung der p85-Untereinheit nachgewiesen werden (Beeton et al., 2000). Das spricht dafür, dass die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$ , wie auch der PI-3-Kinase  $\alpha$ , eine Phosphorylierung der regulatorischen p85-Untereinheit bewirkt (Dhand et al., 1994). Betrachtet man jedoch die strukturelle Verwandtschaft der katalytischen Untereinheiten der p85-assoziierten PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$ , so weisen die p110 $\beta$ - und die p110 $\delta$ -Untereinheit mit 56 % die größte Aminosäureidentität auf. Beim Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenzen aller vier p110-Untereinheiten (Abb. 25) fällt weiterhin auf, dass die p110 $\beta$  – ebenso wie die p110 $\gamma$ - und p110 $\delta$ -Untereinheit – im extremen C-Terminus einen Serin-Rest aufweist. Die beiden letztgenannten PI-3-Kinase-Isoformen werden an diesen Serin-Resten phosphoryliert (siehe 5.2.2 und Vanhaesebroeck et al., 1999a), während die PI-3-Kinase  $\alpha$ , die in diesem Sequenzbereich kein Serin besitzt, die regulatorische p85-Untereinheit phosphoryliert (Dhand et al., 1994).

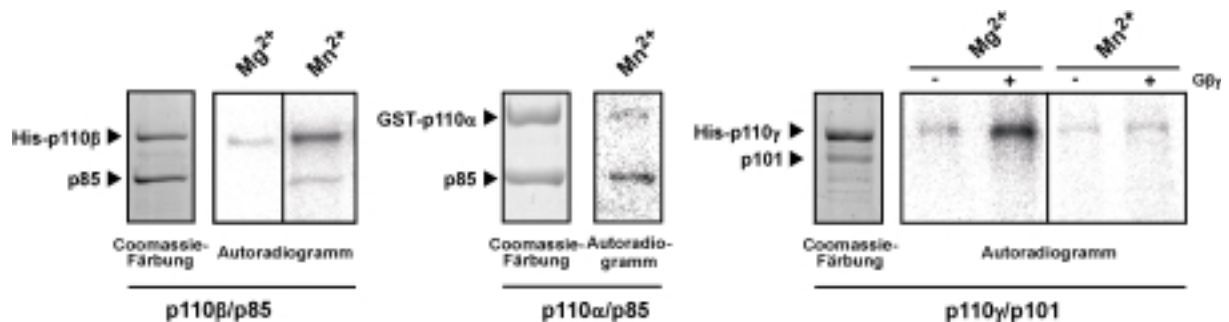


**Abb. 25: C-terminale Aminosäuresequenz der p110-Untereinheiten**

Konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Die phosphorylierten Serin-Reste der p110 $\gamma$ - und p110 $\delta$ -Untereinheit sind fett markiert und unterstrichen.



Unter strukturellen Gesichtspunkten wäre somit nicht nur eine Phosphorylierung der p85-Untereinheit, sondern auch eine Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit vorstellbar. Um dies zu prüfen, wurde die Proteinkinase-Aktivität der aus *Sf9*-Zellen gereinigten heterodimeren PI-3-Kinase  $\beta$  in Anwesenheit von Phosphoinositid-freien Phospholipid-Vesikeln untersucht. Da für die p85-assoziierten PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  eine Mn<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Proteinkinase-Aktivität beschrieben wurde (Dhand et al., 1994, Vanhaesebroeck et al., 1997), während die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  in Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup> abläuft (Maier et al., 1999), sollte zunächst die Metallionen-Abhängigkeit der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\beta$  überprüft werden (Abb. 26).



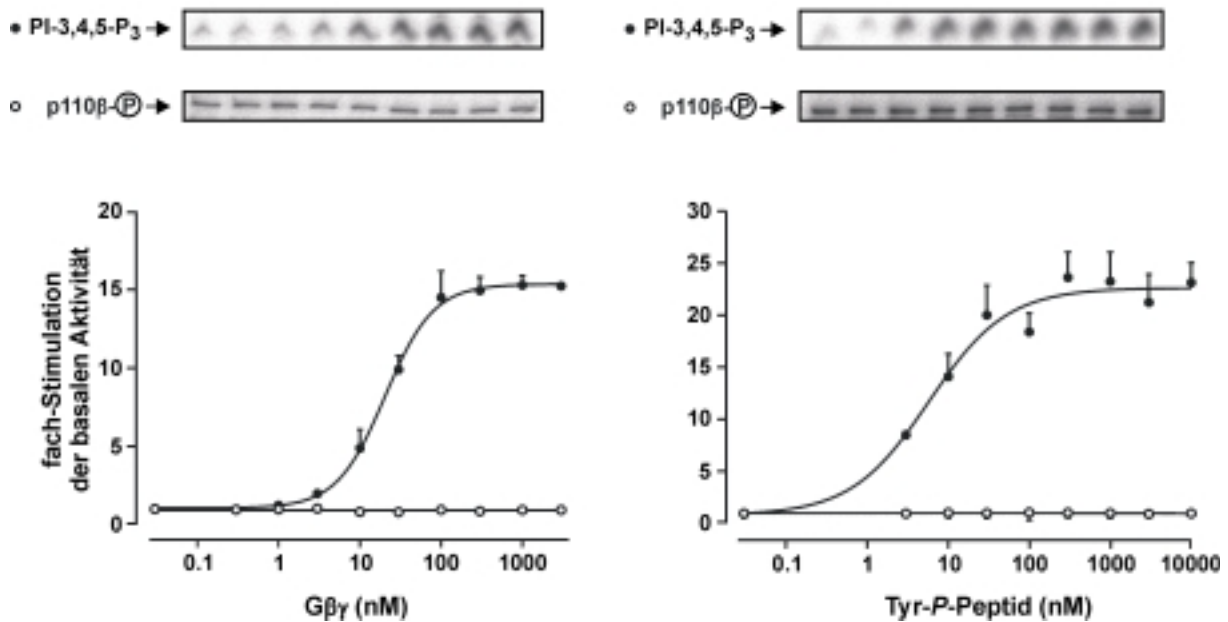
**Abb. 26: Metallionen-Abhängigkeit der Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen**

Rekombinante gereinigte His-p110 $\beta$ /p85, GST-p110 $\alpha$ /p85 und His-p110 $\gamma$ /p101 wurden auf den Einbau von radioaktiv markiertem <sup>32</sup>P-Phosphat in Anwesenheit von 7 mM Mg<sup>2+</sup> bzw. 2 mM Mn<sup>2+</sup> untersucht. Für die PI-3-Kinase  $\gamma$  erfolgte die Messung in An- (+) bzw. Abwesenheit (-) von 120 nM G $\beta_1\gamma_2$ -His. Dargestellt sind jeweils ein Coomassie-gefärbtes Protein-Gel der affinitätschromatographisch gereinigten PI-3-Kinase sowie repräsentative Autoradiogramme.

In Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup> zeigte die PI-3-Kinase  $\beta$  nur eine schwache Proteinkinase-Aktivität, die in Anwesenheit von Mn<sup>2+</sup> deutlich erhöht war (siehe Abb. 26 links). In beiden Fällen wurde die p110 $\beta$ -Untereinheit autophosphoryliert. In Anwesenheit von Mn<sup>2+</sup> war zusätzlich ein Einbau von Phosphat in die p85-Untereinheit zu beobachten, der jedoch nur etwa 15 % des Phosphat-Einbaus in die p110 $\beta$ -Untereinheit betrug. Im Vergleich dazu konnte bei der PI-3-Kinase  $\alpha$  (siehe Abb. 26 Mitte) eine Phosphorylierung der p85-Untereinheit beobachtet werden, die die Phosphat-Inkorporation in die p110 $\alpha$ -Untereinheit bei weitem übertraf. Der Vergleich mit der Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit (Abb. 26 rechts) machte auch deutlich, dass sich die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  in ihrer Metallionen-Abhängigkeit wie die übrigen p85-assoziierten PI-3-Kinase-Isoformen verhielt und damit ein anderes Verhalten als die Klasse I $\beta$  PI-3-Kinase  $\gamma$  zeigte.

Es ist bekannt, dass die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  sowohl durch G $\beta\gamma$ -Komplexe als auch durch von verschiedenen RTKs abgeleitete Phosphotyrosin-Peptide stimuliert werden kann (Kurosu et al., 1997, Maier et al., 1999). Daher sollte geprüft werden, ob die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  ebenfalls gegenüber diesen Stimuli sensitiv ist. Dazu wurde die Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit in Gegenwart von

steigenden Mengen  $G\beta_1\gamma_2$ -His bzw. eines vom PDGF-Rezeptor abgeleiteten Phosphotyrosin-Peptids bestimmt (Abb. 27).



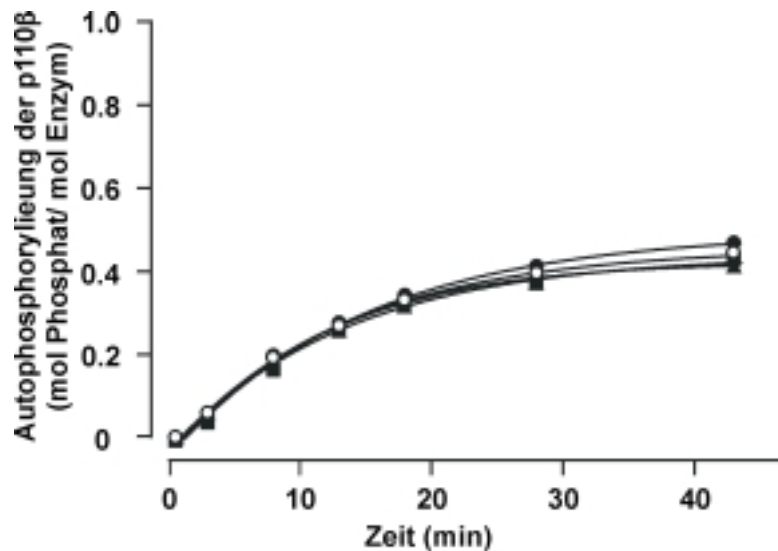
**Abb. 27: Sensitivität der Lipid- und Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  gegenüber  $G\beta\gamma$  und Phosphotyrosin-Peptid**

Heterodimere PI-3-Kinase  $\beta$  wurde auf ihre Stimulierbarkeit mit steigenden Konzentrationen  $G\beta_1\gamma_2$ -His (links) bzw. Phosphotyrosin-Peptid (rechts) untersucht. Zur Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität (●) wurde die Bildung von  $^{32}P$ -markiertem PI-3,4,5- $P_3$  in Anwesenheit von 7 mM  $Mg^{2+}$  als Vielfaches des Basalwertes gemessen. In einem parallelen Ansatz wurde die Stimulation der Autophosphorylierung (○) der p110 $\beta$ -Untereinheit in Anwesenheit von 2 mM  $Mn^{2+}$  bestimmt. Gemessen wurde der Einbau von radioaktivem Phosphat in die katalytische p110 $\beta$ -Untereinheit als Vielfaches des Basalwertes. Dargestellt sind repräsentative Autoradiogramme sowie die Mittelwerte ( $\pm$  S.D.) aus drei Versuchen.

Während  $G\beta_1\gamma_2$ -His-Komplexe die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  mit einem  $EC_{50}$ -Wert von ca. 20 nM stimulierten, konnte selbst mit 100-fach höheren Konzentrationen von  $G\beta_1\gamma_2$ -His keine Stimulation der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  erzielt werden (siehe Abb. 27 links). Auch durch Inkubation mit dem Phosphotyrosin-Peptid konnte die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  nicht aktiviert werden, obwohl die Stimulation der Lipidkinase-Aktivität mit einem  $EC_{50}$ -Wert von ca. 5 nM erfolgte (siehe Abb. 27 rechts). Bei weiteren Versuchen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  oder von Gemischen beider Kationen konnte ebenfalls keine signifikante Stimulation der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  durch  $G\beta\gamma$ -Komplexe oder Phosphotyrosin-Peptid beobachtet werden (nicht gezeigt). Demnach ist die Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit im Gegensatz zur p110 $\gamma$ -Untereinheit zumindest *in vitro* unter Versuchsbedingungen, die eine Stimulation der Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  sowie der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  erlaubten, nicht stimulierbar.

Diese fehlende Stimulierbarkeit der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  könnte darauf zurückzuführen sein, dass bereits unter Basalbedingungen ein hoher Phosphat-Einbau

in die p110 $\beta$ -Untereinheit stattfindet, der durch Zugabe von G $\beta\gamma$ -Komplexen oder Phosphotyrosin-Peptid nicht weiter erhöht werden kann. Um dies zu prüfen, sollte die Stöchiometrie der Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit bestimmt werden. Dafür wurde der Zeitverlauf der Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit untersucht (Abb. 28).



**Abb. 28: Zeitverlauf der Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit**

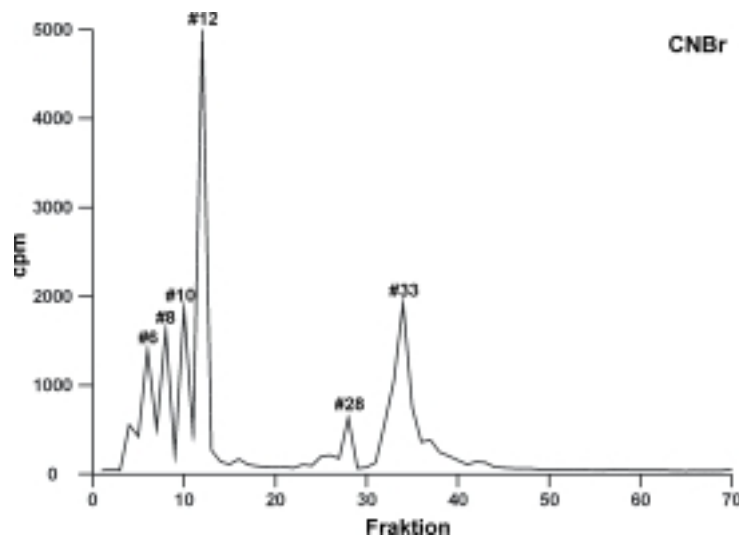
Die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  wurde in Gegenwart von 2 mM Mn $^{2+}$  unter Basalbedingungen (○), in Anwesenheit von 120 nM G $\beta_1\gamma_2$ -His (●), 100 nM Phosphotyrosin-Peptid (■) sowie beider Stimuli (▲) entsprechend den Angaben in den Methoden bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Die Geschwindigkeit der Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit war relativ gering, der maximale Phosphat-Einbau wurde erst nach etwa 30 min erreicht. Durch Zugabe von G $\beta\gamma$ -Komplexen oder Phosphotyrosin-Peptid konnte die Geschwindigkeit der Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit nicht erhöht werden. Das bestätigte unseren Befund, dass die Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit nicht stimulierbar ist. Der Zeitverlauf war mit der Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit vergleichbar (siehe Abb. 9). Im Gegensatz zur Stöchiometrie der Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit, die ca. 1 mol Phosphat pro mol p110 $\gamma$  betrug (siehe 5.1.2), wurde für die Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit eine wesentlich niedrigere Stöchiometrie des Phosphat-Einbaus von 0,38 – 0,59 mol Phosphat pro mol p110 $\beta$  (n = 4) ermittelt.

### 5.3.2 Identifizierung der Phosphorylierungsstelle der p110 $\beta$ -Untereinheit

Nun sollte geprüft werden, ob die Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit ebenfalls an einem Serin-Rest im extremen C-Terminus des Proteins erfolgt. Hierfür sollten wiederum massenspektrometrische Methoden zur Anwendung kommen. Anhand der Aminosäuresequenz der p110 $\beta$ -Untereinheit sowie der Spaltungsmuster der verschiedenen Endoproteinasen (siehe 5.2.2.1) erschien keine Protease dazu geeignet, C-terminale Peptide geeigneter

Größe zu erzeugen. Daher wurde eine Spaltung des Gel-fixierten Proteins mit CNBr durchgeführt. Hierbei werden Peptidbindungen C-terminal von Methionin unter Bildung eines Homoserinlactons gespalten. Nach der Extraktion der Peptide aus dem Gel erfolgten die Auftrennung des Peptidgemisches mit Hilfe einer *reversed phase*-HPLC und die Identifizierung radioaktiver Fraktionen (Abb. 29).

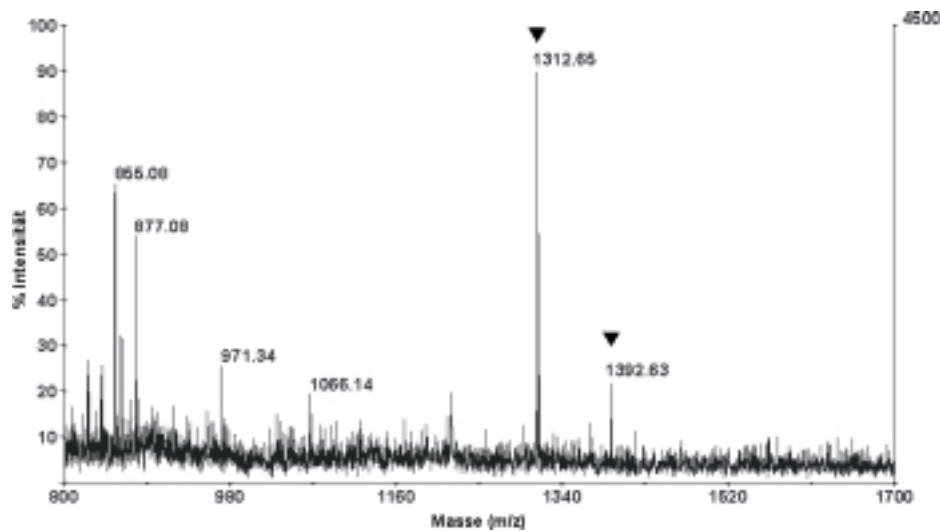


**Abb. 29: Auftrennung des nach CNBr-Spaltung der phosphorylierten p110 $\beta$ -Untereinheit entstandenen Peptidgemisches mittels *reversed phase*-HPLC**

Die nach der CNBr-Spaltung mit 0,5 % (v/v) TFA in Acetonitril aus dem Gel extrahierten Peptide wurden auf eine C<sub>18</sub>-Säule (Vydac 218 TP 5115, 150 x 1,0 mm, 5  $\mu$ m) geladen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Acetonitril-Gradienten (4-64 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 60 min, 64 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 5 min, 64-4 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure, 2 min) mit einem Fluß von 30  $\mu$ l/min in Fraktionen á 30  $\mu$ l. Die Cerenkov-Strahlung der einzelnen Fraktionen wurde gemessen.

Der Hauptteil der Radioaktivität konnte in Fraktion 12 nachgewiesen werden. Ein MALDI-MS-Spektrum dieser Fraktion im Reflektions-Modus ist in Abb. 30 dargestellt. Das 1312,65 Da schwere Peptid entsprach dem phosphorylierten C-Terminus der p110 $\beta$ -Untereinheit ( $^{1061}\text{AHTVRKDYRS}^{1070}$ , m/z (kalkuliert) 1312,65 Da). Ein weiteres Peptidion mit einer Masse von 1392,63 Da, jedoch wesentlich geringerer Intensität, könnte auf eine zweifache Phosphorylierung des C-Terminus hindeuten. Dies könnte einer zusätzlichen Phosphorylierung an Threonin<sup>1063</sup> entsprechen. Da beide Peptide eine ausreichende Signalintensität aufwiesen, wurden zur näheren Charakterisierung der beiden Peptidionen MALDI-PSD-Spektren aufgenommen. Hierbei werden Fragmentationen, die nach der Beschleunigung durch Zerfall der Peptidionen in der feldfreien Driftstrecke – der sog. metastabilen Fragmentierung – entstanden sind, erfasst. Anhand dieser Fragmente können, ähnlich wie bei der Sequenzierung mittels Tandem-Massenspektrometrie, Hinweise auf die Sequenz des Peptids gewonnen werden (Metzger und Hoffmann, 2000). Insbesondere konnte bei beiden Peptiden die Abspaltung eines neutralen Fragments mit einer Masse von 98 Da nachgewiesen werden

(nicht gezeigt). Diese Massendifferenz entsprach dem Verlust von  $H_3PO_4$ . Das ließ den Schluß zu, dass die Peptide als Phosphopeptide vorlagen.



**Abb. 30: MALDI-MS-Spektrum nach Spaltung der p110 $\beta$ -Untereinheit mit CNBr**

Die nach CNBr-Spaltung und Auftrennung des Peptidgemisches mittels *reversed phase*-HPLC identifizierte radioaktive Fraktion 12 wurde in der Vakuumzentrifuge auf ca. 1  $\mu$ l eingeeengt und mit 1  $\mu$ l ACHC-Matrix-Lösung vermischt direkt auf die Probenplatte gebracht. Dargestellt ist ein MALDI-MS-Spektrum im Reflektions-Modus. Die dem phosphorylierten C-Terminus der p110 $\beta$ -Untereinheit entsprechenden Massen sind markiert.

Eine komplette Sequenzierung der Peptide mittels MALDI-PSD gelang jedoch nicht. Daher kam zur Sequenzierung wiederum nESI-MS/MS zum Einsatz. Das Ergebnis der Sequenzierung des 1312,65 Da schweren Peptids ist in Tab. 9 zusammengefasst.

**Tab. 9: Nachgewiesene Fragmentionen des 1312,65 Da schweren Peptids**

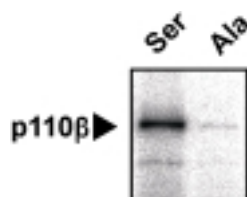
y''-Ion	m/z (Da)	Neutralverlust (Da)	b-Ion	m/z (Da)	Neutralverlust (Da)
y <sub>3</sub> ''	505,18	407,20	b <sub>2</sub>	209,10	-
y <sub>7</sub> ''	1003,47	905,50	b <sub>3</sub>	310,15	-
y <sub>8</sub> ''	1104,52	1006,54	b <sub>5</sub>	565,32	-
y <sub>9</sub> ''	1241,58	1143,60	b <sub>6</sub>	693,42	-
			b <sub>7</sub>	808,44	-
			b <sub>8</sub>	971,51	-
			b <sub>9</sub>	1127,61	-
			b <sub>10</sub>	1294,61	1196,63

Anhand der Fragmente, deren Massen den kalkulierten Massen der y''- bzw. b-Ionen des phosphorylierten C-Terminus ( $^{1061}AHTVRKDYRS^{1070}$ ) der p110 $\beta$ -Untereinheit ent-

sprachen, konnte die Sequenz des Peptids zweifelsfrei bestätigt werden. Aus allen nachgewiesenen C-terminalen Fragmentionen ( $y_3''$ ,  $y_7''$ ,  $y_8''$ ,  $y_9''$ ) wurde ein neutrales Fragment mit einer Masse von 98 Da,  $H_3PO_4$  entsprechend, abgespalten (Neutralverlust, siehe Tab. 9). Im Gegensatz dazu zeigte nur das N-terminale  $b_{10}$ -Ion, welches das komplette Peptid repräsentierte, nicht jedoch das  $b_9$ -Ion mit der Sequenz  $^{1061}AHTVRKDYR^{1069}$  sowie alle weiteren b-Ionen, einen Verlust von  $H_3PO_4$  (siehe Tab. 9). Damit wurde deutlich, dass die Autophosphorylierung der  $p110\beta$ -Untereinheit an der C-terminalen Aminosäure des Peptids und damit an Serin<sup>1070</sup> erfolgte. Das vermutlich doppelt phosphorylierte, 1392,63 Da schwere Peptid konnte in den nESI-MS/MS-Experimenten nicht nachgewiesen werden, womit die Bestätigung einer zweiten Phosphorylierung nicht möglich war.

### 5.3.3 Lipid- und Proteinkinase-Aktivität von PI-3-Kinase $\beta$ -Mutanten

Um zu prüfen, ob die Autophosphorylierung ausschließlich an Serin<sup>1070</sup> stattfindet, wurde eine Mutante erzeugt, bei der Serin<sup>1070</sup> durch Alanin ersetzt wurde. Die Proteinkinase-Aktivität dieser Mutante wurde im Vergleich zur nicht modifizierten PI-3-Kinase  $\beta$  untersucht (Abb. 31).



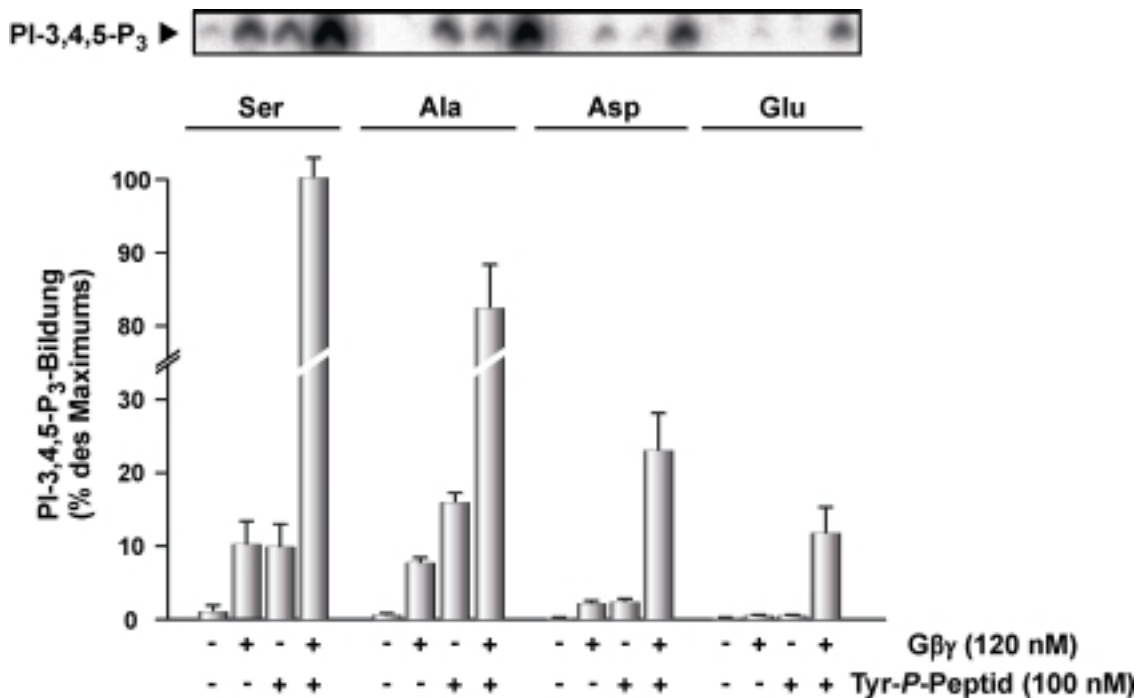
**Abb. 31: Proteinkinase-Aktivität der  $p110\beta S1070A$ -Mutante**

Gereinigte heterodimere PI-3-Kinase  $\beta$ , die entweder die unmodifizierte  $p110\beta$ -Untereinheit (Ser) oder eine  $p110\beta S1070A$ -Untereinheit (Ala) enthielt, wurde auf den Einbau von radioaktiv markiertem  $^{32}P$ -Phosphat untersucht. Die Messungen wurden entsprechend den Angaben in den Methoden durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm.

Nach Austausch des Serin-Restes gegen Alanin war eine massive Abnahme der Autophosphorylierung der  $p110\beta$ -Untereinheit zu beobachten. Die verbliebene geringfügige Proteinkinase-Aktivität der mutierten PI-3-Kinase  $\beta$  ist eventuell auf eine Phosphorylierung von Threonin<sup>1063</sup> zurückzuführen, für die wir in den MALDI-MS-Untersuchungen erste Hinweise erhielten. Jedoch war wegen des geringen Ausmaßes der Phosphorylierung eine Bestätigung durch Sequenzierung nicht möglich. Somit können wir schließen, dass die quantitativ bedeutsamste Autophosphorylierung der  $p110\beta$ -Untereinheit an Serin<sup>1070</sup> im extremen C-Terminus des Proteins erfolgt. Es findet also eine zur Autophosphorylierung der PI-3-Kinase-Isoformen  $\gamma$  und  $\delta$  analoge Serin-Phosphorylierung statt. Dies warf die Frage auf, welche Auswirkungen diese Autophosphorylierung auf die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  hat.

Dazu wurden  $p110\beta$ -Mutanten erzeugt, die anstelle von Serin<sup>1070</sup> Asparagin- bzw. Glutaminsäure enthielten (siehe 5.2.3). Die Lipidkinase-Aktivität gereinigter Aspartat-,

Glutamat- und Alanin-Mutanten wurde im Vergleich zur Wildtyp-PI-3-Kinase  $\beta$  bestimmt (Abb. 32).



**Abb. 32: Lipidkinase-Aktivität von p110 $\beta$ S1070-Mutanten**

Die Lipidkinase-Aktivität der gereinigten heterodimeren PI-3-Kinase  $\beta$ , die entweder die unmodifizierte p110 $\beta$ -Untereinheit (Ser) oder eine mutierte p110 $\beta$ -Untereinheit (p110 $\beta$ S1070A = Ala, p110 $\beta$ S1070D = Asp, p110 $\beta$ S1070E = Glu) enthielt, wurde in Ab- (-) sowie Anwesenheit (+) von 120 nM G $\beta$  $\gamma$ -His, 100 nM Phosphotyrosin-Peptid bzw. beider Stimuli untersucht. Die Isolation, Trennung und Quantifizierung von <sup>32</sup>P-markiertem PI-3,4,5-P<sub>3</sub> wurde entsprechend den Angaben in den Methoden durchgeführt. Gezeigt sind ein repräsentatives Autoradiogramm sowie die Mittelwerte ( $\pm$  S.D.) aus drei Experimenten.

Die Alanin-Mutante zeigte eine im Vergleich zum nicht modifizierten Protein verringerte basale PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung, während die durch G $\beta$  $\gamma$ -Komplexe, Phosphotyrosin-Peptid sowie durch beide Stimuli synergistisch aktivierte Lipidkinase-Aktivität mit dem Wildtyp-Enzym vergleichbar waren. Im Gegensatz dazu wurde durch Austausch des Serin-Restes gegen Asparagin- bzw. Glutaminsäure sowohl die basale als auch die stimulierte Lipidkinase-Aktivität des Enzyms deutlich gehemmt. Während die Aspartat-Mutante eine Restaktivität von etwa 25 % zeigte, wies die Glutamat-Mutante nur noch etwa 10 % der Lipidkinase-Aktivität des Wildtyp-Enzyms auf. Auffällig war weiterhin, dass die Stabilität der heterodimeren PI-3-Kinase  $\beta$ , die eine der mutierten p110 $\beta$ -Untereinheiten enthielt, deutlich reduziert war.

Somit ist feststellbar, dass die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\beta$  genau wie die Autophosphorylierung der anderen Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  zu einer Hemmung der Lipidkinase-Aktivität dieser Enzyme führt.

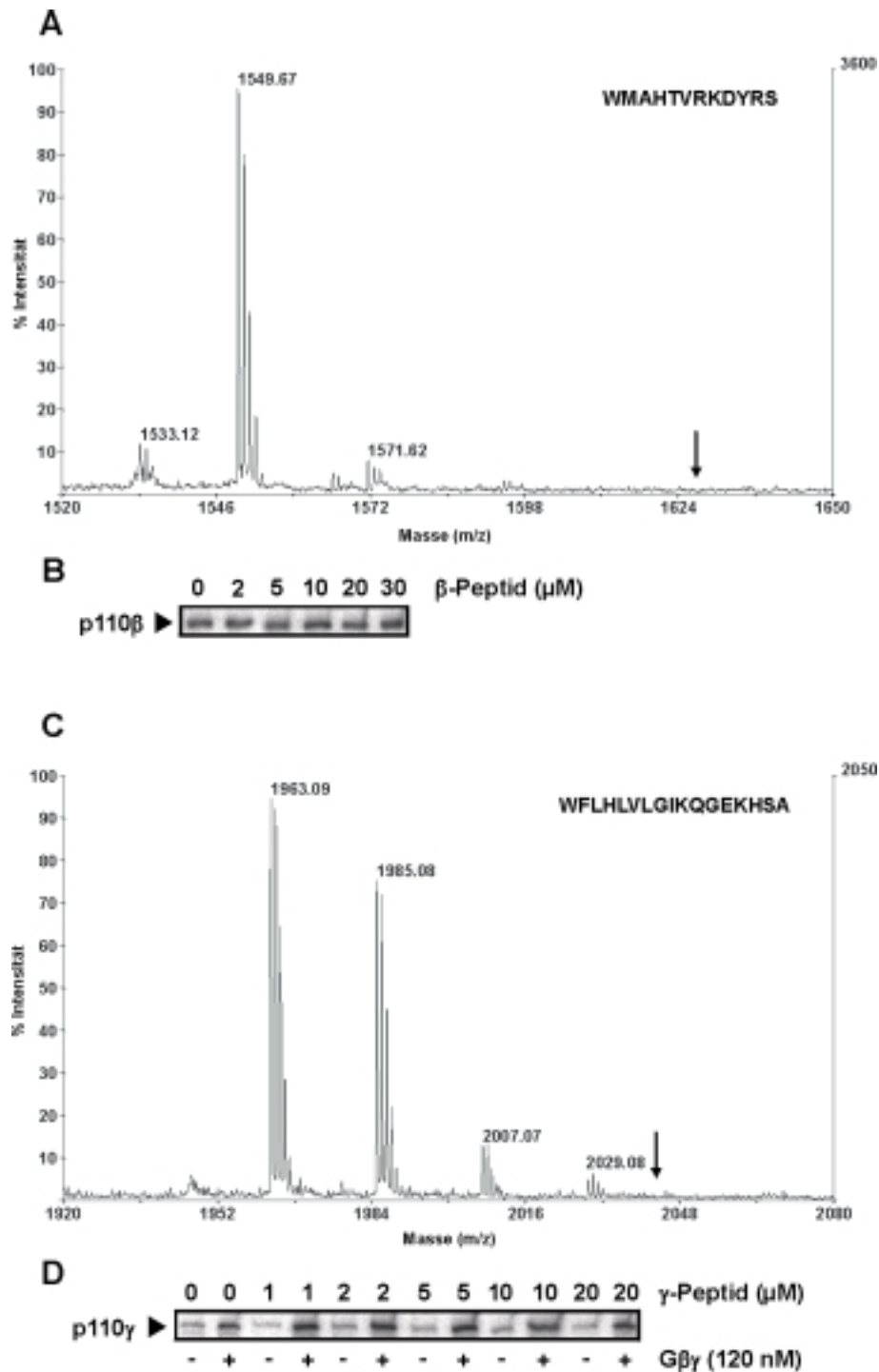
## 5.4 Mechanismus der Autophosphorylierung $G\beta\gamma$ -sensitiver PI-3-Kinasen

Es stellte sich nun die Frage nach dem Mechanismus der PI-3-Kinase-Autophosphorylierung. Die Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  sollen nicht in der Lage sein, Peptide, die von den Phosphorylierungsstellen der p85- bzw. p110 $\delta$ -Untereinheit abgeleitet sind, zu phosphorylieren (Vanhaesebroeck et al., 1999a). Das spricht dafür, dass die Phosphorylierungsreaktionen dieser PI-3-Kinase-Isoformen spezifische Protein-Protein-Interaktionen voraussetzen. Daher sollte geprüft werden, inwieweit die PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  in der Lage sind, Peptidsubstrate zu phosphorylieren. Dazu wurden Peptide synthetisiert, die den C-Termini der beiden PI-3-Kinasen entsprachen und eine für die massenspektrometrische Analyse geeignete Größe aufwiesen (Abb. 33). Diese Peptide wurden in Gegenwart von ATP und den entsprechenden Metallionen ( $Mn^{2+}$  bzw.  $Mg^{2+}$ ) mit der jeweiligen heterodimeren PI-3-Kinase inkubiert. Zusätzlich enthielt das Reaktionsgemisch Phospholipid-Vesikel. Im Fall der PI-3-Kinase  $\gamma$  wurden weiterhin  $G\beta\gamma$ -Komplexe zur Stimulation der Proteinkinase-Aktivität zugegeben. Wie in Abb. 33A und C gezeigt, war bei beiden PI-3-Kinase-Isoformen auch nach mehrstündiger Inkubation keine Phosphorylierung der C-terminalen Peptide zu beobachten. Um zu bestätigen, dass mit dem angewendeten Verfahren eine Peptid-Phosphorylierung durch eine Proteinkinase nachweisbar ist, wurden die Proteinkinasen A (PKA) und G (PKG) mit ihrem jeweiligen Peptid-Substrat (LRRASLG bzw. GRTGRRNSI) inkubiert und die Phosphorylierung der Peptide mit der gleichen Methode massenspektrometrisch bestimmt. Bereits nach 30-minütiger Inkubation konnte eine vollständige (PKA) bzw. deutliche (PKG) Phosphorylierung der Peptide nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Daher war die Methode zur Bestimmung von Peptid-Phosphorylierungen geeignet.

Weiterhin wurde der Einfluß der C-terminalen Peptide auf die Autophosphorylierung der p110 $\beta$ - und p110 $\gamma$ -Untereinheit untersucht. Dazu wurde die Proteinkinase-Aktivität der beiden PI-3-Kinase-Isoformen in Gegenwart steigender Mengen des jeweiligen C-terminalen Peptids bestimmt. In Abb. 33B ist gezeigt, dass die Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit auch bei höchsten Peptid-Konzentrationen unbeeinflusst blieb. Weiterhin wurde das Ausmaß der basalen und der  $G\beta\gamma$ -stimulierten Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit durch Inkubation mit dem C-terminalen Peptid nicht verändert (siehe Abb. 33D). Aus beiden Befunden lässt sich schließen, dass weder die PI-3-Kinase  $\beta$  noch die PI-3-Kinase  $\gamma$  mit Peptid-Substraten wechselwirken und diese auch nicht phosphorylieren können.

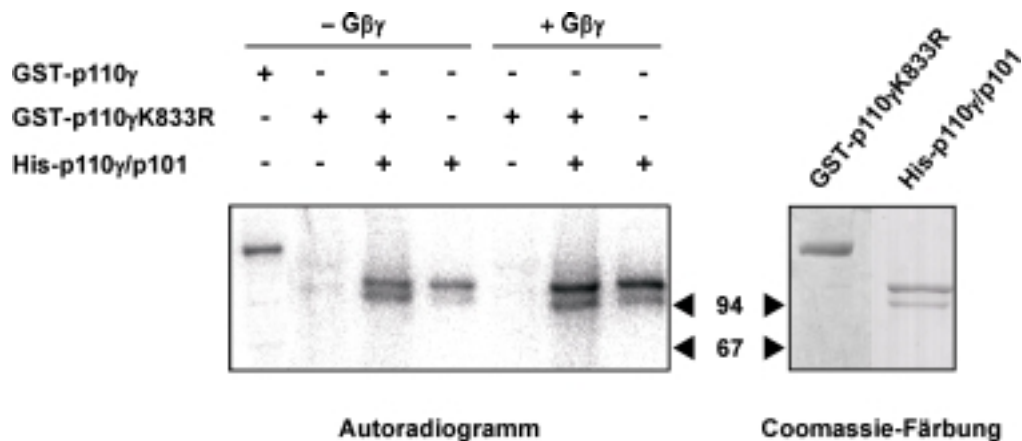
Um weiterhin zu prüfen, ob der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  ein Transphosphorylierungs- oder ein „echter“ Autophosphorylierungs-Mechanismus zugrunde liegt, wurde gereinigte heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$  (His-p110 $\gamma$ /p101) mit einer p110 $\gamma$ -Mutante (GST-p110 $\gamma$ K833R) inkubiert, die weder eine Lipid- noch eine Proteinkinase-Aktivität besitzt (Stoyanova et al., 1997).





**Abb. 33: Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  in Gegenwart C-terminaler Peptide**

**A/C** Die C-terminalen Peptide der p110 $\beta$ - (A) bzw. p110 $\gamma$ -Untereinheit (C) wurden in Gegenwart von Phospholipid-Vesikeln, ATP und den entsprechenden Metallionen ( $Mn^{2+}$  bzw.  $Mg^{2+}$ ) mit der heterodimeren PI-3-Kinase  $\beta$  (A) bzw. der heterodimeren PI-3-Kinase  $\gamma$  und  $G\beta\gamma$ -Komplexen (C) inkubiert. Anschließend wurden MALDI-MS-Spektren der Peptidmischungen aufgenommen. Die Massen der phosphorylierten Peptide sind mit einem Pfeil markiert. **B/D** Die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  (B) bzw.  $\gamma$  (D) wurde in Gegenwart steigender Mengen der entsprechenden C-terminalen Peptide sowie im Fall der PI-3-Kinase  $\gamma$  in An- (+) und Abwesenheit (-) von 120 nM  $G\beta_1\gamma_2$ -His entsprechend den Angaben in den Methoden bestimmt. Dargestellt ist jeweils ein typisches Autoradiogramm eines von drei Versuchen.



**Abb. 34: Mechanismus der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$**

Die Proteinkinase-Aktivität der gereinigten heterodimeren PI-3-Kinase  $\gamma$  (His-p110 $\gamma$ /p101) und der Kinase-inaktiven Mutante GST-p110 $\gamma$ K833R wurde entweder allein oder nach Koinkubation der beiden Enzyme in An- (+) und Abwesenheit (-) von 120 nM G $\beta$  $\gamma$ <sub>2</sub>-His entsprechend den Angaben in den Methoden bestimmt. Zur Markierung der Laufhöhe von phosphorylierter GST-p110 $\gamma$ K833R wurde zusätzlich die Autophosphorylierung der monomeren GST-p110 $\gamma$  gemessen. Dargestellt sind ein repräsentatives Autoradiogramm (links) und ein Coomassie-gefärbtes Protein-Gel der affinitätschromatographisch gereinigten PI-3-Kinasen (rechts).

Wie in Abb. 34 zu sehen ist, wurde die Hexahistidin-markierte p110 $\gamma$ -Untereinheit des Heterodimers, nicht jedoch die GST-fusionierte, Kinase-inaktive p110 $\gamma$ -Untereinheit phosphoryliert. Auch nach Stimulation der Proteinkinase-Aktivität der heterodimeren PI-3-Kinase  $\gamma$  mit G $\beta$  $\gamma$ -Komplexen konnte keine Phosphorylierung der GST-p110 $\gamma$ K833R-Mutante nachgewiesen werden. Demnach erfolgte die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  nicht über einen Transphosphorylierungs-Mechanismus. Vergleichbare Resultate wurden kürzlich von Bondev und Mitarbeitern (2001) unter Verwendung der monomeren p110 $\gamma$ -Untereinheit erzielt.

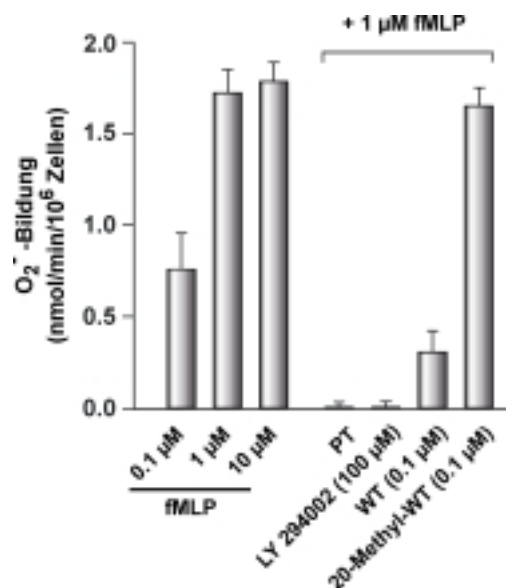
## 5.5 *In vivo*-Autophosphorylierung der PI-3-Kinase $\gamma$

### 5.5.1 *Nachweis der PI-3-Kinase $\gamma$ in HL-60-Zellen*

Eine entscheidende Frage ist, welche Bedeutung die Autophosphorylierung der Klasse I PI-3-Kinasen *in vivo* hat. Da wir gefunden hatten, daß die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  regulierbar ist, während die PI-3-Kinase  $\beta$  eine konstitutive Aktivität zeigte, konzentrierten wir uns bei den *in vivo*-Untersuchungen auf die PI-3-Kinase  $\gamma$ . Die bisherigen Befunde zur Proteinkinase-Aktivität von Tyrosinkinase-assoziierten PI-3-Kinasen nach Überexpression in *Sf9*-Zellen sind uneinheitlich. Während Dhand und Mitarbeiter (1994) durch metabolische Markierung der überexprimierten PI-3-Kinase  $\alpha$  mit <sup>32</sup>P-Phosphat eine starke Phosphorylierung der p85-Untereinheit sowie einen geringen Phosphat-Einbau in die p110 $\alpha$ -Untereinheit nachweisen konnten, wurde die p110 $\delta$ -Untereinheit bei der Expression in *Sf9*-Zellen nicht phosphoryliert (Vanhaesebroeck et al., 1999a). Für die PI-3-Kinase  $\gamma$  konnten

wir nach Überexpression in *Sf9*-Zellen und  $^{32}\text{P}$ -Phosphat-Markierung ebenfalls keine signifikante Phosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit nachweisen (nicht gezeigt). Vanhasebroeck und Mitarbeiter (1999a) zeigten weiterhin in unstimulierten Jurkat-T-Zellen, welche die PI-3-Kinase  $\delta$  exprimierten, nach Behandlung mit dem Serin/Threonin-Proteinphosphatase-Inhibitor Okadainsäure eine Phosphorylierung der p110 $\delta$ -Untereinheit, die durch CD28 stimulierbar war.

Daher erschien es interessant, die *in vivo*-Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  in einem Zellsystem zu untersuchen, das die PI-3-Kinase  $\gamma$  exprimiert. In neutrophilen Granulozyten und U937-Zellen konnte eine G-Protein-abhängige, RTK-unabhängige Stimulation der PI-3,4,5-P $_3$ -Bildung durch fMLP und ATP gezeigt werden (Stephens et al., 1993a, b). Dies führt zur Beeinflussung verschiedener Signalwege, wie z.B. zur Aktivierung der NADPH-Oxidase (Coffer et al., 1998). Tatsächlich exprimieren neutrophile Granulozyten sowie humane Leukämie-Zelllinien, wie U937- und K562-Zellen, die p110 $\gamma$ -Untereinheit (Stoyanov et al., 1995, Kular et al., 1997, Naccache et al., 2000). Wir verwendeten für unsere Untersuchungen HL-60-Zellen, die durch Behandlung mit dbt-cAMP in Richtung neutrophiler Granulozyten differenziert werden können. In diesen Zellen kann durch Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit dem chemotaktischen Faktor fMLP durch Aktivierung der NADPH-Oxidase die Bildung von O $_2^-$  induziert werden (Abb. 35).

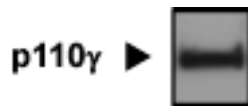


**Abb. 35: O $_2^-$ -Produktion in HL-60-Zellen**

Die fMLP-induzierte Bildung von O $_2^-$  in dbt-cAMP-differenzierten HL-60-Zellen wurde als Reduktion von Cytochrom c entsprechend den Angaben in den Methoden gemessen. Die Vorbehandlung der Zellen mit Pertussistoxin (PT) erfolgte für 24 h, während die Inkubation mit den PI-3-Kinase-Inhibitoren Wortmannin (WT) bzw. LY294002 sowie dem inaktiven 20-Methyl-Wortmannin für 30 min erfolgte. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  S.D.) aus drei Experimenten.

Anhand der Sensitivität der fMLP-stimulierten O $_2^-$ -Bildung gegenüber Pertussistoxin und den PI-3-Kinase-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 konnte geschlossen werden, dass eine

G-Protein-abhängige PI-3-Kinase in diesen Signalweg involviert war. Der Nachweis der PI-3-Kinase  $\gamma$  in HL-60-Zellen erfolgte durch Immunoblot-Analyse mit einem monoklonalen, gegen die p110 $\gamma$ -Untereinheit gerichteten Antikörper (Leopoldt et al., 1998, Abb. 36).

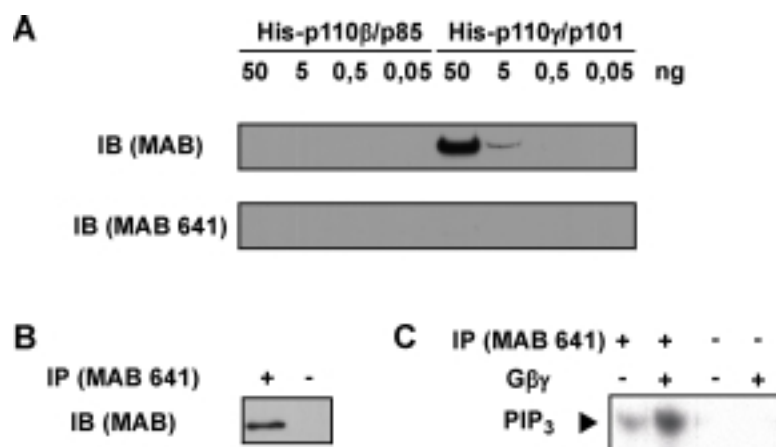


**Abb. 36: Immunologischer Nachweis der p110 $\gamma$ -Untereinheit in differenzierten HL-60-Zellen**

HL-60-Zellextrakt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Immunoblot-Analyse mit einem monoklonalen, gegen die p110 $\gamma$ -Untereinheit gerichteten Antikörper analysiert.

### 5.5.2 Biochemische Charakterisierung der in HL-60-Zellen enthaltenen PI-3-Kinase $\gamma$

Zur biochemischen Charakterisierung der in HL-60-Zellen enthaltenen PI-3-Kinase  $\gamma$  sollte das Enzym mittels Immunpräzipitation gewonnen werden. In Vorversuchen zeigte sich, dass der zur Immunoblot-Analyse verwendete monoklonale anti-p110 $\gamma$ -Antikörper (MAB) hierfür ungeeignet war. Daher sollte ein neuer monoklonaler, gegen die p110 $\gamma$ -Untereinheit gerichteter Antikörper (MAB 641) zur Anwendung kommen. Zur Charakterisierung dieses Antikörpers im Vergleich zu MAB wurde zunächst eine Immunoblot-Analyse mit den gereinigten PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  durchgeführt (Abb. 37A).

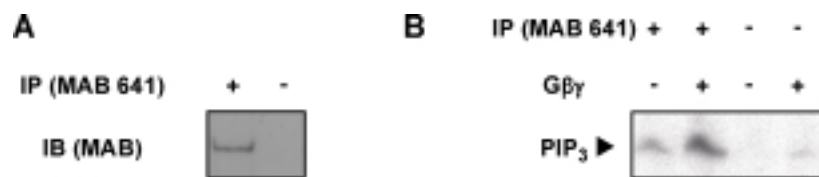


**Abb. 37: Charakterisierung eines monoklonalen anti-p110 $\gamma$ -Antikörpers**

**A** Die aus *Sf9*-Zellen gereinigten PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  (0,5-50 ng) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und durch Immunoblot-Analyse (IB) mit den monoklonalen anti-p110 $\gamma$ -Antikörpern MAB bzw. MAB 641 analysiert. **B/C** HEK293-Zellen wurden entsprechend den Angaben in den Methoden mit p110 $\gamma$ - und p101-Plasmid-DNA transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und der Zellextrakt gewonnen. Die Immunpräzipitation (IP) der PI-3-Kinase  $\gamma$  erfolgte über Nacht mit an ProteinA-Sepharose gebundenem anti-p110 $\gamma$ -Antikörper (MAB 641), zur Kontrolle wurde Antikörper-freie ProteinA-Sepharose (-) verwendet. Nach dem Abzentrifugieren der ProteinA-Sepharose wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen entfernt. Die ProteinA-Sepharose wurde in Probenpuffer nach Lämmli resuspendiert, es folgten die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine, der Transfer auf Nitrocellulose-Membranen sowie der immunologische Nachweis der p110 $\gamma$ -Untereinheit mit MAB (**B**). Zur Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität wurde die ProteinA-Sepharose in Reaktionspuffer aufgenommen und die Bildung von PI-3,4,5-P<sub>3</sub> in An- (+) und Abwesenheit (-) von 120 nM G $\beta\gamma$ -His entsprechend den Angaben in den Methoden gemessen (**C**).

Im Gegensatz zum bisher verwendeten MAB, der spezifisch die p110 $\gamma$ -Untereinheit markierte, erkannte MAB 641 die denaturierte p110 $\gamma$ -Untereinheit in der Immunoblot-Analyse nicht. Hingegen konnte mit Hilfe des MAB 641 die in HEK293-Zellen über-exprimierte, heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$  immunpräzipitiert werden, wie der immunologische Nachweis der p110 $\gamma$ -Untereinheit im Immunpräzipitat durch den MAB zeigte (siehe Abb. 37B). Wie in Abb. 37C zu sehen ist, konnte die Lipidkinase-Aktivität dieser aus HEK293-Zellen präzipitierten PI-3-Kinase  $\gamma$  mit G $\beta\gamma$  stimuliert werden. Damit konnte mit dem angewendeten Verfahren zur Immunpräzipitation eine funktionell aktive PI-3-Kinase  $\gamma$  gewonnen werden.

Nun wurde die in differenzierten HL-60-Zellen enthaltene PI-3-Kinase  $\gamma$  immunpräzipitiert und auf ihre Lipidkinase-Aktivität untersucht. Wie in Abb. 38A zu sehen ist, konnte die mittels Immunoblot-Analyse in HL-60-Zellen nachgewiesene PI-3-Kinase  $\gamma$  mit dem monoklonalen anti-p110 $\gamma$ -Antikörper MAB 641 spezifisch immunpräzipitiert werden. Die Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität (siehe Abb. 38B) zeigte, dass die durch die immunpräzipitierte PI-3-Kinase  $\gamma$  katalysierte PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung durch Zugabe von G $\beta\gamma$ -Komplexen stimuliert werden konnte. Die Resultate bestätigten, dass die in differenzierten HL-60-Zellen exprimierte PI-3-Kinase  $\gamma$  funktionell aktiv war.



**Abb. 38: Lipidkinase-Aktivität der in differenzierten HL-60-Zellen enthaltenen PI-3-Kinase  $\gamma$**

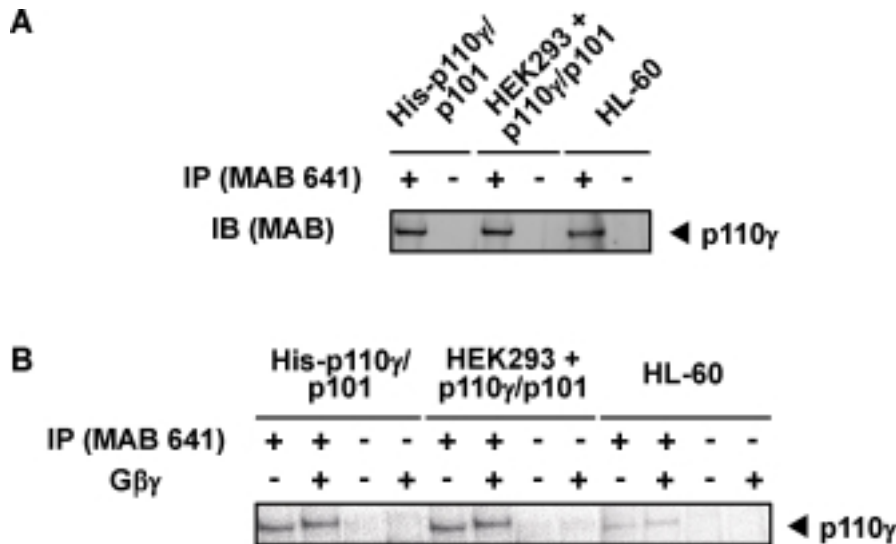
**A** Die Immunpräzipitation (IP) der in HL-60-Zellen enthaltenen PI-3-Kinase  $\gamma$  erfolgte über Nacht mit an ProteinA-Sepharose gebundenem anti-p110 $\gamma$ -Antikörper (MAB 641), zur Kontrolle wurde Antikörper-freie ProteinA-Sepharose (-) verwendet. Nach dem Abzentrifugieren der ProteinA-Sepharose wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen entfernt. Die ProteinA-Sepharose wurde in Probenpuffer nach Lämmli resuspendiert, es folgten die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine, der Transfer auf Nitrocellulose-Membranen sowie die Immunoblot-Analyse (IB) mit MAB. **B** Zur Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität wurde die ProteinA-Sepharose in Reaktionspuffer aufgenommen und die Bildung von PI-3,4,5-P<sub>3</sub> in An- (+) und Abwesenheit (-) von 120 nM G $\beta_1\gamma_2$ -His entsprechend den Angaben in den Methoden gemessen.

### 5.5.3 *In vivo-Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase $\gamma$*

Zur Untersuchung der *in vivo*-Phosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit wurden differenzierte HL-60-Zellen mit <sup>32</sup>P-Phosphat metabolisch markiert. Nach der anschließenden Immunpräzipitation der PI-3-Kinase  $\gamma$  konnte jedoch keine signifikante Phosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit nachgewiesen werden. Auch eine Behandlung der HL-60-Zellen mit Okadainsäure (siehe 5.5.1) bewirkte keine verstärkte Phosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit (nicht gezeigt). Weiterhin wurden die <sup>32</sup>P-Phosphat-markierten HL-60-Zellen mit fMLP stimuliert, was ebenfalls nicht zu einer erhöhten Phosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  führte (nicht

gezeigt). Somit konnte in HL-60-Zellen keine *in vivo*-Phosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit nachgewiesen werden.

Es stellte sich daher die Frage, ob die in differenzierten HL-60-Zellen enthaltene PI-3-Kinase  $\gamma$  über eine Proteinkinase-Aktivität verfügte. Um dies zu überprüfen, wurde die *in vitro*-Autophosphorylierung der aus HL-60-Zellen immunpräzipitierten PI-3-Kinase  $\gamma$  bestimmt (Abb. 39).



**Abb. 39: Proteinkinase-Aktivität der immunpräzipitierten PI-3-Kinase  $\gamma$**

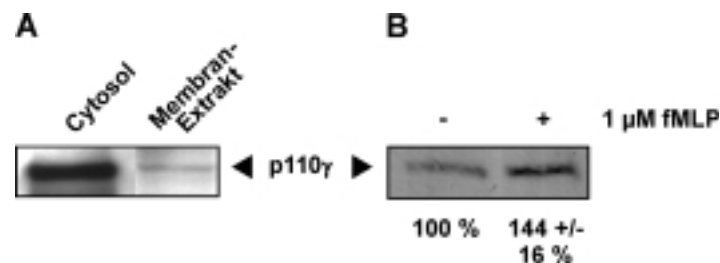
**A/B** Gereinigte heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$  (50 ng), Zellextrakt von HEK293-Zellen, die mit p110 $\gamma$ - und p101-Plasmid-DNA transfiziert waren, sowie aus differenzierten HL-60-Zellen gewonnener Zellextrakt wurden über Nacht mit an ProteinA-Sepharose gebundenem anti-p110 $\gamma$ -Antikörper (MAB 641) inkubiert, zur Kontrolle wurde Antikörper-freie ProteinA-Sepharose (-) verwendet. Nach dem Abzentrifugieren der ProteinA-Sepharose wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen entfernt. Die ProteinA-Sepharose wurde in Probenpuffer nach Lämmli resuspendiert, es folgten die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine, der Transfer auf Nitrocellulose-Membranen sowie der immunologische Nachweis der p110 $\gamma$ -Untereinheit mit MAB (A). Zur Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität wurde die ProteinA-Sepharose in Reaktionspuffer aufgenommen und die Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit in An- (+) und Abwesenheit (-) von 120 nM G $\beta$  $\gamma$ <sub>2</sub>-His entsprechend den Angaben in den Methoden bestimmt (B).

Zum Vergleich wurde auch eine Immunpräzipitation der gereinigten PI-3-Kinase  $\gamma$  (His-p110 $\gamma$ /p101, 50 ng Protein) sowie der in HEK293-Zellen überexprimierten, heterodimeren PI-3-Kinase  $\gamma$  durchgeführt. Wie in Abb. 39A zu sehen ist, konnten vergleichbare Mengen der gereinigten sowie der überexprimierten PI-3-Kinase  $\gamma$  gewonnen werden, während aus HL-60-Zellen eine etwa halb so große Menge der PI-3-Kinase  $\gamma$  immunpräzipitiert wurde. In allen Immunpräzipitaten konnte eine basale Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmengen fiel die Autophosphorylierung der aus HL-60-Zellen immunpräzipitierten p110 $\gamma$ -Untereinheit im Vergleich zur gereinigten und in HEK293-Zellen überexprimierten PI-3-Kinase  $\gamma$  jedoch deutlich geringer aus (siehe Abb. 39B). Das könnte möglicherweise darauf

zurückzuführen sein, dass der aus HL-60-Zellen gewonnene Immunkomplex auch eine mit der PI-3-Kinase  $\gamma$  assoziierte Protein-Phosphatase enthielt.

Auffällig war weiterhin, dass in keinem Immunpräzipitat eine Stimulation der Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit durch G $\beta\gamma$ -Komplexe nachgewiesen werden konnte. Da die Proteinkinase-Aktivität der gereinigten PI-3-Kinase  $\gamma$  bei allen bisherigen Untersuchungen sensitiv gegenüber G $\beta\gamma$ -Dimeren war (siehe 5.1.1), könnte der an die p110 $\gamma$ -Untereinheit gebundene Antikörper Ursache für die fehlende Stimulierbarkeit der Autophosphorylierung der immunpräzipitierten PI-3-Kinase  $\gamma$  sein. Um dies näher zu untersuchen, wurde gereinigte PI-3-Kinase  $\gamma$  (His-p110 $\gamma$ /p101) an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gebunden und anschließend die Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit bestimmt. Während eine basale Autophosphorylierung stattfand, konnte die Proteinkinase-Aktivität der immobilisierten PI-3-Kinase  $\gamma$  wiederum nicht durch G $\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert werden (nicht gezeigt). Somit scheint der Verlust der G $\beta\gamma$ -Stimulierbarkeit der Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit nach Immobilisierung des Proteins ein generelles Problem darzustellen, was bei der Interpretation entsprechender Experimente beachtet werden muß.

Um die fehlende Stimulierbarkeit der *in vivo*-Phosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit durch fMLP besser einordnen zu können, sollte die Rezeptor-vermittelte Membran-Rekrutierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  in differenzierten HL-60-Zellen näher untersucht werden. Dazu wurde zunächst die subzelluläre Verteilung der PI-3-Kinase  $\gamma$  untersucht. Unter Basalbedingungen war der größte Teil der PI-3-Kinase  $\gamma$  cytosolisch lokalisiert, während nur ein geringer Anteil in der Membranfraktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 40A).



**Abb. 40: Rezeptor-vermittelte Membran-Translokation der PI-3-Kinase  $\gamma$**

**A** Subzelluläre Verteilung der PI-3-Kinase  $\gamma$  in HL-60-Zellen. Die Gewinnung von Cytosol und Membranen erfolgte gemäß den Angaben in den Methoden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung gleicher Proteinmengen der cytosolischen und Membranfraktionen wurde die p110 $\gamma$ -Untereinheit immunologisch nachgewiesen. **B** HL-60-Zellen wurden für 15 s mit 1  $\mu$ M fMLP oder dem entsprechenden Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Gewinnung von Cytosol und Membranen. Aliquots der Membranfraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die p110 $\gamma$ -Untereinheit wurde immunologisch nachgewiesen. Die Laufhöhe der rekombinanten gereinigten p110 $\gamma$ -Untereinheit ist markiert. Dargestellt ist ein typischer von 6 Versuchen. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch ausgewertet. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert ( $\pm$  S.D.) aus den 6 Versuchen.

Weiterhin wurden Membranen von unstimulierten und fMLP-stimulierten HL-60-Zellen auf ihren Gehalt an PI-3-Kinase  $\gamma$  untersucht. In Abb. 40B ist gezeigt, dass in differenzierten HL-60-Zellen nach fMLP-Stimulation eine Membran-Translokation der p110 $\gamma$ -Untereinheit zu beobachten war. Diese entsprach in ihrem Ausmaß der von Naccache und Mitarbeitern (2000)

---

nach Rezeptor-Stimulation gezeigten Translokation der PI-3-Kinase  $\gamma$  in neutrophilen Granulozyten. Verglichen mit dem cytosolischen Anteil der PI-3-Kinase  $\gamma$  ist das Ausmaß dieser Translokation jedoch gering. Da eine fMLP-vermittelte Aktivierung der Enzymaktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  jedoch nur möglich ist, wenn das Enzym mit den an der Membran lokalisierten aktivierten  $G\beta\gamma$ -Komplexen interagiert, könnte das geringe Ausmaß der durch fMLP bewirkten Translokation der PI-3-Kinase  $\gamma$  erklären, warum wir keine Stimulation der *in vivo*-Phosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit durch fMLP beobachten konnten.



## 6 DISKUSSION

### 6.1 Mechanismen der Spezifität PI-3-Kinase-abhängiger Signalwege

Klasse I PI-3-Kinasen vermitteln eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Wachstum und Differenzierung, cytoskelettale Veränderungen, Zellmigration oder vesikuläre Transportvorgänge (siehe Abb. 4). Die Aktivierung der PI-3-Kinasen erfolgt hierbei in erster Linie durch verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), wie z.B. den Insulin-, EGF- oder PDGF-Rezeptor, sowie durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), wie z.B. den fMLP- oder den Lysophosphatidsäure-Rezeptor. Während die Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  ubiquitär exprimiert werden, konnte die ebenfalls p85-assoziierte PI-3-Kinase  $\delta$  nur in Leukozyten nachgewiesen werden (Hu et al., 1993, Vanhaesebroeck et al., 1997). Auch die Klasse I<sub>B</sub> PI-3-Kinase  $\gamma$  kommt bevorzugt in hämatopoietischen Zellen vor und wird anscheinend in neuronalen Geweben und im ZNS nicht exprimiert (Stoyanov et al., 1995, Bernstein et al., 1998). Trotz des restriktiven Expressionsmusters einzelner Klasse I PI-3-Kinasen enthalten die meisten Zellen jedoch mehr als eine PI-3-Kinase-Isoform. In Leukozyten werden sogar alle vier Vertreter exprimiert. Das Vorhandensein einer Vielzahl von Stimuli für die Auslösung PI-3-Kinase-abhängiger Signalwege und die Expression mehrerer PI-3-Kinase-Isoformen in einer Zelle legen nahe, dass die verschiedenen Klasse I PI-3-Kinasen spezifische Funktionen bei der Signalübertragung ausüben.

Erste Hinweise hierfür ergaben sich durch Studien an „Knockout“-Mäusen. So sind die Mäuse nach Ausschaltung des p110 $\gamma$ -Gens lebensfähig. Sie zeigen jedoch spezifische Defekte in der Funktion hämatopoietischer Zellen, z.B. neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten, wie es anhand des Expressionsmusters der PI-3-Kinase  $\gamma$  zu erwarten war (Hirsch et al., 2000, Li et al., 2000, Sasaki et al., 2000a). Hingegen ist die Inaktivierung des p110 $\alpha$ - bzw. p110 $\beta$ -Gens letal (Wymann und Pirola, 1998, Bi et al., 1999). Deshalb müssen Aussagen zur Spezifität dieser ubiquitär exprimierten PI-3-Kinase-Isoformen zurückgestellt werden, bis lebensfähige Tiere, z.B. durch konditionelle Ausschaltung der entsprechenden Gene in bestimmten Geweben, existieren. Dennoch konnten in jüngster Zeit wichtige Hinweise auf spezifische Funktionen von PI-3-Kinase-Isoformen durch Inaktivierung der Enzyme mit Hilfe Isoform-spezifischer Antikörper erbracht werden. Demnach vermittelt die PI-3-Kinase  $\alpha$  nach Stimulation von Makrophagen mit CSF-1 (*colony-stimulating factor 1*) die Aktivierung der DNA-Synthese, während durch Aktivierung der PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\delta$  Cytoskelett-Veränderungen induziert werden (Vanhaesebroeck et al., 1999b). Weiterhin soll die PI-3-Kinase  $\alpha$  in PAE (*porcine aortic endothelial*)-Zellen eine PDGF-abhängige Actin-Umlagerung bewirken, während die Insulin-vermittelte Actin-Umlagerung über die PI-3-Kinase  $\beta$  verlaufen soll (Hooshmand-Rad et al., 2000). Schließlich konnte in NK (*natural killer*)-Zellen nachgewiesen werden, dass die PI-3-Kinase  $\gamma$  in die Chemokin-vermittelte

Chemotaxis involviert ist, während die PI-3-Kinase  $\alpha$  hierbei keine Rolle zu spielen scheint (Al-Aoukaty et al., 1999).

Wie kommt diese hohe Isoform-Selektivität PI-3-Kinase-abhängiger Signalwege zustande? Zunächst unterscheiden sich Klasse I PI-3-Kinasen in ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen Rezeptorfamilien. Während die PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  durch RTK aktiviert werden und die Aktivierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  über eine Stimulation von GPCR vermittelt wird, ist die PI-3-Kinase  $\beta$  sowohl gegenüber RTK als auch  $G\beta\gamma$ -Komplexen sensitiv (Kurosu et al., 1997, Maier et al., 1999). Da die Interaktion der Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen mit RTK über p85-Adaptor-Untereinheiten erfolgt, könnte eine Selektivität PI-3-Kinase-abhängiger Signalwege durch unterschiedliche Affinitäten von p85-Isoformen zu RTK bedingt sein. In der Tat gibt es Hinweise, dass die Adaptor-Untereinheiten mit verschiedenen RTK unterschiedlich gut assoziieren. So sollen p85-Isoformen mit Insulin-induzierten Signalkomplexen in der Reihenfolge  $p50\alpha > p85\alpha > p55\alpha$  interagieren (Antonetti et al., 1996, Inukai et al., 1997, 2001). Allerdings konnte bisher keine selektive Interaktion der katalytischen Untereinheiten der Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen mit bestimmten Adaptor-Untereinheiten nachgewiesen werden (Vanhaesebroeck et al., 1997). Folgerichtig wurde bislang eine Isoform-spezifische Kopplung von Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen mit untersuchten Rezeptoren, wie dem CSF-1-, CD28- oder GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)-Rezeptor, ausgeschlossen (Vanhaesebroeck et al., 1997, 1999b). Da aber durch Aktivierung eines bestimmten Rezeptors unterschiedliche Effekte über verschiedene PI-3-Kinase-Isoformen ausgelöst werden können (s.o.), sind zusätzliche, die Spezifität der Interaktion von Rezeptor und PI-3-Kinase bedingende Mechanismen wahrscheinlich.

Ein weiterer Aspekt für eine Selektivität PI-3-Kinase-abhängiger Signalwege könnte eine unterschiedliche Lipidsubstrat-Spezifität bestimmter Klasse I PI-3-Kinase-Isoformen sein. Während *in vitro* eine Phosphorylierung von PI, PI-4-P und PI-4,5-P<sub>2</sub> erfolgt, besteht *in vivo* eine Präferenz der Klasse I PI-3-Kinasen für PI-4,5-P<sub>2</sub> (Stephens et al., 1991, Hawkins et al., 1992). Allerdings gibt es Hinweise, dass die p110 $\gamma$ -Untereinheit in Abwesenheit der p101-Untereinheit nach  $G\beta\gamma$ -Stimulation bevorzugt PI phosphoryliert, während die heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$  verstärkt PI-4,5-P<sub>2</sub> phosphorylieren soll (Maier et al., 1999, referiert in Steinberg, 2001). Die entstehenden Lipidprodukte PI-3-P bzw. PI-3,4,5-P<sub>3</sub> werden selektiv von Proteinen erkannt, die unterschiedliche Lipid-Bindungsdomänen enthalten. Während sog. FYVE-Domänen PI-3-P binden, können bestimmte PH-Domänen mit PI-3,4,5-P<sub>3</sub> und/oder PI-3,4-P<sub>2</sub> wechselwirken (Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999). Da die p110 $\gamma$  in bestimmten Zellen nicht konstitutiv mit p101 assoziiert sein soll, sondern möglicherweise als monomere p110 $\gamma$ -Untereinheit Funktionen ausüben kann, wäre grundsätzlich vorstellbar, dass die PI-3-Kinase  $\gamma$  durch die selektive Bildung distinkter 3'-phosphorylierter Phosphoinositide unterschiedliche Signale weitergeben könnte (Baier et al., 1999, Metjian et al., 1999).

Möglicherweise bestimmt nicht nur die Generierung sekundärer Botenstoffe, sondern auch die direkte Interaktion von PI-3-Kinasen mit weiteren Proteinen und damit die Bildung

von Signalkomplexen, die Selektivität PI-3-Kinase-abhängiger Signalwege. So konnte eine Wechselwirkung von Ras mit p110-Untereinheiten nachgewiesen werden (Vanhaesebroeck et al., 1997, Deora et al., 1998, Pacold et al., 2000, Rubio und Wetzker, 2000). Weiterhin sollen p85-Untereinheiten, auch in Abwesenheit der p110-Untereinheit, mit Rac und Cdc42 interagieren (Zheng et al., 1994, Tolias et al., 1995, Jimenez et al., 2000, Kang et al., 2002).

Neuere Studien heben die Existenz eines unabhängigen Polyphosphoinositid-Stoffwechsels im Zellkern hervor. Es gibt Hinweise, dass Klasse I PI-3-Kinasen nicht nur cytosolisch, sondern auch nukleär lokalisiert sein können (Metjian et al., 1999, Martelli et al., 2000, Bacqueville et al., 2001). Die Regulation dieser nukleären PI-3-Kinasen soll sich teilweise von der Regulation cytosolischer PI-3-Kinasen unterscheiden. So wurde kürzlich die nukleäre GTPase PIKE (*phosphoinositide kinase enhancer*) identifiziert, die an p85-Untereinheiten binden und damit Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen aktivieren soll (Ye et al., 2000). Hingegen wird die nukleäre PI-3-Kinase  $\gamma$  durch aus nukleären G<sub>i/o</sub>-Proteinen freigesetzte G $\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert (Bacqueville et al., 2001). Die subzelluläre Verteilung könnte also zur Selektivität der Signalwege von Klasse I PI-3-Kinasen beitragen.

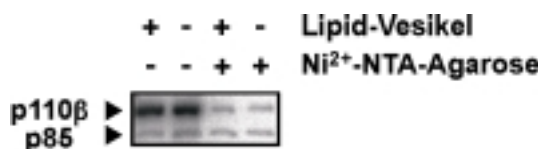
In jüngster Zeit wird zunehmend auch ein Einfluß der Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen auf die funktionelle Spezifität dieser Enzyme diskutiert (Hunter, 1995, Vanhaesebroeck et al., 1999b, Cantrell, 2001, Steinberg, 2001). Wichtigste Hinweise hierfür lieferten Bondeva und Mitarbeiter (1998), die eine p110 $\gamma$ -Mutante erzeugten, die durch Austausch der PI-Substratbindungsregion keine Lipidkinase-Aktivität besaß, während die Proteinkinase-Aktivität der Mutante, gemessen als Autophosphorylierung, erhalten blieb. Die Überexpression dieser Mutante bewirkte in einem zellulären Kontext im Gegensatz zum nicht modifizierten Enzym keine Aktivierung von PKB/Akt, stimulierte jedoch die MAPK. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der Annahme, dass durch die beiden Enzymqualitäten der PI-3-Kinase  $\gamma$  unterschiedliche Signalwege beeinflusst werden können. Gegenwärtig ist jedoch das Substrat der Protein-Phosphorylierung nicht identifiziert. Weiterhin ist noch unklar, in welcher Weise die über die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  vermittelte MAPK-Aktivierung durch GPCR reguliert werden kann, da nur die cytosolisch lokalisierte, jedoch nicht die Membran-gebundene PI-3-Kinase  $\gamma$  die MAPK aktivierte, obwohl der direkte Stimulus G $\beta\gamma$  nur Membran-assoziiert vorkommt.

Zum besseren Verständnis der Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen wurden deshalb mit der vorliegenden Arbeit weitere Untersuchungen zur proteinbiochemischen Charakterisierung dieser enzymatischen Eigenschaft durchgeführt. Hierbei konzentrierten wir uns auf die Proteinkinase-Aktivität der G-Protein-regulierten PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$ .

## 6.2 *In vitro-Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen*

In früheren Untersuchungen zur Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  fiel eine  $Mn^{2+}$ -Abhängigkeit der Autophosphorylierung auf (Dhand et al., 1994, Vanhaesebroeck et al., 1997). Die Autophosphorylierung der hier untersuchten, gleichfalls p85-assoziierten PI-3-Kinase  $\beta$  benötigt ebenfalls  $Mn^{2+}$ . Im Gegensatz dazu ist eine suffiziente Proteinkinase-Aktivität der Klasse I<sub>B</sub> PI-3-Kinase  $\gamma$  bereits in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  zu beobachten. Zudem sind die erforderlichen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen nahezu identisch mit den für die Lipidkinase-Aktivität benötigten Konzentrationen (Stoyanova et al., 1997, Maier et al., 1999). Somit unterscheiden sich die p85-assoziierten Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen hinsichtlich der Metallionen-Abhängigkeit der Autophosphorylierung von der Klasse I<sub>B</sub> PI-3-Kinase  $\gamma$ .

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  eine Phosphorylierung ihrer katalytischen p110 $\beta$ -Untereinheit bewirkt. Dies wird durch unpublizierte Beobachtungen von Bart Vanhaesebroeck und Mitarbeitern gestützt (pers. Mitteilung). Interessanterweise berichteten andere Arbeitsgruppen über eine Phosphorylierung der regulatorischen p85-Untereinheit der PI-3-Kinase  $\beta$  (Roche et al., 1998, Beeton et al., 2000). Die Untersuchung von Roche und Mitarbeitern (1998) wurde jedoch mit der nach Überexpression in COS7-Zellen immunpräzipitierten p110 $\beta$ -Untereinheit durchgeführt, der große Mengen der aus *Sf9*-Zellen gereinigten p85-Untereinheit als Substrat zugefügt wurden. Da mit den von uns verwendeten, stöchiometrischen His-p110 $\beta$ /p85-Dimeren ebenfalls ein geringfügiger Phosphat-Einbau in die p85-Untereinheit beobachtet werden konnte (siehe Abb. 26), ist vorstellbar, dass bei einem massiven Überangebot der p85 eine deutliche Phosphorylierung dieser Adaptor-Untereinheit nachweisbar ist. Unklar blieb in der Publikation von Roche und Mitarbeitern (1998), ob die p110 $\beta$ -Untereinheit ebenfalls phosphoryliert wurde. Eine weitere Besonderheit in der zitierten Arbeit sowie der Publikation von Beeton und Mitarbeitern (2000) war die Verwendung einer durch Immunpräzipitation immobilisierten PI-3-Kinase  $\beta$  zur Untersuchung der Autophosphorylierung. In der Tat scheint jedoch gerade dieser methodische Ansatz einen Einfluß auf die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  zu haben. So konnten wir in vergleichenden Untersuchungen eine verstärkte Phosphorylierung der p85-Untereinheit beobachten, wenn die PI-3-Kinase  $\beta$  immobilisiert vorlag. Dies war unabhängig davon, ob bei der Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität Phosphoinositid-freie Phospholipid-Vesikel verwendet wurden (Abb. 41).



**Abb. 41: Proteinkinase-Aktivität der löslichen und immobilisierten PI-3-Kinase β**

Gereinigte heterodimere PI-3-Kinase β (1 µg) wurde entweder an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gebunden (+) oder als lösliches Enzym (-) verwendet. Die Proteinkinase-Aktivität wurde in beiden Fällen in An- (+) und Abwesenheit (-) von Phosphoinositid-freien Phospholipid-Vesikeln entsprechend den Angaben in den Methoden bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Autoradiogramm. Die Proteinverluste bei der Bindung der PI-3-Kinase β an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose bedingten, dass geringere Mengen der immobilisierten PI-3-Kinase β bei der Bestimmung der Autophosphorylierung zum Einsatz kamen. Die Menge des <sup>32</sup>P-Phosphat-Einbaus in die p110β-Untereinheit korrelierte mit der Proteinmenge (nachgewiesen durch Ponceau-Färbung), während die p85-Phosphorylierung der immobilisierten PI-3-Kinase β im Vergleich zum löslichen Enzym erhöht war.

Somit haben die Versuchsbedingungen einen signifikanten Einfluß auf die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase β. Auch bei der Untersuchung der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ war ein Einfluß der Versuchsbedingungen zu beobachten. Eine Stimulation der Autophosphorylierung durch Gβγ-Komplexe erfolgte nur, wenn die PI-3-Kinase γ nicht immobilisiert war (siehe 5.5.3).

Unsere Befunde belegen eindeutig, dass die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ bevorzugt eine Phosphorylierung der p110γ-Untereinheit und nicht der p101-Untereinheit bewirkt (siehe Abb. 6, Stoyanova et al., 1997, Maier et al., 1999). Für die PI-3-Kinase δ hatten Vanhaesebroeck und Mitarbeiter (1997) ebenfalls eine Autophosphorylierung der katalytischen p110δ-Untereinheit nachgewiesen. Im Gegensatz dazu erfolgt die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase α an der regulatorischen p85-Untereinheit, jedoch nur, wenn die Assoziation von p85 und p110α nicht behindert ist (Dhand et al., 1994, Vanhaesebroeck et al., 1999a). Somit lassen sich Klasse I PI-3-Kinasen anhand ihrer Autophosphorylierung differenzieren. Die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase-Isoformen β, γ und δ führt zur Autophosphorylierung der katalytischen p110-Untereinheit, während die PI-3-Kinase α eine Phosphorylierung der p85-Untereinheit bewirkt.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Regulierbarkeit der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase-Isoformen β und γ. Unter *in vitro*-Bedingungen ist nur eine geringe basale Autophosphorylierung der p110γ-Untereinheit der gereinigten PI-3-Kinase γ zu beobachten. Diese kann durch Gβγ-Komplexe auf das 8 - 10-fache gesteigert werden. Der hierbei beobachtete EC<sub>50</sub>-Wert von etwa 30 nM Gβγ stimmt mit dem entsprechenden Wert für die Stimulation der Lipidkinase-Aktivität überein (siehe Abb. 7, Maier et al., 1999). Eine Voraussetzung für die Stimulation der p110γ-Autophosphorylierung durch Gβγ-Dimere ist allerdings die Gegenwart von Lipid-Vesikeln (siehe Abb. 6). Vermutlich sind diese Lipide nicht nur für die Aktivität von Gβγ, sondern auch für die korrekte Orientierung der katalytischen Domäne der PI-3-Kinase γ notwendig (Roger Williams, pers. Mitteilung, Pacold et al., 2000). Im Fall der PI-3-Kinase β ist die Proteinkinase- im Gegensatz zur Lipidkinase-Aktivität unter den gewählten Versuchsbedingungen weder durch Gβγ-Dimere noch durch das Phosphotyrosin-Peptid stimulierbar. Auch die

Verwendung von Lipid-Vesikeln sowie die Variation der  $Mn^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ -Konzentration ermöglichten keine Stimulation der Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit. Der Einfluß von Ras auf die Proteinkinase-Aktivität der gereinigten PI-3-Kinase  $\beta$  konnte wegen der Notwendigkeit eines bislang unbekanntem Kofaktors nicht untersucht werden (Pacold et al., 2000). Das Studium der Literatur ergab ebenfalls keine Hinweise auf eine *in vitro*-Stimulierbarkeit der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$ , da die Untersuchungen für beide PI-3-Kinasen in der Regel mit den an Phosphotyrosin-Peptid-beladenen Resinaten immobilisierten Enzymen durchgeführt wurden (Dhand et al., 1994, Vanhaesebroeck et al., 1997, 1999a). Dies würde zwar einer Aktivierung entsprechen, jedoch fehlen Daten zur basalen Phosphorylierung. Somit verbieten sich Aussagen über das Verhältnis von basaler zu stimulierter Proteinkinase-Aktivität. Beobachtungen von Vanhaesebroeck und Mitarbeitern (1999a) bei Untersuchungen zur *in vivo*-Phosphorylierung der PI-3-Kinase  $\delta$  in Jurkat-T-Zellen deuteten jedoch auf eine Stimulation der p110 $\delta$ -Phosphorylierung durch CD28 hin, die durch den PI-3-Kinase-Inhibitor LY294002 hemmbar war. Allerdings blieb ungeklärt, ob die PI-3-Kinase  $\delta$  selbst für diese Phosphorylierung verantwortlich war.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Gegenwart von  $Mn^{2+}$  eine Stöchiometrie des Phosphat-Einbaus von 0,5 mol Phosphat pro mol p110 $\beta$  ermittelt. Damit könnte vermutet werden, dass die hohe basale Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\beta$  die Regulierbarkeit durch G $\beta\gamma$  und Phosphotyrosin-Peptid behindert. Da aber auch in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  keine Stimulation beobachtet werden konnte, obwohl der Phosphat-Einbau in die p110 $\beta$ -Untereinheit wesentlich geringer war, ist anzunehmen, dass die fehlende Aktivierbarkeit der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  andere Ursachen hat. Vanhaesebroeck und Mitarbeiter (1999a) ermittelten für die aus Sf9-Zellen gereinigte PI-3-Kinase  $\delta$  ebenfalls eine Stöchiometrie der Autophosphorylierung von etwa 0,5 mol Phosphat pro mol p110 $\delta$ . Es ist daher vorstellbar, dass die Reaktionsbedingungen für die Phosphorylierung von Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen oder die Natur dieser Phosphorylierung an sich für diesen substöchiometrischen Phosphorylierungsgrad verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu wurde für die G $\beta\gamma$ -stimulierte Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit eine Stöchiometrie von etwa 1 mol Phosphat pro mol p110 $\gamma$  bestimmt, während der basale Phosphat-Einbau nach 30 min nur etwa 0,1 mol pro mol p110 $\gamma$  betrug.

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur die Phosphorylierungsstellen der p85 $\alpha$ - sowie der p110 $\delta$ -Untereinheit bekannt (Dhand et al., 1994, Vanhaesebroeck et al., 1999a). Hier konnte Serin<sup>1101</sup> der p110 $\gamma$ -Untereinheit als die nach G $\beta\gamma$ -Stimulation phosphorylierte Aminosäure identifiziert werden. Dies basierte auf der massenspektrometrischen Sequenzierung eines C-terminalen Phosphopeptids sowie auf der Bestätigung dieses Befundes anhand der fehlenden Stimulierbarkeit der Autophosphorylierung einer p110 $\gamma$ -Mutante, bei der Serin<sup>1101</sup> durch Alanin ersetzt war. In analoger Weise wurde Serin<sup>1070</sup> als die phosphorylierte Aminosäure der p110 $\beta$ -Untereinheit identifiziert und durch Mutation bestätigt. Für die p110 $\delta$ -

Untereinheit war in einer früheren Untersuchung Serin<sup>1039</sup> als phosphorylierte Aminosäure bestimmt worden (Vanhaesebroeck et al., 1999a). Somit erfolgt die Autophosphorylierung der Klasse I PI-3-Kinasen, deren katalytische p110-Untereinheit phosphoryliert wird, an einem homologen Serin-Rest im extremen C-Terminus des Proteins (siehe Abb. 25 und Tab. 10). Hingegen verfügt die p110 $\alpha$ -Untereinheit in diesem Bereich nicht über einen Serin-Rest und wird auch nicht phosphoryliert.

**Tab. 10: Charakteristika der Autophosphorylierung von Klasse I PI-3-Kinasen**

PI-3-Kinase-Isoform	PI3K $\alpha$ <sup>1</sup>	PI3K $\beta$	PI3K $\gamma$	PI3K $\delta$ <sup>2</sup>
Metallionen-Abhängigkeit	Mn <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> <sup>4</sup>	Mn <sup>2+</sup>
phosphorylierte Untereinheit	p85	p110 $\beta$ <sup>3</sup>	p110 $\gamma$ <sup>4,5</sup>	p110 $\delta$
phosphorylierte Aminosäure	Ser <sup>608</sup>	Ser <sup>1070</sup>	Ser <sup>1101</sup>	Ser <sup>1039</sup>
Effekt der Autophosphorylierung auf die Lipidkinase-Aktivität	↓	↓	-	↓
Stimulierbarkeit der Autophosphorylierung	k.A.	-	durch G $\beta$ $\gamma$ <sup>6</sup>	k.A.

↓ = Hemmung; - = kein Einfluß; k.A. = keine Aussage

<sup>1</sup> Dhand et al., 1994

<sup>2</sup> Vanhaesebroeck et al., 1999a

<sup>3</sup> Hinweise auf p85-Phosphorylierung durch Roche et al., 1998, Beeton et al., 2000

<sup>4</sup> Stoyanova et al., 1997, Maier et al., 1999

<sup>5</sup> Hinweise auf p101-Phosphorylierung durch Bondev et al., 1999

<sup>6</sup> Maier et al., 2000

Für die PI-3-Kinase  $\gamma$  liegt mittlerweile die Kristallstruktur der monomeren p110 $\gamma$ -Untereinheit vor (Walker et al., 1999, 2000, Pacold et al., 2000). Hieraus ist ersichtlich, dass sich der phosphorylierte Serin-Rest (Serin<sup>1101</sup>) in einer Region hinter der C-terminalen  $\alpha$ 12-Helix befindet. Diese Helix bildet zusammen mit der Aktivierungsschleife und der katalytischen Schleife des Enzyms eine Tasche, die für die Substratbindung von Bedeutung ist. Entsprechend ist auch der  $\gamma$ -Phosphat-Rest des ATP in der Nähe dieser Region lokalisiert. Somit befinden sich die 3'-Position des Phosphoinositids sowie Serin<sup>1101</sup> und damit das Lipid- wie auch das Proteinsubstrat der PI-3-Kinase  $\gamma$  in unmittelbarer räumlicher Nähe. Aufgrund dieser sterischen Verhältnisse könnte die Hydroxylgruppe des Serins mit der 3'-Hydroxylgruppe des Phosphoinositids um den Angriff des  $\gamma$ -Phosphat-Restes des ATP konkurrieren. Serin<sup>1101</sup> könnte also eine für die Autophosphorylierung des Enzyms begünstigte Position einnehmen. Der Einfluß der p101-Untereinheit und von G $\beta$  $\gamma$  bei der Autophosphorylierung bleiben jedoch spekulativ, da hierfür bisher keine Kristalldaten vorliegen. Weiterhin ist zu vermuten, dass Serin<sup>1070</sup> der p110 $\beta$ -Untereinheit und Serin<sup>1039</sup> der p110 $\delta$ -Untereinheit innerhalb des Enzyms eine zu Serin<sup>1101</sup> der p110 $\gamma$ -Untereinheit vergleichbare Position einnehmen, wodurch die Autophosphorylierung dieser Serin-Reste begünstigt ist. Erste, durch massenspektrometrische Untersuchungen erbrachte Hinweise auf eine

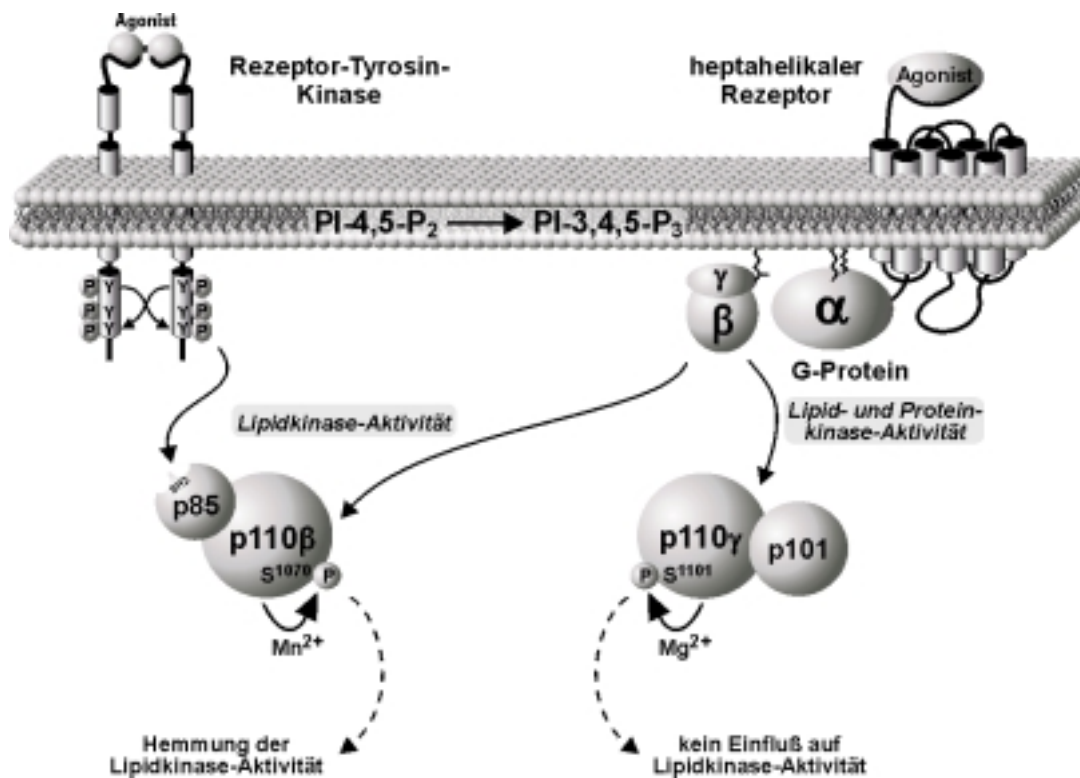
Threonin-Phosphorylierung im extremen C-Terminus der p110 $\beta$ -Untereinheit stehen ebenfalls in Übereinstimmung mit der Annahme, dass die unmittelbare Nähe zur Substratbindungs-tasche eine Autophosphorylierung von Threonin<sup>1063</sup> ermöglicht. Interessanterweise zeigen auch die Befunde von Pirola und Mitarbeitern (2001) zur Proteinkinase-Aktivität von PI-3-Kinase  $\alpha$ -Hybriden eine deutliche Autophosphorylierung der p110 $\alpha$ -Untereinheit. Es wäre zu prüfen, ob diese Autophosphorylierung an dem zu Threonin<sup>1063</sup> der p110 $\beta$ -Untereinheit homologen Threonin-Rest der p110 $\alpha$  erfolgt (siehe Abb. 25).

Für die PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  wurde *in vitro* gezeigt, dass die Autophosphorylierung der p85-Untereinheit an Serin<sup>608</sup> (PI-3-Kinase  $\alpha$ ) bzw. der p110 $\delta$ -Untereinheit an Serin<sup>1039</sup> (PI-3-Kinase  $\delta$ ) zu einer Hemmung der durch RTK stimulierten Lipidkinase-Aktivität führt (Dhand et al., 1994, Vanhaesebroeck et al., 1999a). Um die Auswirkungen der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  auf deren Lipidkinase-Aktivität zu prüfen, wurden in der hier vorgestellten Untersuchung p110-Mutanten erzeugt, deren phosphorylierter Serin-Rest durch Asparagin- bzw. Glutaminsäure ersetzt war. Damit sollte der Einfluß der durch Phosphorylierung der entsprechenden Serin-Reste eingeführten negativen Ladung auf das Protein nachgeahmt werden. Die PI-3-Kinase  $\gamma$ -Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym keine Veränderungen der basalen und G $\beta\gamma$ -stimulierten Lipidkinase-Aktivität (siehe Abb. 24). Außerdem katalysierten die präphosphorylierte und die nicht präphosphorylierte Wildtyp-PI-3-Kinase  $\gamma$  die PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung in gleicher Weise (siehe Abb. 10). Beide Befunde lassen den Schluß zu, dass die Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  nicht beeinträchtigt. Das ist insofern überraschend, als Walker und Mitarbeiter (1999) anhand der p110 $\delta$ -Befunde und der Kristallstruktur der p110 $\gamma$ -Untereinheit postuliert hatten, dass eine Phosphorylierung von Klasse I PI-3-Kinasen im extremen C-Terminus des Enzyms einen Abschalt-Mechanismus für die Lipidkinase-Aktivität darstellt. Als Ursache wurde eine sterische Behinderung der Substratbindung diskutiert. Bei der ebenfalls in diesem Bereich der p110 $\beta$ -Untereinheit phosphorylierten PI-3-Kinase  $\beta$  führt die Autophosphorylierung zu einer Hemmung sowohl der basalen als auch der durch G $\beta\gamma$ -Komplexe, Phosphotyrosin-Peptid sowie synergistisch durch beide Stimuli aktivierten PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung (siehe Abb. 32). Dies steht in Übereinstimmung mit den für die strukturell am nächsten verwandte PI-3-Kinase  $\delta$  erhobenen Befunden (Vanhaesebroeck et al., 1999a). Eine zusätzliche Unterstützung unserer Befunde durch einen komplementären Versuchsansatz, der eine Präphosphorylierung der PI-3-Kinase  $\beta$  und die anschließende Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität im Vergleich zum unbehandelten Enzym beinhaltete, war hier nicht möglich. Ursache könnte ein hemmender Effekt von Mn<sup>2+</sup> auf die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  sein, der eine vollständige Entfernung dieses für die Präphosphorylierung der PI-3-Kinase  $\beta$  notwendigen Kations erforderte. Ein derartiger Effekt wurde früher für native, p85-assoziierte PI-3-Kinasen aus Rattenleber beschrieben (Chauhan et al., 1995). Abhilfe würde möglicherweise eine Immobilisierung der PI-3-Kinase  $\beta$  bringen, um nach der Präphosphorylierung Mn<sup>2+</sup> durch



Chelierung und Waschen vollständig entfernen zu können. Da diese Immobilisierung jedoch eine verstärkte p85-Phosphorylierung (siehe Abb. 41) und damit die von Dhand und Mitarbeitern (1994) beschriebenen Auswirkungen auf die Lipidkinase-Aktivität des Enzyms zur Folge hätte, ist unter diesen Versuchsbedingungen eine Aussage über den Einfluß einer Autophosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit auf die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  nicht möglich.

In Abb. 42 sind die hier erhobenen *in vitro*-Befunde zur Autophosphorylierung der PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  schematisch zusammengefasst. Es ist festzustellen, dass die Autophosphorylierung beider PI-3-Kinase-Isoformen an einem homologen Serin-Rest im C-Terminus der katalytischen Untereinheit erfolgt. Jedoch unterscheidet sich diese Autophosphorylierung in allen untersuchten Charakteristika. Während die Mg<sup>2+</sup>-abhängige Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  durch G $\beta\gamma$ -Dimere um das 8 - 10-fache stimuliert wird und keinen Einfluß auf die Lipidkinase-Aktivität des Enzyms hat, führt die Mn<sup>2+</sup>-abhängige Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\beta$ , die weder durch G $\beta\gamma$ -Komplexe noch durch ein vom PDGF-Rezeptor abgeleitetes Phosphotyrosin-Peptid stimulierbar ist, zu einer Hemmung der Lipidkinase-Aktivität des Enzyms.



**Abb. 42: Autophosphorylierung der PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$**

Die Lipidkinase-Aktivität beider PI-3-Kinase-Isoformen kann durch entsprechende Stimuli (G $\beta\gamma$ -Dimere bei der PI-3-Kinase  $\gamma$  bzw. G $\beta\gamma$ -Komplexe und RTKs bei der PI-3-Kinase  $\beta$ ) aktiviert werden. Im Gegensatz dazu ist die Proteinkinase-Aktivität nur bei der PI-3-Kinase  $\gamma$  stimulierbar. Beide PI-3-Kinase-Isoformen werden an einem Serin-Rest im C-Terminus der p110-Untereinheit phosphoryliert, wobei Unterschiede in der Metallionen-Abhängigkeit dieser Autophosphorylierung bestehen. Während die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  keinen Einfluß auf die Lipidkinase-Aktivität des Enzyms hat, führt die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\beta$  zur Abschaltung der Lipidkinase-Aktivität des Enzyms.

Vergleicht man weiterhin die hier erhobenen Befunde mit den aus der Literatur bekannten Daten zur Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$ , wird deutlich, dass die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  innerhalb der Klasse I PI-3-Kinasen eine Sonderstellung einnimmt, während die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\beta$  in wichtigen Charakteristika, wie der Metallionen-Abhängigkeit und dem Abschalt-Mechanismus, mit denen der anderen Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen übereinstimmt (siehe Tab. 10).

Hinsichtlich der Metallionen-Abhängigkeit der Proteinkinase-Aktivität von PI-3-Kinasen ist interessant, dass die  $Mn^{2+}$ -abhängige Autophosphorylierung der Klasse III PI-3-Kinase Vps34p nicht zu einer Hemmung der Lipidkinase-Aktivität führt, wobei allerdings unbekannt ist, welcher Bereich der Kinase phosphoryliert wird (Stack und Emr, 1994). Im Gegensatz dazu wird die Lipidkinase-Aktivität der PI-4-Kinase  $\beta$  durch eine  $Mn^{2+}$ -abhängige Autophosphorylierung des Enzyms, die wie bei den PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  in einer C-terminalen Region und damit in der katalytischen Domäne des Enzyms stattfinden soll, gehemmt. Diese Autophosphorylierung ist allerdings in Gegenwart von PI, dem Lipidsubstrat der PI-4-Kinase  $\beta$ , nicht zu beobachten (Zhao et al., 2000). Für einen weiteren Vertreter der Lipidkinasen, die Typ I Phosphatidylinositolphosphat-Kinase, wurde berichtet, dass eine  $Mg^{2+}$ -abhängige Autophosphorylierung die Lipidkinase-Aktivität des Enzyms hemmt, wobei diese Autophosphorylierung durch PI stimuliert wird (Itoh et al., 2000).

Es ist festzustellen, dass die Autophosphorylierung eine charakteristische Eigenschaft von Lipidkinasen ist. Zwischen verschiedenen Klassen und sogar einzelnen Isoformen dieser Enzyme bestehen allerdings Unterschiede in der Metallionen-Abhängigkeit sowie in der Regulation der Autophosphorylierung. Nur für die Klasse I PI-3-Kinasen wurde jedoch postuliert, dass die Proteinkinase-Aktivität dieser Enzyme durch die Phosphorylierung von Substraten zur Signaltransduktion beiträgt (Bondeva et al., 1998).

### **6.3 Mechanismus der Autophosphorylierung**

Deshalb war die Analyse des der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  zugrunde liegenden Mechanismus ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Eine erste Frage war, ob es sich um eine Auto- und/oder Transphosphorylierung handelt. Die heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$  (His-p110 $\gamma$ /p101) war nicht in der Lage, eine GST-fusionierte, Kinase-inaktive p110 $\gamma$ -Mutante (GST-p110 $\gamma$ K833R) zu phosphorylieren (siehe Abb. 34). Analoge Ergebnisse wurden kürzlich von Bondev und Mitarbeitern (2001) unter Verwendung der monomeren p110 $\gamma$ -Untereinheit berichtet. Zwar kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass der zur Dimerisierung neigende N-terminale GST-Fusionsbereich der p110 $\gamma$ -Mutante die Phosphorylierung durch die enzymatisch aktive, heterodimere PI-3-Kinase  $\gamma$  behindert. Dies ist jedoch aus mehreren Gründen wenig wahrscheinlich. So haben Untersuchungen zur G $\beta$  $\gamma$ -Stimulierbarkeit der Lipid- und Proteinkinase-Aktivität der GST-fusionierten sowie Hexahistidin-markierten PI-3-Kinase  $\gamma$  keine signifikanten Unterschiede ergeben (C. Czupalla

und M. Culo, unveröffentlichte Befunde). Deshalb ist anzunehmen, dass eine Dimerisierung der GST-p110 $\gamma$ K833R-Mutante höchstens ein partielles Hindernis für den Zugang des His-p110 $\gamma$ /p101-Dimers und damit für eine Transphosphorylierungs-Reaktion darstellt. Jedoch wurde keinerlei Phosphat-Einbau in die p110 $\gamma$ -Mutante beobachtet, obwohl im gleichen Versuch eine leichte Phosphorylierung der p101-Untereinheit des enzymatisch aktiven Heterodimers stattfand. Somit können wir schließen, dass es sich tatsächlich um eine p110 $\gamma$ -Auto- nicht jedoch um eine Transphosphorylierung handelt. In dieser Eigenschaft gleicht die PI-3-Kinase  $\gamma$  einer weiteren Lipidkinase, der PI-4-Kinase  $\beta$ , für die ebenfalls keine Transphosphorylierung nachgewiesen werden konnte (Zhao et al., 2000).

In diesem Zusammenhang sind unsere Befunde von Bedeutung, die zeigen, dass die PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  mit C-terminalen Peptiden, die die Phosphorylierungsstellen der p110 $\beta$ - bzw. p110 $\gamma$ -Untereinheit beeinhalteten, nicht interagierten (siehe Abb. 33B/D) und diese auch nicht phosphorylieren konnten (siehe Abb. 33A/C). Für die PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  wurde ebenfalls berichtet, dass diese nicht in der Lage sind, Substratpeptide, die von den entsprechenden Regionen der p85- bzw. p110 $\delta$ -Untereinheit abgeleitet waren, zu phosphorylieren (Vanhaesebroeck et al., 1999a). Hingegen konnten Beeton und Mitarbeiter (2000) die Phosphorylierung eines p85-Peptids durch die PI-3-Kinase-Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  nachweisen. Ob die Diskrepanz der in den verschiedenen Arbeitsgruppen erzielten Resultate auf versuchstechnischen Spezifitäten beruht, muß derzeit leider ungeklärt bleiben.

Unabhängig davon wird jedoch deutlich, dass die Phosphorylierungsreaktionen der PI-3-Kinasen nur unter der Bedingung einer spezifischen Protein-Protein-Interaktion stattfinden. Das hat Auswirkungen auf die Suche nach Phosphorylierungs substraten von Klasse I PI-3-Kinasen.

#### **6.4 Zellbiologisch-funktionelle Konsequenzen der Protein-kinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen**

Zur *in vivo*-Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen gibt es bisher wenige und uneinheitliche Befunde. Die p85-Untereinheit der PI-3-Kinase  $\alpha$  wird sowohl nach Überexpression des Heterodimers in Sf9-Zellen und HEK293-Zellen als auch in bovinen SGBAF-1-Zellen, einer Nebennierenrinden-Zelllinie, phosphoryliert (Dhand et al., 1994, Beeton et al., 2000). Hingegen erfolgt in HEK293-Zellen nach Transfektion der PI-3-Kinase  $\beta$  keine Phosphorylierung der p110 $\beta$ -Untereinheit (Beeton et al., 2000). Für die PI-3-Kinase  $\delta$  konnten Vanhaesebroeck und Mitarbeiter (1999a) in Jurkat-T-Zellen eine durch CD28 stimulierbare Phosphorylierung der p110 $\delta$ -Untereinheit nachweisen. In allen weiteren in dieser Studie untersuchten Zelllinien, wie z.B. SCF (*stem cell factor*)-stimulierten MC/9-Mastzellen, wurde die p110 $\delta$ -Phosphorylierung jedoch nicht verstärkt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der *in vivo*-Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  HL-60-Zellen verwendet, die durch Behandlung mit dbt-cAMP in Richtung neutrophiler Granulozyten differenziert waren. Die in HL-60-Zellen endogen exprimierte PI-3-Kinase  $\gamma$  konnte durch Stimulation der Zellen mit dem chemotaktischen Faktor fMLP aktiviert werden. Dies führte zu einer Membran-Translokation der PI-3-Kinase  $\gamma$  (siehe Abb. 40) sowie über die Aktivierung der NADPH-Oxidase zur verstärkten  $O_2^-$ -Bildung (siehe Abb. 35). Trotz dieser Stimulation der PI-3-Kinase  $\gamma$  durch fMLP konnte jedoch keine fMLP-vermittelte *in vivo*-Phosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit nachgewiesen werden. Auch nach Behandlung der HL-60-Zellen mit dem Serin/Threonin-Proteinphosphatase-Inhibitor Okadainsäure war keine p110 $\gamma$ -Phosphorylierung zu beobachten. Dieser Befund macht eine parallel zur Phosphorylierungsreaktion ablaufende Dephosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit durch eine Proteinphosphatase unwahrscheinlich. Im Unterschied hierzu konnten Vanhaesebroeck und Mitarbeiter (1999a) nach Behandlung von Jurkat-T-Zellen mit Okadainsäure eine signifikante Phosphorylierung der p110 $\delta$ -Untereinheit beobachten, die durch CD28 stimulierbar war. Während in dieser Studie auch in weiteren Cytokin-abhängigen Zelllinien mit Hilfe von Okadainsäure eine p110 $\delta$ -Autophosphorylierung nachgewiesen werden konnte, war diese jedoch in keinem Fall stimulierbar (s.o.). Ursache könnte die transiente PI-3-Kinase-Aktivierung durch die verwendeten Stimuli IL-3 und SCF sein, die bereits nach 2-5 min ihr Maximum erreicht, während CD28 länger als 15 min über die p85-Untereinheit mit der PI-3-Kinase  $\delta$  assoziiert. Weiterhin wird auch die geringe Dichte der Rezeptoren dieser Stimuli im Vergleich zum 10 - 50-fach häufiger vorkommenden CD28-Molekül als Ursache für die fehlende Stimulierbarkeit diskutiert. Möglicherweise ist also die Stimulation der p110 $\delta$ -Autophosphorylierung durch CD28 ein für diesen Stimulus spezifisches Phänomen und kann für andere PI-3-Kinase-Isoformen und die entsprechenden Stimuli nicht nachgewiesen werden. Betrachtet man weiterhin das Ausmaß der fMLP-stimulierten Membran-Translokation der PI-3-Kinase  $\gamma$  im Vergleich zur Menge des cytosolisch lokalisierten Enzyms (siehe Abb. 40), so wird deutlich, dass nur ein geringer Anteil der PI-3-Kinase  $\gamma$  (weniger als 10 %) an die Membran gelangt. Eine fMLP-vermittelte Aktivierung der Enzymaktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  ist jedoch nur möglich, wenn das Enzym mit den an der Membran lokalisierten G $\beta\gamma$ -Dimeren interagieren kann. Zusammen mit einer im Vergleich zum rekombinanten Protein offensichtlich geringeren *in vitro*-Proteinkinase-Aktivität der aus HL-60-Zellen gewonnenen PI-3-Kinase  $\gamma$  (siehe Abb. 39) könnte dieser geringe Anteil der nach fMLP-Stimulation an der Membran befindlichen PI-3-Kinase  $\gamma$  erklären, warum wir eine möglicherweise stattfindende *in vivo*-Phosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit nicht nachweisen konnten.

Neben dem *in vivo*-Nachweis einer Autophosphorylierung der Klasse I PI-3-Kinasen stellt sich natürlich die Frage nach der funktionellen Bedeutung dieser Autophosphorylierung. Für die PI-3-Kinase  $\alpha$  soll die über deren intrinsische Proteinkinase-Aktivität vermittelte Serin-Phosphorylierung der p85-Untereinheit zur Hemmung der Lipidkinase-Aktivität des

Enzyms führen (Carpenter et al., 1993, Dhand et al., 1994). Daneben findet auch eine Tyrosinkinase-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung der p85-Untereinheit statt, die eine Aktivierung der Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\alpha$  bewirken soll (Gout et al., 1992, Ruiz-Larrea et al., 1993, Roche et al., 1994). Anhand dieser Untersuchungen schlugen Woscholski und Mitarbeiter bereits 1994 das folgende Modell zur Regulation der Enzymaktivität der PI-3-Kinase  $\alpha$  vor. Danach wird die PI-3-Kinase-vermittelte PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung nicht nur durch die Stimulation von RTKs und die anschließende Membran-Translokation der PI-3-Kinase  $\alpha$ , sondern auch durch die Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung der p85-Untereinheit reguliert. Die Serin-phosphorylierte, inaktive PI-3-Kinase  $\alpha$  soll dabei durch die RTK-Aktivierung sowie durch die Tyrosin-Phosphorylierung der p85-Untereinheit aktiviert werden und anschließend durch eine über endogene Proteinphosphatasen vermittelte Dephosphorylierung des Serin-Restes ihre volle Aktivität erlangen. Die Deaktivierung des Enzyms soll durch eine Tyrosin-Dephosphorylierung sowie durch die PI-3-Kinase-vermittelte Serin-Phosphorylierung der p85-Untereinheit erfolgen. Somit wäre die zeitlich limitierte PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung nach einer Stimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren durch eine konzertierte positive und negative Regulation der PI-3-Kinase  $\alpha$  bedingt. Unterstützt wird dieses Modell von Untersuchungen, die eine durch die Tyrosinkinasen Abl und Lck vermittelte Phosphorylierung der p85-Untereinheit an Tyrosin<sup>688</sup> nachweisen konnten, die zur Aktivierung der PI-3-Kinase  $\alpha$  führte und durch die Proteinphosphatase SHP-1 reguliert war (von Willebrand et al., 1998, Cuevas et al., 1999, 2001). Im Gegensatz dazu konnten Geltz und Augustine (1998) bei Untersuchungen zur Phosphorylierung der PI-3-Kinase  $\alpha$  in Thrombozyten keinen Einfluß einer Tyrosin-Phosphorylierung auf die Lipidkinase-Aktivität feststellen. Hier war jedoch eine Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung beider Untereinheiten der PI-3-Kinase  $\alpha$  zu beobachten. Weiterhin gibt es Hinweise, dass eine Tyrosin-Phosphorylierung der p110 $\alpha$ -Untereinheit durch einen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor zur Hemmung der Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\alpha$  führen soll (Nakagawa et al., 2001). Zum Einfluß der p85-Serin-Phosphorylierung auf die Aktivität der PI-3-Kinase  $\alpha$  gibt es hingegen keine neueren Untersuchungen. Insbesondere ist unbekannt, inwieweit ein Austausch des phosphorylierten Serin<sup>608</sup> durch Alanin die *in vivo*-Lipidkinase-Aktivität des Enzyms beeinflusst. Zum besseren Verständnis der komplexen Wirkungen einer Serin- bzw. Tyrosin-Phosphorylierung auf die Aktivität der PI-3-Kinase  $\alpha$  sind daher weitere Untersuchungen erforderlich. Im Gegensatz zur Regulation der Aktivität der PI-3-Kinase  $\alpha$  durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Enzyms vermuteten Yu und Mitarbeiter (1998b), dass durch die PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung eine Regulation der PI-3-Kinase  $\alpha$  über eine Produkthemmung erfolgen soll. Das scheint anhand der raschen Kinetik von PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung und -Abbau (s.u.) allerdings wenig wahrscheinlich zu sein.

Auch für die PI-3-Kinase  $\delta$  wurde von Vanhaesebroeck und Mitarbeitern (1999a) vorgeschlagen, dass die Autophosphorylierung der p110 $\delta$ -Untereinheit als Autoregulations-Mechanismus dient. In der zitierten Arbeit konnte mit Hilfe eines Phosphopeptid-spezifischen

Antikörpers mit Hilfe von CD28 erstmals eine Rezeptor-stimulierte *in vivo*-Autophosphorylierung einer PI-3-Kinase-Untereinheit gezeigt werden (s.o.). Dennoch bleibt ein direkter Zusammenhang zwischen der parallel stattfindenden *in vivo*-p110 $\delta$ -Phosphorylierung und einer hiermit korrelierenden Abnahme der *in vitro*-Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\delta$  zu beweisen. Hilfreich wäre eine analoge Untersuchung mit einer p110 $\delta$ -Mutante, bei der der phosphorylierte Serin-Rest durch Alanin ersetzt ist. Diese zusätzliche Kontrolle erscheint wünschenswert, da Vanhaesebroeck und Mitarbeiter (1999a) in derselben Studie eine Stimulation der *in vitro*-Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  durch CD28 nachweisen konnten.

Betrachtet man den Zeitverlauf der *in vitro*-Autophosphorylierung von Klasse I PI-3-Kinasen, so wird deutlich, dass dies ein eher langsamer Prozeß ist, da erst nach 5-10 min eine merkliche Phosphorylierung zu beobachten ist (siehe Abb. 9, Abb. 28, Dhand et al., 1994). Darüber hinaus erfolgt auch die *in vivo*-Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\delta$  in einer vergleichbaren Geschwindigkeit (Vanhaesebroeck et al., 1999a). Hingegen ist die *in vivo*-Bildung von PI-3,4,5-P<sub>3</sub> und dessen Abbauprodukt PI-3,4-P<sub>2</sub> transient. Beispielsweise wird in fMLP-stimulierten neutrophilen Granulozyten nach wenigen Sekunden das Maximum der PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung erreicht, während die durch Dephosphorylierung des PI-3,4,5-P<sub>3</sub> bedingte PI-3,4-P<sub>2</sub>-Bildung nur leicht verzögert ist (Stephens et al., 1991, Ptasznik et al., 1996). Daher könnte ein Abbau der PI-3-Kinase-Lipidprodukte durch Phosphatasen wie die Phosphatidylinositol-3-Phosphatase PTEN der wichtigere Kontrollmechanismus für den Umsatz 3'-phosphorylierter Phosphoinositide als sekundärer Botenstoffe sein (Cantley und Neel, 1999). Dies lassen Daten von PTEN-defizienten Tumorzellen vermuten. Diese Zellen weisen einen erhöhten Gehalt an PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> sowie eine konstitutive Aktivierung von PI-3-Kinase-abhängigen Signalwegen auf (Stambolic et al., 1998, Shan et al., 2000, Liliental et al., 2000). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Autophosphorylierung von Klasse I PI-3-Kinasen für die Regulation des Umsatzes 3'-phosphorylierter Lipidprodukte nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint und darüber hinaus für die Regulation der Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  ohne Bedeutung ist.

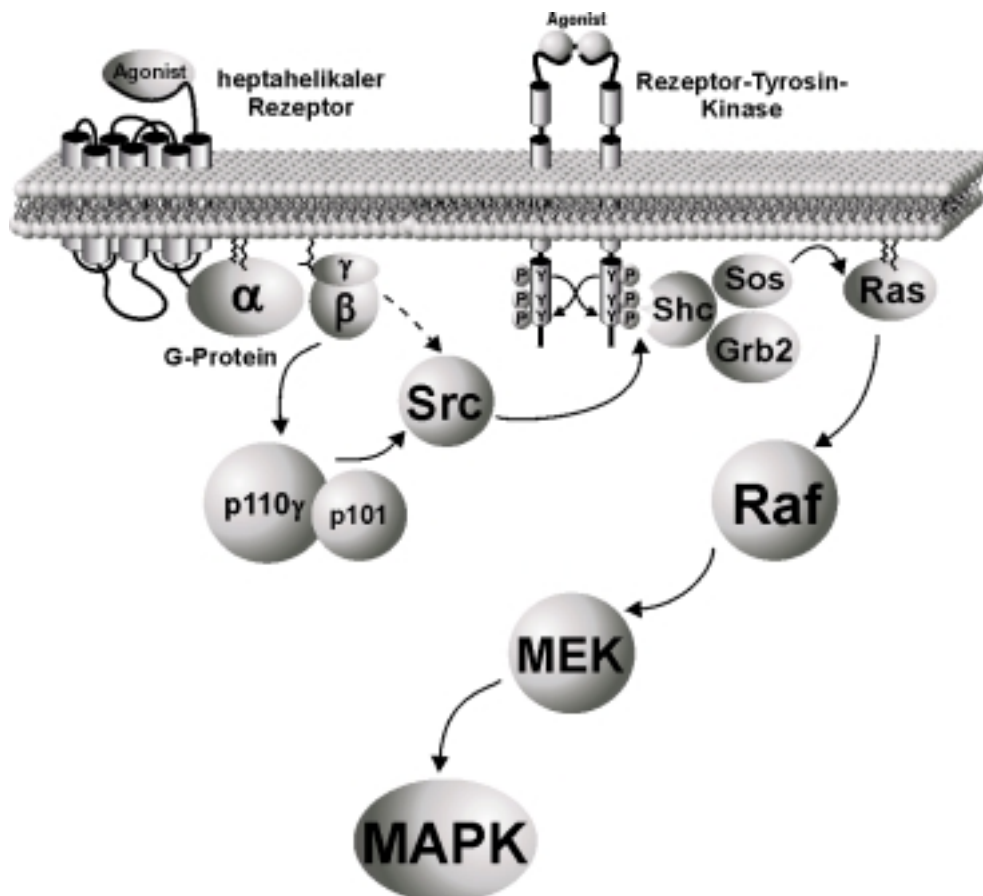
#### *Suche nach neuen Funktionen der Autophosphorylierung von Klasse I PI-3-Kinasen*

Wenn also die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$ , möglicherweise sogar aller Klasse I PI-3-Kinasen, nicht als Regulationsmechanismus der Enzymaktivität dient, welche Funktion könnte diese Phosphorylierung dann haben? In den letzten Jahren gibt es zunehmend Hinweise, dass nicht nur durch eine Tyrosin-Phosphorylierung, sondern auch durch eine Phosphorylierung von Serin- oder Threonin-Resten Bindungsstellen für Proteine geschaffen werden, wodurch eine Bildung multimolekularer Signalkomplexe ermöglicht wird (Yaffe und Elia, 2001). So wurden 14-3-3-Proteine als Phosphoserin-bindende Proteine identifiziert (Muslin et al., 1996, Yaffe et al., 1997). Diese 14-3-3-Proteine binden beispielsweise die durch Chk1 phosphorylierte Proteinphosphatase Cdc25, die dadurch im Cytosol retiniert wird.

Somit wird der Zugang von Cdc25 zu seinem im Zellkern lokalisierten Substrat Cdc2 und damit die Zellzyklus-Progression verhindert (Zeng und Piwnica-Worms, 1999, Lopez-Girona et al., 1999). Weiterhin erkennen bestimmte Proteinmotive, die zwei konservierte Tryptophan-Reste (W) enthalten und daher als WW-Domänen bezeichnet werden, sowie FHA (*forkhead-associated*)-Domänen selektiv Phosphoserin- bzw. Phosphothreonin-haltige Proteine (Lu et al., 1999, Durocher et al., 2000). Deshalb ist gut vorstellbar, dass auch Bindungspartner existieren, die spezifisch mit einer phosphorylierten PI-3-Kinase interagieren. Durch eine Assoziation von PI-3-Kinasen mit derartigen Phosphoserin-erkennenden Proteinen wäre eine über die Autophosphorylierung der PI-3-Kinasen vermittelte Signalweiterleitung denkbar. Ein nächster wichtiger Schritt ist daher die Suche nach Interaktionspartnern phosphorylierter PI-3-Kinasen.

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, dass die Frage nach Substraten der Proteinkinase-Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen nicht endgültig geklärt ist. Ursprünglich wurde IRS-1 als *in vitro*-Phosphorylierungssubstrat der PI-3-Kinase  $\alpha$  beschrieben (Lam et al., 1994, Tanti et al., 1994, Uddin et al., 1997, Pirola et al., 2001). Jedoch konnte der für die Abschätzung der physiologischen Bedeutung wichtige *in vivo*-Nachweis dieser Phosphorylierung bislang nicht erbracht werden. Darüber hinaus wird diskutiert, dass eine PI-3-Kinase auch in die Insulin-vermittelte Phosphorylierung der Phosphodiesterase PDE3B involviert ist (Rondinone et al., 2000). Im Unterschied zur Identifizierung direkter Phosphorylierungssubstrate gingen Bondeva und Mitarbeiter (1998) den umgekehrten Weg und suchten in einem eleganten Versuchsansatz nach Signalwegen, die durch die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  beeinflusst werden. Dazu verwendeten sie eine p110 $\gamma$ -Mutante, die durch Austausch der PI-Substratbindungsregion gegen die entsprechende Region der Klasse IV PI-3-Kinase FRAP selektiv ihre Lipidkinase-Aktivität und damit die Fähigkeit, PKB/Akt zu stimulieren, verloren hatte (siehe 6.1). Diese Mutante, deren Proteinkinase-Aktivität erhalten war, konnte dennoch eine MAPK-Aktivierung bewirken. Die Annahme, dass die Beeinflussung des MAPK-Weges durch die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  erfolgt, wird von dem Befund unterstützt, dass die durch Expression der PI-3-Kinase  $\alpha$  katalysierte PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung für eine Stimulation der MAPK nicht ausreicht (Lopez-Illasaca et al., 1997). Allerdings hat die gleiche Arbeitsgruppe Hinweise, daß die MAPK auch ohne Beteiligung der Proteinkinase-Aktivität durch die PI-3-Kinase  $\gamma$  stimuliert werden kann (Hehl et al., 2001). In ihren nachfolgenden Untersuchungen haben die Autoren mittlerweile MEK1 als mögliches Phosphorylierungssubstrat der PI-3-Kinase  $\gamma$  postuliert (Bondev et al., 1999). Von Lopez-Illasaca und Mitarbeitern (1997) wurde hingegen gezeigt, dass die PI-3-Kinase  $\gamma$  oberhalb von Src-Kinasen und Shc in den MAPK-Weg signalisieren soll (siehe Abb. 43). Dies wird durch Befunde von Hawes und Mitarbeitern aus dem Arbeitskreis von Lefkowitz (1996) gestützt, wobei allerdings nicht auszuschließen ist, dass auch p85-assoziierte PI-3-Kinasen in die MAPK-Aktivierung involviert sind. Weiterhin wird eine über PKC-Isoformen verlaufende, PI-3-Kinase  $\gamma$ -abhängige MAPK-Aktivierung

diskutiert (Takeda et al., 1999, Cieslik et al., 2001). Auch für die PI-3-Kinase  $\beta$  gibt es Hinweise, dass in humanen SW-480-Colonkarzinom-Zellen nach  $G\beta\gamma$ -Stimulation über eine Aktivierung der PKC $\epsilon$  und von Raf die MAPK aktiviert wird (Graneß et al., 1998). Nicht zuletzt sollen p85-assoziierte PI-3-Kinasen durch Bildung von Komplexen mit Grb2 auch in die RTK-abhängige Aktivierung der MAPK involviert sein (Daub et al., 1997).



**Abb. 43: Rezeptor-vermittelte MAPK-Aktivierung**

Der „klassische“ MAPK-Weg verläuft über eine Tyrosinkinase-vermittelte Komplexbildung von Shc, Grb2 und Sos. Das führt zur sequentiellen Aktivierung der monomeren GTPase Ras, der Proteinkinasen Raf, MEK sowie MAPK. Daneben kann eine MAPK-Aktivierung auch über eine Stimulation von GPCR erfolgen. Exemplarisch ist die  $G\beta\gamma$ -vermittelte, vermutlich über eine PI-3-Kinase  $\gamma$ -abhängige Aktivierung der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src verlaufende Stimulation des MAPK-Wegs gezeigt (nach Liebmann, 2001b, modifiziert).

Aufgrund ihrer biochemischen Charakteristika, insbesondere der  $Mn^{2+}$ -Abhängigkeit sowie einer fehlenden Regulierbarkeit der Proteinkinase-Aktivität (für die PI-3-Kinase  $\beta$  gezeigt), scheint es allerdings wenig wahrscheinlich, dass die Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen über ihre Proteinkinase-Aktivität Signalwege wie den MAPK-Weg beeinflussen. Die beobachtete Wortmannin-Sensitivität wäre in dieser Hypothese eher der Ausdruck einer sterischen Behinderung der Interaktion von PI-3-Kinasen mit Komplexpartnern, als einer Hemmung der Proteinkinase-Aktivität (Lam et al., 1994, Rondinone et al., 2000). Als Proteine mit vielfältigen Bindungsdomänen (SH2, SH3, BH) könnten diese PI-3-Kinasen vielmehr eine



---

„Scaffold“-Funktion haben. Dies könnte auch zur Aktivierung der MAPK durch die Lipidkinase-defiziente PI-3-Kinase  $\gamma$  beitragen. Die Konstruktion einer PI-3-Kinase  $\gamma$ -Mutante, der selektiv die Proteinkinase-Aktivität fehlt, während die Lipidkinase-Aktivität erhalten ist, wäre daher wünschenswert. Eine derartige Mutante könnte bei der Beantwortung der Frage helfen, ob die MAPK-Stimulation ausschließlich über die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  verläuft, oder ob weitere Faktoren, wie die Bildung von Signalkomplexen, eine Rolle spielen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Über eine Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen werden vielfältige zelluläre Prozesse wie Wachstums- und Differenzierungsvorgänge, cytoskelettale Veränderungen oder die Steuerung vesikulärer Transportvorgänge vermittelt. Dies kann sowohl über die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinasen durch Bildung 3'-phosphorylierter Phosphoinositide als sekundäre Botenstoffe, als auch über die Proteinkinase-Aktivität dieser Enzyme erfolgen. Während die Lipidkinase-Aktivität der Klasse I PI-3-Kinasen in vielen Untersuchungen charakterisiert wurde, ist insbesondere über die Proteinkinase-Aktivität der G-Protein-sensitiven PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Proteinkinase-Aktivität dieser PI-3-Kinase-Isoformen anhand ihrer Autophosphorylierung näher zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurden beide PI-3-Kinase-Isoformen als Hexahistidin-markierte, heterodimere Enzyme in *Sf9*-Zellen exprimiert, gereinigt und *in vitro* phosphoryliert. Es wurde bestätigt, dass die  $Mg^{2+}$ -abhängige Autophosphorylierung der katalytischen p110 $\gamma$ -Untereinheit der PI-3-Kinase  $\gamma$  durch G $\beta\gamma$ -Komplexe stimulierbar ist. Hingegen konnte die ebenfalls an der katalytischen p110 $\beta$ -Untereinheit stattfindende,  $Mn^{2+}$ -abhängige Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\beta$  weder durch G $\beta\gamma$ -Dimere noch durch ein vom PDGF-Rezeptor abgeleitetes Phosphotyrosin-Peptid stimuliert werden, obwohl unter den entsprechenden Versuchsbedingungen eine Aktivierung der Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$  mit diesen Stimuli erfolgte. Durch massenspektrometrische Analyse konnten Serin<sup>1070</sup> der p110 $\beta$ -Untereinheit sowie Serin<sup>1101</sup> der p110 $\gamma$ -Untereinheit als die phosphorylierten Aminosäuren identifiziert werden. Die Bestätigung dieser Befunde erfolgte mit Hilfe von Autophosphorylierungs-defizienten PI-3-Kinase-Mutanten, deren phosphorylierter Serin-Rest durch Alanin ersetzt war. Somit findet die Autophosphorylierung beider PI-3-Kinase-Isoformen an einem homologen Serin-Rest im extremen C-Terminus der katalytischen p110-Untereinheit statt.

Um den Einfluß der Autophosphorylierung auf die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  zu analysieren, wurden Mutanten erzeugt, deren phosphorylierter Serin-Rest durch Aspartat bzw. Glutamat ersetzt war. Es zeigte sich, dass diese einer Phosphorylierung entsprechende Einführung einer negativen Ladung bei der PI-3-Kinase  $\beta$  zur Hemmung der Lipidkinase-Aktivität führte, während die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  nicht beeinflusst wurde. Für die PI-3-Kinase  $\gamma$  konnte durch den Vergleich der Lipidkinase-Aktivität des präphosphorylierten Enzyms mit der Aktivität der nicht präphosphorylierten PI-3-Kinase  $\gamma$  bestätigt werden, dass die Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit keinen Einfluß auf die Lipidkinase-Aktivität des Enzyms hat. Folglich unterscheidet sich die an einem homologen Serin-Rest der p110-Untereinheit stattfindende Autophosphorylierung der PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  bezüglich ihrer biochemischen Charakteristika wie Metallionen-Abhängigkeit und Stimulierbarkeit und führt zu unterschiedlichen Effekten auf

die Lipidkinase-Aktivität dieser Enzyme. Weiterhin kann ein Abschaltmechanismus als generelle Funktion der Autophosphorylierung von Klasse I PI-3-Kinasen zumindest für die PI-3-Kinase  $\gamma$  ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung des Mechanismus der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  wurden C-terminale Peptide der jeweiligen p110-Untereinheit verwendet. Diese Peptide konnten weder durch die entsprechende PI-3-Kinase phosphoryliert werden, noch beeinflussten sie die Autophosphorylierung des jeweiligen Enzyms. Darüber hinaus konnte mit Hilfe einer Kinase-inaktiven p110 $\gamma$ -Mutante ausgeschlossen werden, dass die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  über einen Transphosphorylierungs-Mechanismus verläuft. Beide Befunde sprechen dafür, dass die Phosphorylierungsreaktionen der PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  spezifischer Protein-Protein-Interaktionen bedürfen. Dies ist für die Suche nach Phosphorylierungs substraten von Bedeutung.

Um die *in vivo*-Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  anhand ihrer Autophosphorylierung zu charakterisieren, wurden dbt-cAMP-differenzierte HL-60-Zellen verwendet, in denen durch Stimulation mit dem chemotaktischen Faktor fMLP PI-3-Kinase  $\gamma$ -abhängige Signalwege ausgelöst werden können. Dennoch konnte keine fMLP-stimulierte *in vivo*-Autophosphorylierung der p110 $\gamma$ -Untereinheit nachgewiesen werden.

Zusammengefaßt kann festgestellt werden, dass sich die G-Protein-sensitiven PI-3-Kinase-Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  hinsichtlich der untersuchten biochemischen Charakteristika der Autophosphorylierung wie Metallionen-Abhängigkeit, Regulierbarkeit und funktioneller Bedeutung signifikant unterscheiden. Somit könnte die Proteinkinase-Aktivität dieser Lipidkinasen eine wichtige Determinante für eine Isoform-spezifische Signaltransduktion sein.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aaij, C., Borst, P. (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **269**, 192-200.
- Ahnert-Hilger, G., Nürnberg, B., Exner, T., Schäfer, T., Jahn, R. (1998) The heterotrimeric G protein  $G\alpha_{o2}$  regulates catecholamine uptake by secretory vesicles. *EMBO J.*, **17**, 406-413.
- Al-Aoukaty, A., Rolstad, B., Maghazachi, A.A. (1999) Recruitment of pleckstrin and phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  into the cell membranes, and their association with  $G\beta\gamma$  after activation of NK cells with chemokines. *J. Immunol.*, **162**, 3249-3255.
- Amersham (1994) DNA sequencing kit. Technical Bulletin 9<sup>th</sup> edition.
- Andreeva, A.Y., Krause, E., Müller, E.-C., Blasig, I.E., Utepbergenov, D.I. (2001) Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38480-38486.
- Annan, R.S., Huddleston, M.J., Verma, R., Deshaies, R.J., Carr, S.A. (2001) A multidimensional electrospray MS-based approach to phosphopeptide mapping. *Anal. Chem.*, **73**, 393-404.
- Antonetti, D.A., Algenstaedt, P., Kahn, C.R. (1996) Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2195-2203.
- Arcaro, A., Wymann, M.P. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.*, **296**, 297-301.
- Arcaro, A., Volinia, S., Zvelebil, M.J., Stein, R., Watton, S.J., Layton, M.J., Gout, I., Ahmadi, K., Downward, J., Waterfield, M.D. (1998) Human phosphoinositide 3-kinase C2 $\beta$ , the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33082-33090.
- Arcaro, A., Zvelebil, M.J., Wallasch, C., Ullrich, A., Waterfield, M.D., Domin, J. (2000) Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3817-3830.
- Arrieumerlou, C., Donnadieu, E., Brennan, P., Keryer, G., Bismuth, G., Cantrell, D., Trautmann, A. (1998) Involvement of phosphoinositide 3-kinase and Rac in membrane ruffling induced by IL-2 in T cells. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 1877-1885.
- Bacqueville, D., Deleris, P., Mendre, C., Pieraggi, M.T., Chap, H., Guillon, G., Perret, B., Breton-Duillon, M. (2001) Characterization of a G protein-activated phosphoinositide 3-kinase in vascular smooth muscle cell nuclei. *J. Biol. Chem.*, **276**, 22170-22176.
- Baier, R., Bondeva, T., Klinger, R., Bondev, A., Wetzker, R. (1999) Retinoic acid induces selective expression of phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  in myelomonocytic U937 cells. *Cell Growth Differ.*, **10**, 447-456.

- Barbier, M., Attoub, S., Calvez, R., Laffargue, M., Jarry, A., Mareel, M., Altruda, F., Gespach, C., Wu, D., Lu, B., Hirsch, E., Wymann, M.P. (2001) Weakening link to colorectal cancer? *Nature*, **413**, 796.
- Beeton, C.A., Chance, E.M., Foukas, L.C., Shepherd, P.R. (2000) Comparison of the kinetic properties of the lipid- and protein-kinase activities of the p110 $\alpha$  and p110 $\beta$  catalytic subunits of class-Ia phosphoinositide 3-kinases. *Biochem. J.*, **350**, 353-359.
- Belluscio, L., Gold, G.H., Nemes, A., Axel, R. (1998) Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron*, **20**, 69-81.
- Bernstein, H.-G., Keilhoff, G., Reiser, M., Freese, S., Wetzker, R. (1998) Tissue distribution and subcellular localization of a G-protein activated phosphoinositide 3-kinase. An immunohistochemical study. *Cell. Mol. Biol.*, **44**, 973-983.
- Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., Wynshaw-Boris, A., Nussbaum, R.L. (1999) Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110 $\alpha$  subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 10963-10968.
- Biemann, K., Scoble, H.A. (1987) Characterization by tandem mass spectrometry of structural modifications in proteins. *Science*, **237**, 992-998.
- Blank, J.L., Ross, A.H., Exton, J.H. (1991) Purification and characterization of two G-proteins that activate the  $\beta$ 1 isozyme of phosphoinositide-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, **266**, 18206-18216.
- Bondev, A., Rubio, I., Wetzker, R. (1999) Differential regulation of lipid and protein kinase activities of phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  *in vitro*. *Biol. Chem.*, **380**, 1337-1340.
- Bondev, A., Bondeva, T., Wetzker, R. (2001) Regulation of phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  protein kinase activity *in vitro* and in COS-7 cells. *Sig. Trans.*, **1**, 79-85.
- Bondeva, T., Pirola, L., Bulgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R., Wymann, M.P. (1998) Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3K $\gamma$  to the protein kinases PKB and MAPK. *Science*, **282**, 293-296.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J. (1995) The elemental principles of calcium signaling. *Cell*, **83**, 675-678.
- Breeze, A.L., Kara, B.V., Barrat, D.G., Anderson, M., Smith, J.C., Luke, R.W., Best, J.R., Cartledge, S.A. (1996) Structure of a specific peptide complex of the carboxy-terminal SH2 domain from the p85 $\alpha$  subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J.*, **15**, 3579-3589.
- Breitwieser, G.E., Szabo, G. (1985) Uncoupling of cardiac muscarinic and  $\beta$ -adrenergic receptors from ion channels by a guanine nucleotide analogue. *Nature*, **317**, 538-540.
- Brown, R.A., Domin, J., Arcaro, A., Waterfield, M.D. (1999) Insulin activates the  $\alpha$  isoform of class II phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 14529-14532.
- Brunk, I., Pahner, I., Maier, U., Jenner, B., Veh, R.W., Nürnberg, B., Ahnert-Hilger, G. (1999) Differential distribution of G-protein  $\beta$ -subunits in brain: an immunocytochemical analysis. *Eur. J. Cell. Biol.*, **78**, 311-322.

- Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J., Gierschik, P. (1992) Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- $\beta_2$  by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature*, **360**, 684-686.
- Cantley, L.C., Neel, B.G. (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**, 4240-4245.
- Cantrell, D.A. (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J. Cell Sci.*, **114**, 1439-1445.
- Carpenter, C.L., Auger, K.R., Duckworth, B.C., Hou, W.M., Schaffhausen, B.S., Cantley, L.C. (1993) A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1657-1665.
- Casey, P., Seabra, M.C. (1996) Protein prenyltransferases *J. Biol. Chem.*, **271**, 5289-5892.
- Chaplinski, T. J., Niedel, J. E. (1982) Cyclic nucleotide-induced maturation of human promyelocytic leukemic cells. *J. Clin. Invest.*, **70**, 953-964.
- Chauhan, V.P.S., Singh, S.S., Chauhan, A., Brockerhoff, H. (1995) Phosphatidylinositol 3-kinase: inhibition of intrinsic protein-serine kinase activity by phosphoinositides, and of lipid kinase activity by  $Mn^{2+}$ . *Biochim. Biophys. Acta*, **1267**, 139-144.
- Chen, W.-J., Andres, D.A., Goldstein, J.L., Russell, D.W., Brown M.S. (1991) cDNA cloning and expression of the peptide-binding  $\beta$  subunit of rat p21ras farnesyltransferase, the counterpart of yeast DPR1/RAM1. *Cell*, **66**, 327- 334.
- Chen, Z., Wells, C.D., Sternweis, P.C., Sprang, S. (2001) Structure of the rgRGS domain of p115RhoGEF. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 805-809.
- Cieslik, K., Abrams, C.S., Wu, K.K. (2001) Up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase promoter by the phosphatidylinositol 3-kinase  $\gamma$ /Janus kinase 2/MEK-1-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, **276**, 1211-1219.
- Clapham, D.E., Neer, E.J. (1997) G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **37**, 167-203.
- Coffer, P.J., Geijsen, N., M'Rabet, L., Schweizer, R.C., Maikoe, T., Raaijmakers, J.A.M., Lammers, J.-W.J., Koenderman, L. (1998) Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function. *Biochem. J.*, **329**, 121-130.
- Cohen, S.L., Chait, B.T. (1996) Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins. *Anal. Chem.*, **68**, 31-37.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria-genetic transformation of E. coli R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2110-2114.
- Cook, L.A., Schey, K.L., Wilcox, M.D., Dingus, J., Hildebrandt, J.D. (1998) Heterogenous processing of a G protein  $\gamma$  subunit at a site critical for protein and membrane interactions. *Biochemistry*, **37**, 12280-12286.

- Cuevas, B., Lu, Y., Watt, S., Kumar, R., Zhang, J., Siminovitch, K.A., Mills, G.B. (1999) SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity. *J. Biol. Chem.*, **274**, 27583-27589.
- Cuevas, B.D., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K., Mills, G.B. (2001) Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27455-27461.
- Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A., Ullrich, A. (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.*, **16**, 7032-7044.
- De Waard, M., Liu, H.Y., Walker, D., Scott, V.E.S., Gurnett, C.A., Campbell, K.P. (1997) Direct binding of G protein  $\beta\gamma$  complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature*, **385**, 446-450.
- Deora, A.A., Win, T., Vanhaesebroeck, B., Lander, H.M. (1998) A redox-triggered Ras-effector interaction. Recruitment of phosphatidylinositol 3'-kinase to Ras by redox stress. *J. Biol. Chem.*, **273**, 29923-29928.
- Dhanasekaran, N., Vara Prasad, M.V.V.S., Wadsworth, S.J., Dermott, J.M., van Rossum, G. (1994) Protein kinase C-dependent and -independent activation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger by  $\text{G}\alpha_{12}$  class of G proteins. *J. Biol. Chem.*, **269**, 11802-11806.
- Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M.J., Gout, I., Totty, N.F., Truong, O., Vicendo, P., Yonezawa, K., Waterfield, M.D. (1994) PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J.*, **13**, 522-533.
- Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S.A., Schlessinger, J. (1996) A role for Pyk2 and Src in linking G protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*, **383**, 547-550.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., Zeiher, A.M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, **399**, 601-605.
- Durocher, D., Taylor, I.A., Sarbassova, D., Haire, L.F., Westcott, S.L., Jackson, S.P., Smerdon, S.J., Yaffe, M.B. (2000) The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phosphodependent signaling mechanisms. *Mol. Cell*, **6**, 1169-1182.
- Dutil, E.M., Toker, A., Newton, A.C. (1998) Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1). *Curr. Biol.*, **8**, 1366-1375.
- Escobedo, J.A., Navankasattusas, S., Kavanaugh, W.M., Milfay, D., Fried, V.A., Williams, L.T. (1991) cDNA cloning of a novel 85 kD protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF  $\beta$ -receptor. *Cell*, **65**, 75-82.
- Essen, L.-O., Perisic, O., Lynch, D.E., Katan, M., Williams, R.L. (1997) A ternary metal binding site in the C2 domain of phosphoinositide-specific phospholipase C- $\delta_1$ . *Biochemistry*, **36**, 2753-2762.
- Evans, R. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor subfamily. *Science*, **240**, 889-895.

- Exner, T., Jensen, O.N., Mann, M., Kleuss, C. and Nürnberg, B. (1999) Posttranslational modification of G $\alpha_{01}$  generates G $\alpha_{03}$ , an abundant G protein in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**, 1327-32.
- Exton, J.H. (1997) Cell signalling through guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G proteins) and phospholipases. *Eur. J. Biochem.*, **243**, 10-20.
- Flanagan, C.A., Schnieders, E.A., Emerick, A.W., Kunisawa, R., Thorner, J.W., Admon, A. (1993) Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science*, **262**, 1444-1448.
- Fruman, D.A., Rameh, L.E., Cantley, L.C. (1999a) Phosphoinositide binding domains: embracing 3-phosphate. *Cell*, **97**, 817-820.
- Fruman, D.A., Snapper, S.B., Yballe, C.M., Davidson, L., Yu, J.Y., Alt, F.W., Cantley, L.C. (1999b) Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85 $\alpha$ . *Science*, **283**, 393-397.
- Fruman, D.A., Mauvais-Jarvis, F., Pollard, D.A., Yballe, C.M., Brazil, D., Bronson, R.T., Kahn, C.R., Cantley, L.C. (2000) Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 $\alpha$ . *Nat. Genet.*, **26**, 379-382.
- Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yoshizawa, T., Akino, T., Shimonishi, Y. (1990) Farnesylated  $\gamma$ -subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature*, **346**, 658-660.
- Garbers, D.L., Koesling, D., Schultz, G. (1994) Guanylyl cyclase receptors. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 1-5.
- Gautam, N., Downes, G.B., Yan, K., Kisselev, O. (1998) The G-protein  $\beta\gamma$ -complex. *Cell. Signal.*, **10**, 447-455.
- Geltz, N.R., Augustine, J.A. (1998) The p85 and p110 subunits of phosphatidylinositol 3-kinase  $\alpha$  are substrates, *in vitro*, for a constitutively associated protein tyrosine kinase in platelets. *Blood*, **91**, 930-939.
- Gilman, A.G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 615-649.
- Gohla, A., Harhammer, R., Schultz, G. (1997) The G-protein G $_{13}$  but not G $_{12}$  mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J. Biol. Chem.*, **273**, 4653-4659.
- Gohla, A., Offermanns, S., Wilkie, T.M., Schultz, G. (1999) Differential involvement of G $\alpha_{12}$  and G $\alpha_{13}$  in receptor-mediated stress fiber formation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17901-17907.
- Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Fry, M.J., Hiles, I., Otsu, M., Waterfield, M.D. (1992) Expression and characterization of the p85 subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase complex and a related p85 $\beta$  protein by using the baculovirus expression system. *Biochem. J.*, **288**, 395-405.



- Graneß, A., Adomeit, A., Heinze, R., Wetzker, R., Liebmann, C. (1998) A novel mitogenic signaling pathway of bradykinin in the human colon carcinoma cell line SW-480 involves sequential activation of a G<sub>q/11</sub> protein, phosphatidylinositol 3-kinase  $\beta$ , and protein kinase C $\epsilon$ . *J. Biol. Chem.*, **273**, 32016-32022.
- Gudermann, T., Nürnberg, B., Schultz, G. (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J. Mol. Med.*, **73**, 51-63.
- Hamm, H.E. (1998) The many faces of G Protein Signaling. *J. Biol. Chem.*, **273**, 669-672.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A., Broek, D. (1998) Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science*, **23**, 558-560.
- Hartley, K.O., Gell, D., Smith, G.C., Zhang, H., Divecha, N., Connelly, M.A., Admon, A., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W., Jackson, S.P. (1995) DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell*, **82**, 849-856.
- Hawes, B.E., Luttrell, L.M., van Biesen, T., Lefkowitz, R.J. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G $\beta\gamma$ -mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **271**, 12133-12136.
- Hawkins, P.T., Jackson, T.R., Stephens, L.R. (1992) Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> by activating a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 3-OH kinase. *Nature*, **358**, 157-159.
- Hehl, S., Stoyanov, B., Oehrl, W., Schönherr, R., Wetzker, R., Heinemann, S.H. (2001) Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  induces *Xenopus* oocyte maturation via lipid kinase activity. *Biochem. J.*, **360**, 691-698.
- Herlitze, S., Garcia, D.E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., Catterall, W.A. (1996) Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature*, **380**, 258-262.
- Herrlich, A., Daub, H., Knebel, A., Herrlich, P., Ullrich, A., Schultz, G., Gudermann, T. (1998) Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 8985-8990.
- Hiles, I.D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M.J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Ruiz-Larrea, F., Thompson, A., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Courtneidge, S.A., Parker, P.J., Waterfield, M.D. (1992) Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kDa catalytic subunit. *Cell*, **70**, 419-429.
- Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F., Wymann, M.P. (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  in inflammation. *Science*, **287**, 1049-1053.
- Hirsch, E., Bosco, O., Tropel, P., Laffargue, M., Calvez, R., Altruda, F., Wymann, M., Montrucchio, G. (2001) Resistance to thromboembolism in PI3K $\gamma$ -deficient mice. *FASEB J.*, **15**, 2019-2021.

- Hofmann, F., Lacinová, L., Klugbauer, N. (1997) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **139**, 33-87.
- Hooshmand-Rad, R., Hájková, L., Klint, P., Karlsson, R., Vanhaesebroeck, B., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.-H. (2000) The PI 3-kinase isoforms p110 $\alpha$  and p110 $\beta$  have differential roles in PDGF- and insulin-mediated signaling. *J. Cell Sci.*, **113**, 207-214.
- Hörsch, D., Kahn, C.R. (1999) Region-specific mRNA expression of phosphatidylinositol 3-kinase regulatory isoforms in the central nervous system of C57BL/6J mice. *J. Comp. Neurol.*, **415**, 105-120.
- Hu, P., Mondino, A., Skolnik, E.Y., Schlessinger, J. (1993) Cloning of a novel, ubiquitously expressed phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7677-7688.
- Huang, L., Hofer, F., Martin, G.S., Kim, S.-H. (1998) Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS. *Nature Struct. Biol.*, **5**, 422-426.
- Huang, L., Shanker, Y.G., Dubauskaite, J., Zheng, J.Z., Yan, W., Rosenzweig, S., Spielman, A.I., Max, M., Margolskee, R.F. (1999) G $\gamma$ <sub>13</sub> colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP<sub>3</sub> responses to bitter denatonium. *Nat. Neurosci.*, **12**, 1055-1062.
- Hunter, T. (1995) When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase. *Cell*, **83**, 1-4.
- Ikeda, S.R. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature*, **380**, 255-258.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Inukai, K., Funaki, M., Ogihara, T., Katagiri, H., Kanda, A., Anai, M., Fukushima, Y., Hosaka, T., Suzuki, M., Shin, B.C., Takata, K., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y., Asano, T. (1997) p85 $\alpha$  gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), p50 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , and p85 $\alpha$ , with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7873-7882.
- Inukai, K., Funaki, M., Anai, M., Ogihara, T., Katagiri, H., Fukushima, Y., Sakoda, H., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Abe, M., Oka, Y., Kikuchi, M., Asano, T. (2001) Five isoforms of the phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit exhibit different associations with receptor tyrosine kinases and their tyrosine phosphorylations. *FEBS Lett.*, **490**, 32-38.
- Itoh, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Oka, Y., Takenawa, T. (2000) Autophosphorylation of type I Phosphatidylinositol phosphate kinase regulates its lipid kinase activity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 19389-19394.
- Jan, L., Jan, Y. (1997) Receptor-regulated ion channels. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 155-160.
- Janek, K., Wenschuh, H., Bienert, M., Krause, E. (2001) Phosphopeptide analysis by positive and negative ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 1593-1599.

- Jelsema, C.L., Axelrod, J. (1987) Stimulation of phospholipase A<sub>2</sub> activity in bovine rod outer segments by the  $\beta\gamma$  subunits of transducin and its inhibition by the  $\alpha$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **84**, 3623-3627.
- Jesaitis, A.J., Tolley, J.O., Allen, R.A. (1986) Receptor-cytoskeleton interactions and membrane traffic may regulate chemoattractant-induced superoxide production in human granulocytes. *J. Biol. Chem.*, **261**, 13662-13669.
- Ji, T.H., Grossmann, M., Ji, I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17299-17302.
- Jiang, H., Wu, D., Simon, M.I. (1994) Activation of phospholipase C- $\beta_4$  by heterotrimeric GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7593-7596.
- Jimenez, C., Portela, R.A., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Collard, J. Serrano A., Martinez-A, C., Avila, J., Carrera, A.C. (2000) Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J. Cell Biol.*, **151**, 249-262.
- Jones, D.T., Reed, R.R. (1989) G<sub>olf</sub>: An olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*, **244**, 790-795.
- Jones, M.B., Garrison, J.C. (1999) Instability of the G Protein  $\beta_5$  subunit in detergent. *Anal. Biochem.* **268**, 126-133.
- Jones, P.G., Lombardi, S.J., Cockett, M.I. (1998) Cloning and tissue distribution of the human G protein  $\beta_5$  cDNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **1402**, 288-291.
- Jordan, J.D., Carey, K.D., Stork, P.J.S., Iyengar, R. (1999) Modulation of Rap activity by direct interaction of G $\alpha_o$  with Rap1 GTPase-activating protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21507-21510.
- Kalkbrenner, F., Dippel, E., Wittig, B., Schultz, G. (1996) Specificity of interaction between receptor and G protein: Use of antisense techniques to relate G protein subunits to function. *Biochim. Biophys. Acta*, **1314**, 125-139.
- Kang, H., Schneider, H., Rudd, C.E. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase p85 adaptor function in T-cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 912-921.
- Kaupp, U.B., Koch, K.-W. (1992) Role of cGMP and Ca<sup>2+</sup> in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.*, **54**, 153-175.
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., Satoh, T. (1991) Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 349-400.
- Kim, M.J., Min, D.S., Ryu, S.H., Suh, P.G. (1998) A cytosolic, G $\alpha_q$ - and  $\beta\gamma$ -insensitive splice variant of phospholipase C- $\beta_4$ . *J. Biol. Chem.*, **273**, 3618-3624.
- King, L.A., Possee, R.D. (1992): The baculovirus expression system: A laboratory guide. Chapman & Hall.
- Kisselev, O.G., Ermolaeva, M.V., Gautam, N. (1994) A farnesylated domain in the G protein  $\gamma$  subunit is a specific determinant of receptor coupling. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21399-21402.

- Kisselev, O.G., Pronin, A., Ermolaeva, M.V., Gautam, N. (1995) Receptor-G protein coupling is established by a potential conformational switch in the  $\beta\gamma$  complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**, 9102-9106.
- Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W.M., Apell, G., Escobedo, M.A., Williams, L.T. (1996) Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4117-4127.
- Kotzyba-Hilbert, F., Grutter, T., Goeldner, M. (1999) Molecular investigations on the nicotinic acetylcholine receptor: conformational mapping and dynamic exploration using photoaffinity labeling. *Mol. Neurobiol.*, **20**, 45-59.
- Kovoor, A., Chen, C.K., He, W., Wensel, T.G., Simon, M.I., Lester, H.A. (2000) Co-expression of G $\beta$ 5 enhances the function of two G $\gamma$  subunit-like domain-containing regulators of G protein signaling proteins. *J. Biol. Chem.*, **275**, 3397-3402.
- Kozasa, T., Hepler, J.R., Smrcka, A.V., Simon, M.I., Rhee, S.G., Sternweis, P.C., Gilman, A.G. (1993) Purification from *Sf9* cells and characterization of recombinant G $\alpha$ <sub>16</sub>. Activation of purified phospholipase C isozymes by G $\alpha$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**, 9176-9180.
- Kratzer, R., Eckerskorn, C., Karas, M., Lottspeich, F. (1998) Suppression effects in enzymatic peptide ladder sequencing using ultraviolet-matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, **19**, 1910-1919.
- Krugmann, S., Hawkins, P.T., Pryer, N., Braselmann, S. (1999) Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110 $\gamma$  phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G $\beta\gamma$  subunits. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17152-17158.
- Kuang, Y., Wu, Y., Smrcka, A., Jiang, H., Wu, D. (1996) Identification of a phospholipase C  $\beta$ <sub>2</sub> region that interacts with G $\beta\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**, 2964-2968.
- Kular, G., Loubtchenkov, M., Swigart, P., Whatmore, J., Ball, A., Cockcroft, S., Wetzker, R. (1997) Co-operation of phosphatidylinositol transfer protein with phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  in the formylmethionyl-leucylphenylalanine-dependent production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in human neutrophils. *Biochem. J.*, **325**, 299-301.
- Kurachi, Y., Nakajima, T., Sugimoto, T. (1986) Acetylcholine activation of potassium channels in cell-free membrane patches of atrial cells. *Am. J. Physiol.*, **251**, H681-H684.
- Kurosu, H., Maehama, T., Okada, T., Yamamoto, T., Hoshino, S., Fukui, Y., Ui, M., Hazeki, O., Katada, T. (1997) Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110 $\beta$  is synergistically activated by the  $\beta\gamma$  subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24252-24262.
- Kussmann, M., Nordhoff, E., Rahbeck-Nielsen, H., Haebel, S., Rossel-Larsen, M., Jakobsen, L., Gobom, J., Mirgorodskaya, E., Kross-Kristensen, A., Palm, L., Roepstorff, P. (1997) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *J. Mass Spectrom.*, **32**, 593-601.

- Lam, K., Carpenter, C.L., Ruderman, N.B., Friel, J.C., Kelly, K.L. (1994) The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by Wortmannin. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20648-20652.
- Lämmlli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Langhans-Rajasekaran, S.A., Wan, Y., Huang, X.Y. (1995) Activation of Tsk and Btk tyrosine kinases by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**, 8601-8605.
- Lee, S.B., Rhee, S.G. (1995) Significance of PIP<sub>2</sub> hydrolysis and regulation of phospholipase C isoenzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 183-189.
- Leopoldt, D., Harteneck, C., Nürnberg, B. (1997): G proteins endogenously expressed in *Sf9* cells: interaction with mammalian histamine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **350**, 329-338.
- Leopoldt, D., Hanck, T., Exner, T., Maier, U., Wetzker, R., Nürnberg, B. (1998) G $\beta\gamma$  stimulates phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J. Biol. Chem.*, **273**, 7024-7029.
- Levay, K., Cabrera, J.L., Satpaev, D.K., Slepak, V.Z. (1999) G $\beta_5$  prevents the RGS7-G $\alpha_o$  interaction through binding to a distinct G $\gamma$ -like domain found in RGS7 and other RGS proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**, 2503-2507.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareisis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parsons, R. (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, **275**, 1943-1947.
- Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A.V., Wu, D. (2000) Roles of PLC- $\beta_2$  and - $\beta_3$  and PI3K $\gamma$  in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*, **287**, 1046-1049.
- Liebmann, C. (2001a) Bradykinin signalling to MAP kinase: Cell-specific connections *versus* principle mitogenic pathways. *Biol. Chem.*, **382**, 49-55.
- Liebmann, C. (2001b) Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell. Signal.*, **13**, 777-785.
- Liliental, J., Moon, S., Lesche, R., Mamillapalli, R., Li, D., Zheng, Y., Sun, H., Wu, H. (2000) Genetic deletion of the PTEN tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac and Cdc42 GTPases. *Curr. Biol.*, **10**, 401-404.
- Lindorfer, M.A., Myung, C.S., Savino, Y., Yasuda, H., Khazan, R. and Garrison, J.C. (1998) Differential activity of the G protein  $\beta_5\gamma_2$  subunit at receptors and effectors. *J. Biol. Chem.*, **273**, 34429-34436.
- Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E.J., Clapham, D.E. (1987) The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature*, **325**, 321-326.
- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O., Russell, P. (1999) Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature*, **397**, 172-175.

- Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S., Wetzker, R. (1997) Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase  $\gamma$ . *Science*, **275**, 394-397.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lu, P.J., Zhou, X.Z., Shen, M., Lu, K.P. (1999) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science*, **283**, 1325-1328.
- Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lefkowitz, R.J. (1997) G $\beta\gamma$ -subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4637-4644.
- MacDermott, A.B., Role, L.W., Siegelbaum, S.A. (1999) Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu. Rev. Neurosci.*, **22**, 443-485.
- Macrez, N., Mironneau, C., Carricaburu, V., Quignard, J.-F., Babich, A., Czupalla, C., Nürnberg, B., Mironneau, J. (2001) Phosphoinositide 3-kinase isoforms selectively couple receptors to vascular L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Circ. Res.*, **89**, 692-699.
- Maehama, T., Dixon, J.E. (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13375-13378.
- Maier, U., Babich, A., Nürnberg, B. (1999) Roles of non-catalytic subunits in G $\beta\gamma$  induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms  $\beta$  and  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, **274**, 29311-29317.
- Maier, U., Babich, A., Macrez, N., Leopoldt, D., Gierschik, P., Illenberger, D., Nürnberg, B. (2000) G $\beta_5\gamma_2$  is a highly selective activator of phospholipid-dependent enzymes. *J. Biol. Chem.*, **275**, 13746-13754.
- Markert, M., Andrews, P.C., Babior, B.M. (1984) Measurement of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. *Meth. Enzymol.*, **105**, 358-365.
- Martelli, A.M., Borgatti, P., Bortul, R., Manfredini, M., Massari, L., Capitani, S., Neri, L.M. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase translocates to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells in response to insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor but not to the proapoptotic cytokine tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Bone Miner. Res.*, **15**, 1716-1730.
- Mattingly, R.R., Macara, I.G. (1996) Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by muscarinic receptors and G-Protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature*, **382**, 268-272.
- McLachlin, D.T., Chait, B.T. (2001) Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 591-602.
- Metjian, A., Roll, R.L., Ma, A.D., Abrams, C.S. (1999) Agonists cause nuclear translocation of phosphatidylinositol 3-kinase  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, **274**, 27943-27947.

- Metzger, S., Hoffmann, R. (2000) Studies on the dephosphorylation of phosphotyrosine-containing peptides during post-source decay in matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Mass Spectrom.*, **35**, 1165-1177.
- Molendijk, A.J., Irvine, R.F. (1998) Inositide signalling in *Chlamydomonas*: characterization of a phosphatidylinositol 3-kinase gene. *Plant Mol. Biol.*, **37**, 53-66.
- Murga, C., Laguinge, L., Wetzker, R., Cuadrado, A., Gutkind, J.S. (1998) Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, **273**, 19080-19085.
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., Shaw, A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, **84**, 889-897.
- Myung, C.S., Yasuda, H., Liu, W.W., Harden, T.K. and Garrison, J.C. (1999) Role of isoprenoid lipids on the heterotrimeric G protein  $\gamma$  subunit in determining effector activation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16595-16603.
- Naccache, P.H., Levasseur, S., Lachance, G., Chakravarti, S., Bourgoin, S.G., McColl, S.R. (2000) Stimulation of human neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of phosphatidylinositol 3-kinase  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, **275**, 23636-23641.
- Nakagawa, H., Mutoh, T., Kumano, T., Kuriyama, M. (2001) Tyrosine phosphorylation of the catalytic subunit p110 of phosphatidylinositol 3-kinase induced by HMG-CoA reductase inhibitor inhibits its kinase activity in L6 myoblasts. *FEBS Lett.*, **508**, 53-56.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F., Wittinghofer, A. (1995) The 2.2 Å crystal structure of the ras-binding domain of the serine/threonine kinase Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature*, **375**, 554-560.
- Neubauer, G., Mann, M. (1999) Mapping of phosphorylation sites of gel-isolated proteins by nanoelectrospray tandem mass spectrometry: potentials and limitations. *Anal. Chem.*, **71**, 235-242.
- Nolte, R.T., Eck, M.J., Schlessinger, J., Shoelson, S.E., Harrison, S.C. (1996) Crystal structure of the PI 3-kinase p85 amino-terminal SH2 domain and its phosphopeptide complexes. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 364-374.
- Nürnberg, B., Gudermann, T., Schultz, G. (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *J. Mol. Med.*, **73**, 123-132. *Korr.* **73**, 379.
- Offermanns, S. (2001) *In vivo* functions of heterotrimeric G-proteins: studies in  $G\alpha$ -deficient mice. *Oncogene*, **20**, 1635-1642.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A. (1992) Baculovirus expression vectors. WH Freeman, New York.
- Otsu, M., Hiles, I., Gout, I., Fry, M.J., Ruiz-Larrea, F., Panayotou, G., Thompson, A., Dhand, R., Hsuan, J., Totty, N., Smith, A.D., Morgan, S.J., Courtneidge, S.A., Parker, P.J., Waterfield, M.D. (1991) Characterization of two 85 kD proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60<sup>c-src</sup> complexes and PI3-kinase. *Cell*, **65**, 91-104.

- Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F., Williams, R.L. (2000) Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ . *Cell*, **103**, 931-943.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science*, **289**, 739-745.
- Panaretou, C., Domin, J., Cockcroft, S., Waterfield, M.D. (1997) Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150:PtdIns 3-kinase complex. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2477-2485.
- Park, D., Jhon, D.Y., Lee, K.H., Rhee, S.G. (1993) Activation of phospholipase C isozymes by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *J. Biol. Chem.*, **268**, 4573-4576.
- Parker, M.G. (1993) Steroid and related receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **3**, 499-504.
- Peterson, G.L. (1983): Determination of total protein. *Meth. Enzymol.*, **91**, 95-119.
- Pirola, L., Zvelebil, M.J., Bulgarelli-Leva, G., Van Obberghen, E., Waterfield, M.D., Wymann, M.P. (2001) Activation loop sequences confer substrate specificity to phosphoinositide 3-kinase  $\alpha$  (PI3K $\alpha$ ) *J. Biol. Chem.*, **276**, 21544-21554.
- Pitcher, J.A., Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 653-692.
- Pitcher, J.A., Inglese, J., Higgins, J.B., Arriza, J.L., Casey, P.J., Kim, C., Benovic, J.L., Kwatra, M.M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992) Role of  $\beta\gamma$  subunits of G proteins in targeting the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science*, **257**, 1264-1267.
- Powell, K.A., Valova, V.A., Malladi, C.S., Jensen, O.N., Larsen, M.R., Robinson, P.J. (2000) Phosphorylation of dynamin I on ser-795 by protein kinase C blocks its association with phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11610-11617.
- Prasad, M.V.V.S.V., Dermott, J.M., Heasley, L.E., Johnson, G.L., Dhanasekaran, N. (1995) Activation of Jun kinase/stress-activated protein kinase by GTPase-deficient mutants of G $\alpha_{12}$  and G $\alpha_{13}$ . *J. Biol. Chem.*, **270**, 18655-18659.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., Ullrich, A. (1999) EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, **402**, 884-888.
- Ptasznik, A., Prossnitz, E.R., Yoshikawa, D., Smrcka, A., Traynor-Kaplan, A.E., Bokoch, G.M. (1996) A tyrosine kinase signaling pathway accounts for the majority of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate formation in chemoattractant-stimulated human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **271**, 25204-25207.
- Pumiglia, K.M., LeVine, H., Haske, T., Habib, T., Jove, R., Decker, S.J. (1995) A direct interaction between G protein  $\beta\gamma$  subunits and the Raf-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14251-14254.
- Qiagen (1993) Preparation of plasmid DNA. Technical Bulletin.



- Rameh, L.E., Cantley, L.C. (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.*, **274**, 8347-8350.
- Ray, K., Kunsch, C., Bonner, L.M, Robishaw, J.D. (1995) Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein  $\gamma$  subunits, including three novel forms designated the  $\gamma_4$ ,  $\gamma_{10}$ , and  $\gamma_{11}$  subunits. *J. Biol. Chem.*, **270**, 21765-21771.
- Rebecchi, M.J., Pentylala, S.N. (2000) Structure, function and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.*, **80**, 1291-1335.
- Rebois, R.V., Warner, D.R., Basi, N.S. (1997) Does subunit dissociation necessarily accompany the activation of all heterotrimeric G proteins? *Cell. Signal.*, **9**, 141-151.
- Reif, K., Nobes, C.D., Thomas, G., Hall, A., Cantrell, D.A. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr. Biol.*, **6**, 1445-1455.
- Roche, S., Dhand, R., Waterfield, M.D., Courtneidge, S.A. (1994) The catalytic subunit of phosphatidylinositol 3-kinase is a substrate for the activated platelet-derived growth factor receptor, but not for middle-T antigen-pp60 c-src complexes., *Biochem. J.*, **301**, 703-711.
- Roche, S., Downward, J., Raynal, P., Courtneidge, S.A. (1998) A function for phosphatidylinositol 3-kinase  $\beta$  (p85 $\alpha$ -p110 $\beta$ ) in fibroblasts during mitogenesis: requirement for insulin- and lysophosphatidic acid-mediated signal transduction. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 7119-7129.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout., I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., Downward, J. (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, **370**, 527-532.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D. (1996) Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with ras and by point mutation. *EMBO J.*, **15**, 2442-2451.
- Roepstorff, P., Fohlmann, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 601.
- Ross, E.M., Wilkie, T.M. (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 795-827.
- Rubio, I., Rodriguez-Viciano, P., Downward, J., Wetzker, R. (1997) Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ . *Biochem. J.*, **326**, 891-895.
- Rubio, I., Wittig, U., Meyer, C., Heinze, R., Kadereit, D., Waldmann, H., Downward, J., Wetzker, R. (1999) Farnesylation of Ras is important for the interaction with phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ . *Eur. J. Biochem.*, **266**, 70-82.
- Rubio, I., Wetzker, R. (2000) A permissive function of phosphoinositide 3-kinase in Ras activation mediated by inhibition of GTPase-activating proteins. *Curr. Biol.*, **10**, 1225-1228.

- Ruiz-Larrea, F., Vicendo, P., Yaish, P., End, P., Panayotou, G., Fry, M.J., Morgan, S.J., Thompson, A., Parker, P.J., Waterfield, M.D. (1993) Characterization of the bovine brain cytosolic phosphatidylinositol 3-kinase complex. *Biochem. J.*, **290**, 609-616.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**, 5463-5467.
- Sankaran, B., Osterhout, J., Wu, D., Smrcka, A.V. (1998) Identification of a structural element in phospholipase C  $\beta_2$  that interacts with G protein  $\beta\gamma$  subunits. *J. Biol. Chem.*, **273**, 7148-7154.
- Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R.G., Oliveira-dos-Santos, A.J., Stanford, W.L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Kozieradzki, I., Joza, N., Mak, T.W., Ohashi, P.S., Suzuki, A., Penninger, J.M. (2000a) Function of PI3K $\gamma$  in thymocyte development, T cell activation and neutrophil migration. *Science*, **287**, 1040-1046.
- Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Horie, Y., Bachmaier, K., Fata, J.E., Li, M., Suzuki, A., Bouchard, D., Ho, A., Redston, M., Gallinger, S., Khokha, R., Mak, T.W., Hawkins, P.T., Stephens, L., Scherer, S.W., Tsao, M., Penninger, J.M. (2000b) Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)K $\gamma$ . *Nature*, **406**, 897-902.
- Schaeffer, E., Schwartzberg, P. (2000) Tec family kinases in lymphocyte signaling and function. *Curr. Opin. Immunol.*, **12**, 282-288.
- Scharenberg, A.M., El-Hillal, O., Fruman, D.A., Beitz, L.O., Li, Z., Lin, S., Gout, I., Cantley, L.C., Rawlings, D.J., Kinet, J.P. (1998) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *EMBO J.*, **17**, 1961-1972.
- Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D., Emr, S.D. (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science*, **260**, 88-91.
- Schwindinger, W.F., Robishaw, J.D. (2001) Heterotrimeric G-protein  $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene*, **20**, 1653-1660.
- Shan, X., Czar, M.J., Bunnell, S.C., Liu, P., Liu, Y., Schwartzberg, P.L., Wange, R.L. (2000) Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6945-6957.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.
- Shioi, T., Kang, P.M., Douglas, P.S., Hampe, J., Yballe, C.M. Lawitts, J., Cantley, L.C., Izumo, S. (2000) The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.*, **19**, 2537-2548.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P., Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, **252**, 802-808.

- Smrcka, A.V., Hepler, J.R., Brown, K.O., Sternweis, P.C. (1991) Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G<sub>q</sub>. *Science*, **251**, 804-807.
- Smrcka, A.V., Sternweis, P.C. (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C  $\beta$  by G protein  $\alpha$  and  $\beta\gamma$ -subunits. *J. Biol. Chem.*, **268**, 9667-9674.
- Snow, B.E., Krumins, A.M., Brothers, G.M., Lee, S.F., Wall, M.A., Chung, S., Mangion, J., Arya, S., Gilman, A.G., Siderovski, D.P. (1998) A G protein  $\gamma$  subunit-like domain shared between RGS11 and other RGS proteins specifies binding to G $\beta_5$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 13307-13312.
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D.G., Hamm, H.E., Sigler, P.B. (1996) Crystal structure of a G-protein  $\beta\gamma$  dimer at 2.1 Å resolution. *Nature*, **379**, 369-374.
- Songyang, Z., Cantley, L.C. (1995) Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 470-475.
- Speicher, K.D., Kolbas, O., Harper, S., Speicher, D.W. (2000) Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies. *J. Biomol. Tech.*, **11**, 74-86.
- Spicher, K., Kalkbrenner, F., Zobel, A., Harhammer, R., Nürnberg, B., Söling, A., Schultz, G. (1994) G<sub>12</sub> and G<sub>13</sub>  $\alpha$ -subunits are immunochemically detectable in membranes of most tissues of various mammalian species. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **198**, 906-914.
- Stack, J.H., Emr, S.D. (1994) Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *J. Biol. Chem.*, **269**, 31552-31562.
- Stambolic, V., Suzuki, A., Delapompa, J., Brothers, G., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J., Siderovski, D., Mak, T. (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell-survival by the tumor-suppressor PTEN. *Cell*, **95**, 29-39.
- Steinberg, S.F. (2001) PI3King the L-type calcium channel activation mechanism. *Circ. Res.*, **89**, 641-644.
- Stensballe, A., Andersen, S., Jensen, O.N. (2001) Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with off-line mass-spectrometry analysis. *Electrophoresis*, **22**, 207-222.
- Stephens, L.R., Hughes, K.T., Irvine, R.F. (1991) Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature*, **351**, 33-39.
- Stephens, L., Eguinoa, A., Corey, S., Jackson, T., Hawkins, P.T. (1993a) Receptor-stimulated accumulation of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate by G-protein mediated pathways in human myeloid derived cells. *EMBO J.*, **12**, 2265-2273.
- Stephens, L., Jackson, T., Hawkins, P.T. (1993b) Synthesis of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in permeabilized neutrophils regulated by receptors and G proteins. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17162-17172.

- Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A.S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., Hawkins, P.T. (1997) The G $\beta\gamma$  sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell*, **89**, 105-114.
- Stephens, L.R., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bormage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P.T. (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*, **279**, 710-714.
- Sternweis, P.C. (1986) The purified  $\alpha$  subunits of G<sub>o</sub> and G<sub>i</sub> from bovine brain require  $\beta\gamma$  for association with phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.*, **261**, 631-637.
- Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F., Hawkins, P.T. (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*, **277**, 567-570.
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nürnberg, B., Gierschik, P., Seedorf, K., Hsuan, J.J., Waterfield, M.D., Wetzker, R. (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science*, **269**, 690-693.
- Stoyanova, S., Bulgarelli-Leva, G., Kirsch, C., Hanck, T., Klinger, R., Wetzker, R., Wymann, M.P. (1997) Lipid and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ : structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem. J.*, **324**, 489-495.
- Strathmann, M.P., Simon, M.I. (1991) G $\alpha_{12}$  and G $\alpha_{13}$  subunits define a fourth class of G protein  $\alpha$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **88**, 5582-5586.
- Streuli, M. (1996) Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 182-188.
- Sunahara, R.K., Dessauer, C.W., Gilman, A.G. (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 461-480.
- Sunahara, R.K., Tesmer, J.J., Gilman, A.G., Sprang, S.R. (1997) Crystal structure of the adenylyl cyclase activator G $\alpha$ . *Science*, **278**, 1943-1947.
- Suzuki, H., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Aizawa, S., Yazaki, Y., Kadowaki, T., Koyasu, Y. (1999) Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Science*, **283**, 390-392.
- Takeda, H., Matozaki, T., Takada, T., Noguchi, T., Yamao, T., Tsuda, M., Ochi, F., Fukunaga, K., Inagaki, K., Kasuga, M. (1999) PI 3-kinase  $\gamma$  and protein kinase C- $\zeta$  mediate Ras-independent activation of MAP kinase by a G<sub>i</sub> protein-coupled receptor. *EMBO J.*, **18**, 386-395.
- Tang, X., Downes, C.P. (1997) Purification and characterization of G $\beta\gamma$ -responsive phosphoinositide 3-kinases from pig platelet cytosol. *J. Biol. Chem.*, **272**, 14193-14199.
- Taniguchi, T. (1995) Cytokine signalling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*, **268**, 251-255.

- Tanti, J.F., Gremeaux, T., Van Obberghen, E., Le Marchand-Brustel, Y. (1994) Insulin receptor substrate 1 is phosphorylated by the serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem. J.*, **304**, 17-21.
- Taussig, R., Gilman, A.G. (1995) Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 1-4.
- Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Sowadski, J.M. Gibbs, C.S., Zoller, M.J. (1993) A template for the protein kinase family. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 84-89.
- ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C.-H. (1996) Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 139-145.
- Terauchi, Y., Tsuji, Y., Satoh, S., Minoury, H., Murakami, K., Okuno, A., Inukai, K., Asano, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., Nakajima, H., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Sekihara, H., Yin, Y., Barrett, J.C., Oda, H., Ishikawa, T., Akanuma, Y., Komuro, I., Suzuki, M., Yamamura, K., Kodama, T., Suzuki, H., Kadowaki, T. et al. (1999) Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 $\alpha$  subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat. Genet.*, **21**, 230-235.
- Thelen, M., Wymann, M.P., Langen, H. (1994) Wortmannin binds specifically to 1-phosphatidylinositol 3-kinase while inhibiting guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor signaling in neutrophil leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**, 4960-4964.
- Tolias, K.F., Cantley, L.C., Carpenter, C.L. (1995) Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17656-17659.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Traynor-Kaplan, A.E., Harris, A.L., Thompson, B.L., Taylor, P., Sklar, L.A. (1988) An inositol tetrakisphosphate-containing phospholipid in activated neutrophils. *Nature*, **334**, 353-356.
- Tsukada, S., Simon, M.I., Witte, O.N., Katz, A. (1994) Binding of  $\beta\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**, 11256-11260.
- Turner, S.J., Domin, J., Waterfield, M.D., Ward, S.G., Westwick, J. (1998) The CC chemokine monocyte chemoattractant peptide-1 activates both the class I p85/p110 phosphatidylinositol 3-kinase and the class II PI3K-C2 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, **273**, 25987-25995.
- Uddin, S., Fish, E.N., Sher, D.A., Gardziola, C., White, M.F., Plataniias, L.C. (1997) Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase by IFN- $\alpha$ . *J. Immunol.*, **158**, 2390-2397.
- Ueki, K., Yballe, C.M., Brachmann, S.M., Vicent, D., Watt, J.M., Kahn, C.R., Cantley, L.C. (2002) Increased insulin sensitivity in mice lacking p85 $\beta$  subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 419-424.

- Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M., Schertler, G.F.X. (1997) Arrangement of rhodopsin transmembrane  $\alpha$ -helices. *Nature*, **389**, 203-206.
- Vanhaesebroeck, B., Welham, M.J., Kotani, K., Stein, R., Warne, P.H., Zvelebil, M.J., Higashi, K., Volinia, S., Downward, J., Waterfield, M.D. (1997) p110 $\delta$ , a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 4330-4335.
- Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D. (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Experim. Cell Res.*, **253**, 239-254.
- Vanhaesebroeck, B., Higashi, K., Raven, C., Welham, M., Anderson, S., Brennan, P., Ward, S.G., Waterfield, M.D. (1999a) Autophosphorylation of p110 $\delta$  phosphoinositide 3-kinase: a new paradigm for the regulation of lipid kinases *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J.*, **18**, 1292-1302.
- Vanhaesebroeck, B., Jones, G.E., Allen, W.E., Zicha, D., Hooshmand-Rad, R., Sawyer, C., Wells, C., Waterfield, M.D., Ridley, A. (1999b) Distinct PI(3)Ks mediate mitogenic signalling and cell migration in macrophages. *Nature Cell Biol.*, **1**, 69-71.
- Viard, P., Exner, T., Maier, U., Mironneau, J., Nürnberg, B., Macrez, N. (1999) G $\beta\gamma$  dimers stimulate vascular L-type Ca<sup>2+</sup> channels via phosphoinositide 3-kinase. *FASEB J.*, **13**, 685-694.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., Rameh, L., Brachmann, S.M., Matsuo, T., Davidson, H.W., Schreiber, A., Backer, J.M., Cantley, L.C., Grinstein, S. (2001) Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol.*, **155**, 19-25.
- Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, R., Mac-Dougall, L.K., Stein, R., Zvelebil, M.J., Domin, J., Panaretou, C., Waterfield, M.D. (1995) A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J.*, **14**, 3339-3348.
- von Willebrand, M., Williams, S., Saxena, M., Gilman, J., Tailor, P., Jascur, T., Amarante-Mendes, G.P., Green, D.R., Mustelin, T. (1998) Modification of phosphatidylinositol 3-kinase SH2 domain binding properties by Abl- or Lck-mediated tyrosine phosphorylation at Tyr-688. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3994-4000.
- Walker, E.H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L., Williams, R.L. (1999) Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature*, **402**, 313-320.
- Walker, E.H., Pacold, M.E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P.T., Wymann, M.P., Williams, R. (2000) Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol. Cell*, **6**, 909-919.
- Wang, T., Pentylala, S., Elliot, J., Dowal, L., Gupta, E., Rebecchi, M.J., Scarlata, S. (1999a) Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C- $\beta_1$  and C $\beta_2$  with activated Gq. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**, 7843-7846.
- Wang, T., Pentylala, S., Rebecchi, M.J., Scarlata, S. (1999b) Differential association of the pleckstrin homology domains of phospholipases-C $\beta_1$ , C $\beta_2$ , and C $\delta_1$  with lipid bilayers and the  $\beta\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry*, **38**, 1517-1524.

- Watson, A.J., Katz, A., Simon, M.I. (1994) A fifth member of the mammalian G protein  $\beta$ -subunit family. *J. Biol. Chem.*, **269**, 22150-22156.
- Watson, A.J., Aragay, A.M., Slepak, V.Z., Simon, M.I. (1996) A novel form of the G protein  $\beta$  subunit  $G\beta_5$  is specifically expressed in the vertebrate retina. *J. Biol. Chem.* **271**, 28154-28160.
- Wells, C.D., Gutowski, S., Bollag, G., Sternweis, P.C. (2001) Identification of potential mechanisms for regulation of p115RhoGEF through analysis of endogenous and mutant forms of the exchange factor. *J. Biol. Chem.*, **276**, 28897-28905.
- Wenzel-Seifert, K., Seifert, R. (1990) Nucleotide-, chemotactic peptide- and phorbol ester-induced exocytosis in HL-60 leucemic cells. *Immunobiology*, **181**, 298-316.
- Wess, J. (1997) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.*, **80**, 231-264.
- Whiting, P.J., Bonnert, T.P., McKernan, R.M., Farrar, S., Le Bourdelles, B., Heavens, R.P., Smith, D.W., Hewson, L., Rigby, M.R., Sirinathsinghji, D.J., Thompson, S.A., Wafford, K.A. (1999) Molecular and functional diversity of the expanding GABA<sub>A</sub> receptor gene family. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **868**, 645-653.
- Wilkie, T.M., Gilbert, D.J., Olsen, A.S., Chen, X.N., Amatruda, T.T., Korenberg, J.R., Trask, B.J., de Jong, P., Reed, R.R., Simon, M.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. (1992) Evolution of the mammalian G protein  $\alpha$  subunit multigene family. *Nature Genet.*, **1**, 85-91.
- Williams, M.R., Arthur, J.S., Balendran, A., van der Kaay, J., Poli, V., Cohen, P., Alessi, D.R. (2000) The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr. Biol.*, **10**, 439-448.
- Wilm, M., Neubauer, G., Mann, M. (1996) Parent ion scans of unseparated peptide mixtures. *Anal. Chem.*, **68**, 527-533.
- Wong, G.T., Gannon, K.S., Margolskee, R.F. (1996) Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*, **381**, 796-800.
- Woscholski, R., Dhand, R., Fry, M.J., Waterfield, M.D., Parker, P.J. (1994) Biochemical characterization of the free catalytic p110 $\alpha$  and the complexed heterodimeric p110 $\alpha$ :p85 forms of the mammalian phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 25067-25072.
- Woscholski, R., Parker, P.J. (1997) Inositol lipid 5-phosphatases – traffic signals and signal traffic. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 427-431.
- Wurmser, A.E., Gary, J.D., Emr, S.D. (1999) Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways. *J. Biol. Chem.*, **274**, 9129-9132.
- Wymann, M.P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M.J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D., Panayotou, G. (1996) Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1722-1733.

- Wymann, M.P., Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1436**, 127-150.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gambin, S.J., Smerdon, S.J., Cantley, L.C. (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, **91**, 961-971.
- Yaffe, M.B., Elia, A.E.H. (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 131-138.
- Yasuda, H., Lindorfer, M.A., Woodfork, K.A., Fletcher, J.E., Garrison, J.C. (1996) Role of the prenyl group on the G protein  $\gamma$  subunit in coupling trimeric G proteins to A1 adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 18588-18595.
- Ye, K., Hurt, K.J., Wu, F.Y., Fang, M., Luo, H.R., Hong, J.J., Blackshaw, S., Ferris, C.D., Snyder, S.H. (2000) Pike. A nuclear GTPase that enhances PI3-kinase activity and is regulated by protein 4.1N. *Cell*, **103**, 919-930.
- Yu, J., Wjasow, C., Backer, J.M. (1998a) Regulation of the p85/p110 $\alpha$  phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the N-terminal and C-terminal SH2 domains. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30199-30203.
- Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G.A., Backer, J.M. (1998b) Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110 $\alpha$  catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1379-1387.
- Zeng, Y., Piwnicka-Worms, H. (1999) DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7410-7419.
- Zhang, J.F., Ellinor, P.T., Aldrich, R.W., Tsien, R.W. (1996) Multiple structural elements in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels support their inhibition by G proteins. *Neuron*, **17**, 991-1003.
- Zhang, X., Herring, C.J., Romano, P.R., Szczepanowska, J., Brzeska, H., Hinnebusch, A.G., Qin, J. (1998) Identification of phosphorylation sites in proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Chem.*, **70**, 2050-2059.
- Zhao, X.-H., Bondeva, T., Balla, T. (2000) Characterization of recombinant phosphatidylinositol 4-kinase  $\beta$  reveals auto- and heterophosphorylation of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14642-14648.
- Zheng, Y., Bagrodia, S., Cerione, R.A. (1994) Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18727-18730.
- Zhou, W., Merrick, B.A., Khaledi, M.G., Tomer, K.B. (2000) Detection and sequencing of phosphopeptides affinity-bound to immobilized metal ion beads by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**, 273-282.



---

Zvelebil, M.J., MacDougall, L., Leever, S., Volinia, S., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Panayotou, G., Domin, J., Stein, R., Pages, F., Koga, H., Salim, K., Linacre, J., Das, P., Panaretou, C., Wetzker, R., Waterfield, M. (1996) Structural and functional diversity of phosphoinositide 3-kinases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **351**, 217-223.

## ***EIGENE PUBLIKATIONEN***

### ***Originalarbeiten***

Macrez, N., Mironneau, C., Carricaburu, V., Quignard, J.-F., Babich, A., Czupalla, C., Nürnberg, B., Mironneau, J. (2001) Phosphoinositide 3-kinase isoforms selectively couple receptors to vascular L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Circ. Res.*, **89**, 692-699.

Breitweg-Lehmann, E., Czupalla, C., Storm, R., Kudlacek, O., Schunack, W., Freissmuth, M., Nürnberg, B. (2002) Activation and inhibition of G proteins by lipoamines. *Mol. Pharmacol.*, **66**(3), in Druck.

Just, H., Stefan, E., Czupalla, C., Nürnberg, B., Nanoff, C., Freissmuth, M. (2002) Beyond G proteins: the role of accessory proteins in G protein-coupled receptor signalling. *Trends Drug Res.*, in Druck.

Goetze, S., Bungenstock, A., Czupalla, C., Eilers, F., Stawowy, P., Kintscher, U., Spencer-Hänsch, C., Graf, K., Nürnberg, B., Fleck, F., Law, R.E., Gräfe, M. (2002) Leptin-induced migration of endothelial cells is Akt- and MAPK-dependent and inhibited by PPAR $\gamma$ -ligands. In Revision.

Czupalla, C., Culo, M., Müller, E.-C., Brock, C., Wetzker, R., Spicher, K., Krause, E., Nürnberg, B. (2002) Isoform-specific regulation of phosphoinositide 3-kinase protein kinase activity. In Vorbereitung.

Czupalla, C., Nürnberg, B., Krause, E. (2002) Analysis of class I phosphoinositide 3-kinase autophosphorylation sites by mass spectrometry. In Vorbereitung.

Brock, C., Schaefer, M., Reusch, H.P., Czupalla, C., Schulz, A., Michalke, M., Spicher, K., Schultz, G., Nürnberg, B. (2002) *In vivo*-imaging reveals a dual role for receptor-released G $\beta\gamma$  dimers in direct activation of heterodimeric phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ . In Vorbereitung.

### ***Kurzfassungen von Kongressbeiträgen***

Breitweg-Lehmann, E., Czupalla, C., Leschke, C., Storm, R., Schunack, W., Nürnberg, B. (1999) Low molecular weight G-protein activators interact selectively with G<sub>i</sub>-proteins. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, **332**(1), 62.

Maier, U., Babich, A., Czupalla, C., Macrez, N., Illenberger, D., Nürnberg, B. (1999): Regulation of phosphoinositide-3-kinase by G proteins. Fifth International Dahlem Symposium on "Cellular Signal Recognition and Transduction". Berlin, 14.-16.10.1999, S34.

- Czupalla, C., Breitweg-Lehmann, E., Schunack, W., Nürnberg, B. (2000) Low molecular G-protein modulators inhibit activation of HL-60 cells by chemoattractants. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **361**(4), R53.
- Czupalla, C., Maier, U., Nürnberg, B. (2001) Receptor-regulated protein kinase activities of heterodimeric class I phosphoinositol-3-kinases. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **363**(4), R54.
- Brock, C., Reusch, H.P., Czupalla, C., Schulz, A., Michalke, M., Schultz, G., Nürnberg, B., Schaefer, M. (2001) Dual role for G $\beta\gamma$  in activation of PI-3-kinase  $\gamma$ . Fachbereich Humanmedizin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, Jahrbuch 2001, S326.
- Czupalla, C., Culo, M., Müller, E.-C., Krause, E., Nürnberg, B. (2001) Isoform-spezifische Regulation der Autophosphorylierung von Klasse I PI-3-Lipidkinasen. Fachbereich Humanmedizin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, Jahrbuch 2001, S327.
- Schulz, A., Czupalla, C., Schimmelpfennig, K., Krause, G., Schunack, W., Nürnberg, B., Spicher, K. (2001) *In vitro* G $_i$ -Protein-stimulierende Lipoamine hemmen rezeptorunabhängig G $_i$ -Proteine in intakten Zellen. Fachbereich Humanmedizin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, Jahrbuch 2001, S333.
- Czupalla, C., Brock, C., Müller, E.-C., Schaefer, M., Krause, E., Nürnberg, B. (2001) Regulation of phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  by G proteins. *Sig. Trans.*, **1**, 154.

# **LEBENS LAUF**

## ***Persönliche Angaben***

Name: Cornelia Czupalla  
Geburtsdatum und -ort: 27.08.1970 in Erfurt  
Eltern: Ruthild Czupalla, geb. Edler, und Frieder Czupalla  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## ***Schule***

1977 - 1987 Polytechnische Oberschule „Ho Chi Minh“, Erfurt  
1987 - 1989 Erweiterte Oberschule „G.E. Lessing“, Erfurt  
30.06.1989 Allgemeine Hochschulreife

## ***Ausbildung***

1989 - 1990 Vorpraktisches Jahr mit Berufsausbildung zum Elektromonteur,  
VEB Erfurt Electronic  
1990 - 1992 Studium der Elektrotechnik (Spezialisierungsrichtung Biomedizinische  
Technik und Biokybernetik),  
Technische Universität Ilmenau  
1992 - 1997 Studium der Pharmazie,  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
01.09.1994 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
08.04.1997 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
05/97 - 04/98 Praktisches Jahr in der Nordapotheke, Erfurt, und in der Apotheke des  
Universitätsklinikums „Benjamin Franklin“, Berlin  
28.07.1998 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
13.08.1998 Approbation als Apothekerin  
06/98 Beginn der Dissertationsarbeit am Institut für Pharmakologie der Freien  
Universität Berlin (geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. G. Schultz)

## ***Stipendien***

08/95 - 04/97 Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes  
06/98 - 10/99 Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Signalketten in lebenden Systemen“

## **DANKSAGUNG**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg für die intensive Betreuung der Arbeit, zahlreiche wissenschaftliche Anregungen und Diskussionen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Günter Schultz danke ich für seine Unterstützung und wissenschaftliche Förderung, insbesondere für die Möglichkeit, meine Dissertationsarbeit am Pharmakologischen Institut der Freien Universität in Berlin durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Eberhard Krause für die Einführung in die Massenspektrometrie, für die wissenschaftliche Begleitung der MALDI-MS-Messungen, die ich bei ihm am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin durchführen konnte, sowie für zahlreiche stimulierende Diskussionen.

Bei Herrn Prof. Dr. Claus Liebmann sowie Herrn Prof. Dr. Reinhard Wetzker möchte ich mich für die Bereitschaft bedanken, die Arbeit vor der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena zu vertreten.

Herrn Dr. Karsten Spicher danke ich für die Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken und die Konstruktion von Baculoviren. Bei Herrn Dr. Udo Maier bedanke ich mich für die experimentelle Einführung in Aktivitätsuntersuchungen von PI-3-Kinasen.

Aleksei Babich, Carsten Brock, Andreas Schulz und Aliaksei Shymanets bin ich für die sehr gute und vielfältige Zusammenarbeit verbunden. Herrn Miran Culo danke ich besonders für sein großes Engagement. Frau Heidemarie Lerch und Herrn Jürgen Malkewitz bin für die hervorragende technische Unterstützung dankbar. Bei Frau Christine Laugwitz möchte ich mich für die stets rasche Hilfe bei logistischen Problemen bedanken.

Frau Majbrit Hjerrild, Süddänische Universität Odense, danke ich für die Hilfe bei der Phosphoaminosäure-Analyse. Frau Dr. Eva-Christina Müller, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin Berlin, danke ich für die Tandem-massenspektrometrischen Messungen.

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

## **Erklärung zur Bewerbung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des o.g. akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe.