

Regulation der Phosphoinositid 3-Kinase γ -Isoformen
durch Rezeptoren, Ras- und heterotrimere G-Proteine

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2009

vorgelegt von

Barbara Kurig

Tag der mündlichen Prüfung:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

3. Berichterstatter:

29.06.2009

Prof. Dr. Lars Wesemann

Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg

Prof. Dr. Peter Ruth

Prof. Dr. Thomas Wieland

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Prinzipien der zellulären Signalverarbeitung	1
1.2	Rezeptor-induzierte Signaltransduktion.....	3
1.2.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-induzierte Signaltransduktion	3
1.2.2	Aufbau und Funktion von G-Proteinen	5
1.2.2.1	Die G α -Untereinheit.....	6
1.2.2.2	Der G $\beta\gamma$ -Komplex	8
1.2.3	Rezeptor-Tyrosin-Kinase-induzierte Signaltransduktion	10
1.2.4	Aufbau und Funktion von Ras-Proteinen.....	12
1.2.5	Ras-vermittelte Signaltransduktion	14
1.3	Phosphoinositid 3-Kinasen	16
1.3.1	Klassifizierung.....	16
1.3.2	Klasse I PI3-Kinasen	17
1.3.2.1	Klasse I _A PI3-Kinasen.....	22
1.3.2.2	Klasse I _B PI3-Kinasen.....	25
2.	Fragestellung	28
3.	Material und Methoden.....	29
3.1	Materialien	29
3.1.1	Säugerzellen und Bakterienstämme.....	29
3.1.2	Medien und Zusätze	29
3.1.3	Plasmide	30
3.1.4	Enzyme.....	31
3.1.5	Chemikalien	31
3.1.6	Antikörper und Antiseren	33
3.1.7	Primer	34
3.1.8	Sonstige Materialien	35
3.2	Methoden.....	36
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	36
3.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktions-Techniken.....	36
3.2.1.1.1	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	36
3.2.1.1.2	Real Time-Polymerase-Kettenreaktion.....	37
3.2.1.2	Konstruktion von Expressionsplasmiden.....	38
3.2.2	Zellbiologische Methoden.....	38
3.2.2.1	Zellkultur und Transfektion	38
3.2.2.2	Immunfluoreszenz	39

3.2.2.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	40
3.2.2.4	Semi-quantitative Analyse der PH-Domänen-Translokation	41
3.2.2.5	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer	42
3.2.2.6	Messung der intrazellulären Konzentration von Kalzium.....	45
3.2.2.7	Bestimmung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosin-monophosphat.....	45
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	46
3.2.3.1	Gewinnung von Zelllysaten	46
3.2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	46
3.2.3.3	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
3.2.3.4	Immunoblot-Analyse	47
3.2.3.5	Immunpräzipitation	48
3.2.3.6	PI3-Kinase-Funktionsbestimmung.....	49
3.2.3.6.1	Herstellung der Phospholipidvesikel.....	49
3.2.3.6.2	Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität.....	49
3.2.3.7	Größenausschlußchromatographie	50
3.2.3.8	Nachweis der Ras-Aktivität mittels Affinitätspräzipitation	50
4.	Ergebnisse	51
4.1	Rezeptor/G-Protein-Spezifität der PI3-Kinase γ	51
4.1.1	Das HEK293-Zellsystem.....	51
4.1.2	Charakterisierung der Aktivität von endogenen PI3-Kinasen in HEK293-Zellen	52
4.1.3	G_i PCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen.....	54
4.1.4	G_s PCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen	55
4.1.5	G_q PCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen.....	57
4.1.6	Heart Like 1-Zellen (HL1) als Modellsystem zur Untersuchung der Rezeptor-Spezifität der PI3-Kinase γ	61
4.1.7	Endogene Expression der PI3-Kinase γ in HL-1-Zellen	61
4.1.8	Aktivierung endogener PI3-Kinasen in HL-1-Zellen	62
4.1.9	G_i PCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ in HL-1-Zellen	63
4.1.10	G_s PCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ in HL-1-Zellen	66
4.1.11	G_q PCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ in HL-1-Zellen	68
4.2	Die Ras-vermittelte Aktivierung der monomeren und heterodimeren PI3-Kinase γ -Isoformen	70
4.3	Mechanismen der Rezeptor-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen	76
4.3.1	Rezeptor-induzierte $G\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen	76
4.3.2	$G\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Rekrutierung der PI3-Kinase γ - Isoformen.....	80

4.3.3	Ras-Abhängigkeit der Rezeptor-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ	82
4.4	Kostimulatorische Funktion der nicht-katalytischen PI3-Kinase γ -Untereinheiten	91
5.	Diskussion.....	94
5.1	Regulierbarkeit der PI3-Kinase γ durch verschiedene G-Proteine ..	96
5.2	Bedeutung der G-Protein-Isoform für die Regulation der PI3-Kinase γ im endogenen Modellsystem.....	99
5.3	Ras-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase γ	101
5.4	Unterschiedliche Mechanismen der Rezeptor-induzierten Regulation der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen	103
5.5	Funktionen der nicht-katalytischen Untereinheiten.....	108
5.6	Regulationsmechanismen der PI3-Kinase γ -Isoformen und mögliche pharmakologische Konsequenzen	110
5.7	Ausblick	111
6.	Zusammenfassung.....	113
7.	Literaturverzeichnis.....	116
8.	Anhang:	145
8.1	Systemvalidierung	145
8.1.1	Charakterisierung der HEK293-Zelllinie	145
8.1.2	Charakterisierung der p87-Konstrukte.....	149
8.1.3	Endogene Expression von PI3-Kinasen und G $\beta\gamma$ -Komplexen in HEK293-Zellen	153
8.2	Die Rolle von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bei der Aktivierung der PI3-Kinase β	163
	Eigene Publikationen	167
	Akademische Lehrer	169
	Lebenslauf.....	170
	Danksagung	172

Abkürzungen

Å	Angström
A	Ampere
AC	Adenylylzyklase
AM	Acetoxymethylester
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β-AR	β-adrenerger Rezeptor
β-ARK	β-adrenerge Rezeptor Kinase
β-ME	β-Mercaptoethanol
BES	N,N-Bis-[-2-hydroxyethyl]-2-amino-ethansulfonsäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Btk	Bruton's Tyrosin-Kinase
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i> , Fluoreszenzvariante des GFP
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Ci	Curie
CLSM	<i>confocal laser-scanning microscope</i> , konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
cm	Zentimeter
CSH2	C-terminal gelegene SH2-Domäne der p85
CXCL12	CXC Chemokin-Ligand 12
CXCR4	CXC Chemokin-Rezeptor 4
d	Schichtdicke
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPEC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
D-PBS	<i>dulbecco's phosphate-buffered saline</i> ; NaCl/Glukose/Phosphatpuffer
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E	FRET-Effizienz
EB	<i>elution buffer</i> , Elutionspuffer
EC ₅₀	Konzentration eines Wirkstoffs, bei der die Hälfte des maximalen Effektes erreicht wird
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Bakterienzellen
EDTA	<i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , Epidermis-Wachstumsfaktor

EGFR	EGF-Rezeptor
EGTA	<i>Ethyleneglycoltetraacetic acid</i> , Ethylen glycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
em	Emission
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
ex	Exzitation
F	Fluoreszenz-Intensität
f[Ca ²⁺]	Funktion der Kalziumkonzentration
Fc	kristallisierbarer Antikörperteil, carboxyterminales Fragment von Immunglobulinen nach Papain-Spaltung (engl.: fragment cristalline)
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
F _{max}	maximale Fluoreszenz-Intensität
F _{min}	minimale Fluoreszenz-Intensität
fMLP	formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
fMLP-R	fMLP-Rezeptor
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FYVE-Domäne	in Fab1p, YOTB, Vac1p und EEA1 gefundene Domäne
G	Gauge (1 G = 38,1 mm)
(x) g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G418	Geneticin
Gα	α-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase
Gβ	β-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
Gβγ	Komplex aus Gβ und Gγ
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein der Qualle <i>Aequoria victoria</i>
Gγ	γ-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
ggfs.	gegebenenfalls
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
Grp1	<i>General receptor of phosphoinositides 1</i>
GRK	GPCR-Kinase
GST	Gluthation-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
³ [H]	Tritium
h	Stunde
H ₂ O	entionisiertes Wasser
HBS	<i>Hepes buffered saline</i> , Hepes gepufferte Salzlösung
HEK	<i>human embryonic kidney</i> , humane embryonale Nierenzellen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HL-1 Zellen	Heart Like-1 Zellen
HL-60 Zellen	humane Promyelozytenleukämie-Zelllinie
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR1, HR2, ...	Homologie-Regionen der PI3-Kinasen
H-Ras	Harvey-Ras
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
I	Intensität
IB	Immunoblot
Ig	Immunglobulin

Ins	Inositol
InsP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP	Immunpräzipitation
iSH2-Domäne	inter-SH2-Domäne (Domäne zwischen den beiden SH2-Domänen einer p85-Untereinheit)
K	Konstante
Kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
λ	Lambda, Wellenlänge
LSM	<i>laser-scanning microscope</i> , Laser-Scanning-Mikroskop
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK-/ERK-Kinase
min	Minute
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , „messenger“ Ribonukleinsäure
N	Normal
N ₂	Stickstoff
NF-1	Neurofibromin 1
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P40
NSH2-Domäne	N-terminal gelegene SH2-Domäne der p85
OD	optische Dichte
³² P	radioaktiv markiertes Phosphor
P1, P2	Prolin-reiche Regionen der p85
p85	Prototyp der nicht-katalytischen Untereinheit der Klasse I _A PI3-Kinasen α, β und γ
p87	nicht-katalytische Untereinheit der Klasse I _B PI3-Kinase γ
p101	nicht-katalytische Untereinheit der Klasse I _B PI3-Kinase γ
p110	katalytische Untereinheit der Klasse I PI3-Kinasen α, β, γ und δ
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> , Plättchen-Wachstumsfaktor
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration in wässriger Lösung
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI	Phosphoinositid (PtdIns oder ein phosphoryliertes Derivat)
PI3-Kinase	Phosphoinositid 3-Kinase
PI3-Kinase γ _{p87}	Heterodimer aus p110γ und p87
PI3-Kinase γ _{p101}	Heterodimer aus p110γ und p101
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	<i>Photomultiplier</i> , Teilchendetektor
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns-3,4-P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PtdIns-3,4,5-P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PtdIns-4,5-P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
PTX	Pertussistoxin, Exotoxin von <i>Bordetella pertussis</i>
PX-Domäne	Phox-Domäne, zuerst in zwei Proteinen gefunden, die in Phagozyten Komponenten des NADPH-Oxidase-Komplexes sind
r	Radius
R0	Förster-Radius (Abstand, bei dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt)
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
RBD	Ras-Bindungs-Domäne
rel.	relativ
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SH2-Domäne	zur 2. Domäne der Kinase Src homologe Domäne
SH3-Domäne	zur 3. Domäne der Kinase Src homologe Domäne
SHIP	SH2-Domänen enthaltende Inositid-5-Phosphatase
t	Zeit
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i> , Tris gepufferte Lösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i> , „transfer“ Ribonukleinsäure
Tween	20 Polyoxyethylen-(20)-monolaurat
U	Units, definiert als diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen je min ein μmol Substrat umsetzt
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
w/o	<i>without</i> , ohne
wt	Wildtyp
y	Quotient der Fluoreszenz-Intensitäten bei 340 nm und 380 nm
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , Variante des GFP
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
%	Prozent

Einbuchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:

A	Alanin	G	Glycin	M	Methionin	S	Serin
C	Cystein	H	Histidin	N	Asparagin	T	Threonin
D	Aspartat	I	Isoleucin	P	Prolin	V	Valin
E	Glutamat	K	Lysin	Q	Glutamin	W	Tryptophan
F	Phenylalanin	L	Leucin	R	Arginin	Y	Tyrosin

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Signalverarbeitung

Die Wahrnehmung und Verarbeitung extrazellulärer Signale ist für eine Zelle lebenswichtig. Für die koordinierte Regulation und Reaktion eines mehrzelligen Organismus müssen die verschiedenen Gewebe, aber auch einzelne Zellen in der Lage sein, miteinander zu kommunizieren. Dieser Informationsaustausch kann entweder über einen direkten Kontakt z.B. mittels spezieller Adhäsionsmoleküle, durch elektrische Signale oder mit Hilfe von Signalmolekülen hergestellt werden (Ji et al., 1998; Aplin et al., 1998; Lee & Juliano, 2004). Letztere sind klassischerweise Hormone bzw. Neurotransmitter, wenn sie von Nervenzellen freigesetzt werden. Sie wirken entweder durch Freisetzung in den interstitiellen Raum auf die sezernierende Zelle selbst (autokrin) sowie auf Nachbarzellen (parakrin) oder aber nach Absonderung in die Blutbahn auf entfernte Gewebe (endokrin). Die diesen Signalmolekülen zugrunde liegenden chemischen Strukturen weisen eine hohe strukturelle Diversität auf. Zusätzlich können jedoch auch Umweltreize, wie beispielsweise Licht, Geruch, Geschmack, aber auch Kälte, Wärme, Schmerz und Druck wahrgenommen und in chemische bzw. elektrische Signale umgewandelt werden (Kroeze et al., 2003).

Lipophile Botenstoffe, wie die Steroid-, Retinoid- oder Thyroidhormone sind dabei in der Lage, durch die Plasmamembran zu diffundieren und an intrazelluläre Rezeptoren zu binden, wodurch sie die Regulation spezifischer Gene beeinflussen (Evans, 1988; Parker, 1993; McKenna & O'Malley, 2001). Die Mehrzahl der Botenstoffe ist jedoch hydrophil und kann daher nicht in die Zelle eindringen. Deshalb erfolgt eine Umsetzung von extrazellulären in spezifische intrazelluläre Signale durch Transmembranproteine (Rezeptoren), welche die Bindung eines extrazellulären Liganden in ein intrazelluläres Signal (sekundären Botenstoff, second messenger) umsetzen. Je nach Mechanismus dieser Transduktion unterscheidet man verschiedene Klassen von membranständigen Rezeptoren (s. Abbildung 1.1):

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (s. Abbildung 1.1 A) weisen eine multimere Struktur auf und sind beispielsweise maßgeblich an der schnellen chemischen Erregungsweiterleitung des synaptischen Spalts beteiligt. Man unterscheidet hier zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Ionenkanälen. Zu den exzitatorischen Kanälen zählen die nikotinergen Acetylcholinrezeptoren, die Glutamatrezeptoren und der ionotrope Serotonin-Rezeptor (der 5-HT₃-R). Sie sind nach Ligandenbindung für Kationen durchlässig und erhöhen so die Wahrscheinlichkeit für eine Depolarisation der Zielzelle. Inhibitorische Ionenkanäle, wie der γ -Aminobuttersäure- (GABA_A) oder der Glycin-Rezeptor, können dagegen im aktivierten Zustand Chloridionen transportieren und verringern auf diese Weise die Wahrscheinlichkeit einer Depolarisation der Zielzelle (MacDermott et al., 1999; Blitzer, 2005).

Die Familie der *enzym-assoziierten Rezeptoren* (s. Abbildung 1.1 B) zeichnet sich durch eine starke Heterogenität aus. Diese Rezeptoren durchspannen die Plasmamembran üblicherweise nur einmal mit einer Transmembranhelix und besitzen auf der extrazellulären Seite eine Ligandenbindungsstelle. Auf der intrazellulären Seite enthalten sie entweder eine enzymatische-Domäne (intramolekular gekoppeltes Rezeptor-Effektorsystem) oder binden

an ein enzymatisch aktives Adapterprotein (intermolekular gekoppeltes Rezeptor-Effektorsystem). Auch die Art der enzymatischen Aktivität dieser Rezeptorklasse ist sehr vielseitig. Zu den medizinisch bedeutenden Gruppen gehören die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), zu denen die meisten Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie der EGF-Rezeptor zählen (Fantl et al., 1993; Bazley & Gullick, 2005), und die Tyrosinkinase-assoziierten Rezeptoren, wie beispielsweise die Interleukinrezeptoren 1 - 6, die an Proteine der Janusfamilie koppeln (Giliani et al., 2005). Weiterhin zählen auch rezeptorähnliche Tyrosinphosphatasen, wie CD45 (Irie-Sasaki et al., 2003; Huntington & Tarlinton, 2004), Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen, wie der TGF β -Rezeptor (ten Dijke & Hill, 2004; Feng & Derynck, 2005) und die Rezeptor-Guanylylzyklen, wie die ANF-bindenden GC-A und -B-Rezeptoren (Pyriochou & Papapetropoulos, 2005) zu den enzymgekoppelten Rezeptoren.

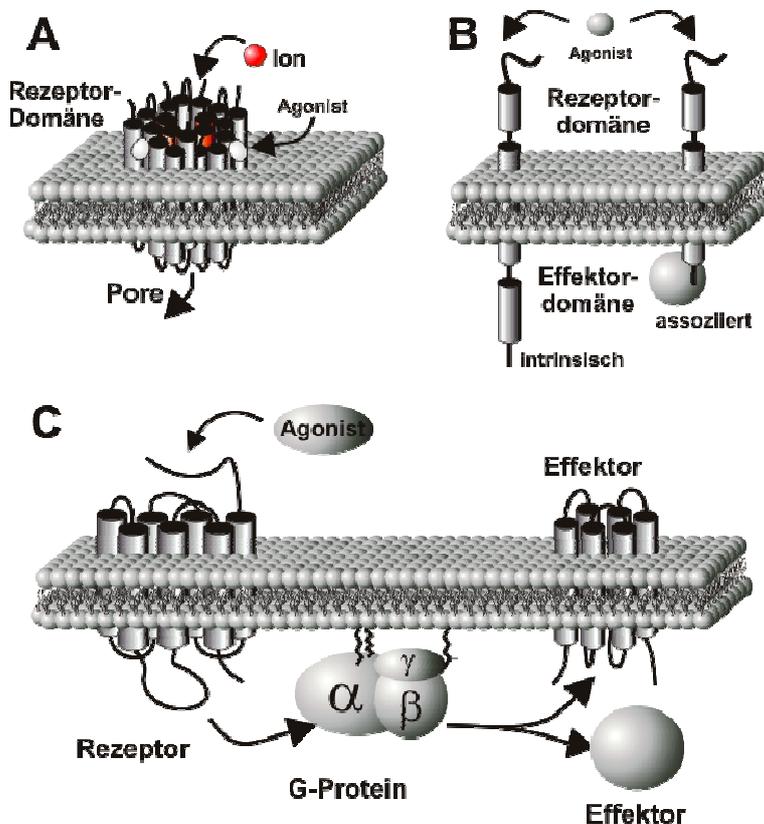


Abbildung 1.1 Prinzipien der Signaltransduktion durch Zelloberflächen-Rezeptoren (Auswahl).

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (A) ändern nach Agonistbindung ihre Konformation, sodass in der Mitte eine für Ionen durchlässige Pore geöffnet oder geschlossen wird. Enzym-assoziierte Rezeptoren (B) besitzen entweder eine eigene intrazellulär lokalisierte katalytische Domäne oder liegen mit einem Enzym assoziiert vor. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (C) benötigen zur Signalweiterleitung an membranständige oder zytosolische Effektoren Signaltransduktoren, die sogenannten G-Proteine.

Die *G-Protein-gekoppelten Rezeptoren* stellen die größte Gruppe der transmembranären Rezeptoren dar (s. 1.2.1). Sie durchspannen die Plasmamembran mit sieben transmembranären Helixstrukturen und werden deshalb auch heptahelikale Rezeptoren genannt. Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt durch Ligandenbindung an extrazelluläre und transmembranäre Bindungsregionen, wobei durch die Ligand-induzierte Konformationsänderung die anschließende Signalweiterleitung auf der intrazellulären Seite der Membran durch Interaktion mit assoziierten GTPasen vom Typ der trimeren Guanin-nukleotid-bindenden Regulatorproteine (G-Proteine; s. Abbildung 1.1 C) transduziert wird. Die G-Proteine werden durch den Austausch von GDP zu GTP aktiviert und dissoziieren in ihre $G\alpha$ -Untereinheit und den $G\beta\gamma$ -Komplex (Lambert, 2008), die getrennt voneinander unterschiedliche Effektoren aktivieren können.

1.2 Rezeptor-induzierte Signaltransduktion

1.2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptor-induzierte Signaltransduktion

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) werden durch ~ 2 - 5 % des humanen Genoms kodiert (Ji et al., 1998; Morris & Malbon, 1999; Dorsam & Gutkind, 2007). Es sind bisher etwa 800 humane heptahelikale Rezeptoren bekannt, von denen ungefähr die Hälfte zu den Geruchsrezeptoren (odorant GPCRs) gezählt werden (Levoye et al., 2006; Dorsam & Gutkind, 2007; Oldham & Hamm, 2008). Bis heute wurden jedoch nur etwa 200 GPCRs näher charakterisiert. GPCRs binden strukturell sehr unterschiedliche Liganden, worunter sich neben biogenen Aminen (z.B. Histamin), Aminosäuren (z.B. Glutaminsäure), Peptiden (z.B. fMLP), Nukleotiden (z.B. ADP), Serinproteasen (z.B. Thrombin), Fettsäurederivaten (z.B. Thromboxan A2) 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. Glukose) und Geruchsstoffe befinden (Ji et al., 1998). Jeder dieser Rezeptor-Agonisten kann einen oder aber auch mehrere Mitglieder der GPCR-Familie gleichzeitig stimulieren. So kann das Katecholamin Adrenalin beispielsweise neun verschiedene adrenerge Rezeptoren aktivieren.

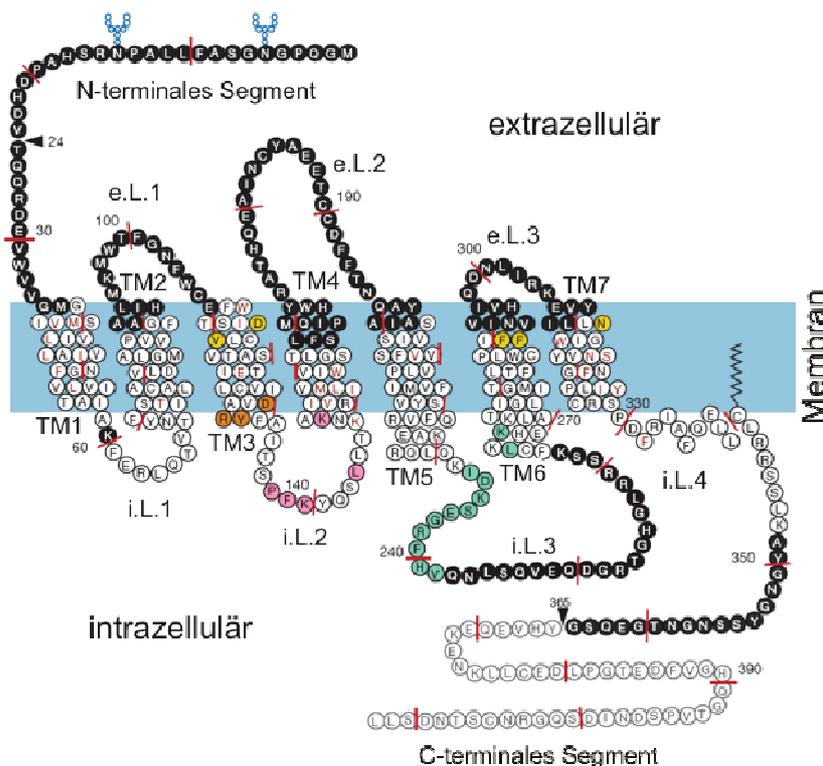


Abbildung 1.2 Schema des β_2 -adrenergen Rezeptors. Im Allgemeinen weisen GPCRs ein N-terminales Segment, sieben transmembranäre Helixstrukturen (TM1 - 7), drei extrazelluläre Loops (e.L.1 - 3), drei bis vier intrazelluläre Loops (i.L.1 - 4) und ein C-terminales Segment auf. (Abbildung aus Rasmussen et al., 2007).

Die kristalline Struktur eines GPCRs wurde erstmals im Jahr 2000 für das bovine Rhodopsin aufgeklärt (Palczewski et al., 2000). Begünstigend war hierbei, dass Rhodopsin im Gegensatz zu den meisten anderen GPCRs weder eine strukturelle Instabilität, noch eine basale Aktivität aufweist. Deshalb gelang es erst sieben Jahre später mit dem β_2 -adrenergen Rezeptor (β_2 -AR) einen weiteren GPCR zu kristallisieren (Rasmussen et al., 2007), wobei

hier die Struktur des Rezeptors mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers sowie eines inversen Agonisten stabilisiert wurde. Aus den gewonnenen Daten ließ sich ein prinzipieller Aufbau von GPCRs bestätigen: GPCRs bestehen aus einem extrazellulären, glykosylierten N-terminalen Segment, sieben Transmembranhelices, je drei extrazellulären und intrazellulären Loops und einem C-terminalen, intrazellulären Segment. Ein vierter intrazellulärer Loop kann durch eine Palmitoylierung eines Cysteins des C-terminalen Segments ausgebildet werden (s. Abbildung 1.2; Liebmann & Bohmer, 2000; Qanbar & Bouvier, 2003).

Durch Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird eine Signaltransduktion induziert. Die hierfür vorhandenen Ligandenbindungsstellen variieren relativ stark (Liebmann & Bohmer, 2000; Oldham & Hamm, 2008). Die Bindungsbereiche umfassen das N-terminale Segment, die extrazellulären Loops und Teile der Transmembranhelices (Ji et al., 1998; Liebmann & Bohmer, 2000; Oldham & Hamm, 2008). Eine Ligandenbindung resultiert letztlich in einer Konformationsänderung der zytosolischen Domänen des GPCR, die mit den assoziierten G-Proteinen interagieren. Allerdings sind die Grenzen zwischen inaktiver und aktiver Konformation fließend (Lefkowitz et al., 1993; Seifert & Wenzel-Seifert, 2002; Hill, 2006).

Man geht davon aus, dass GPCRs in unterschiedlichen aktiven oder inaktiven Zuständen existieren können. Bindet nun ein Ligand an einen GPCR, so wird dieser in einem bestimmten Zustand stabilisiert. Anhand dessen lassen sich Liganden in die folgenden Klassen einteilen: Partielle und volle Agonisten, partielle und volle inverse Agonisten sowie Antagonisten (Costa & Herz, 1989; Kenakin, 2001; Hill, 2006). Ein voller Agonist kann beispielsweise den vollständig aktivierten Zustand und ein partieller Agonist einen partiell aktiven Zustand des Rezeptors stabilisieren. Der Antagonist ist wiederum in der Lage, die Bindung eines anderen Liganden zu blockieren und stabilisiert den Rezeptor somit in seinem ligandenungebundenen Aktivitätszustand. Inverse Agonisten können wiederum die basale Aktivität, welche einige Rezeptoren schon im ligandenungebundenen Zustand zeigen, inhibieren und diese somit in einem inaktiven Zustand stabilisieren (Costa & Herz, 1989). Bisher gelang es allerdings nicht diese Konformationsänderungen von Rezeptoren in verschiedenen Aktivitätszuständen vollständig zu charakterisieren (Salom et al., 2006). Erst kürzlich veröffentlichte Kristallstrukturen zeigen erstmalig die Konformation eines aktiven, jedoch Liganden-freien GPCRs (Scheerer et al., 2008; Park et al., 2008).

Durch die Konformationsänderungen des Rezeptors wird der Guaninnukleotid-Austausch von der zytosolisch-gebundenen $G\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins induziert. Der Austausch von GDT zu GTP in der $G\alpha$ -Untereinheit führt zu einer Konformationsänderung, die nachfolgend eine funktionale Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins bewirkt.

Durch Abdissoziation der Liganden kehrt der Rezeptor in seinen Ausgangszustand zurück. Darüber hinaus kann die Rezeptoraktivität durch weitere Mechanismen reguliert werden (Claing et al., 2002; Krasel et al., 2004; Hill, 2006; Moore et al., 2007). Somit wird eine genaue zeitliche und räumliche Feinabstimmung von GPCR-vermittelten Signalen ermöglicht.

In den letzten Jahren zeigte sich, dass sowohl die Regulation der Aktivität, als auch die Signalweiterleitung von GPCRs weitaus komplexer sind, als zuvor angenommen. So sind

einige GPCRs beispielsweise in der Lage, mehrere G-Protein-Spezies parallel zu aktivieren (Bockaert et al., 2003; Oldham & Hamm, 2008). Andere wiederum erfahren einen von ihrer Aktivität abhängigen Wechsel von G_s -Protein- zu G_i -Protein-vermittelter Signaltransduktion (Daaka et al., 1997; Martin et al., 2004). Auch das Prinzip der GPCR-Dimerisierung wird mehr und mehr in seiner Bedeutung erkannt (Fotiadis et al., 2003; Bulenger et al., 2005; Hill, 2006). Der Mechanismus der Heterodimerisierung von GPCRs führt zu einer erhöhten Heterogenität der durch einen einzelnen Liganden aktivierten G-Protein-Spezies. Somit führt die Aktivierung eines GPCRs meist zur Stimulation mehrerer G-Protein-Isoformen.

Die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion stellt für GPCRs jedoch nicht die einzige Möglichkeit zur Signalweiterleitung dar. Diese Rezeptoren sind in der Lage, eine große Anzahl verschiedener Proteine zu binden und so weiterführende Signalwege, wie beispielsweise die MAPK-Kaskade, zu beeinflussen (Bockaert et al., 2003; McGarrigle & Huang, 2007; Ma & Pei, 2007; Violin & Lefkowitz, 2007; Richter et al., 2008). Eine andere Form dieser zusätzlichen Art der Regulation und Signaltransduktion ist die Rezeptor-Interaktion mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs). RTKs sind in der Lage, die Aktivität von GPCRs zu regulieren. So kann beispielsweise der anabole Insulinrezeptor die Internalisierung des katabol wirkenden β_2 -ARs induzieren und somit die Glukoseaufnahme aus dem Blut sicherstellen (Gavi et al., 2006). Auf der anderen Seite können aber auch GPCRs RTKs aktivieren, ein Konzept, das als Rezeptortransaktivierung bezeichnet wird (Daub et al., 1996; Daub et al., 1997; Luttrell et al., 1997; Piiper & Zeuzem, 2004). Hier werden vor allem Src-vermittelte Signalwege diskutiert. Über die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) kommt es nachfolgend zur autokrinen Freisetzung von heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF; Downward, 2003; Piiper & Zeuzem, 2004). Alternativ wird eine direkte Stimulation von RTKs durch eine $G\alpha_q$ -vermittelte Src Aktivierung diskutiert (Howes et al., 2006).

GPCR-abhängige Signalwege sind in ein Netzwerk von Signalsystemen eingebunden und auf jeder Stufe der Signalweiterleitung durch unterschiedliche Regulationsmechanismen kontrolliert. Vor dem Hintergrund, dass derzeit etwa jeder vierte therapeutisch eingesetzte Wirkstoff direkt an GPCRs angreift (Overington et al., 2006; Dorsam & Gutkind, 2007; Oldham & Hamm, 2008), kommt dem detaillierten Verständnis von GPCR-vermittelten Signalwegen eine besondere Bedeutung zu. Besonderes Interesse gilt hierbei GPCR-abhängigen Prozessen im Kardiovaskularsystem (Rockman et al., 2002).

1.2.2 Aufbau und Funktion von G-Proteinen

Die Signalweiterleitung von GPCRs erfolgt hauptsächlich über heterotrimere G-Proteine, welche an der Innenseite der Plasmamembran mit den Rezeptoren assoziiert vorliegen und so die extrazellulär ankommenden Signale an Effektoren im Zellinneren weiterleiten können. Für diese Interaktion ist eine plasmamembranäre Lokalisation der aus $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten bestehenden G-Proteine erforderlich. Dies wird u.a. durch posttranslationale Modifikationen erreicht. Des Weiteren lassen sich G-Proteine aber auch

auf Endomembranen und im Zellkern nachweisen, wobei ihre Funktion hier bisher nicht eindeutig geklärt ist (Nürnberg & Ahnert-Hilger, 1996; Cho & Kehrl, 2007; Marrari et al., 2007; Gohla et al., 2007a; Gohla et al., 2007b).

Die Rezeptor-induzierte Aktivierung des G-Proteins wird durch eine Liganden-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors sowie des assoziierten G-Proteins ermöglicht (Oldham et al., 2006; Van Eps et al., 2006; Oldham & Hamm, 2008; Schwartz & Hubbell, 2008). Infolgedessen kommt es zu einer Öffnung der Guaninnukleotid-Bindungstasche und zu einer Freisetzung von GDP aus der $G\alpha$ -Untereinheit. Der GPCR wirkt also für ein heterotrimeres G-Protein als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF), indem er die Freisetzung des GDP fördert und den nukleotidfreien Übergangszustand stabilisiert. Die nukleotidfreie $G\alpha$ -Untereinheit kann anschließend GTP binden, das intrazellulär in wesentlich höheren Konzentrationen als GDP vorliegt. Hierdurch ausgelöst durchläuft die $G\alpha$ -Untereinheiten eine erneute Konformationsänderung in den drei als Schalter (switch) I, II und III bezeichneten Regionen. Nachfolgend dissoziiert das Trimer in seine zwei funktionellen Einheiten (Lambright et al., 1996). Dies sind die GTP-gebundene $G\alpha$ -Untereinheit und der $G\beta\gamma$ -Komplex, der unter physiologischen Bedingungen nicht dissoziiert (Clapham & Neer, 1997; Cabrera-Vera et al., 2003). Beide Einheiten können nun unabhängig voneinander mit Effektoren wechselwirken und diese modulieren. Die Terminierung der Signaltransduktion erfolgt durch Hydrolyse des GTP zu GDP mit Hilfe der intrinsischen GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit, die durch verschiedene Effektoren sowie RGS (*regulators of G-protein signaling*)-Proteine reguliert werden kann (Arshavsky & Pugh, Jr., 1998; Siderovski & Willard, 2005). Im GDP-gebundenen Zustand reassoziert die $G\alpha$ -Untereinheit mit dem $G\beta\gamma$ -Heterodimer, wodurch die Effektorinteraktion beider Signalkomponenten unterbunden wird. 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).

1.2.2.1 Die $G\alpha$ -Untereinheit

Die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine haben ein Molekulargewicht von 39 - 52 kDa und werden z.T. posttranslational myristoyliert und/oder palmitoyliert (Casey, 1994; Nürnberg et al., 1995; Marrari et al., 2007). Die 23 bekannten $G\alpha$ -Isoformen werden durch 16 Gene kodiert (Downes & Gautam, 1999) und nach ihrer Sequenzähnlichkeit in vier Subfamilien eingeteilt, die sich auch in ihren funktionellen Eigenschaften widerspiegeln: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$ (Simon et al., 1991; Milligan & Kostenis, 2006). Entsprechend werden auch die heterotrimeren G-Proteine nach ihrer α -Untereinheit in die Subfamilien G_s , G_i , G_q und G_{12} eingeteilt.

Das zuerst entdeckte G-Protein war das ubiquitär exprimierte G_s (Pfeuffer, 1977), dessen $G\alpha$ -Untereinheit über die Rezeptor-induzierte Stimulation von Adenylylzyklen die intrazelluläre Konzentration des second messenger cAMP reguliert (Sunahara et al., 1996). Zwei Gene kodieren für Mitglieder dieser Familie, denen eine für diese Familie typische

Choleratoxin (CTX)-Sensitivität gemein ist (Ribeiro-Neto et al., 1985; Wreggett, 1986; Passador & Iglewski, 1994). Aus dem $G\alpha_s$ -Gen (Gnas) gehen verschiedene Spleißvarianten hervor, die ubiquitär bzw. neuronal exprimiert werden (Novotny & Svoboda, 1998; Klemke et al., 2000; Pasolli et al., 2000; Bastepe et al., 2002). Das zweite Mitglied der G_s -Protein Familie, G_{olf} , kommt überwiegend im olfaktorischen Epithel vor und ist dort am Geruchsprozess beteiligt (Luo et al., 2002).

Als nächstes G-Protein wurde das G_i identifiziert, dessen α -Untereinheit ($G\alpha_i$) inhibierend auf Adenylylzyklasen wirkt und somit ebenfalls an der Regulation der cAMP-Konzentration beteiligt ist (Kaziro et al., 1991; Offermanns, 2003). Es sind derzeit drei G_i -Isoformen bekannt, wobei G_{i1} überwiegend neuronal, G_{i2} ubiquitär und G_{i3} überwiegend nicht-neuronal exprimiert wird. Die Familie der G_i -Proteine umfasst aber auch die vor allem in neuronalen und neuroendokrinen Zellen vorkommenden G_o -Proteine. G_o -Protein-vermittelte Effekte scheinen hauptsächlich durch $G\beta\gamma$ -Komplexe vermittelt zu sein, während für die $G\alpha_o$ -Untereinheit bisher kein Effektor eindeutig nachgewiesen werden konnte (Exner et al., 1999; Anis et al., 1999; Offermanns, 2003). Ein weiteres Mitglied der Familie ist das Pertussistoxin-insensitive G_z , dessen α -Untereinheit ($G\alpha_z$) ebenfalls inhibierend auf Adenylylzyklasen (Wong et al., 1992) wirkt, sich ansonsten jedoch in seinen Eigenschaften deutlich von $G\alpha_i$ unterscheidet (Casey et al., 1990; Ho & Wong, 2001). Zur Familie der G_i -Proteine zählen ebenfalls die sensorischen, in den Geschmacksknospen exprimierten Gustuzine (G_{gust} ; McLaughlin et al., 1992; Margolskee, 2002) sowie die beiden in der Retina vorkommenden und an Rhodopsin koppelnden Transduzine (G_t , Yarfitz & Hurley, 1994; Arshavsky et al., 2002). Beide stimulieren Phosphodiesterasen, die zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) spalten (Kaziro et al., 1991; Exner et al., 1999). Im Gegensatz zu den Mitgliedern der anderen G-Protein-Subfamilien werden fast alle G_i -Proteine an ihrer α -Untereinheit (Ausnahmen: $G\alpha_z$, sowie die lange Spleißvariante des $G\alpha_{i2}$) durch Pertussistoxin (PTX, Exotoxin von *Bordetella pertussis*) ADP-ribosyliert, wodurch ihre Rezeptor-induzierte Aktivierung blockiert wird (Ribeiro-Neto et al., 1985; Wreggett, 1986; Kaziro et al., 1991; Passador & Iglewski, 1994; Nürnberg, 2000).

Die G_q -Subfamilie besteht aus vier Mitgliedern, zu denen neben dem ubiquitär bzw. breit exprimierten G_q bzw. G_{11} auch G_{14} und G_{15} (Maus) bzw. G_{16} (Mensch) gehören, die ein restriktiveres Expressionsmuster aufweisen (Strathmann & Simon, 1990; Offermanns, 2000). Die $G\alpha$ -Untereinheiten aller vier Mitglieder der G_q -Familie aktivieren Phospholipasen C β (PLC β) und regulieren somit Pertussistoxin-unabhängige intrazelluläre Kalziumkonzentrationen (Exton, 1996; Rhee, 2001).

Die zuletzt entdeckte Familie von G-Proteinen ist die G_{12} -Familie (Strathmann & Simon, 1991). Die beiden Mitglieder G_{12} und G_{13} werden zwar ubiquitär, aber in relativ geringen Mengen exprimiert (Spicher et al., 1994; Harhammer et al., 1994; Harhammer et al., 1996). Die Haupteffektoren der $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ -Untereinheiten sind die Rho-spezifischen Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF und LARG (Gohla et al., 1999; Suzuki et al., 2003).

1.2.2.2 Der G β γ -Komplex

Die G β -Untereinheit besteht aus einem α -helikal strukturierten N-Terminus und der sogenannten β -Propeller-Struktur, welche aus sieben kreisförmig angeordneten β -Faltblättern aufgebaut ist (Neer et al., 1994; Gautam et al., 1998). Es wurden mittlerweile fünf (einschließlich Spleißvarianten sieben) G β -Isoformen mit einem Molekulargewicht von 35 - 39-kDa charakterisiert. Die G β -Isoformen 1 - 4 weisen mit 78 – 88 % eine relativ hohe Sequenzähnlichkeit auf, wohingegen sich G β_5 mit nur 50 % Sequenzhomologie strukturell und funktionell unterscheidet (Clapham & Neer, 1997; Maier et al., 2000; Smrcka, 2008).

Die G γ -Untereinheit besitzt ebenfalls einen α -helikal strukturierten N-Terminus, welcher mit der N-terminalen Helix von G β superspiralisiert („*coiled coil*“), während der restliche Teil der G γ -Untereinheit überwiegend hydrophobe Wechselwirkungen mit den äußeren Bereichen der G β -Untereinheit eingeht, die für die starke Interaktion von G β γ -Komplexen verantwortlich sind (Lambright et al., 1996; Sondek et al., 1996; Sprang, 1997). Die G γ -Untereinheiten sind mit 6 - 8 kDa deutlich kleiner als G α und G β . Man kennt bisher zwölf G γ -Isoformen, welche mit 27 - 76 % Sequenzidentität eine hohe Diversität aufweisen (Schwindinger & Robishaw, 2001). Im Gegensatz zu den G β -Untereinheiten werden alle G γ -Untereinheiten posttranslational modifiziert. Dabei erfolgt zuerst eine Isoprenylierung am Cystein der C-terminalen CAAX-Box. Anschließend werden die letzten drei Aminosäuren des Motivs proteolytisch abgespalten und das Cystein abschließend carboxymethyliert (Cook et al., 1998; Fu & Casey, 1999). Hierbei bestimmt die letzte, beliebige Aminosäure der CAAX-Box die Art der Isoprenylierung: Ein Serin, wie im Fall von G γ_1 , G γ_9 und G γ_{11} , führt zu einer Farnesylierung (C15), während alle anderen G γ -Untereinheiten ein Leucin tragen und somit mit einem Geranylgeranylrest (C20) isoprenyliert werden (Lane & Beese, 2006). Die Isoprenylierung der γ -Untereinheit verleiht den G β γ -Komplexen einen lipophilen Charakter und ermöglicht so ihre Verankerung in Membran.

Obwohl das Guaninnukleotid an die G α -Untereinheit gebunden vorliegt, übernimmt der G β γ -Komplex dennoch wichtige Funktionen bei der Rezeptor-induzierten Regulation des Nukleotidaustausches: Der G β γ -Komplex behindert die spontane Freisetzung von GDP aus der G α -Untereinheit (Sprang, 1997), während die Affinität von GDP-gebundenen G α -Untereinheiten zum GPCR durch den G β γ -Komplex erhöht wird (Hamm, 1998). Weiterhin ist der G β γ -Komplex neben G α an der Interaktion mit dem Rezeptor beteiligt (Kisselev et al., 1999) und somit essentiell für die Rezeptor-induzierte GDP-Freisetzung aus der G α -Untereinheit (Iiri et al., 1998). Lange Zeit wurde angenommen, dass G β γ -Komplexe lediglich bei der Aktivierung/Inaktivierung sowie der Membranassoziation der G α -Untereinheit eine Rolle spielen (Sternweis, 1986). Diese Vorstellung wurde aufgegeben, nachdem eine aktivierende Wirkung von G β γ -Komplexen auf muskarinische Kalium-Kanäle im Herzen nachgewiesen werden konnte (Logothetis et al., 1987). Seither wurde eine Vielzahl weiterer G β γ -Komplex-Effektoren charakterisiert (s. Tabelle 1.1). Aber auch nach der Entdeckung einer eigenen Signalwirkung von G β γ -Komplexen bleibt die bisherige Klassifizierung von G-Proteinen anhand ihrer G α -Untereinheiten weiterhin bestehen, da keine eindeutige Spezifität für G β γ -Komplex-vermittelte Signale nachgewiesen werden konnte (Cabrera-Vera et al., 2003). So wurde beispielsweise nur eine gering ausgeprägte Selektivität für die Komplexbildung von

G β - und G γ -Isoformen gefunden (Clapham & Neer, 1997; Gautam et al., 1998). Da diese Untersuchungen allerdings weitgehend *in vitro* vorgenommen wurden, bleibt die Frage einer selektiven Kombination von G β - und G γ -Isoformen *in vivo* bislang unbeantwortet. Des Weiteren ist nicht bekannt, welche G $\beta\gamma$ -Kombinationen *in vivo* tatsächlich existieren (Robishaw & Berlot, 2004; Smrcka, 2008).

Tabelle 1.1: G $\beta\gamma$ -regulierte Effektoren

Effektoren	Modulation	Referenz
ACI	↓	(Sunahara et al., 1996)
ACII, IV ⁽¹⁾ , VII ⁽¹⁾	↑	(Sunahara et al., 1996)
GIRK1-4	↑	(Coetzee et al., 1999)
N-, P/Q-, R-, T-type VDCC	↓	(Vignali et al., 2006)
PLC β_{1-3}	↑	(Exton, 1997)
PLA ₂	↑	(Jelsema & Axelrod, 1987)
PI3K- $\beta^{(2)}$, - γ	↑	(Maier et al., 1999)
GRK2,3	↑	(Tesmer et al., 2005)
Raf-1	↑	(Pumiglia et al., 1995)
p140 ^{Ras-GEF}	↑	(Mattingly & Macara, 1996)
P-Rex1 ⁽³⁾	↑	(Mayeenuddin et al., 2006)
Btk	↑	(Tsukada et al., 1994)
Tsk	↑	(Langhans-Rajasekaran et al., 1995)
FLJ00018	↑	(Ueda et al., 2008)
Phosducin und verwandte Proteine	(-) ⁽⁴⁾	(Schulz, 2001)

¹ AC wird nur nach G α_s -vermittelter Stimulation durch G $\beta\gamma$ überadditiv aktiviert.

² Die Stimulation wurde bisher nur unter *in vitro* Bedingungen gezeigt.

³ P-Rex1 ist ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor für die kleine GTPase Rac und wird synergistisch durch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat und G $\beta\gamma$ stimuliert.

⁴ Phosducin und Phosphoducin-verwandte Proteine regulieren G-Protein-vermittelte Signale, indem sie an G $\beta\gamma$ binden und somit die Interaktion des Dimers mit der Zellmembran verhindern.

↑ = Stimulation; ↓ = Inhibition; AC: Adenylylzyklase; Btk: Bruton's Tyrosin-Kinase; FLJ00018: Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für die kleinen GTPasen Rac und Cdc42; GIRK: G-Protein-gekoppelte einwärts gleichrichtende K⁺-Kanäle; GRK: G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase; p140^{Ras-GEF}: Guaninnukleotid-Austauschfaktor für die kleine GTPase Ras; PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase; PLA₂: Phospholipase A₂; PLC β : Phospholipase C β ; Raf-1: Mitglied der Raf/Mil-Unterfamilie von Serin/Threonin- Proteinkinasen; Tsk: Interleukin-2 (IL-2)-induzierte Tyrosin-Kinase (Itk); VDCC: spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle. (Modifiziert nach Nürnberg, 2004).

Der Gedanke einer Isoformselektivität G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelter Funktionen wird in jüngerer Zeit jedoch wieder intensiv diskutiert (Jones et al., 2004; Robishaw & Berlot, 2004). Eine Möglichkeit der Selektivität von G $\beta\gamma$ -Komplexen wird hierbei besonders hervorgehoben: Die G γ -Untereinheiten zeigen im Gegensatz zu den G β -Untereinheiten eine wesentlich stärkere Diversität ihrer Isoformen, die auch über Speziesgrenzen hinweg gefunden werden kann. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass die G γ -Untereinheit die Selektivität der G $\beta\gamma$ -Komplexe bestimmt. Daher wurde in Studien der genetische „knock-out“ verschiedener G γ -Isoformen untersucht. Hier zeigten sich spezifische Funktionen für G γ_3 und G γ_7 in Mäusen, G γ_2 in Zebrafisch sowie G γ_{1+2} in *Arabidopsis Thaliana* (Schwindinger et al., 2003; Schwindinger et al., 2004; Leung et al., 2006; Trusov et al., 2007). Die zugrunde liegenden Mechanismen konnten bislang jedoch noch nicht geklärt werden. Des Weiteren wurde *in vitro* keine Selektivität von G $\beta\gamma$ -Komplexen gegenüber G α -Untereinheiten und Effektoren nachgewiesen, was auf eine mögliche Beteiligung weiterer zellulärer Komponenten an der Regulation hindeutet (Robishaw & Berlot, 2004; Smrcka, 2008).

Durch $G\beta\gamma$ -Komplexe werden letztendlich mehr Effektoren reguliert als durch $G\alpha$ -Untereinheiten, darunter auch solche, die ebenfalls $G\alpha$ -abhängig reguliert werden (vgl. 1.2.2.1 und Tabelle 1.1). Hierbei kann die Wirkung der $G\beta\gamma$ -Komplexe sowohl synergistisch, als auch antagonistisch zu der Wirkung von $G\alpha$ -Untereinheiten sein. So wird beispielsweise die $G\alpha_s$ -vermittelte Aktivierung der Adenylylzyklasen durch $G\beta\gamma$ -Komplexe im Fall der Adenylylzyklase II potenziert und die der Adenylylzyklase I inhibiert (Cabrera-Vera et al., 2003).

Im Gegensatz zu $G\alpha$ -Untereinheiten erfahren $G\beta\gamma$ -Komplexe wahrscheinlich keine signifikanten Konformationsänderungen beim Übergang vom aktiven in den inaktiven Zustand. Ihr regulatorischer Einfluss hängt alleine von ihrer Bindung an $G\alpha$ -Untereinheiten ab. Da die Bindungsstellen für die $G\alpha$ -Untereinheiten überwiegend mit denen der Effektoren überlappen, kann ein im Heterotrimer vorliegender $G\beta\gamma$ -Komplex keine Interaktion mit seinen Effektoren eingehen. Zudem weisen $G\beta\gamma$ -Komplexe keine enzymatische Aktivität auf. Die $G\beta\gamma$ -vermittelte Signalweiterleitung kann prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen: Entweder durch die Rekrutierung zytosolischer Proteine durch den membrangebundenen $G\beta\gamma$ -Komplex an die Plasmamembran oder durch eine allosterische Aktivierung. Ein Beispiel für einen rein durch Rekrutierung aktivierten Effektor ist die β -adrenerge Rezeptor Kinase (β -ARK; Pitcher et al., 1992). Ein weiterer Effektor, bei dessen Aktivierung eine Rekrutierung offensichtlich keine Rolle spielt, sind die G-Protein-regulierten einwärts gleichrichtenden K^+ -Kanäle (GIRK), die durch eine Konformationsänderung in der Transmembranregion aktiviert werden (Logothetis et al., 1987; Mirshahi et al., 2003).

1.2.3 Rezeptor-Tyrosin-Kinase-induzierte Signaltransduktion

Eine weitere große Gruppe von Transmembranrezeptoren stellen die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) dar (s. 1.1). Zu den Liganden dieser Rezeptorklasse zählen Peptidhormone wie das Insulin und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise der epidermale Wachstumsfaktor. Basierend auf ihrem strukturellen Aufbau werden die 58 bisher bekannten RTKs in 20 Subfamilien unterteilt (Blume-Jensen & Hunter, 2001). Sie setzen sich aus einer glykosylierten, extrazellulären Domäne und einem zytoplasmatischen Anteil zusammen, welche durch eine einzelne helikale Membrandomäne verbunden sind. Der extrazelluläre Teil der verschiedenen RTKs ist für die Ligandenbindung verantwortlich und kann eine Vielzahl unterschiedlicher Sequenzmotive enthalten. Beispielsweise enthalten Mitglieder der EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptorfamilie zwei Cystein-reiche Regionen in ihrer extrazellulären Domäne, während sich die Familie des PDGF (*platelet-derived growth factor*)-Rezeptors durch fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen auszeichnet (s. Abbildung 1.3 A; Malarkey et al., 1995; Bazley & Gullick, 2005). Der zytoplasmatische Bereich der RTKs wird in die Juxtamembranregion, die Kinasedomäne und den carboxyterminalen Bereich unterteilt (Ullrich & Schlessinger, 1990).

Nach ihrer Aktivierung initiieren RTKs durch Assoziation mit spezifischen Effektoren intrazelluläre Signalkaskaden und geben dadurch den externen Stimulus an zyto-

plasmatische oder Zellkern-lokalisierte Zielproteine weiter. Prototyp für Phosphotyrosin-bindende Domänen ist die häufig vorkommende SH2-Domäne (benannt nach der Homologie zur 2. Domäne der Kinase Src; *src-homology 2*; Pawson & Gish, 1992; Pawson, 1995). Aber auch PTB (*phosphotyrosine binding*)-Bindungsmotive vermitteln die Interaktion von Effektoren mit phosphorylierten Tyrosinen (Kavanaugh et al., 1995). Dabei bestimmen die umgebenden Aminosäuren die Selektivität dieser Interaktionen (Songyang et al., 1993; van der & Pawson, 1995). Neben SH2-Domänen besitzen viele Effektoren auch SH3 (*src-homology 3*)-Domänen, welche an prolinreiche Sequenzen in Proteinen binden können (Yu et al., 1994). Die Klasse I_A PI3-Kinase und die PLC γ binden beispielsweise über zwei SH2-Domänen an aktivierte RTKs. Anschließend werden beide unter anderem an die Plasmamembran rekrutiert und so in räumliche Nähe zu ihrem spezifischen Substrat, dem Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, gebracht (s. 1.3; Wymann & Pirola, 1998; Matsuda et al., 2001; Engelman et al., 2006, Nürnberg & Jeanclous, 2008).

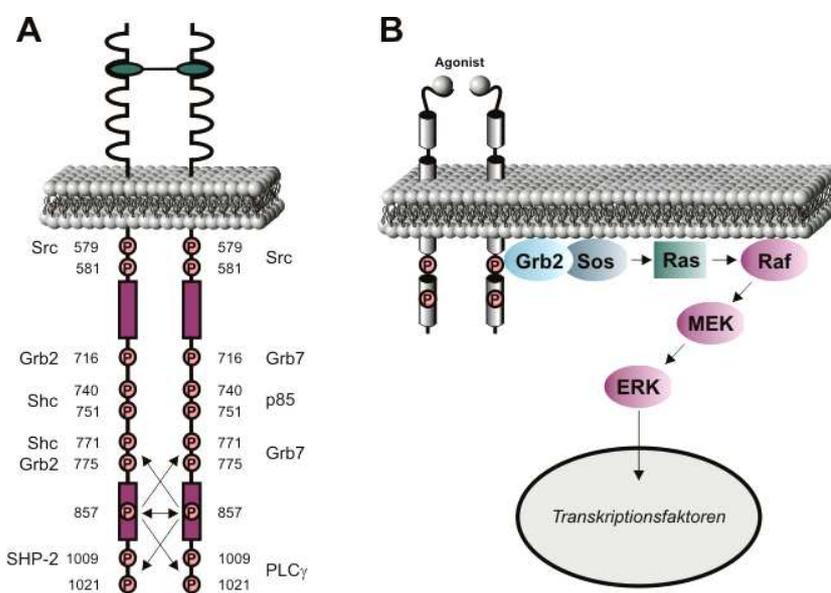


Abbildung 1.3: Signaltransduktion durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen am Beispiel des PDGF- β -Rezeptors. Die Bindung des bivalenten Liganden führt zu einer Rezeptor-Dimerisierung. Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen phosphorylieren sich gegenseitig. Die Phosphorylierung in der katalytischen Domäne (beim PDGF-Rezeptor zweigeteilt) erhöht die Kinase-Aktivität. Die phosphorylierten Tyrosinreste außerhalb der katalytischen Domäne dienen als Bindestellen für weitere Signaltransduktions-Proteine. Modifiziert nach: (Heldin & Westermark, 1999). **B: Schematische Darstellung der Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen über die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade.** (Erläuterungen siehe Text.)

Häufig führt die Stimulation von RTKs über die sogenannte Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade (MAPK-Kaskade) zu einer Expression von Genen, die an der Kontrolle von Wachstums- und Proliferationsprozessen beteiligt sind (s. Abbildung 1.3 B). Ein wichtiges Signalprotein für die mitogene Signalübertragung ist das Adapterprotein Grb2 (*growth factor receptor binding protein 2*; Lowenstein et al., 1992). Mit Hilfe seiner SH2-Domäne kann Grb2 mit autophosphorylierten RTKs, aber auch mit Phosphotyrosinen anderer Adapterproteine wie SHC und Gab1 interagieren. Über seine SH3-Motive bindet Grb2 den Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos (*son of sevenless*), wodurch nach Rezeptoraktivierung eine Translokation von Sos an die Zellmembran initiiert wird (Holgado-Madruga et al., 1996). Damit kommt Grb2 die Rolle eines Adapters zwischen RTK und Sos zu. Sos wiederum ist

ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) für das an der Membran verankerte Guaninnukleotid-bindende Protein Ras. Aktives Ras spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen (s. 1.2.6; Downward, 1997). Daher stellen auch Entartungen dieser Signalkaskade, angefangen von der Rezeptor-Tyrosin-Kinase bis zu Ras-Effektoren, eine der häufigsten Ursachen für die Entstehung von Malignomen dar (Brugge et al., 2007).

1.2.4 Aufbau und Funktion von Ras-Proteinen

Die kleine GTPase Ras wurde zunächst als ein Sarkom-auslösender Faktor in Rattenviren beschrieben (Ras = *rat sarcoma*). Hier wurden zwei verschiedene Isoformen identifiziert, Harvey-Ras (H-Ras; Harvey, 1964) und Kirsten-Ras (K-Ras; Kirsten et al., 1967). Später wurden auch protoonkogene Homologe beim Menschen gefunden, und mittlerweile sind über 150 Mitglieder der Ras-Superfamilie bekannt (Takai et al., 2001). Diese Superfamilie untergliedert sich aufgrund struktureller Homologien der Effektorregionen in die Ras-, Rho-, Rab-, Arf- und Ran-Subfamilien. Im Folgenden soll die Ras-Familie vorgestellt werden, die aus mindestens 21 Mitgliedern besteht, unter ihnen H-Ras, K-Ras (A und B), N-Ras, R-Ras, TC21 / R-Ras2 und M-Ras / R-Ras3.

Die Aktivität der kleinen GTPasen wird ebenfalls durch den Austausch von GDP zu GTP in einem unidirektionalen Zyklus reguliert. Analog zu den heterotrimeren G-Proteinen liegen kleine GTPasen im GDP-gebundenen Zustand in ihrer inaktiven Form vor und werden durch den Austausch von GDP zu GTP in eine aktive Konformation überführt. Dieser Zyklus wird durch spezifische Regulatoren eng kontrolliert. Der Nukleotidaustausch wird durch Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs) wie Sos, Ras-GRF oder RasGRP katalysiert (Geyer & Wittinghofer, 1997; Mitin et al., 2005) und resultiert in einer Konformationsänderung zweier Schalterregionen (switch I und II), welche die Bindung von Ras an seine Effektoren ermöglicht (Lowy & Willumsen, 1993; Takai et al., 2001). Die Inaktivierung kleiner GTPasen erfolgt durch die Hydrolyse von GTP zu GDP aufgrund ihrer intrinsischen GTPase-Aktivität. Die Kontrolle der Intensität dieser intrinsisch relativ schwachen GTPase-Aktivität und somit des zeitlichen Ablaufs der Inaktivierung wird durch GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) sichergestellt (Geyer & Wittinghofer, 1997; Mitin et al., 2005).

Von den Mitgliedern der Ras-Familie wurden die drei klassischen Ras-Isoformen ausführlich charakterisiert. Die 21 kDa großen Ras-Proteine werden durch drei Ras-Gene kodiert: H-Ras, N-Ras sowie die beiden Spleißvarianten K-RasA und K-RasB (Barbacid, 1987; Bos, 1989) und weisen große Sequenzhomologien auf (s. Abbildung 1.4). H-Ras-, N-Ras- und K-RasB-Proteine bestehen aus 188 Aminosäuren, K-RasA umfasst dagegen 189 Aminosäuren (Lowy & Willumsen, 1993). Innerhalb eines die ersten 86 Aminosäuren umfassenden Bereichs, welcher die Schalter I und II Regionen beinhaltet, sind die vier Ras-Isoformen identisch (Boriack-Sjodin et al., 1998). Die Schalter I-Region (AS 32 - 40) stellt die Bindungsdomäne für Effektorproteine dar, während die Schalter II-Region (AS 60 - 74) den Guaninnukleotid-Austausch vermittelt und so an der Ras-Aktivierung beteiligt ist. Die nächste

80 Aminosäuren umfassende Region weist eine Sequenzhomologie von nur noch 85 % zwischen den einzelnen Ras-Isoformen auf (Bar-Sagi, 2001). Daran schließt sich die C-terminale, hypervariable Region an, in der nur das CAAX-Motiv (C: Cystein, A: aliphatische Aminosäure, X: Methionin oder Serin) am Ende konserviert vorliegt. Die CAAX-Box (s.1.2.2.2; Wright & Philips, 2006) repräsentiert das posttranslationale Modifizierungsmotiv der Ras-Proteine, wobei der Cystein-Rest farnesyliert und nach proteolytischer Spaltung des AAX-Restes methyliert wird (Clarke, 1992; Cook et al., 1998; Fu & Casey, 1999; Michaelson et al., 2005). Diese Modifikation ist jedoch alleine nicht ausreichend für eine funktionelle Membranassoziation (Laude & Prior, 2008). Deshalb werden, abgesehen von K-RasB, alle anderen Ras-Isoformen zusätzlich einer Palmitoylierung an weiteren Cystein-Resten der hypervariablen Domäne unterzogen (s. Abbildung 1.4; Bar-Sagi, 2001). Diese Thioesterbindung ist reversibel und bedingt dadurch die Lokalisation der entsprechenden Ras-Isoform auf Endo- (depalmitoyliert) oder Plasmamembranen (palmitoyliert; Plowman & Hancock, 2005). K-RasB hingegen wird durch carboxyterminale Polylysine-Reste an der Plasmamembran stabilisiert.

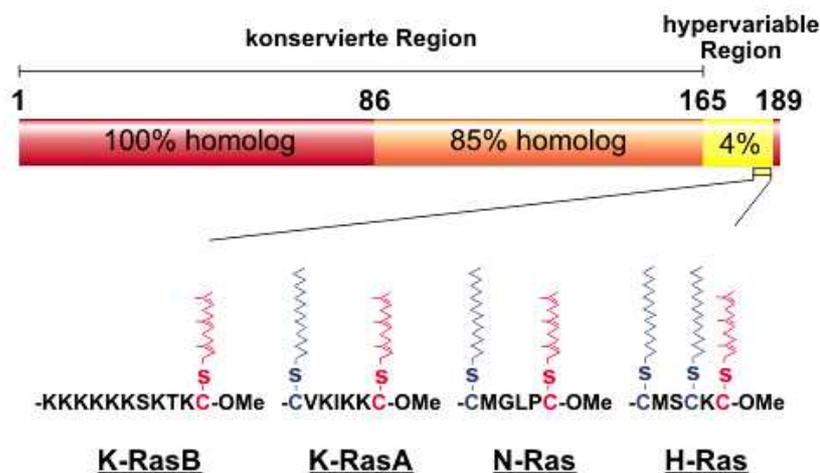


Abbildung 1.4: Posttranslationale Modifikationen der Ras-Isoformen. Die Sequenzen der Isoformen sind in den ersten 86 und in den letzten vier Aminosäuren des CAAX-Motives zu 100 % und in den Aminosäuren 87 - 165 zu 85 % identisch. Sie unterscheiden sich jedoch in der C-terminalen hypervariablen Region (weiß) stark voneinander. Die für die Verankerung in der Membran zuständige Region ist mit allen posttranslationalen Veränderungen vergrößert dargestellt. Alle Isoformen werden nach Entfernung des AAX-Restes methyliert und farnesyliert (alternativ z.T. auch geranylgeranyliert), K-RasA, N-Ras und H-Ras werden zusätzlich palmitoyliert. K-RasB hat als Lokalisationssignal eine polybasische Domäne aus Lysinresten. Die Bindung von Ras-Effektoren erfolgt in der hoch homologen Region (Aminosäuren 32 - 40). (Modifiziert nach Bar-Sagi, 2001).

Anhand von geninaktivierten „knock-out“-Mäusen wurde eine mögliche Kompensation /Substitution der verschiedenen Ras-Isoformen untereinander untersucht. Mäuse, in denen entweder H-Ras, N-Ras oder sogar beide (H- und N-) Ras-Gene deletiert wurden, zeigten jedoch keine Einschränkungen in ihrer Entwicklung. Andererseits war die Deletion von K-Ras embryonal letal (Umanoff et al., 1995; Johnson et al., 1997; Ise et al., 2000).

Dies lässt vermuten, dass die Funktionen von H-Ras und N-Ras durch andere Ras-Proteine übernommen werden können, während K-Ras nicht substituierbar ist. Diese Befunde waren besonders erstaunlich, da die Ras-Isoformen eine extrem hohe Sequenzhomologie aufweisen und *in vitro* mit den gleichen Regulatoren und Effektoren interagieren. Jedoch belegten Studien Unterschiede bei der Interaktion der verschiedenen Ras-Isoformen

mit ihren Regulatoren bzw. Effektoren (Jones & Jackson, 1998; Yan et al., 1998; Voice et al., 1999; Wolfman, 2001).

Deshalb geht man derzeit davon aus, dass die verschiedenen Ras-Isoformen spezifische zelluläre Effekte regulieren. Studien zur Beantwortung der Frage, wie diese hoch homologen Isoformen unterschiedliche Signale vermitteln, offenbarten eine starke räumliche Kompartimentierung der Signalkaskaden (Omerovic et al., 2007). *In vivo* haben Studien gezeigt, dass die Dynamik der Ras-Aktivierung und Lokalisation für die verschiedenen Mitglieder der Ras-Familie stark variieren (Mochizuki et al., 2001; Wolfman, 2001; Chiu et al., 2002; Bivona & Philips, 2003; Perez, I et al., 2004). Die Ursache hierfür ist die Assoziation mit unterschiedlichen zellulären Membranen, aber auch Membran-Mikrodomänen, die durch die Diversität der posttranslationalen Modifikationen der Ras-Isoformen beeinflusst werden (Chiu et al., 2002; Hancock, 2003).

R-Ras (für *related Ras viral oncogene homolog*) weist nur eine 55 %ige Sequenzhomologie zu den klassischen Ras-Isoformen auf und enthält weitere 26 Aminosäuren an seinem N-Terminus (Lowe et al., 1987; Ehrhardt et al., 2002). Innerhalb des essentiellen Teils der Effektorregion ist R-Ras mit den klassischen Ras-Isoformen identisch (AS 30 - 40), während die gesamte Effektorregion (AS 23 - 46) nur eine 60 %ige Identität aufweist (Self et al., 1993). In Übereinstimmung mit dieser hohen Sequenzidentität teilen R-Ras und die klassischen Ras-Isoformen einige ihrer Effektoren, wie beispielsweise die PI3-Kinasen, aber auch ein ganze Reihe von Regulatoren, wie Neurofibromin 1, p120Ras-GAP und RasGRF (Rey et al., 1994; Ebinu et al., 1998; Ohba et al., 2000; Ehrhardt et al., 2002).

1.2.5 Ras-vermittelte Signaltransduktion

Ras-Proteine werden überwiegend durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen reguliert. Alternativ kann Ras auch durch GPCRs/G-Proteine (van Biesen et al., 1995) sowie Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinase aktiviert werden (Ihle, 1995). Die Aktivierung von Ras ermöglicht die Bindung an Effektorproteine. Gemeinsames Merkmal von Ras-Effektoren ist die *Ras Binding Domain* (RBD), die mit hoher Affinität an die Effektorschleife von Ras-GTP bindet (Khosravi-Far et al., 1998). Es sind bereits eine Vielzahl von Ras-Effektoren beschrieben worden (Repasky et al., 2004), wobei die Proteinkinase Raf, der Austauschfaktor RaIGDS und die PI3-Kinasen als die wichtigsten Effektoren gelten (s. Abbildung 1.5; Nassar et al., 1995; Huang et al., 1998; Walker et al., 1999; Herrmann, 2003).

Der am besten charakterisierte Ras-Effektor-Signalweg ist die Aktivierung der drei Raf-Isoformen A-Raf, B-Raf und Raf-1 (Chong et al., 2003). Durch die Interaktion mit aktivem Ras wird die Serin/Threonin-Kinase Raf aus dem Zytosol an die Plasmamembran rekrutiert, was wiederum die nachfolgende Aktivierung von Raf ermöglicht (Stokoe et al., 1994; Leever et al., 1994). An der Regulation von Raf sind noch weitere Proteine beteiligt, wobei die Details bislang weitgehend unverstanden sind (Wellbrock et al., 2004). Aktiviertes Raf ist Ausgangspunkt einer mehrstufigen Signalkaskade von Kinasen, die sich nacheinander durch

Phosphorylierung aktivieren (Robinson & Cobb, 1997). So phosphoryliert Raf die Kinase MEK (MAPK-/ERK-Kinase). MEK wiederum phosphoryliert die Serin/Threonin-Kinase ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) sowohl an Tyrosin- als auch an Threonin-Resten. Die phosphorylierte ERK transloziert in den Zellkern und phosphoryliert dort bestimmte Transkriptionsfaktoren, wodurch letztendlich die Expression von Genen vermittelt wird, welche maßgeblich an der Proliferation, Differenzierung oder auch Transformation von Zellen beteiligt sind (s. Abbildung 1.5; Pouyssegur & Lenormand, 2003).

Ein weiterer Ras-Effektor ist RalGDS, welches einen Austauschfaktor für die kleine GTPase Ral darstellt. Über die Ral-abhängige Aktivierung von Cdc42 und Rac1 ist Ras in der Lage, auch die zytoskeletale Organisation sowie die Bildung von Filopodien und Lamellopodien zu beeinflussen (Wennerberg & Der, 2004). Des Weiteren ist Ras über die Ral-vermittelte Aktivierung der Phospholipase D 1 (PLD1) an der Kontrolle von Endo- und Exozytose-Prozessen sowie des Vesikeltransports beteiligt (Jenkins & Frohman, 2005). PI3-Kinasen als Ras-Effektoren werden in Kapitel 1.3 beschrieben.

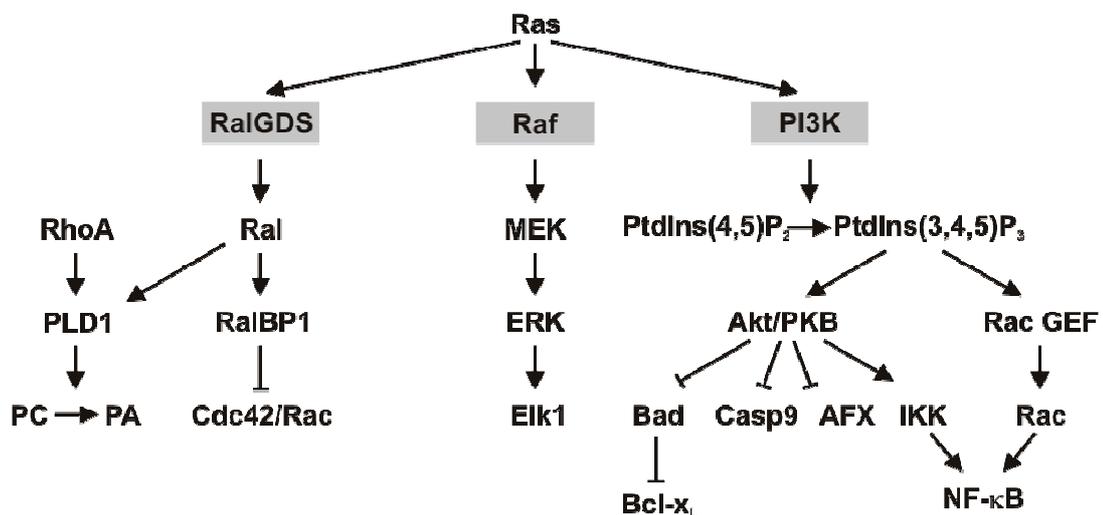


Abbildung 1.5: Ras-vermittelte Signaltransduktion. Schematische Darstellung der drei bedeutendsten Ras-induzierten Signaltransduktionswege. (Modifiziert nach Shields et al., 2000).

Aufgrund ihrer protoonkogenen Natur wurden die verschiedenen klassischen Ras-Isoformen besonders eingehend charakterisiert. Verantwortlich hierfür sind aktivierende Punktmutationen der H-Ras-, K-Ras- und N-Ras-Gene, welche insbesondere mit humanen Karzinomen und Leukämien in Verbindung gebracht werden (Bos, 1989; Malumbres & Barbacid, 2003; Repasky et al., 2004; Giehl, 2005). Zusätzlich können aber auch konstitutiv aktive Mutationen der R-Ras-Isoformen eine Entartung von Zellen auslösen (Marte et al., 1997; Graham et al., 1999; Rodriguez-Viciano et al., 2004). Diese Tumor-assoziierten Mutationen blockieren das Protein in einem konstitutiv aktiven, GTP-gebundenen Zustand, was zu einer permanenten Ras-vermittelten Aktivierung führt. Zwei Signalwege werden hauptsächlich für die Ras-abhängige Transformation und Tumorgenese verantwortlich gemacht: Erstens die Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalwegs (Khosravi-Far et al., 1998) und zweitens die PI3-Kinase-vermittelte Signaltransduktion (Downward, 1998; Brazil & Hemmings, 2001). Interessanterweise wird die R-Ras-abhängige Tumorgenese vermutlich ausschließlich über PI3-Kinasen vermittelt (Marte et al., 1997).

1.3 Phosphoinositid 3-Kinasen

Neben zyklischen Nukleotiden oder Ionen können auch Lipide sekundäre Botenstoffe darstellen. Ein Präkursor für derartige sekundäre Botenstoffe (aber wahrscheinlich auch ein eigenständiger Botenstoff) ist das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns-4,5-P₂), das durch verschiedene Enzyme (wie die Phospholipasen A, C und D) zu verschiedenen Botenstoffen gespalten werden kann. Kinasen können den Inositolring aber auch phosphorylieren. Die Kinasen, die den Inositolring an der D3 Position phosphorylieren nennt man Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3-Kinasen; Stephens et al., 1993; Fruman et al., 1998; Foster et al., 2003; Lindmo & Stenmark, 2006; Nürnberg & Jeanclos, 2008).

1.3.1 Klassifizierung

Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten, Substratspezifitäten und Aktivierungsmechanismen werden die PI3-Kinasen in drei Klassen unterteilt (Lindmo & Stenmark, 2006):

Die Klasse III PI3-Kinasen sind die in der Evolution am stärksten konservierte Klasse und in allen eukaryotischen Zellen vorhanden (Engelman et al., 2006). Sie wurden zunächst in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert und aufgrund ihrer Beteiligung an intrazellulären Transportprozessen *vacuolar protein-sorting protein* (Vps34p) genannt (Schu et al., 1993). Kurz darauf wurde auch ein homologes Protein in Säugern nachgewiesen (Volinia et al., 1995). Die katalytische Untereinheit der Klasse III PI3-Kinasen ist mit einer regulatorischen Untereinheit Vps15p bzw. p150 assoziiert, welche interessanterweise eine Serin/Threonin-Proteinkinase-Aktivität aufweist und für die Membran-Assoziation von Klasse III PI3-Kinasen verantwortlich ist (s. Abbildung 1.6; Volinia et al., 1995; Panaretou et al., 1997). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* phosphoryliert Vps34p ausschließlich Phosphatidylinositol (PtdIns) und führt somit zur Bildung von PtdIns-3-P. Die Signalweiterleitung durch Lipide erfolgt generell durch deren Bindung an Effektorproteine, die über spezifische Bindungsdomänen verfügen. Diese Interaktion resultiert in einer Rekrutierung dieser Effektoren an Membranen, wo sie aktiviert werden (Lemmon, 2007). Die primäre PtdIns-3-P-bindende Proteindomäne ist die Zink-Finger ähnliche FYVE (*Fab1p-YOPB-Vps27p-EEA1*)-Domäne (Misra & Hurley, 1999; Sasaki et al., 2007). Weiterhin können auch Proteine, die eine Phox (PX)-Domäne tragen, PtdIns-3-P binden (Bravo et al., 2001; Sasaki et al., 2007). Klasse III PI3-Kinase-Aktivität wird auf frühen Endosomen und Autophagosomen gefunden und ist dort an der Regulation des Endosomen-Verkehrs und dem Bildungsprozess von Autophagosomen beteiligt (Gillooly et al., 2000; Kihara et al., 2001; Zeng et al., 2006).

Die Funktion der Klasse II PI3-Kinasen ist weniger gut verstanden. Obwohl sie *in vitro* sowohl PtdIns als auch PtdIns-4-P phosphorylieren können, wird angenommen, dass ihr *in vivo*-Substrat, genau wie für die Klasse III PI3-Kinasen, PtdIns ist (Lindmo & Stenmark, 2006; Falasca & Maffucci, 2007). Klasse II PI3-Kinasen sind jedoch im Gegensatz zu den Klasse III und Klasse I PI3-Kinasen monomere Enzyme und größtenteils bereits unstimuliert in der Membranfraktion zu finden (Ono et al., 1998). Sie besitzen ein Molekulargewicht von 170 - 210 kDa. Charakteristisch für die Klasse II PI3-Kinasen ist ein längerer C-Terminus,

der eine PX- und eine C2-Domäne beinhaltet (s. Abbildung 1.6; MacDougall et al., 1995). Aus diesem Grund werden die drei in Säugerzellen gefundenen Klasse II PI3-Kinase-Isoformen auch als PI3-Kinase-C2 α , PI3-Kinase-C2 β und PI3-Kinase-C2 γ bezeichnet (alternativ auch PI3-Kinase-II α , PI3-Kinase-II β und PI3-Kinase-II γ). Obwohl die Klasse II PI3-Kinasen die Bildung des gleichen Produktes wie die der Klasse III katalysieren, regulieren diese Enzyme andere Signalwege. Vermutlich ist dies durch ihre Lokalisation bedingt. Sie werden an trans-Golgi Membranen nachgewiesen, sollen aber nach Rezeptor-Stimulation auch an die Plasmamembran translozieren und so Rezeptor-induzierte Signale vermitteln können (Turner et al., 1998; Brown et al., 1999; Domin et al., 2000; Arcaro et al., 2000; Brown & Shepherd, 2001). Des Weiteren konnte auch eine Interaktion mit Clathrin gezeigt werden, was eine Beteiligung an Clathrin-vermittelten Transportvorgängen nahe legt (Gaidarov et al., 2001; Meunier et al., 2005).

1.3.2 Klasse I PI3-Kinasen

Klasse I PI3-Kinasen sind Rezeptor-regulierte, heterodimere Enzyme, die aus einer etwa 110 kDa großen katalytischen Untereinheit (p110) und einer kleineren (50 - 101 kDa) nicht-katalytischen Untereinheit aufgebaut sind (s. Abbildung 1.6; Vanhaesebroeck et al., 2001; Hawkins et al., 2006; Nürnberg & Jeanclos, 2008). *In vitro* können Klasse I PI3-Kinasen sowohl PtdIns; PtdIns-4-P als auch PtdIns-4,5-P₂ phosphorylieren, wobei *in vivo* wahrscheinlich nur PtdIns-4,5-P₂ phosphoryliert wird (Vanhaesebroeck et al., 2001). In Säugerzellen kennt man zurzeit vier verschiedene p110-Isoformen: p110 α (Hiles et al., 1992), p110 β (Hu et al., 1993), p110 γ (Stoyanov et al., 1995) und p110 δ (Vanhaesebroeck et al., 1997). Die heterodimeren Enzyme bezeichnet man entsprechend als PI3-Kinasen α , β , γ und δ . Klasse I PI3-Kinasen lokalisieren überwiegend im Zytosol, werden aber auch im Zellkern gefunden (Brock et al., 2003). Sie werden durch Zelloberflächen-Rezeptoren aktiviert und dabei aus dem Zytosol an die Plasmamembran rekrutiert. Aufgrund ihrer Sequenzhomologie und Funktion werden sie in Klasse I_A und I_B unterteilt: Die Klasse I_A PI3-Kinasen α , β und δ bestehen aus der katalytischen p110 und einer 50 - 85 kDa großen regulatorischen Untereinheit (Prototyp: p85) und werden vor allem durch Rezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosin-Kinase-Aktivität aktiviert (s. 1.2.4). Das bisher einzig bekannte Mitglied der Klasse I_B PI3-Kinasen ist die PI3-Kinase γ . Das PI3-Kinase γ -Heterodimer besteht aus einer katalytischen p110 γ -Untereinheit sowie einer 87 oder einer 101 kDa großen nicht-katalytischen Untereinheit und wird vor allem über GPCRs durch G $\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert (s. 1.2.2.2).

Obwohl die Klasse I PI3-Kinasen aufgrund einer unterschiedlichen Struktur und verschiedenartiger Regulationsmechanismen in zwei Subfamilien unterteilt werden, zeigen die katalytischen p110-Untereinheiten dennoch eine starke Ähnlichkeit zueinander (s. Abbildung 1.6). Ihre Primärstruktur weist drei konservierte Bereiche auf, welche auch als Homologie-Regionen (HR) bezeichnet und von C- nach N-terminal durchnummeriert werden (HR1 - HR3; Vanhaesebroeck et al., 2001). Da die katalytischen Untereinheiten, bis auf den

N-Terminus, dieselbe Anordnung konservierter Domänen aufweisen, wird davon ausgegangen, dass alle vier katalytischen Untereinheiten dieselbe prinzipielle Struktur besitzen. Die einzige bisher veröffentlichte Kristallstruktur einer katalytischen Untereinheit ist die einer N-terminal trunkeierten p110 γ , welche somit als Strukturmodell der katalytischen Klasse I PI3-Kinase-Untereinheiten dient (Walker et al., 1999).

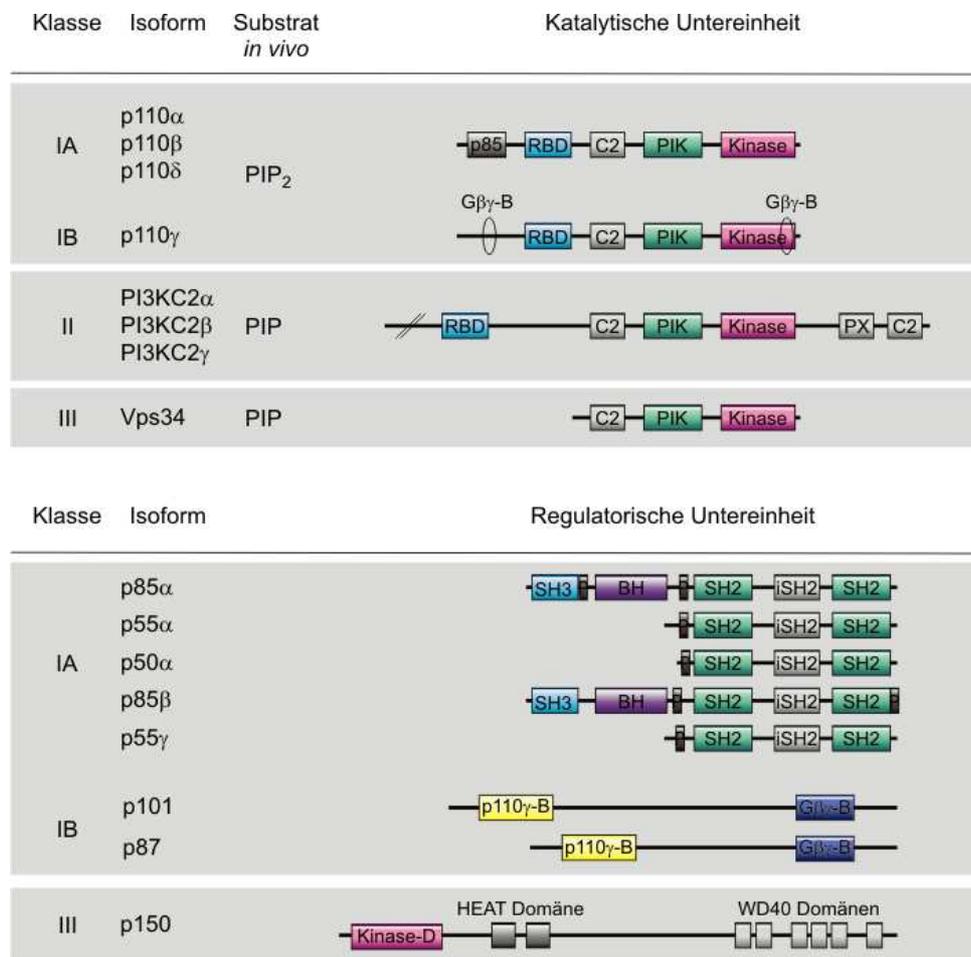


Abbildung 1.6: Strukturmerkmale der katalytischen und regulatorischen PI3-Kinase-Untereinheiten. Die Klassifizierung der PI3-Kinasen erfolgt anhand ihrer Substratspezifität und Domänen-Organisation, welche hier schematisch wiedergegeben sind. Die Bezeichnungen der Domänen sind wie folgt: p85: p85-Bindungs-Domäne; RBD: Ras-Bindungs-Domäne; C2: Proteinkinase-C-Homologie-Domäne 2; PIK: PIK-Domäne; Kinase: katalytische PI3-Kinasedomäne; PX: Phox-Domäne; SH3: Src-Homologie 3-Domäne; P: Prolin-reiche-Domäne; BH: BH (*breakpoint cluster region homology*)-Domäne; SH2: Src-Homologie 2-Domäne; iSH2: inter SH2-Domäne; p110 γ -B: p110 γ -Bindungs-Domäne; G β γ -B: G β γ -Bindungs-Domäne; Kinase-D: Serin/Threonin-Kinasedomäne; HEAT-Domäne: HEAT (*Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR*) Domäne; WD40 Domänen: WD-40 repeat Domäne. (Modifiziert nach Marone et al., 2008).

Die Domänen, die alle katalytischen Untereinheiten aufweisen, sind eine katalytische Kinasedomäne (Kinase), eine sog. PIK-Region (PIK), eine C2-Domäne (C2) und eine Ras-Bindungs-Domäne (RBD). Der N-Terminus weist bei Klasse I_A und I_B PI3-Kinasen zwar Unterschiede auf, jedoch lokalisieren hier bei allen vier katalytischen Untereinheiten die Bindungsregionen für ihre jeweiligen regulatorischen bzw. nicht-katalytischen Untereinheiten (s. Abbildung 1.6). Die Kristallstruktur der p110 γ macht deutlich, dass die Teilstrukturen des Enzyms um die als Rückgrat dienende PIK-Domäne angeordnet sind. Die PIK-Domäne oder HR2 kommt in allen Lipidkinasen vor und wurde zuerst in PI-4-Kinasen gefunden (Flanagan

et al., 1993). Die HR2 besteht aus fünf Paaren antiparalleler α -Helices und wird daher auch als helikale Domäne bezeichnet. Ihre Abwesenheit geht mit dem Verlust der Lipidkinase-Aktivität einher (Molendijk & Irvine, 1998).

Die katalytische HR-1-Domäne ist am stärksten konserviert. Ihre Struktur ähnelt der von Kinasedomänen bekannter Proteinkinasen, insbesondere an der ATP-Bindungsstelle. In der Tat zeigen einige PI3-Kinasen neben ihrer charakteristischen Lipidkinase- auch eine Proteinkinase-Aktivität (Hunter, 1995; Maier et al., 1999; Czupalla et al., 2003). Die Kinasedomäne der p110 γ lässt sich wiederum in eine N-terminale und eine C-terminale Subdomäne aufteilen, zwischen denen das ATP gebunden wird. Die Wirkung des aus *Penicillium wortmanni* gewonnenen PI3-Kinase-Inhibitors Wortmannin (Baggiolini et al., 1987) beruht auf einer kovalenten Bindung an das Lysin 833, welches den α -Phosphatrest des ATPs bindet (Walker et al., 2000; Kirsch et al., 2001). Die Mutation dieses Lysins zu Arginin (K833R) führt ebenfalls zum Verlust der enzymatischen Aktivität (Wymann et al., 1996; Stoyanova et al., 1997).

Die HR3-Region der PI3-Kinasen beinhaltet eine C2-Domäne. C2-Domänen sind häufig an der Bindung von Proteinen an Phospholipidmembranen beteiligt. So konnte für die isolierte C2-Domäne der p110 γ eine Ca²⁺-unabhängige Interaktion mit Phospholipidvesikeln gezeigt werden (Walker et al., 1999).

Alle katalytischen p110-Untereinheiten der Klasse I PI3-Kinasen besitzen als weiteres gemeinsames Strukturmerkmal eine Ras-Bindungs-Domäne (RBD). Diese liegt N-terminal der HR3 und wird als HR4 bezeichnet. Die Struktur der Ras-Bindungs-Domäne im p110 γ -Kristall aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt mit zwei flankierenden α -Helices entspricht der Struktur der RBD bekannter Ras-Effektoren wie Raf.

Die Interaktion von katalytischen p110-Untereinheiten der Klasse I_A PI3-Kinasen α , β und δ mit ihren 50 – 85 kDa großen regulatorischen Untereinheiten erfolgt über eine noch weiter N-terminal gelegene sogenannte p85-Bindungsdomäne. Hingegen gibt es bei der Klasse I_B PI3-Kinase γ widersprüchliche Befunde zur Bedeutung des N-terminalen Bereichs der p110 γ -Untereinheit für ihre Interaktion mit der nicht-katalytischen p101-Untereinheit (Leopoldt et al., 1998; Maier et al., 1999; Krugmann et al., 1999). Die vollständige 3D-Struktur des N-terminalen Bereichs der p110 γ ist jedoch nicht bekannt, da für die Kristallisation eine um die ersten 143 Aminosäuren verkürzte Untereinheit verwendet wurde. Unzweifelhaft ist jedoch, dass N-terminal eine Bindungs-Region für p101 vorliegt (Marone et al., 2008). Die kürzlich entdeckte zweite nicht-katalytische PI3-Kinase γ -Untereinheit, die p87 (p87^{PIKAP} oder p84; Suire et al., 2005; Voigt et al., 2005; Voigt et al., 2006) wurde aufgrund von Sequenzhomologien zu den p110 γ - und G β γ -Bindungsregionen der p101 gefunden. Daher wird auch hier eine Interaktion von p110 γ mit p87 in dieser Region vermutet (Marone et al., 2008).

Die Aktivität aller Klasse I PI3-Kinasen führt zu der Bildung des sekundären Botenstoffes PtdIns-3,4,5-P₃ sowie wahrscheinlich seines primären Metaboliten, PtdIns-3,4-P₂. Daher können diese identische intrazelluläre Effekte regulieren. PtdIns-3,4,5-P₃ und PtdIns-3,4-P₂ können, ähnlich wie PtdIns-3-P, zelluläre Proteine über die Interaktion mit spezifischen Domänen an die Plasmamembran translozieren und aktivieren (s. Abbildung 1.7). Bei den PtdIns-3,4,5-P₃-bindenden Domänen handelt es sich um Pleckstrin-

Homologie (PH)-Domänen, welche erstmals in Pleckstrin (*platelet and leukocyte C kinase substrate protein*), einem Hauptsubstrat der PKC, entdeckt wurden (Haslam et al., 1993). PH-Domänen sind durch ihre hohe strukturelle Ähnlichkeit definiert; ihre Sequenzähnlichkeit ist hingegen nur gering (Rebecchi & Scarlata, 1998). Etwa 10 % der PH-Domänen binden an PtdIns-4,5-P₂, PtdIns-3,4-P₂ und/oder PtdIns-3,4,5-P₃ mit hoher Spezifität sowie Affinität und regulieren so die Aktivität des entsprechenden Enzyms (Lemmon, 2007). Die Funktion der restlichen PH-Domänen ist bislang unklar. Viele binden ebenfalls mit geringer Affinität und Sensitivität an Lipide, wobei die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion unbekannt ist (Kavran et al., 1998; Lemmon & Ferguson, 2000). Die Rekrutierung von diversen GFP-fusionierten PH-Domänen in Abhängigkeit von spezifischen Phospholipiden an Membranen nutzt man als Werkzeug für die räumlich und zeitlich aufgelöste Darstellung der entsprechenden Phosphoinositide in lebenden Zellen (Balla et al., 2000; Rusten & Stenmark, 2006).

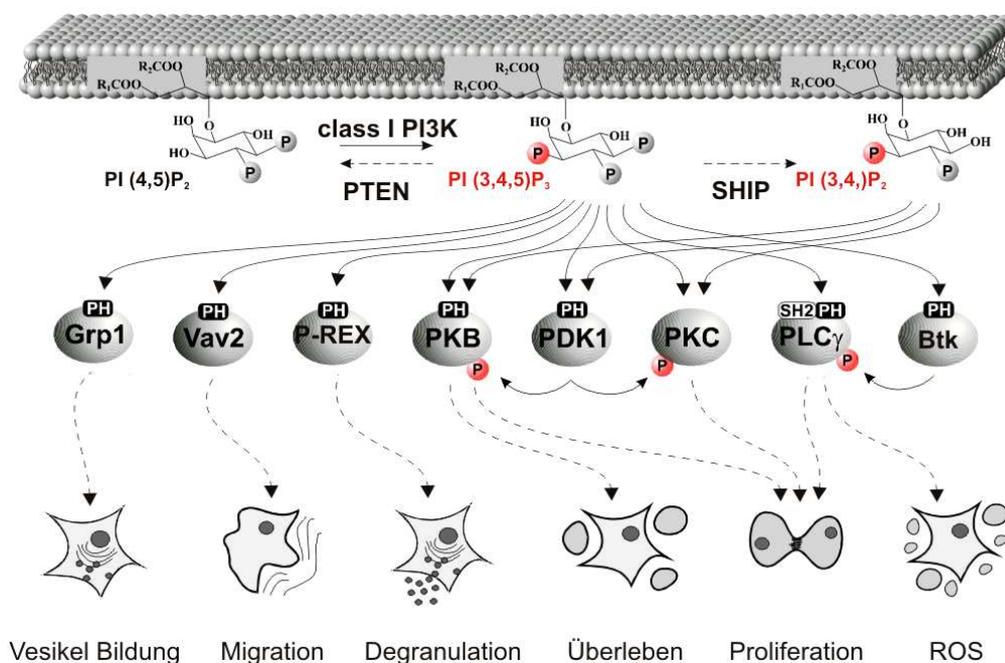


Abbildung 1.7: PI3-Kinase-abhängige Signaltransduktion. Rezeptor-abhängig aktivierte Klasse I_A PI3-Kinasen synthetisieren PtdIns-3,4,5-P₃, welches PtdIns-3,4,5-P₃-sensitive PH-Domänen beinhaltende Proteine (PtdIns-3,4,5-P₃-Sensoren) an die Plasmamembran rekrutiert. Aufgrund der starken Diversität dieser Effektoren sind die Klasse I PI3-Kinasen in der Lage, so verschiedene zelluläre Effekte wie die Bildung von Vesikeln, die Migration, die Degranulation, das Überleben, die Proliferation oder auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies zu regulieren. Die Modulation bzw. Abschaltung dieser Signalkaskade erfolgt durch die Dephosphorylierung von PtdIns-3,4,5-P₃ durch Phosphatasen wie SHIP bzw. PTEN. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

Die zeitliche und räumliche Regulation der PtdIns-3,4,5-P₃-Konzentrationen wird jedoch nicht nur durch PI3-Kinasen bedingt. PtdIns-3,4,5-P₃ kann durch Phosphatasen entweder an der D3- oder der D5-Position des Inositolrings dephosphoryliert werden. Für die Dephosphorylierung an der D5-Position ist beispielsweise SHIP (*SH2-Domänen enthaltende Inositid-5-Phosphatase*) verantwortlich (s. Abbildung 1.7; Woscholski & Parker, 1997; Sly et al., 2007). Einige der Phospholipid-sensitiven PH-Domänen interagieren selektiv mit

PtdIns-3,4-P₂ oder PtdIns-3,4,5-P₃, andere binden sowohl an PtdIns-3,4,5-P₃ als auch an PtdIns-3,4-P₂ mit unterschiedlicher Affinität. Somit kann die Dephosphorylierung an D5 zu einer Veränderung der Signalantwort führen. Die vollständige Abschaltung der Klasse I PI3-Kinase-vermittelten Signaltransduktion erfolgt hingegen durch Dephosphorylierung der D3-Position des Inositolrings durch entsprechende Phosphatasen wie PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*; s. Abbildung 1.7; Vanhaesebroeck et al., 2001; Sly et al., 2003; Suzuki et al., 2008).

Der am besten charakterisierte Effektor von Klasse I PI3-Kinasen ist die Serin/Threonin-Kinase Akt, das zelluläre Homolog des viralen Onkoproteins v-Akt (Downward, 2004; Cully et al., 2006). Infolge der Bildung von PtdIns-3,4,5-P₃ und PtdIns-3,4-P₂ wird Akt/PKB über seine PH-Domäne an die Membran rekrutiert, was eine Konformationsänderung von Akt zur Folge hat, die die nachfolgende Phosphorylierung erleichtert (Milburn et al., 2003). Das so an der Membran phosphorylierte und aktivierte Akt löst sich anschließend von der Membran und diffundiert durch das Zytosol in den Zellkern, wo es (vermutlich in beiden Kompartimenten) weitere Proteine phosphoryliert (Lawlor & Alessi, 2001). Zu den Substraten von Akt/PKB gehören z.B. Transkriptionsfaktoren der *forkhead*-Familie (Kops et al., 2002) oder die Kinasen GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3; Cross et al., 1995; Woodgett, 2001) und BAD (*Bcl-2 antagonist causing cell death*; Franke & Cantley, 1997). Über diese und weitere Effektoren wirkt Akt/PKB unter anderem Proliferations-fördernd sowie Apoptose-hemmend (Downward, 2004; Song et al., 2005; Cully et al., 2006).

Zu einer weiteren zentralen Effektorfamilie der PI3-Kinasen gehören kleine GTPasen wie Rac, Arf oder Rho. Diese werden über die PtdIns-3,4,5-P₃-abhängige Aktivierung von GEFs und/oder GAPs reguliert (Welch et al., 2003; Andrews et al., 2007b). Auf diese Weise sind die PI3-Kinasen in der Lage, auch zytoskeletale Prozesse wie Migration, Chemotaxis und den Vesikelverkehr zu beeinflussen. Zu den Rac- und teilweise auch Rho-regulierenden PI3-Kinase Effektoren zählen Rac-GEFs, wie Vav und P-Rex, aber auch SWAP-70, Sos, Tiam und DOCK180 (Han et al., 1998; Das et al., 2000; Welch et al., 2002; Leemhuis et al., 2004; Barber et al., 2007). Die PI3-Kinase-abhängige Regulation von Arf kann sowohl über die Aktivierung von Arf-GEFs als auch Arf-GAPs erfolgen. Zu den PH-Domänen beinhaltenden Arf-GEFs gehört beispielsweise der hoch selektive PtdIns-3,4,5-P₃-bindende Grp1 (*general receptor for phosphoinositides 1*; Klarlund et al., 1998; Gray et al., 1999).

Des Weiteren können PI3-Kinasen ein Mitglied der Tec-Kinase-Familie, die Btk (*Bruton's tyrosine kinase*), im Zusammenspiel mit Gβγ-Komplexen aktivieren (Miller & Berg, 2002; Takesono et al., 2002). Nach der PI3-Kinase-abhängigen Translokation der Kinase an die Plasmamembran wird diese durch Src-Kinasen aktiviert (Nore et al., 2000; Carpenter, 2004). Die Expression der Tec-Kinasen ist auf das hämatopoetische System beschränkt, wo sie in B-, T- und Mastzellen vorkommen. Sie vermitteln die Freisetzung von Kalzium und Diacylglycerol (DAG) über die Aktivierung der PLCγ und regulieren somit unter anderem die Entwicklung und Proliferation von Zellen (Gauld et al., 2002; Gomez-Rodriguez et al., 2007). Gleichzeitig kann die PLCγ auch direkt über ihre PH-Domäne durch PtdIns-3,4,5-P₃ reguliert und an die Membran rekrutiert werden (Falasca et al., 1998).

Anhand dieser Diversität von Effektoren wird deutlich, dass die PI3-Kinasen an vielen physiologischen, aber auch an vielen pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind. So kontrollieren vorwiegend die Mitglieder der Klasse I_A Zellwachstum, Differenzierung und Proliferation (Vanhaesebroeck et al., 2001; Hawkins et al., 2006). Fehlfunktionen der Klasse I_A PI3-Kinase Signalkaskade sind wahrscheinlich die häufigste Ursache für die Entwicklung von malignen Tumoren (Bachman et al., 2004; Samuels et al., 2004). Eine weitere Funktion der PI3-Kinasen, die über die Tyrosin-Kinase-vermittelte Aktivierung und somit Klasse I_A-abhängig reguliert wird, ist die Kontrolle von metabolischen Prozessen. Hier steht vor allem die Insulinrezeptorsubstrat (IRS)-vermittelte Aktivierung durch Insulin- (IR) oder Leptin-Rezeptoren im Vordergrund (Munzberg & Myers, Jr., 2005; Knight et al., 2006).

Durch die bevorzugte Expression der PI3-Kinasen γ und δ im hämatopoetischen System nehmen diese Isoenzyme zentrale Funktionen bei der Regulation des Immunsystems ein (Rommel et al., 2007; Konrad et al., 2008; Zebedin et al., 2008). Die PI3-Kinase δ ist hier überwiegend an Antigenrezeptor-induziertem Zellwachstum und Differenzierung von B-, T- und Mastzellen beteiligt (Okkenhaug et al., 2007). Demgegenüber nimmt die PI3-Kinase γ eine entscheidende Rolle in Chemokin- und Chemoattraktans-induzierten Migrationsprozessen von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen ein (Ruckle et al., 2006; Marone et al., 2008; Stephens et al., 2008; Barberis & Hirsch, 2008). Darüberhinaus weisen PI3-Kinasen bei vielen Autoimmunerkrankungen eine erhöhte Aktivität auf (Ruckle et al., 2006; Ehrhardt et al., 2006; Okkenhaug et al., 2007; Marone et al., 2008; Konrad et al., 2008).

Im Kardiovaskularsystem sind die PI3-Kinasen α , β und γ exprimiert. Ihre funktionelle Relevanz wurde für alle drei Isoformen nachgewiesen (Naga Prasad et al., 2000; Shioi et al., 2000; Crackower et al., 2002; Oudit et al., 2003; Patrucco et al., 2004; Puri et al., 2005; Vecchione et al., 2005; Hirsch et al., 2006; Marone et al., 2008).

Somit wird die Relevanz der PI3-Kinasen für Signalprozesse deutlich, die für die Entstehung einer Vielzahl von charakteristischen Krankheiten der westlichen Welt relevant sind, wie beispielsweise Krebs, Diabetes Typ 2, Adipositas, Autoimmun- und kardiovaskuläre Erkrankungen wie Koronare-Herz-Krankheit (KHK) und Herzinfarkt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass diese Proteinfamilie in den letzten Jahren im Zentrum der pharmazeutischen Forschung stand, bergen diese Lipidkinasen doch ein großes pharmakologisches, medizinisches und nicht zuletzt auch wirtschaftliches Potential. Gleichzeitig wird jedoch auch deutlich, wie wichtig hier eine präzise Aufklärung von spezifischen Funktionen und Regulationsmechanismen der einzelnen Isoformen ist, um die Entwicklung gezielter Therapieansätze zu ermöglichen. Im Folgenden wird deshalb die Regulation der beiden PI3-Kinase Subfamilien näher dargestellt.

1.3.2.1 Klasse I_A PI3-Kinasen

Die Klasse I_A der PI3-Kinasen besteht aus den drei Isoformen α , β und δ . Während die PI3-Kinasen α und β ubiquitär vorkommen, wird die PI3-Kinase δ hauptsächlich im

hämatopoetischen System exprimiert (Vanhaesebroeck et al., 2001). Entsprechend sind die $p110\alpha^{-/-}$ - und $p110\beta^{-/-}$ -Mäuse früh embryonal letal (Bi et al., 1999; Bi et al., 2002), während die $p110\delta^{-/-}$ - und $p110\delta^{KD/KD}$ -Mäuse Defekte des Immunsystems zeigen (Clayton et al., 2002; Jou et al., 2002; Okkenhaug et al., 2002; Ali et al., 2004). Die katalytischen Untereinheiten der Klasse I_A PI3-Kinasen heterodimerisieren mit regulatorischen Untereinheiten der p85-Familie. Die p85-Familie besteht aus fünf Mitgliedern, die durch drei Gene kodiert werden und sich strukturell sehr ähnlich sind. Eine Ausnahme bilden hier die $p55\gamma$, sowie die beiden kleineren Spleißvarianten von $p85\alpha$, welchen der N-terminale Bereich der größeren p85-Untereinheiten fehlt. Alle Mitglieder der p85-Familie weisen zwei SH2-Domänen, eine inter-SH2-Domäne, eine SH3-Domäne, eine BH-Domäne und ein bis zwei prolinreiche Domänen auf (s. Abbildung 1.6). Die inter-SH2-Domäne ist für die Dimerisierung mit der katalytischen Untereinheit verantwortlich (Klippel et al., 1993). Diese Interaktion von p85 mit den katalytischen Klasse I_A-Untereinheiten stabilisiert die sonst instabilen $p110\alpha$ -, β - und δ -Untereinheiten und führt gleichzeitig zu einer Inhibition der relativ hohen basalen Aktivität dieser katalytischen Untereinheiten (Yu et al., 1998b). Die beiden SH2-Domänen wiederum interagieren ihrerseits mit phosphorylierten pYXXM-Motiven, wie sie auf aktivierten Tyrosin-Kinasen zu finden sind (Klippel et al., 1992; Cohen et al., 1995; Songyang & Cantley, 1995). Die SH3-, die BH-Domänen und die prolinreichen Sequenzen sind an weiteren Protein-Protein Interaktionen beteiligt (Wymann & Pirola, 1998). Der genetische „knock-out“ von regulatorischen Klasse I_A PI3-Kinase-Untereinheiten erlaubt jedoch aufgrund einer fehlenden Selektivität bei der Heterodimerisierung von p85-Untereinheiten mit bestimmten Klasse I_A p110-Isoformen keine Isoform-spezifischen Aussagen über die Funktionen distinkter PI3-Kinasen (Fruman et al., 1998; Vanhaesebroeck et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die p85-Untereinheiten auch an Kinase-unabhängigen Signaltransduktions-prozessen beteiligt sind, was die Interpretation dieser Phänotypen zusätzlich erschwert (Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2001).

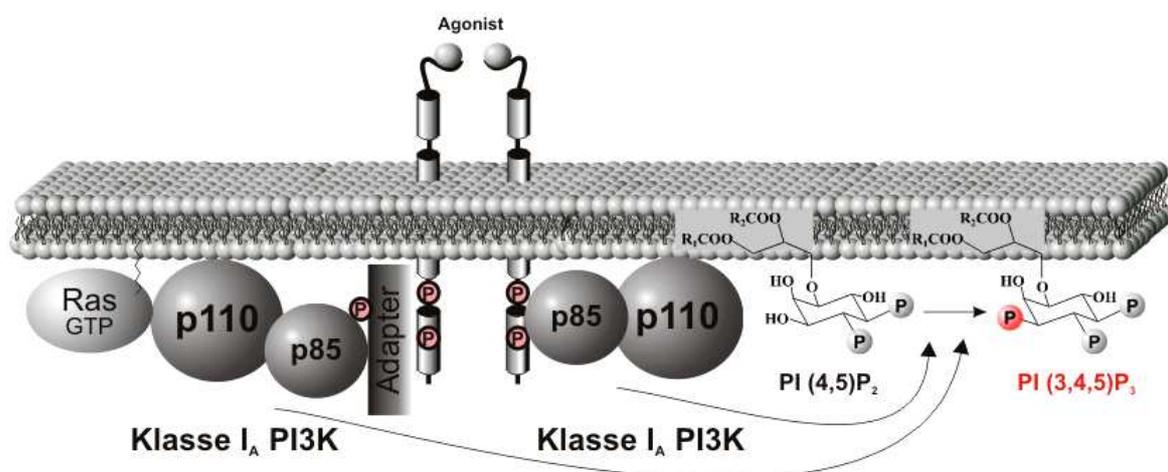


Abbildung 1.8: Rezeptor-induzierte Aktivierung der Klasse I_A PI3-Kinasen. Klasse I_A PI3-Kinasen werden durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert. Die regulatorische p85-Untereinheit bindet hierbei an phosphorylierte Tyrosine, welche im zytosolischen Teil des Rezeptors oder an Adapterproteinen lokalisiert sind. Hierdurch wird (i) die Kinase an die Plasmamembran und somit zu ihrem Substrat gebracht und (ii) die inhibitorische Wirkung der p85- auf die p110-Untereinheit aufgehoben. Weiterhin wird durch die Desinhibition die Bindung von Ras an die p110-Untereinheit und somit eine synergistische Aktivierung ermöglicht.

Die Unterteilung der Klasse I PI3-Kinasen in I_A und I_B basiert jedoch nicht nur auf der Heterodimerisierung der katalytischen Untereinheiten mit verschiedenen Typen von regulatorischen Untereinheiten, sondern auch auf unterschiedlichen Regulationsmechanismen (vgl. Abbildung 1.8 und Abbildung 1.9).

Alle Klasse I PI3-Kinasen werden nach Liganden-induzierter Aktivierung von Transmembranrezeptoren an die Plasmamembran transloziert, wodurch sie in räumliche Nähe zu ihrem Substrat gelangen und so aktiviert werden können (Hawkins et al., 2006; Marone et al., 2008). Im Fall der Klasse I_A PI3-Kinasen wird dies über die Interaktion der beiden SH2-Domänen der regulatorischen p85-Untereinheiten mit phosphorylierten Tyrosinresten im zytoplasmatischen Teil von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ermöglicht (Songyang et al., 1993). Durch die Interaktion der beiden SH2-Domänen mit phosphorylierten Tyrosinresten kommt es zu einer Desinhibition der katalytischen Aktivität der p110-Untereinheiten (Yu et al., 1998a), die vermutlich durch eine Konformationsänderung in der nSH2-iSH2-Region bedingt wird (Shekar et al., 2005). Somit basiert der Aktivierungsmechanismus der Klasse I_A PI3-Kinasen durch RTKs eher auf einer Verminderung der basalen Inhibition, als auf einer echten Aktivierung. Weiterhin führt die Lockerung der Bindung zwischen der p85- und p110-Untereinheit zu einer Exposition der sonst durch p85 maskierten RBD, was eine weitere Aktivierung der PI3-Kinasen durch Ras ermöglicht (s. Abbildung 1.8; Rodriguez-Viciana et al., 1994; Jimenez et al., 2002; Rodriguez-Viciana et al., 2004). Die Relevanz dieser Ras-abhängigen Aktivierung war lange unklar, neuere Studien belegen jedoch, dass der kostimulatorische Effekt von Ras unter bestimmten Umständen für eine vollständige Aktivierung und physiologische Funktion der Klasse I_A PI3-Kinasen essentiell notwendig sein kann (Orme et al., 2006; Gupta et al., 2007). Neben einer direkten Interaktion von RTK mit der p85-Untereinheit kann die RTK-induzierte Aktivierung der Klasse I_A PI3-Kinasen auch über Adapterproteine vermittelt werden (s. Abbildung 1.8). Zu diesen Adapterproteinen zählen IRS, Shc, Cbl und Grb2, welche ebenfalls über phosphorylierte pYXXM-Motive verfügen, zusätzlich aber noch über SH3-Domänen oder prolinreichen Sequenzen mit den p85-Untereinheiten interagieren können (Harrison-Findik et al., 1995; Soltoff & Cantley, 1996). Weiterhin können auch nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie die Src-Kinasen Fyn und Lck eine Aktivierung der Klasse I_A PI3-Kinasen über eine Interaktion mit der p85 Untereinheit induzieren (Fry et al., 1992; Vogel & Fujita, 1993; Prasad et al., 1993a; Prasad et al., 1993b).

Bei der Regulation der Enzymaktivität bildet die PI3-Kinase β eine Ausnahme. Hier gibt es Befunde, dass die p110 β -Untereinheit, im Gegensatz zu den anderen p110-Untereinheiten, nicht durch Ras-Proteine aktiviert wird (Rodriguez-Viciana et al., 2004). Allerdings ist sie die einzige Klasse I_A PI3-Kinase, welche ebenfalls responsiv gegenüber G $\beta\gamma$ -Komplexen ist (Kurosu et al., 1997; Maier et al., 1999; Macrez et al., 2001). Neueste Untersuchungen deuten sogar darauf hin, dass die PI3-Kinase β -Aktivität *in vivo* hauptsächlich durch GPCRs und nicht über RTKs reguliert wird (Graupera et al., 2008; Guillermet-Guibert et al., 2008).

1.3.2.2 Klasse I_B PI3-Kinasen

Die PI3-Kinase γ ist die einzige bisher bekannte Klasse I_B PI3-Kinase. Sie wird überwiegend im hämatopoetischen System gefunden, kommt jedoch in geringerem Ausmaß auch in Herz, Leber, Pankreas, Niere und Skelettmuskeln vor (Stoyanov et al., 1995). Der „knock-out“ der katalytischen p110 γ -Untereinheit in der Maus wurde von drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander simultan veröffentlicht (Hirsch et al., 2000; Sasaki et al., 2000; Li et al., 2000). Sie zeigten hauptsächlich einen Defekt in der Immunantwort, welcher auf den Verlust wichtiger Funktionen von neutrophilen Granulozyten zurückzuführen ist. Es konnten aber auch Defekte in Makrophagen (Jones et al., 2003; Konrad et al., 2008), dendritischen Zellen (Del Prete et al., 2004), B-Zellen (Beer et al., 2008), T-Zellen (Reif et al., 2004) und eosinophilen Granulozyten (Pinho et al., 2005) nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten sich ebenfalls Auswirkungen auf das Kardiovaskularsystem (Hirsch et al., 2006).

Im Gegensatz zu den katalytischen Untereinheiten der Klasse I_A PI3-Kinasen assoziiert die p110 γ -Untereinheit nicht mit einer regulatorischen p85-Untereinheit, sondern bildet ein Heterodimer mit der nicht-katalytischen p101- oder der kürzlich identifizierten p87-Untereinheit (Stephens et al., 1997; Suire et al., 2005; Voigt et al., 2005; Voigt et al., 2006). Eine stabilisierende Funktion der nicht-katalytischen Untereinheiten auf die p110 γ -Untereinheit konnte hier jedoch nicht gezeigt werden, vielmehr ist die p110 γ -Untereinheit per se stabil, während die p101-Untereinheit erst durch eine Dimerisierung mit p110 γ stabilisiert wird (Brock et al., 2003). Nach der Identifizierung der katalytischen Untereinheit konnte in initialen Studien belegt werden, dass die p110 γ *in vitro* durch G β γ -Komplexe aktivierbar ist (Stoyanov et al., 1995; Leopoldt et al., 1998). Die Entdeckung der nicht-katalytischen p101-Untereinheit zeigte, dass p101 die katalytische Untereinheit für G β γ -Komplexe sensitisiert und als G β γ -Adapter fungiert (Stephens et al., 1997; Maier et al., 1999; Krugmann et al., 1999). Initiale Charakterisierungen führten zu der Schlussfolgerung, dass auch die p87-Untereinheit eine G β γ -Adapterfunktion aufweist, wenn auch quantitativ schwächer (Suire et al., 2005; Voigt et al., 2006). Analog zur p101 erhöhte dabei auch die p87 die Rezeptor-Sensitivität der p110 γ gegenüber G β γ -Komplexen, wobei dieser Effekt im direkten Vergleich bei der p87 schwächer ausgeprägt ist (Voigt et al., 2006).

Die proteinchemische und zellbiologische Analyse von Strukturkomponenten der p101 mit Hilfe von Deletionsmutanten ergab, dass eine N-terminale Region für die Heterodimerisierung mit p110 γ verantwortlich ist, während die Interaktion mit G β γ -Komplexen am C-Terminus stattfindet (Krugmann et al., 1999; Voigt et al., 2005). Basierend auf diesen Strukturmerkmalen war es trotz fehlender Protein-übergreifender Ähnlichkeiten der p101 zu anderen Proteinen möglich, eine weitere potentielle nicht-katalytische PI3-Kinase γ -Untereinheit zu identifizieren, die p87^{PIKAP} oder p84 (p87; Suire et al., 2005; Voigt et al., 2005). Diese zweite Untereinheit weist nur eine geringe Sequenzhomologie auf, jedoch sind die putativen G β γ - und p110 γ -Bindungsregionen hoch homolog. Letztere ist möglicherweise für die Dimerisierung mit der p110 γ verantwortlich, jedoch gibt es hierzu keine Befunde. Die Klasse I_B beinhaltet also zwei Mitglieder, die sich allerdings nur in der nicht-katalytischen Untereinheit unterscheiden. Somit könnte den nicht-katalytischen Untereinheiten bei der Spezifität von Klasse I_B-abhängigen Signalwegen eine besondere Bedeutung zukommen.

Auch unterscheidet sich das Expressionsmuster der p87 von dem der p101. So scheint im Herzen überwiegend p87 exprimiert zu sein, während die p101 in neutrophilen Granulozyten die vorwiegende nicht-katalytische Untereinheit darstellt (Suire et al., 2006; Voigt et al., 2006). Des Weiteren ist die p87 im Gegensatz zur p101 auch als Monomer in Zellen stabil (Brock et al., 2003; Voigt et al., 2006), wobei Gewebe von $p110\gamma^{-/-}$ -Mäusen eine Reduktion der p87-Expression zeigen (Suire et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten auf spezifische Funktionen der PI3-Kinase γ -Isoformen hin.

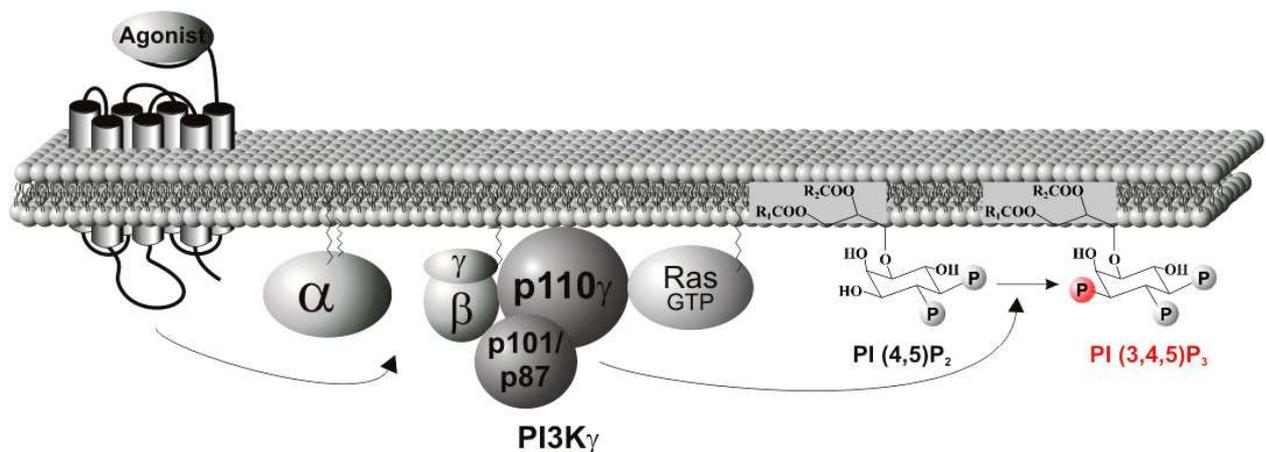


Abbildung 1.9: Rezeptor-induzierte Aktivierung der Klasse I_B PI3-Kinase. Die Klasse I_B PI3-Kinase wird durch Gβγ-Komplexe, die nach Ligandenbindung an GPCRs aus G_i-Proteinen freigesetzt werden, aktiviert. Gβγ-Komplexe binden direkt an die nicht-katalytischen Untereinheit, wodurch die Kinase an die Plasmamembran und somit zu ihrem Substrat rekrutiert wird. Anschließend wird die p110γ durch Interaktion mit Gβγ-Komplexen aktiviert. Ras hingegen soll nicht in der Lage sein, die PI3-Kinase γ an die Membran zu rekrutieren, stimuliert jedoch ebenfalls das Enzym. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

Die PI3-Kinase γ kann sowohl durch G-Proteine, als auch durch Ras reguliert werden (Stoyanov et al., 1995; Rubio et al., 1997). Wie bereits erwähnt, scheint dabei die Rekrutierung der zytosolisch lokalisierten Kinase an die Plasmamembran eine Voraussetzung für die Aktivierung des Enzyms zu sein (al Aoukaty et al., 1999; Naccache et al., 2000; Brock et al., 2003). Diese Rekrutierung wird im Fall der PI3-Kinase γ_{p101} über eine Interaktion der nicht-katalytischen Untereinheit mit Gβγ-Komplexen erreicht (Brock et al., 2003). Jedoch ist diese Membranassoziation der Kinase nicht ausreichend, um eine vollständige Aktivierung zu erreichen. Lipid-assoziierte PI3-Kinase γ kann durch Gβγ weiter aktiviert werden (Krugmann et al., 2002; Brock et al., 2003). Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist bislang ungeklärt, jedoch wäre entweder ein über die p101-vermittelter Effekt, ein direkter Effekt von Gβγ-Komplexen auf die p110γ oder beides denkbar. Die zuletzt genannten Vermutungen werden dadurch gestützt, dass schon zuvor die direkte Interaktion von Gβγ-Komplexen mit N- und C-terminalen Regionen der p110γ an gereinigten Proteinen gezeigt werden konnte (Stoyanov et al., 1995; Leopoldt et al., 1998). Weiterhin konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass die monomere p110γ ebenfalls Gβγ-Komplex-abhängig aktivierbar ist und *in vivo* führte die Koexpression von Gβγ-Komplexen ebenfalls zu einer Stimulation von Membran-assoziiierter monomerer p110γ (Stoyanov et al., 1995; Leopoldt et al., 1998; Brock et al., 2003). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Gβγ-Komplexe die PI3-Kinase γ über die Interaktion mit p87 oder p101 an die Plasmamembran rekrutieren und

hier die PI3-Kinase γ über eine zusätzliche Interaktion mit der p110 γ -Untereinheit aktiviert wird. Unklar ist in diesem Kontext jedoch, ob die Interaktion mit der katalytischen Untereinheit von dem gleichen G $\beta\gamma$ -Komplex vermittelt wird, welcher auch mit der p87 oder der p101 interagiert, oder ob hier noch ein weiterer G $\beta\gamma$ -Komplex beteiligt ist (Brock et al., 2003).

Wie die Klasse I_A p110-Untereinheiten, kann die p110 γ direkt durch Ras aktiviert werden (Rubio et al., 1997; Pacold et al., 2000). Jedoch wird davon ausgegangen, dass Ras nur das bereits mit der Membran assoziierte Enzym stimuliert, da bislang eine Ras-vermittelte Rekrutierung der PI3-Kinase γ ausgeschlossen wird (Suire et al., 2002). Außer den klassischen H-, N- und K-Ras-Isoformen, sind auch R-, M-Ras und TC21 in der Lage, die p110 γ zu aktivieren, wobei K- und R-Ras potentere Aktivatoren darstellen als H- und N-Ras (Suire et al., 2002; Rodriguez-Viciana et al., 2004). Die GTP-abhängige Interaktion von Ras und p110 γ wird jedoch im Gegensatz zu Klasse I_A PI3-Kinasen nicht durch die Heterodimerisierung mit den nicht-katalytischen Untereinheiten blockiert und ist somit unabhängig von kostimulatorischen Einflüssen (Pacold et al., 2000; Suire et al., 2002). Die Kristallstruktur der p110 γ im Komplex mit N-Ras macht deutlich, dass Ras an p110 γ in einer anderen Orientierung bindet, als an seine übrigen Effektoren. In der Folge interagieren nicht nur die Schalter I-Region von Ras mit der RBD der p110 γ , sondern es wird ein zusätzlicher Kontakt zwischen der Schalter II-Region und sowohl der RBD, als auch der katalytischen Domäne von p110 γ ausgebildet. Des Weiteren zeigt ein Vergleich mit der Kristallstruktur der monomeren p110 γ eine Ras-bedingte Konformationsänderung der p110 γ , und zwar vor allem eine Vergrößerung des Abstandes zwischen der C2- und der katalytischen Domäne (Walker et al., 1999; Pacold et al., 2000). Diese Konformationsänderung könnte auf einen allosterischen Aktivierungsmechanismus hindeuten, allerdings ist auch eine Reorientierung der p110 γ zur Plasmamembran hin denkbar, die die aktivierende Wirkung von Ras bedingt (Pacold et al., 2000; Suire et al., 2002). Basierend auf dieser Kokristallstruktur wurde eine p110 γ -Mutante, die p110 γ -DASAA (T232D, K251A, K254S, K255A und K256A) generiert, welche nicht mehr durch Ras aktivierbar ist. Untersuchungen dieser p110 γ -DASAA-Mutante haben ergeben, dass die Aktivierung der PI3-Kinase γ durch Ras unabhängig von G $\beta\gamma$ -Komplexen erfolgt, aber trotzdem synergistisch mit diesen wirken kann (Pacold et al., 2000). Obwohl die voneinander unabhängige Ras- und G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte PI3-Kinase γ -Aktivierung sowohl *in vitro* (Leopoldt et al., 1998; Maier et al., 1999; Krugmann et al., 2002), als auch *ex vivo* (Pacold et al., 2000; Suire et al., 2002) untersucht wurde, ist bisher wenig über die physiologische Relevanz dieser beiden Aktivierungswege bekannt. Eine neuere Studie vergleicht das Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten aus p101^{-/-}- und p110 γ ^{DASAA/DASAA}-Mäusen mit p110 γ ^{-/-}-Mäusen. In dieser Studie konnte mittels fMLP bzw. C5a-vermittelter Chemotaxis gezeigt werden, dass die volle Aktivität der PI3-Kinase γ , sowie ebenfalls die PI3-Kinase γ -abhängige Migration nur bei Anwesenheit der Ras-Bindungsstelle sowie der p101 vorhanden ist. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die PI3-Kinase γ -abhängige ROS (reactive oxygen species)-Bildung bereits bei der p110 γ ^{DASAA/DASAA}-Mutante vollständig fehlt (Suire et al., 2006). Der exakte Mechanismus der Ras-induzierten PI3-Kinase γ -Aktivierung sowie die physiologische Relevanz einer Ras-unabhängigen, ausschließlich G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelten PI3-Kinase γ -Aktivierung sind jedoch noch unklar.

2. Fragestellung

Regulation der Phosphoinositid 3-Kinase γ -Isoformen durch Rezeptoren, Ras- und heterotrimere G-Proteine.

In den letzten Jahren stand die Entwicklung PI3-Kinase-Isoform-selektiver Inhibitoren zu therapeutischen Zwecken im Fokus der pharmakologischen Forschung. Dabei hat sich herausgestellt, dass der bisher verwendete Inhibitionsmechanismus auf Basis kompetitiver ATP-Analoga nur eine begrenzte Isoform-Spezifität ermöglicht. Für die Entwicklung neuer und selektiverer Wirkprinzipien ist jedoch ein tieferes Verständnis für die PI3-Kinase-Isoform-spezifischen Funktionen und Regulationsmechanismen erforderlich. Insbesondere die G-Protein-regulierte PI3-Kinase γ ist aufgrund ihrer essentiellen Bedeutung bei immunologischen, entzündlichen und kardiovaskulären Erkrankungen eine interessante pharmakotherapeutische Zielstruktur.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass sich die PI3-Kinase γ aus der nicht-katalytischen p101- und der katalytischen p110 γ -Untereinheit zusammensetzt. Jedoch zeigen neuere Studien die Existenz einer zweiten nicht-katalytischen Untereinheit, der p87. Über die Funktionen der beiden nicht-katalytischen Untereinheiten sowie die Regulation der daraus resultierenden PI3-Kinase γ -Isoformen ist bislang jedoch nur wenig bekannt.

1. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die zelluläre Regulation der PI3-Kinase γ -Isoformen zu untersuchen. Bislang ist sie als klassischer G_iPCR-Effektor bekannt. Deshalb sollte analysiert werden, ob auch Rezeptoren, die an andere G-Protein-Familien koppeln, in der Lage sind, die PI3-Kinase γ zu regulieren.

2. Ein weiterer GTP-abhängiger Regulator der PI3-Kinase γ ist Ras. Während die aktivierende Wirkung von Ras auf die p110 γ -Untereinheit schon länger bekannt ist, wurde der Einfluss von Ras bei der physiologischen Regulation der Kinase-Aktivität bisher als weniger bedeutsam gegenüber der G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelten Aktivierung angesehen. Neuere Studien lassen jedoch vermuten, dass die Ras-abhängige Regulation der PI3-Kinase γ möglicherweise ebenso bedeutend ist. Während der Aktivierungsmechanismus der Ras-induzierten Stimulation von Klasse I_A PI3-Kinasen relativ detailliert untersucht wurde, fehlen entsprechende Daten für die Klasse I_B PI3-Kinase. Deshalb wurde die Interaktion von Ras mit den beiden heterodimeren PI3-Kinase γ -Isoformen näher charakterisiert.

3. Die kürzlich beschriebene nicht-katalytische PI3-Kinase γ -Untereinheit, p87, ist in ihrer Funktion weitgehend unbekannt. Es fiel eine geringere Aktivität der PI3-Kinase γ_{p87} nach Rezeptor-induzierter Stimulation im Vergleich zur PI3-Kinase γ_{p101} auf. Mit Hilfe zellbiologischer Ansätze sollte die Funktion der p87 charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Säugerzellen und Bakterienstämme

HEK293-Zellen	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig
HEK293-M ₃ -Zellen	Frau Prof. M. Schmidt, Groningen, Niederlande
Heart Like-1 (HL-1) Zellen	Prof. W. Claycomb, New Orleans, LA, USA
HL-60 Zellen	DSMZ, Braunschweig
Kompetente Bakterien (<i>E. coli</i> "TOP 10")	Invitrogen, Leek, Niederlande
Kompetente Bakterien (<i>E. coli</i> "DH5 α ")	Invitrogen, Leek, Niederlande

3.1.2 Medien und Zusätze

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Claycomb Medium	J.H.R. Bioscience, Lenexa, KS, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Fibronektin	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS)	J.H.R. Bioscience, Lenexa, KS, USA
Folsäure	Sigma, Deisenhofen
Gelatine	Difco Laboratories, Detroit, USA
Geneticin (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Calbiochem, Frankfurt
Luria-Bertani Medium (LB-Medium)	Applichem, Darmstadt
Norepinephrin (Noradrenalin)-bitartrat	Sigma, Deisenhofen
Natrium-L-Ascorbat	Sigma, Deisenhofen
nichtessentielle Aminosäuren	Gibco BRL, Eggenstein
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Genaxxon, Stafflangen

Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
RPMI-1640 Medium	Gibco BRL, Eggenstein
Soybean	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin	Calbiochem, Frankfurt
Trypton	Sigma, Deisenhofen

3.1.3 Plasmide

pcDNA3	Invitrogen, Leek, Niederlande
pEYFP-C1	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pECFP-C1	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pcDNA3-YFP	Prof. M. Schaefer, Berlin/Leipzig
pcDNA3-CFP	Prof. M. Schaefer, Berlin/Leipzig
p85 α (Rind) in pcDNA3	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
p110 β (Mensch) in pcDNA3	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
p87 (Maus) in pcDNA3	diese Arbeit, O. Fedorchenko
YFP-p87 (Maus) in pEYFP-C1	diese Arbeit, O. Fedorchenko
CFP-p87 (Maus) in pECFP-C1	diese Arbeit, O. Fedorchenko
p87-YFP (Maus) in pcDNA3-YFP	diese Arbeit, O. Fedorchenko
p87-CFP (Maus) in pcDNA3-CFP	diese Arbeit, O. Fedorchenko
p101 (Schwein) in pcDNA3	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
YFP-p101 (Schwein) in pEYFP-C1	Dr. M. Michalke, AG Nürnberg
CFP-p101 (Schwein) in pECFP-C1	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
p101-YFP (Schwein) in pcDNA3-YFP	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
p110 γ (Mensch) in pcDNA3	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
YFP-p110 γ (Mensch) in pEYFP-C1	Dr. M. Michalke, AG Nürnberg
CFP-p110 γ (Mensch) in pECFP-C1	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
p110 γ -YFP (Mensch) in pEYFP-C1	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
p110 γ -CFP (Mensch) in pECFP-C1	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
p110 γ -CAAX (Mensch) in pcDNA3	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
G α_{i2} (Ratte) in pcDNA3	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
G β_1 (Mensch) in pcDNA3	Dr. M. Michalke, AG Nürnberg
G γ_2 (Rind) in pcDNA3	Dr. M. Michalke, AG Nürnberg
GFP-Grp1 _{PH} (Maus) in pEGFP-C1	Prof. C. P. Downes, Dundee, Großbritannien
Btk _{PH} -CFP (Mensch) in pECFP-N1	Dr. K. Spicher, AG Nürnberg
β -ARK (GRK2)-CT-CFP (C-Terminus)	Dr. P. Voigt / Prof. M. Schaefer, Berlin/Leipzig

H-Ras-wt (Mensch) in pcDNA3	Frau Prof. M. Schmidt, Groningen, Niederlande
YFP-H-Ras-wt (Mensch) in pEYFP-C1	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
H-Ras-S17N (Mensch) in pcDNA3	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
H-Ras-G12V (Mensch) in pcDNA3	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
fMLP-R (Mensch) in pcDNA3	Dr. C. Brock, AG Nürnberg
CXCR4 (Mensch) in pcDNA5	Prof. B. Homey, Düsseldorf
EGFR in pRK5	Prof. A. Ullrich, Martinsried
β_1 -adrenerger Rezeptor in pMC	Frau Dr. S. Schmittmeyer, Düsseldorf
muskarinischer Acetylcholinrezeptor M ₃ in pMT ₂	Frau Prof. M. Schmidt, Groningen, Niederlande
Neurofibromin 1-333 (NF-1, AS 570-689)	PD. Dr. Reza Ahmadian, Düsseldorf

3.1.4 Enzyme

Omniscript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen, Hilden
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> -T4-DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Power SYBR Green PCR Master Mix	AB Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

3.1.5 Chemikalien

30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche, Mannheim
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	Hartmann Analytic, Braunschweig
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Appllichem, Darmstadt
5-[5-(4-Fluoro-2-hydroxy-phenyl)-furan-2-ylmethylene]- thiazolidine-2,4-dione (AS-252424)	Merck, Darmstadt
Atropinsulfat Monohydrat	Sigma, Deisenhofen
Benoxathianhydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
N,N-Bis-[-2-hydroxyethyl]-2-amino-ethansulfonsäure (BES)	Sigma, Deisenhofen
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
[(2-Carbamoyloxyethyl) trimethylammonium chlorid] (Carbachol)	Sigma, Deisenhofen
<i>stromal derived factor 1</i> , SDF-1 (CXCL12)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Genaxxon, Stafflangen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluca, St. Gallen, Schweiz
Dithiothreitol (DTT)	ICN, Eschwege
Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline w/o Ca ²⁺ / Mg ²⁺ (D-PBS)	Genaxxon, Stafflangen
Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline +Ca ²⁺ / Mg ²⁺ (D-PBS)	Genaxxon, Stafflangen
ECL Western Blot Detection System	GE Healthcare, München
<i>epidermal growth factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Calbiochem, Frankfurt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylen-glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- Tetraessigsäure (EGTA)	Serva, Heidelberg
N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin (fMLP)	Calbiochem, Frankfurt
FuGene HD Transfection Reagent	Roche, Mannheim
Fura-2 AM (Acetoxymethylester)	Invitrogen, Leek, Niederlande
Glycerol	Merck, Darmstadt
β-Glycerophosphat	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glukose	Sigma, Deisenhofen
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Isoprenalin ((-)-Isoproterenol hydrochlorid)	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Deisenhofen
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Appllichem, Darmstadt
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Deisenhofen
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen

Natriumpyrophosphat	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P40 (NP40)	Calbiochem, Frankfurt
Okadainsäure	Calbiochem, Frankfurt
Oligonukleotide	Operon, Köln
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin	Applichem, Darmstadt
Pertussistoxin (PTX)	Calbiochem, Frankfurt
Phenylephrinhydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns-4,5-P ₂)	Sigma, Deisenhofen
L- α -Phosphatidylcholin	Sigma, Deisenhofen
L- α -Phosphatidylethanolamin	Sigma, Deisenhofen
L- α -Phosphatidylserin	Sigma, Deisenhofen
Pluronic F-127	Invitrogen, Leek, Niederlande
Polyoxyethylen-10-Laurylether (C12E10)	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
ProLong Gold Antifade Reagent	Invitrogen, Leek, Niederlande
n-Propanol	Roth, Karlsruhe
(R)-(+)-Propranolol-hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Random Hexamer Primer	Roche, Mannheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sphingomyelin	Sigma, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris (hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trizol	Invitrogen, Leek, Niederlande
Tween 20	Applichem, Darmstadt

3.1.6 Antikörper und Antiseren

anti-p85 α (sc-423)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
anti-p101	Prof. L. Stephens, Cambridge, UK
anti-p110 β (sc-7175)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
anti-p110 γ zur Immunpräzipitation (mAb641)	Prof. R. Wetzker, Jena
anti-p110 γ zur Immunoblot-Analyse	Prof. R. Wetzker, Jena
anti-G β_{common} (AS398)	Dr. K. Spicher, Berlin
anti-GFP zur Immunpräzipitation (ab290-50)	Abcam, Cambridge, Großbritannien

anti-GFP zur Immunoblot-Analyse (632381)	Clontech, Palo Alto, CA, USA
anti-Akt (#9272)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
anti-phospho-Akt (Ser473; #4058)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
anti-H-Ras (sc-520)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
anti-Pan-Ras (R02120)	Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA
anti-muskarinischer Acetylcholinrezeptor M ₃ (sc-7474)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
anti-Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
anti-Maus-IgG, HRP-gekoppelt	Dako, Glostrup, Dänemark
anti-Schaf-IgG, HRP-gekoppelt	Dako, Glostrup, Dänemark
Alexa Fluor 633, anti-Kaninchen IgG, aus Ziege	Invitrogen, Leek, Niederlande

3.1.7 Primer

Tabelle 3.1 Klonierungsprimer für murine p87:

Vektor	Orientierung	Sequenz	Spezies
pcDNA3	forward	5'-AGGCTTCGATGGAGAGCTCAGATGTGGAG-3'	Maus
pcDNA3	reverse	5'-TCTAGATTATTGGATGATGCCAGAGAATGTGTTG-3'	Maus
pcDNA3-YFP/CFP	forward	5'-AGGCTTCGATGGAGAGCTCAGATGTGGAG-3'	Maus
pcDNA3-YFP/CFP	reverse	5'-TCTAGACCTTGGATGATGCCAGAGAATGTGTTG-3'	Maus
pEYFP/pECFP	forward	5'-AGGCTTCGATGGAGAGCTCAGATGTGGAG-3'	Maus
pEYFP/pECFP	reverse	5'-TCTAGATTATTGGATGATGCCAGAGAATGTGTTG-3'	Maus

Tabelle 3.2 Reverse-Transkriptase-PCR:

Primer	Orientierung	Sequenz	Spezies
p110 α	forward	5'-CAGGACTGAGTAACAGACTAGC-3'	Mensch
p110 α	reverse	5'-TCTCCAATTCAACCACAGTGG-3'	Mensch
p110 β	forward	5'-AGCAACAGGAGATCGCTCTGG-3'	Mensch
p110 β	reverse	5'-TAGTAGTCCAGCTTTCCTGAG-3'	Mensch
p110 γ	forward	5'-GATGAAGTCCTGAATCACTGGC-3'	Mensch
p110 γ	reverse	5'-ACAGTCCATCCTTTGTCTCTGC-3'	Mensch
p110 δ	forward	5'-CAACCTCAGCACCATCAAGC-3'	Mensch
p110 δ	reverse	5'-ACCTGGAA GGTGAAGCTCTC-3'	Mensch

Tabelle 3.3 Real Time-PCR:

Primer	Orientierung	Sequenz	Spezies
GAPDH	forward	5'-CGAGAATGGGAAGCTTGTCATC-3'	Maus
GAPDH	reverse	5'-CGGCCTCACCCCATTTG-3'	Maus
p110 γ	forward	5'-ACAGGGTTCGGGCTGAAAT-3'	Maus
p110 γ	reverse	5'-TGGCTATGATCGCCTCCAAT-3'	Maus
p101	forward	5'-GGCAGAACCCTAAATCCAAAAA-3'	Maus
p101	reverse	5'-GAGCCGATGATCAGCACCTT-3'	Maus
p87	forward	5'-CGGGTGTCCACCGACAGT-3'	Maus
p87	reverse	5'-AAGCTCATCGCTCCCCAAA-3'	Maus

3.1.8 Sonstige Materialien

Transferpapier GB002	Schleicher und Schuell, Dassel
cyclic AMP [³ H] Biotrak Assay System	GE Healthcare, München
Deckgläser	Marienfeld GmbH, Lauda- Königshofen
Dünnschichtplatten mit Kieselgel 60	Whatman, Maidstone, UK
Hybond C Nitrozellulose-Membran	GE Healthcare, München
LMW Electrophoresis Calibration Kit	GE Healthcare, München
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Glutathion-Sepharose 4B Beads	GE Healthcare, München
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Protein A-Sepharose CL-4B	GE Healthcare, München
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Purification Kits	Qiagen, Hilden
Röntgenfilme (SuperRX)	Fuji Photo Film, Tokyo, Japan
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten molekularbiologische Standardmethoden sind ausführlich bei Sambrook & Russell (2001) beschrieben.

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktions-Techniken

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Vervielfältigung von DNA-Bereichen, welche durch spezifische Primer definiert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für unterschiedliche Zwecke eingesetzt und entsprechend verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen verwendet. Für die analytische PCR (s. 3.2.1.1.1 und 3.2.1.1.2) wurde die *Taq* DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eingesetzt. Für das Synthetisieren von DNA-Fragmenten, bei denen die Genauigkeit der Sequenz von besonderer Bedeutung war, wurde eine Proof-Reading-Polymerase verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden in 500 µl Reaktionsgefäßen im Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt. Das Verifizieren der PCR-Ergebnisse erfolgte über Agarosegelelektrophorese.

3.2.1.1.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die RT-PCR wurde zum Nachweis von verschiedenen PI3-Kinase-Untereinheiten in Zelllinien eingesetzt. Für den Nachweis von PI3-Kinase-Untereinheiten in HEK293-Zellen wurde Zelllysate-RNA isoliert. Zur Herstellung der cDNA wurden 2 µg RNA, sowie 1 µl Omniscript Reverse Transkriptase, 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl RNase out, 2 µl 10x Omniscript-Puffer und 1 µl Random Hexamer Primern verwendet und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Reaktion wurde eine Stunde lang bei 37 °C und abschließend 5 min lang bei 95 °C durchgeführt.

Tabelle 3.4 Eigenschaften der RT-PCR Produkte

Fragment	Spezies	Ziel mRNA	Bereich (bp)	Größe (bp)
p110α	Mensch	NM_006218	1609-2430	822
p110β	Mensch	NM_006219	2530-3170	641
p110γ	Mensch	AF327656	3020-3555	536
p110δ	Mensch	NM_005026	371-815	445

Die daraus entstandene cDNA wurde als Template, *Taq* DNA-Polymerase als Polymerase nach Herstellerangaben und die in Tabelle 3.2 aufgeführten Primer für die nachfolgende PCR genutzt. Hierzu wurde der PCR-Ansatz (25 µl) initial 94 °C für 5 min denaturiert und anschließend die Amplifikation für 30 Zyklen (94 °C für 30 s, 57 °C für 30 s, 72 °C für 1 min) durchgeführt. Nach einer terminale n Elongation von zwei Minuten bei der

vorangegangenen Elongationstemperatur wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Als Kontrollen dienten Wasseransätze ohne DNA zur Kontaminationserkennung. Die charakteristischen PCR-Produkte sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

3.2.1.1.2 Real Time-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Überprüfung der endogenen Expression der PI3-Kinase γ in HL-1-Zellen wurde die sensitivere Methode der Real Time-PCR zur Detektion der Untereinheiten gewählt. Die Detektion der cDNA-Amplifikation erfolgte mit Hilfe des Farbstoffs SYBR Green, welcher nur nach Einbau in doppelsträngige DNA anregbar ($\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$) ist. Das Emissionsmaximum liegt bei 521 nm. Abweichungen in der Fragmentlänge, Nukleotidvariationen des Amplifikats oder Primerdimere können mittels Schmelzkurvenanalyse differenziert werden. Da in der hier vorliegenden Arbeit nur die endogene Expression bestätigt und keine Aussage über die Quantität des Produktes getroffen werden sollte, wurden die Fluoreszenzsignale jedoch direkt photometrisch bestimmt und keine gradientenbasierte Größenkontrolle vorgenommen. Zur Überprüfung der Spezifität der Reaktion wurden die PCR-Produkte anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert, um eine Kontamination mit unspezifischen Signalen auszuschließen. Des Weiteren wurde eine Analysemethode gewählt, bei der keine interne Kontrolle verwendet wurde. Stattdessen wurden die Ergebnisse aus HL-1-Zellen mit denen aus murinen Herzen verglichen. Als Basiskonstante der Genexpression wurde auf die GAPDH standardisiert. Als Kontrollen dienten Wasseransätze ohne DNA zur Kontaminationserkennung. Die Gentranskripte konnten in ihrer relativen Menge zueinander bestimmt werden.

Tabelle 3.5 Eigenschaften der Real Time-PCR Produkte:

Fragment	Spezies	Ziel mRNA	Bereich (bp)	Größe (bp)
GAPDH	Maus	NM_001001303	226-311	86
p110 γ	Maus	NM_020272	1943-2002	60
p101	Maus	NM_177320	2478-2559	82
p87	Maus	BC028998	1000-1056	57

Zur Reaktion wurden 1 μl cDNA aus HL-1-Zellen oder aus murinen Herzen, 12,5 μl SYBR Green I PCR Master Mix und 200 nM Primer in einem Gesamtvolumen von 25 μl verwendet. Die Reaktion wurde in einem 7500 Real Time-PCR System Sequence Detector (AB Applied Biosystems) nach dem folgenden Protokoll durchgeführt: Zunächst wurde das Reaktionsgemisch für initiale 2 min auf 50 $^{\circ}\text{C}$ gebraucht. Dieser Schritt ist notwendig, um die im inaktiven Zustand gelieferte Polymerase zu aktivieren. Anschließend wurde die DNA für 10 min bei 95 $^{\circ}\text{C}$ denaturiert und nachfolgend über 40 Zyklen bei 95 $^{\circ}\text{C}$ für 15 s und 58.5 $^{\circ}\text{C}$ bzw. 62 $^{\circ}\text{C}$ für 30 s entsprechend für p110 γ und p101 oder p87 amplifiziert. Die charakteristischen PCR-Produkte sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

3.2.1.2 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Für die Herstellung von Expressionsplasmiden wurde die nachfolgende Strategie verwendet: Das Einfügen von geeigneten Schnittstellen direkt vor dem Startcodon bzw. das Entfernen von Stopcodons geschah mittels PCR (s. 3.2.1.1) unter Verwendung der *Pfu*-T4-Polymerase. Die dabei entstandenen Fragmente wurden zunächst in pCR 2.1-TOPO subkloniert, mittels Restriktionsenzymen geschnitten und später weiter in die finalen Vektoren kloniert: pcDNA3 für nicht-markierte, pcDNA3-CFP bzw. -YFP für C-terminal markierte, sowie pECFP- bzw. pEYFP-C1 für N-terminal markierte Proteine. Die Sequenzen aller PCR-generierten Fragmente wurden durch Sequenzierung überprüft (GATC Biotech).

p87, YFP-p87 und CFP-p87:

Die p87-cDNA wurde aus einem sequenzverifizierten cDNA-Klon (IRAVp968F0666D6, RZPD) mittels PCR mit den Primern 5'-AG GCT TCG ATG GAG AGC TCA GAT GTG GAG-3' und 5'-TCT AGA TTA TTG GAT GAT GCC AGA GAA TGT GTT G-3' amplifiziert, in pCR 2.1-TOPO subkloniert und anschließend über *HindIII*- und *XbaI*-Schnittstellen in die Vektoren pcDNA3, pEYFP-C1 und pECFP-C1 inseriert.

p87-YFP und p87-CFP:

Mittels PCR mit den Primern 5'-AG GCT TCG ATG GAG AGC TCA GAT GTG GAG-3' und 5'-TC TAG ACC TTG GAT GAT GCC AGA GAA TGT GTT G-3' wurde ein p87-cDNA Fragment generiert, welches eine *XbaI*-Schnittstelle anstelle des Stopcodons enthielt. Dieses Fragment wurde zuerst in pCR 2.1-TOPO subkloniert und anschließend mit Hilfe der *HindIII*- und *XbaI*-Schnittstellen in die Vektoren pcDNA3-YFP und pcDNA3-CFP inseriert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultur und Transfektion

HEK293-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert und alle drei bis vier Tage nach Ablösen im Verhältnis 1:10 in neue Zellkulturschalen überführt. HEK293-M₃-Zellen wurden analog zu den HEK293-Zellen kultiviert, zusätzlich wurde dem Wachstumsmedium G418 (0,5 mg/ml) zur Selektion zugegeben.

Die Transfektion von subkonfluenten Zellen (~70%) erfolgte mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode. Für Ø 3 cm Schalen wurden jeweils 2,5 µg (ggfs. mit leerem pcDNA3-Vektor aufgefüllt) cDNA in 112,5 µl H₂O, 12,5 µl 2,5 M CaCl₂ und 125 µl zweifach BBS (50 mM BES, 280 mM NaCl₂ und 1,5 mM Na₂HPO₄; pH 7,02) gemischt und nach 1 min Inkubation zum Medium hinzugegeben (für Ø 6 cm oder Ø 10 cm Schalen wurde die zweifache bzw. fünffache Menge verwendet). Nach sechs bis neun Stunden Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Ca²⁺/Mg²⁺ haltigem D-PBS gewaschen und anschließend für

ca. 22 h in DMEM ohne FCS gehungert. Für konfokale Fluoreszenzuntersuchungen der subzellulären Distribution von PI3-Kinase-Untereinheiten wurden die Zellen mit je 0,2 µg der YFP-fusionierten PI3-Kinase-Untereinheiten, 0,4 µg für die nichtfusionierte komplementäre Untereinheit, 0,2 µg H-Ras-Konstrukt und je 0,5 µg der G β_1 - und G γ_2 -Untereinheiten transfiziert. Zur Translokation der PH-Domänen wurde in HEK293-Zellen 0,2 µg Plasmid des jeweiligen Rezeptors oder eines der H-Ras Konstrukte, 0,4 µg Plasmid je PI3-Kinase-Untereinheit und der Fluoreszenz-markierten PH-Domäne, je 0,5 µg der G β_1 - und G γ_2 -Untereinheiten sowie jeweils 1,1 µg Plasmid für NF1 oder β -ARK-CT-CFP transfiziert. Für Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Analysen wurden HEK293-Zellen mit 0,6 µg Plasmid für YFP-fusioniertes H-Ras-wt und je 0,4 µg der YFP- oder CFP-markierten PI3-Kinase γ -Untereinheiten transfiziert. Alle Experimente wurden 24 - 36 Stunden nach Transfektion ausgewertet.

HL-1-Zellen wurden freundlicher Weise von Herrn Prof. W. C. Claycomb zur Verfügung gestellt (Claycomb et al., 1998; White et al., 2004). Die Kultivierung der HL-1-Zellen erfolgte in Claycomb Medium mit 10 % speziellem FCS (J.H.R. Bioscience, Lenexa, USA), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin und 0,1 mM Norepinephrin in 0,3 mM Ascorbinsäure bei 5 % CO₂ und 37 °C. Nach Ablösen mit Trypsin/EDTA-Lösung und anschließender Zugabe der gleichen Menge an 1750 U/ml Soybean, wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:3 in neue, mit Fibronectin-Gelatine behandelten Zellkulturflaschen überführt. Für Transfektionen wurden Zellen auf Fibronectin-Gelatine behandelten Glasplättchen ausgebracht. Die Transfektion der subkonfluenten Zellen erfolgte mit Hilfe des FuGene HD Transfektions-Reagenz nach Herstellerangaben, dabei wurden die zuvor beschriebenen Plasmidkonzentrationen verwendet.

Für die Kultur von HL-60-Zellen bei 37 °C und 7 % CO₂ 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 zwei bis drei Tage wurden die Zellen durch Zugabe von frischem Medium auf eine Dichte von 0,5 x 10⁶ Zellen/ml verdünnt.

3.2.2.2 Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation endogener Proteine wurden in der vorliegenden Arbeit HEK293-Zellen für 20 min in 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei RT fixiert und anschließend 5 min lang mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Die fixierten Zellen wurden 1 Stunde in 3 % BSA in Ca²⁺/Mg²⁺ freiem D-PBS blockiert und nachfolgend 1,5 h mit 1:400 in 1 % BSA in Ca²⁺/Mg²⁺ freiem D-PBS verdünntem anti-H-Ras Antikörper bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit Ca²⁺/Mg²⁺ freiem D-PBS gewaschen und für 1 h 1:100 mit 1 % BSA in Ca²⁺/Mg²⁺ freiem D-PBS verdünntem Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit IgG inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Proben abschließend in ProLong Gold Antifade Reagenz eingebettet und später konfokalmikroskopisch ausgewertet.

3.2.2.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die subzelluläre Lokalisation der heterolog exprimierten fluoreszierenden Fusionsproteine wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) untersucht. Im Vergleich zu einem konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskop (s. Abbildung 3.1 A) ist das CLSM in der Lage, eine wesentlich geringere Schichtdicke bei höherer räumlicher Auflösung abzubilden. Dies wird optisch durch das Einbringen von zwei Lochblenden in den Strahlengang erreicht (s. Abbildung 3.1 C). Die erste Lochblende befindet sich dabei direkt hinter der Lichtquelle, wodurch die Probe Punkt für Punkt durch den fokussierten Laser angeregt werden kann (s. Abbildung 3.1 B). Um die Detektion von Streulicht aus den Ebenen ober- und unterhalb des angeregten Punktes zu verhindern, wird vor dem Detektor eine zweite Lochblende eingebracht, die im Brennpunkt mit der ersten Blende übereinstimmt. Durch das Scannen einer Ebene entsteht auf diese Art und Weise ein Querschnitt durch die untersuchte Zelle, der es ermöglicht, eine etwa 1 μm durchmessende Zellschicht zu betrachten und so exakt zwischen z.B. zytosolischer oder membranärer Fluoreszenz zu unterscheiden (Emptage, 2001).

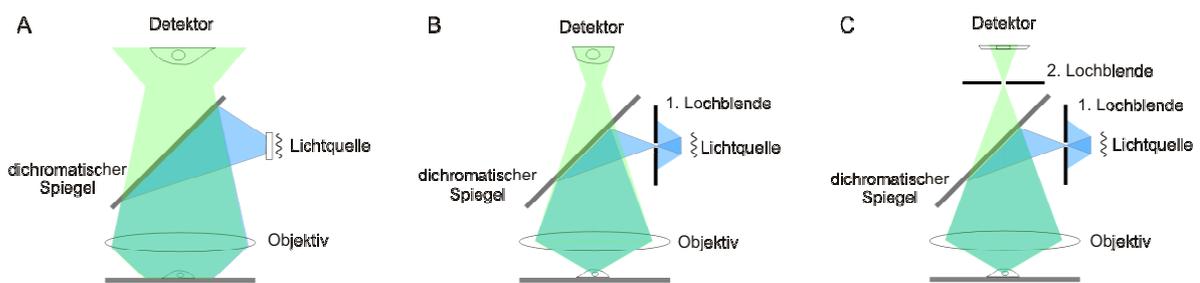


Abbildung 3.1: Optisches Prinzip. (A) Schematische Darstellung des Aufbaus eines Epifluoreszenz-Mikroskops. (B) Veränderung der optischen Abbildung durch das Einbringen der ersten Lochblende. (C) Optisches Prinzip eines konfokalen Mikroskops. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

Um lebende Zellen untersuchen zu können, wurden die Glasplättchen mit den darauf adhären den transfizierten Zellen aus den Kulturschälchen entnommen, vorsichtig mit HBS-Puffer (10 mM HEPES pH 7,5, 128 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 und 5,5 mM Glukose) abgespült, in eine Kammer eingespannt, mit HBS-Puffer überschichtet und schließlich mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510-Meta (Carl Zeiss, Jena) mit einem Plan-Apochromat 63x/1,4-Objektiv ausgewertet. Um eine konstante Temperatur von 37 $^{\circ}\text{C}$ zu gewährleisten, wurde das Mikroskop in einen Zeiss Inkubator XL integriert. CFP, GFP oder YFP wurden mit dem Licht eines Argon-Lasers mit Hilfe der Wellenlängen 458, 488 oder 514 nm angeregt und das emittierte Fluoreszenzlicht durch einen 458, 488 oder 514 nm-Hauptfarbteiler und den 475-525 nm, 505-530 nm oder 530-600 nm Bandpassfiltern detektiert. Die fixierten und mit Alexa 633-markierten Zellen wurden mittels eines Argon-Lasers und des HeliumNeon2 (HeNe2) Lasers mit den Wellenlängen 488 nm und 633 nm nacheinander getrennt angeregt. Das Fluoreszenzlicht wurde mit Hilfe des UV/488/543/633 nm-Hauptfarbteilers, sowie dem 505-530 nm Bandpassfilter bzw. 650 nm Langpassfilter detektiert. Die konfokalen Blenden wurden so eingestellt, dass die optischen Schichtdicken zwischen 0,5 und 1,0 μm lagen.

3.2.2.4 Semi-quantitative Analyse der PH-Domänen-Translokation

Die Eigenschaft PtdIns-3,4,5-P₃-sensitiver PH-Domänen, nach PtdIns-3,4,5-P₃ Produktion an die Plasmamembran zu translozieren, wurde in der vorliegenden Arbeit als Nachweis für die Aktivität von Klasse I PI3-Kinasen genutzt. Hierzu wurde eine PtdIns-3,4,5-P₃-sensitive PH-Domäne mit GFP-markiert und die subzelluläre Lokalisation der PH-Domäne mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie visualisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die GFP-markierte PH-Domäne des general receptor for phosphoinositides-1 (Grp1) als selektiver PtdIns-3,4,5-P₃-Sensor (PIP₃-Sensor; GFP-Grp1_{PH}) für den Nachweis der PI3-Kinase γ -Aktivität verwendet (Gray et al., 1999; Brock et al., 2003). Die Befunde wurden weiterhin mit Hilfe der PH-Domäne der Brutons Tyrosin-Kinase (Btk) bestätigt (nicht gezeigt; Varnai et al., 1999). Da nach Rekrutierung des PIP₃-Sensors die Fluoreszenz an die Plasmamembran sehr schnell der gesättigte Bereich der Fluoreszenzintensität erreicht wird, ist diese dort nicht proportional zur Konzentration des GFP-Grp1_{PH}-Proteins. Aus diesem Grund wurde die Anreicherung der PH-Domäne an der Membran als Verlust an intrazellulärer Fluoreszenz nach Agonist-induzierter Stimulation gemessen. Dabei wurde angenommen, dass der Verlust an intrazellulär detektierbarem GFP-Fusionsprotein direkt proportional zur Translokation an die Plasmamembran ist. Der Bleicheffekt wurde anhand von Kontrollexperimenten gezeigt. Entsprechend wurden kurz vor und nach Zugabe des Stimulus aufeinander folgende Aufnahmen gemacht (alle 10 s für 3 - 4 min). Die relative Menge an GFP-Grp1_{PH}-Domäne, welche zum gegebenen Zeitpunkt (t) transloziert war, wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$[(F_{\text{zyto}}(0) - F_{\text{zyto}}(t)) / F_{\text{zyto}}(0)] \times 100$$

$F_{\text{zyto}}(0)$ ist die zytosolische Fluoreszenz vor Stimulation.

$F_{\text{zyto}}(t)$ ist die zytosolische Fluoreszenz zum Zeitpunkt (t) nach Stimulation.

Für die statistische Analyse der PI3-Kinase-Aktivität wurden Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils sechs Zellen aus unabhängigen Transfektionen berechnet.

Im Fall einer permanenten, Agonist-unabhängigen Rekrutierung des PIP₃-Sensors war es nicht möglich, die Effektivität der Stimulation auf die oben genannte Weise zu berechnen, da in diesem Fall kein unstimulierter Vergleichswert für die gleiche Zelle zur Verfügung stand. Hier wurde die durchschnittliche Membranfluoreszenz (F_M) durch die durchschnittliche intrazelluläre (d.h. zytosolische und nukleäre) Fluoreszenz (F_{Z+N}) dividiert.

$$F_M / F_{Z+N}$$

Es wurden die durchschnittlichen Quotienten für 18 Zellen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten gezeigt, in denen insgesamt 18 Zellen analysiert wurden. Zur statistischen Analyse der PI3-Kinase-Aktivität wurden Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten basierend auf jeweils sechs Zellen berechnet. Die Signifikanz-Niveaus wurden mittels gepaartem Student t-Test berechnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,005$).

3.2.2.5 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Eine weitere Anwendung von Fusionsproteinen mit verschiedenen Farbvarianten des GFP (Tsien, 1998) ist der erstmals 1996 beschriebene Nachweis der Interaktion zweier Proteine in lebenden Zellen mittels Fluoreszenz- oder Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET, Heim & Tsien, 1996; Pollok & Heim, 1999; van Roessel & Brand, 2002). Es handelt sich hierbei um ein physikalisches Phänomen, bei dem Energie strahlungsunabhängig von einem Fluorophor (Donor) auf ein zweites Fluorophor (Akzeptor) übertragen wird (s. Abbildung 3.2).

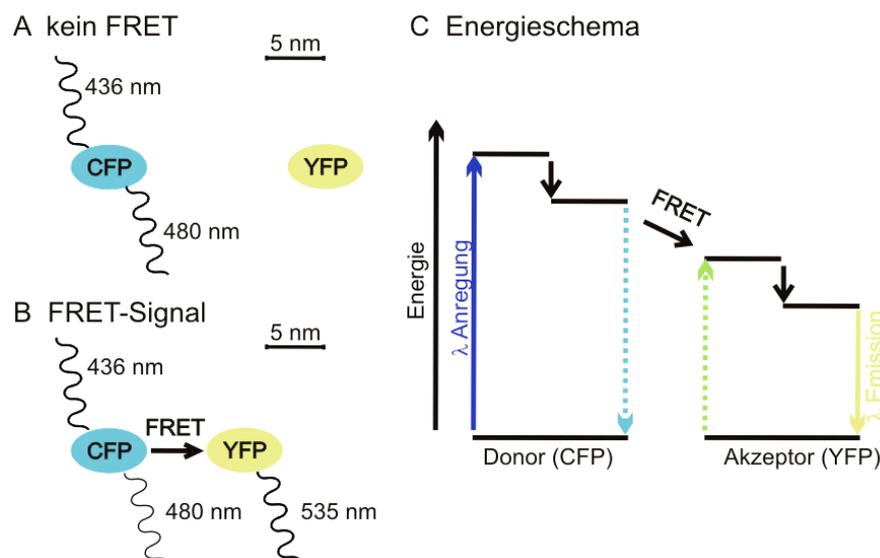


Abbildung 3.2: FRET-Prinzip. (A) CFP wird durch monochromatisches Licht der Wellenlänge 458 nm angeregt und emittiert Licht mit einem Wellenlängenmaximum von 480 nm. (B) CFP wird erneut durch monochromatisches Licht der Wellenlänge 458 nm angeregt, aber emittiert weniger Licht als in A. Stattdessen wird ein Teil der Energie vom CFP auf YFP übertragen, da dieses in große Nähe (1-10 nm) zum Donor CFP gelangt ist. YFP emittiert nach FRET Licht mit einem Wellenlängenmaximum von 535 nm. (C) Energiediagramm von CFP/YFP FRET: CFP (Donor) ist angeregt, jedoch wird der größte Teil seiner Energie nicht für die Emission von Zyanblau verwendet, sondern auf das YFP (Akzeptor) übertragen, so dass als Ergebnis hauptsächlich gelbes Licht emittiert wird.

Um einen Resonanz-Energie-Transfer zu beobachten, müssen drei Bedingungen erfüllt sein. (i) Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen (s. Abbildung 3.3 B, grau dargestellt). (ii) Der Emissionsdipol des Donors darf nicht senkrecht zum Absorptionsdipol des Akzeptors orientiert sein. Und (iii) die Donor- und Akzeptormoleküle dürfen nicht weiter als 10 nm (100 Å) von einander entfernt sein. Förster zeigte, dass die Effizienz des FRETs von der sechsten Potenz des Abstandes (r) von Donor und Akzeptor abhängig ist.

$$E = [1 + (r/R_0)^6]^{-1}$$

Hierbei ist R_0 der sogenannte Förster-Radius, bei dem die FRET-Effizienz, unter Voraussetzung einer zufälligen Orientierung der Dipole, 50 % beträgt (Förster, 1948). R_0 ist somit abhängig von der Kombination der Fluorophore und liegt z.B. für das CFP-/YFP-Paar bei 49-52 Å. Eben diese starke Abhängigkeit vom Abstand der beiden Fluorophore

ermöglicht es mittels FRET den Abstand von interagierenden Proteinen im Bereich von 1 bis 10 nm zu messen. Die Energieübertragung von CFP auf YFP durch FRET macht sich beispielsweise dadurch bemerkbar, dass es bei der Anregung des CFP nicht nur zu einer verminderten CFP-Fluoreszenz, sondern zusätzlich auch zu einer zusätzlichen YFP-spezifischen Emission kommt (s. Abbildung 3.2).

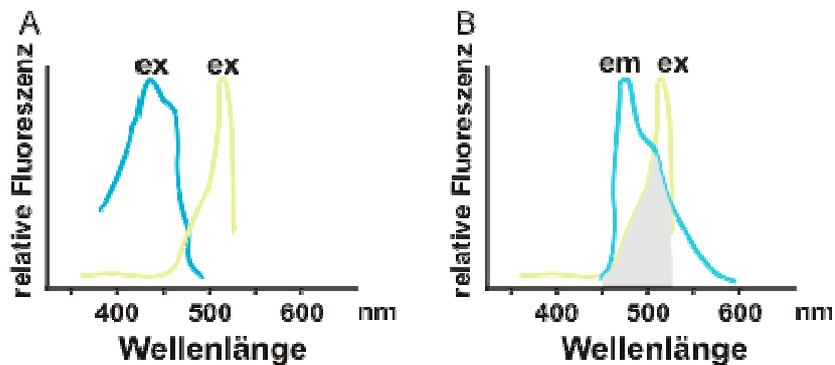
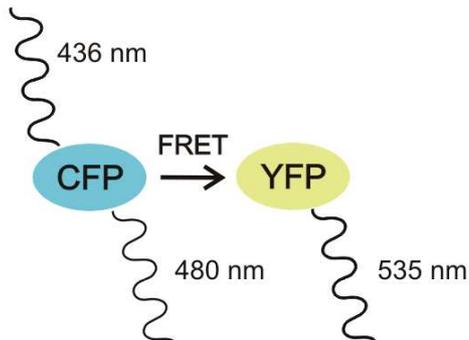


Abbildung 3.3: Spektren. (A) Zeigt die Exzitationspektren von CFP (türkis) und YFP (gelb). Es wird deutlich, dass im gesamten Exzitationsbereich des CFP, YFP ebenfalls in geringem Maße angeregt wird. Hierdurch kommt es zu einer YFP-Emission nach Anregung von CFP und somit zu unspezifischen Signalen, was als spektrales Durchbluten bezeichnet wird. (B) Zeigt das Emissionsspektrum des Donors CFP und das Exzitationspektrum des Akzeptors YFP. Der überlappende Bereich, der für den Energietransfer verantwortlich ist, ist hier grau dargestellt.

A FRET-Signal



B kein FRET

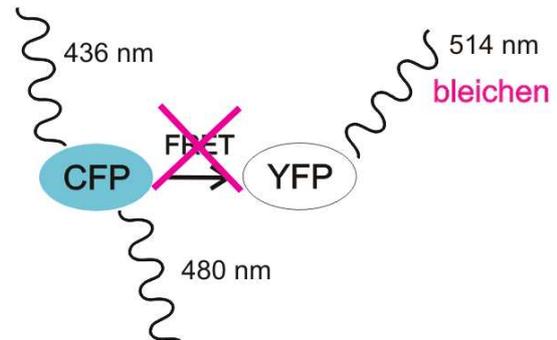


Abbildung 3.4: Akzeptor-Photobleach. (A) FRET erfolgt nach Exzitation des CFP und führt zu einer YFP-spezifischen Emission. (B) Um das Ausmaß des Energietransfers ermitteln zu können, wird anschließend der Akzeptor mit monochromatischem Licht einer geeigneten Wellenlänge gebleicht. Dies führt dazu, dass die YFP Fluoreszenzintensität abnimmt und die CFP Fluoreszenzintensität im entsprechenden Ausmaß zunimmt, da keine Energie mehr auf den Akzeptor übertragen werden kann und diese nun komplett in Emissionslicht umgewandelt wird. Der Anstieg der Donoremission nach vollständigem Bleichen des Akzeptors ist proportional zur Energiemenge, die zuvor auf den Akzeptor übertragen wurde und ist ein Maß für die Effizienz des FRETs.

Der einfachste Weg FRET zu messen ist, die Entstehung eines FRET-Signals durch die Induzierung einer Interaktion zweier Fluoreszenz-markierter Proteine zu messen. Da in der vorliegenden Arbeit aber ein bereits bestehendes FRET-Signal nachgewiesen werden sollte, wurde bei den hier vorgestellten Experimenten die Änderung des FRET-Signals durch Ausbleichen des Akzeptors während der Messung erzwungen. Auf diese Weise konnte die FRET-Effizienz zwischen CFP und YFP durch Ausbleichen des Akzeptors (YFP) und

gleichzeitiger Messung der Donorfluoreszenz (CFP) bestimmt werden (s. Abbildung 3.4). Kommt es durch Wegnahme des Akzeptors zu einem Anstieg der Donorfluoreszenz, so ist dadurch nachgewiesen, dass zwischen den beiden Fluorophoren FRET stattgefunden hat (Kenworthy, 2001). Das Ausmaß des Anstiegs der Donorfluoreszenz durch vollständiges Ausbleichen des Akzeptors ist proportional zur FRET-Effizienz.

Zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen durch spektrales „Durchbluten“ wurde in der vorliegenden Arbeit eine regressionsbasierte spektrale Auswertung unter Zuhilfenahme des Meta-Detektors sowie der von der Firma Zeiss mitgelieferten Software vorgenommen (s. Abbildung 3.3 A; Lenz et al., 2002; Amiri et al., 2003). Der Meta-Detektor stellt eine Aneinanderreihung von 32 Punktdetektoren (PMTs; Photomultiplier) dar, welche eine Aufnahme der gesamten spektralen Signatur in 10,7 nm Schritten und eine anschließende Zusammenfassung zu einem Emissionsspektrum ermöglichen. Es werden zunächst separate Referenzspektren für alle verwendeten Fluorophore (in unserem Fall CFP und YFP) mit allen wichtigen, im späteren Verlauf beibehaltenen Einstellungen aufgezeichnet. Danach werden die Fluorophore unter Verwendung ihrer individuellen Referenzspektren mit Hilfe linearer Entmischung (linear unmixing) in die zugehörigen Kanäle aufgetrennt. Dadurch können selbst stark überlappende Emissionsspektren wieder sauber den Fluorophoren zugeordnet werden.

Für die in dieser Arbeit vorgestellten FRET-Experimente wurden Glasplättchen mit adhätierenden transfizierten Zellen aus den Kulturschälchen entnommen, vorsichtig mit HBS-Puffer (138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5,5 mM Glukose, 10 mM HEPES, pH 7,5) abgespült, in eine Kammer eingespannt, mit 200 µl HBS-Puffer überschichtet und schließlich mit einem invertierten CLSM durch ein Plan-Apochromat 63x/1,4-Objektiv unter Verwendung des Meta-Detektors bei 37 °C ausgewertet. Zur Bestimmung des FRETs wurden Zellen, welche CFP- und YFP-Fusionsproteine exprimierten, mit Laserlicht der Wellenlänge 458 nm angeregt und die Emissionssignale mit Hilfe des META-Detektors von 462-548 nm aufgezeichnet. FRET wurde als Wiedererlangung von CFP-(Donor)-Fluoreszenz während YFP-(Akzeptor)-Bleichens gemessen. Dafür wurden zunächst die Referenzspektren für CFP und YFP ohne Bleichen des Akzeptors über fünf Zyklen aufgezeichnet. Anschließend wurden zwölf Zyklen aufgezeichnet, zwischen denen YFP mit der Wellenlänge 514 nm bei 100 % Laserleistung und fünf Wiederholungen ausgebleicht wurde. CFP- und YFP-Fluoreszenzintensitäten wurden linear entmischt und die FRET-Effizienz in Prozent mittels der nachstehenden Formel berechnet (Bestvater et al., 2005):

$$\text{rel. I.} = (I_t \times I_{N0}) / (I_0 \times I_{Nt}).$$

rel. I. = relative Intensität (1 = 100 %)

I_t = Fluoreszenzintensität der gebleichten Zelle zum angegebenen Zeitpunkt

I_0 = durchschnittliche Fluoreszenzintensität der gebleichten Zelle vor Akzeptor-Photobleach

I_{Nt} = Fluoreszenzintensität der Kontrollzelle zum angegebenen Zeitpunkt

I_{N0} = durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Kontrollzelle vor Akzeptor-Photobleach

3.2.2.6 Messung der intrazellulären Konzentration von Kalzium

Die fluoreszenzphotometrische Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Kalzium in HEK293-Zellen erfolgte mit Hilfe des Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 AM (Grynkiewicz et al., 1985). Fura-2 AM eignet sich besonders gut zur Messung von Kalziumkonzentrationen, da die Fluoreszenzintensität hier unabhängig von der Konzentration des Farbstoffs, der Dicke der Zelle, der die optischen Eigenschaften der Messapparatur zusammenfassenden Konstante und der Ca^{2+} -Konzentrationsfunktion bestimmt werden kann. Mit Hilfe der folgenden Formel wurde die Kalziumkonzentration errechnet (Burelout et al., 2004):

$$224[(y-F_{\min})(F_{\max}-y)^{-1}]$$

$$y = F_{340}/F_{380} \text{ der Probe}$$

HEK293-M₃-Zellen wurden in einfach HBS mit 2 mM Ca^{2+} (138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 5.5 mM Glukose, 10 mM HEPES; pH 7.5) aufgenommen und für 15 min bei RT mit 2 μM Fura-2 AM, 0,1 % FCS und 0,02 % Pluronic F-127 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 1000 x g (Labofuge 400R, Heraeus, Hanau) und RT zentrifugiert, in frischem einfach HBS mit 2 mM Ca^{2+} für 30 min bei 37 °C und 7 % CO_2 inkubiert und in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro 96-well ausgebracht. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Lumineszenz-Spektrometers Modell FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg), bei den Anregungswellenlängen 340 und 380 nm. Während der Messung wurden die Zellen mit 50 μM Carbachol stimuliert (s. Abb. Anhang 8.11) und anschließend die intrazellulären Kalziumkonzentrationen nach Ermittlung von F_{\max} durch Behandlung der Zellen mit 0,5 % NP-40 und F_{\min} durch Zugabe von 50 mM EGTA mit der oben beschriebenen Formel errechnet.

3.2.2.7 Bestimmung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat

Die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde mittels des cyclic AMP [³H] Biotrak Assay Systems (GE Healthcare, München) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Prinzip der kompetitiven Verdrängung zwischen dem zu messenden und radioaktiv markiertem cAMP. Zur Messung von intrazellulärem cAMP wurden Zellen zunächst für eine Minute mit 10 μM Isoprenalin stimuliert und anschließend die stimulierten, aber auch unstimulierte Kontrollzellen in flüssigem Stickstoff zerkleinert und in 6 % Trichloressigsäure durch Ultraschall (10–15 s) extrahiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden bei 13.000 rpm für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand fünfmal mit sechs Volumenteilen Diethylether gewaschen. Abschließend wurden die Proben in einem Vacuum Concentrator System (Bachofer, Reutlingen) getrocknet und in je 50 μl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7,5) resuspendiert (Patrucco et al., 2004). Die so gewonnenen Proben, eine cAMP-Standardreihe und eine Nullprobe wurden

jeweils in Triplikaten angesetzt. 50 µl Probe bzw. 50 µl des cAMP-Standards wurden zusammen mit je 50 µl [³H]cAMP und 100 µl *Binding Protein* für 90 min inkubiert. Überschüssiges freies cAMP wurde durch Zugabe von medizinischer Kohle abgefangen und durch Zentrifugation (500 x g, 12 min, 4 °C) von der [³H]cAMP-Protein-Fraktion getrennt. Anschließend wurde 200 µl des Überstandes zu 3 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und in einem 1214 Rackbeta Liquid Szintillation Counter (LKB Wallac, Turku, Finnland) die Radioaktivität bestimmt. Mit Hilfe der ermittelten Standardkurve konnte die Menge an intrazellulärem cAMP berechnet werden.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Gewinnung von Zelllysaten

HEK293-Zellen wurden mit Ca²⁺/Mg²⁺ haltigem D-PBS gewaschen und anschließend in Lysepuffer (1 % SDS in D-PBS mit 10 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin und 1 mM PMSF) per Ultraschall dreimal für jeweils 15 s auf Eis lysiert. Zur Bestimmung der Akt (Ser473)-Phosphorylierung wurden die 43 h in DMEM ohne FCS gehungerten HL-1-Zellen für 5 min mit dem jeweiligen Agonisten stimuliert und nachfolgend in eiskaltem Akt-Lysepuffer (20 mM Tris pH 7,4, 300 mM NaCl, 3,5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 40 mM β-Glycerophosphat, 1 mM Natriumorthovanadat, 100 nM Okadainsäure, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin und 1 mM PMSF) lysiert und 20 min bei 4 °C inkubiert. Um die G_i-Protein- oder die PI3-Kinase γ-Aktivität zu inhibieren, wurden die HL-1 Zellen vor der Zugabe des Agonisten entweder über Nacht mit 200 ng/ml Pertussistoxin (Merck, Darmstadt, Germany) oder für 20 min mit 3 µM AS252424 (Merck) inkubiert. In beiden Fällen wurde der partikuläre Anteil bei 13.000 rpm abzentrifugiert.

3.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die in dieser Arbeit verwendete Methode nach Lowry und Mitarbeitern (Lowry et al., 1951), welche teilweise nach Peterson (Peterson, 1983) modifiziert wurde, ist für Detergenzhaltige Präparationen besonders geeignet. Als Mengenstandard wurde BSA verwendet. Je 5 µl der Zelllysate (s. 3.2.3.1) wurden auf 1000 µl mit deionisiertem Wasser verdünnt und 10 min mit je 1 ml Reagenz A (200 mM NaOH, 0,025 % CuSO₄, 0,05 % KNa(C₄H₂O₆), 2,5 % NaCO₃ und 2,5 % SDS) inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Reagenz B (333 mM Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz) hinzugegeben und der Ansatz erneut für 30 min bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm (DU 800 Spektrophotometer, Beckman Coulter).

3.2.3.3 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer relativen molekularen Masse wurde ein von Laemmli (Laemmli, 1970) entwickeltes, denaturierendes, diskontinuierliches Elektrophorese-System verwendet.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurden je Probe 25 µg der lysierten Proteine (s. 3.2.3.1 und 3.2.3.2) mit vierfach Laemmli-Puffer (250 mM Tris-HCl, 40 % Glycerol, 20 % β-Mercaptoethanol, 4 % SDS, 0,08 % Bromphenolblau) versetzt, so dass eine einfache Konzentration entstand. Anschließend wurden die Proben auf das Gels aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin und 0,1 % SDS) mit Hilfe des Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (BioRad Laboratories GmbH, München) bei einer konstanten Stromspannung von 35 mA je Gel (1 mm Schichtdicke). Zur Konzentrierung der Proteine diente ein relativ großporiges Sammelgel, während die Auftrennung in einem kleinporigen Trenngel erfolgte.

	Sammelgel	Trenngel
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	4,5 %	10 oder 15 %
SDS	0,1 %	0,1 %
APS	0,1 %	0,1 %
TEMED	0,1 %	0,1 %
Tris-HCl	125 mM, pH 6,8	375 mM, pH 8,8

3.2.3.4 Immunoblot-Analyse

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine (s. 3.2.3.3) auf Nitrozellulose-Membranen (Hybond C extra) erfolgte mittels des Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH; Towbin et al., 1992). Die Membran, sowie sechs Lagen Transferpapier wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Zwei Stücke Transferpapier wurden in Anodenpuffer I getränkt und auf der Anode plziert, ein weiteres mit Anodenpuffer II getränktes Papier wurde darüber geschichtet. Die Membran wurde für zwei Minuten in H₂O gegeben und anschließend für fünf Minuten in Anodenpuffer II äquilibriert, bevor sie auf die Filterpapiere aufgelegt wurde. Das Gel inkubierte fünf Minuten in Kathodenpuffer und wurde dann auf der Membran plziert. Den Abschluss zur Kathode bildeten drei Lagen Transferpapier, welche in Kathodenpuffer getränkt waren. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten des Blots wurden entfernt. Der Transfer dauerte 30 – 90 min bei einer Stromstärke von 70 mA pro transferiertem Gel.

Die Nitrozellulose-Membranen wurden mit Ponceau S-Lösung angefärbt und der überschüssige Farbstoff durch Spülen mit demineralisiertem H₂O entfernt. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden dabei durch Bindung des roten Farbstoffs reversibel sichtbar gemacht und zur Dokumentation eingescannt. Das Blockieren der Membran, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, erfolgte in 20 ml einer Lösung aus 5 % Magermilchpulver in TBS-T für 30 min bei RT. Im Anschluss daran folgte über Nacht die

Inkubation bei 4 °C mit spezifischen primären Antikörpern (1:200 - 1:1000) in einem Antikörperpuffer (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % BSA und 0,01 % NaN₃). Nach mehrmaligem Waschen der Nitrozellulose-Membranen mit TBS-T oder deionisiertem Wasser wurden diese für eine Stunde mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (Anti-Maus-, Anti-Schaf oder Anti-Kaninchen-IgG 1:1000 – 1:5000) inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden nach erneutem Waschen der Membranen mit TBS-T oder deionisiertem Wasser über die Peroxidase-Aktivität durch Chemilumineszenz nachgewiesen (ECL). Im Fall des Nachweises der Akt (Ser473)-Phosphorylierung und des Akt-Proteins wurden die Nitrozellulose-Membranen nach Auswertung der phospho-Akt-Signale für 20 min bei 55 °C in Strippuffer (62,5 mM Tris pH 6,7, 2 % SDS, 100 mM β-ME) inkubiert, sechsmal mit TBS-T gewaschen und im Anschluss erneut mittels Immunoblot-Analyse untersucht.

Als Blotpuffer dienen für:

	Proteine größer 40 kDa	Proteine kleiner 40 kDa
Anode I	300 mM Tris, 20 % Methanol	300 mM Tris, 40 % Methanol
Anode II	25 mM Tris, 20 % Methanol	25 mM Tris, 40 % Methanol
Kathode	25 mM Tris, 40 mM Glycin, 10 % Methanol, 0,005 % SDS	25 mM Tris, 40 mM Glycin, 10 % Methanol

3.2.3.5 Immunpräzipitation

In der vorliegenden Arbeit wurde die Immunpräzipitation (IP) verwendet, um die Lipidkinase-Aktivität der PI3-Kinase γ zu analysieren. Dazu wurden HL-60-Zellen oder HEK293-Zellen, wie unter 3.2.3.1 beschrieben, in IP-Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 10 μ g/ml Aprotinin, 1 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin und 1 mM PMSF) lysiert und durch Homogenisieren mit einer Injektionskanüle (27 G) aufgeschlossen. Zur Gewinnung des Zellextrakts wurde eine ultrazentrifugiert (100.000 x g, 4 °C, 30 min, 3K30, Sigma). Parallel wurde der anti-p110 γ -Antikörper für die Immunpräzipitation in 1 ml Präzipitationspuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM NaF, 1 % NP40, 10 μ g/ml Aprotinin, 1 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin und 1 mM PMSF) bei 4 °C für 1 h an Protein A-Sepharose gebunden. Die Zellextrakte wurden mit Präzipitationspuffer verdünnt und mit antikörperhaltiger bzw. antikörperfreier Protein A-Sepharose über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Sedimentation der Sepharose (1000 x g, 2 min) wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen mit Präzipitationspuffer entfernt. Es folgten Waschschrte mit 1 M LiCl in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 sowie mit 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 7 mM MgCl₂). Die so vorbereiteten Proben wurden zur Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität (s. 3.2.3.6.2) eingesetzt oder zur Identifizierung der gebundenen Proteine mit Probenpuffer nach Laemmli (s. 3.2.3.3) resuspendiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.2.3.3) und durch ihre Immunoreaktivität (s. 3.2.3.4) identifiziert.

3.2.3.6 PI3-Kinase-Funktionsbestimmung

Die Lipidkinase-Aktivität der Klasse I PI3-Kinasen wird zum Nachweis der Aktivität genutzt. Hier besteht die Möglichkeit, eine GFP-fusionierte PH Domäne entweder anhand Ihrer Rekrutierung in lebenden Zellen (Brock et al., 2003), oder biochemisch zum Nachweis von PtdIns-3,4,5-P₃ im Dotblot-Verfahren (Guillou et al., 2007a; Guillou et al., 2007b) zu verwenden. Des Weiteren kann ein PtdIns-3,4,5-P₃ spezifischen Antikörper (Gupta et al., 2007) oder ein radioaktiver *in vitro* Assay (Stephens et al., 1994; Leopoldt et al., 1998; Maier et al., 1999) zum Nachweis der PI3-Kinase-Aktivität genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden zur Aktivitätsbestimmung verwendet: Zum einen die unter 3.2.2.3 und 3.2.2.4 beschriebene Translokation einer GFP-fusionierten PH-Domäne an die Plasmamembran und zum anderen der im Folgenden beschriebene *in vitro* Lipidkinase-Assay.

3.2.3.6.1 Herstellung der Phospholipidvesikel

Die Herstellung von Lipidvesikeln erfolgte nach (Czupalla et al., 2003) mit Modifikationen. Es wurde eine Mischung aus 320 µM Phosphatidylethanolamin, 300 µM Phosphatidylserin, 140 µM Phosphatidylcholin, 30 µM Sphingomyelin und 40 µM PI-4,5-P₂ hergestellt und im N₂-Strom getrocknet. Der so entstandene Lipidfilm wurde in 345 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 7 mM MgCl₂) aufgenommen. Die Eppendorfgefäße wurden im Ultraschallbad bei RT solange inkubiert, bis sich der Lipidfilm vollständig von der Gefäßwandung unter Bildung einer leicht trüben Suspension gelöst hatte.

3.2.3.6.2 Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität

Die Überprüfung der Lipidkinase-Aktivität erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 50 µl wie beschrieben (Maier et al., 1999) nach folgendem Prinzip: 30 µl Phospholipidvesikel (s. 3.2.3.6.1) wurden mit 4 µl BSA (1 %) und 3 µl Gβγ-Komplexen für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 10 ng des Enzyms hinzugegeben und der Reaktionsansatz erneut für 10 min auf Eis in einem Endvolumen von 40 µl inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 µM ATP (1 µCi [³²P]ATP, Hartmann Analytic) in 10 µl 0,1 % BSA enthaltendem Vesikelpuffer gestartet und erfolgte für 15 min bei 30 °C. Zur Beendigung der Reaktion wurde dem Ansatz 150 µl eiskaltes 1 N HCl hinzugegeben und der Ansatz auf Eis gestellt. Die Lipide wurden durch Vortexen in Gegenwart von 500 µl einer 1:1 Mischung Chloroform : Methanol extrahiert. Nach Zentrifugation konnte die organische Phase abgetrennt und nachfolgend zweimal mit 200 µl 1 N HCl gewaschen werden. 70 µl der so erhaltenen organischen Phase wurden mit Hilfe einer Kaliumoxalat-beschichteten Dünnschichtchromatographie-Platte (DC-Platte, Whatman) mit einem Laufmittel aus 35 ml 2 N Essigsäure und 65 ml Propanol aufgetrennt. Die getrocknete DC-Platte wurde

abschließend autoradiographisch mittels Fuji Imaging Folien und eines Fujifilm FLA-5000 Imaging Systems (Raytest) ausgewertet.

3.2.3.7 Größenausschlußchromatographie

Die Größenausschlußchromatographie dient der flüssigchromatographischen Fraktionierung einer Proben nach Größe (Porath & Flodin, 1959) und wird verwendet, um die Dimerisierung der überexprimierten PI3-Kinase-Untereinheiten nachzuweisen. Zunächst wurden Zellen mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ haltigem D-PBS gewaschen und in Elutionspuffer (20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM β -ME, 4 mM EDTA, 0,2 % Polyoxyethylen-10-Laurylether (C12E10), 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Trypsin-Inhibitor, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin und 1 mM PMSF) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Injektionskanüle (27 G) homogenisiert und die unlöslichen Bestandteile mittels Ultrazentrifugation (30 min bei 100.000 x g, 4 °C) abgetrennt. Die Zytosole wurden nachfolgend auf eine 24 ml Superdex 200-Säule (GE Healthcare) aufgetragen und mit Elutionspuffer unter Zuhilfenahme eines „ÄKTA purifier“ HPLC-Systems (GE Healthcare) in Fraktionen à 0,5 ml eluiert. Aliquots der Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (s. 3.2.3.3) und Immunoblot (s. 3.2.3.4) analysiert.

3.2.3.8 Nachweis der Ras-Aktivität mittels Affinitätspräzipitation

Die Tatsache, dass kleine GTPasen nur im aktiven, GTP-gebundenen Zustand an ihre Effektoren binden können, macht man sich zu Nutze, indem man die Ras-Bindungs-Domänen (RBDs) von Effektorproteinen verwendet, um selektiv nur aktiviertes Ras mit Hilfe der Affinitätspräzipitation anzureichern. Im Fall von Ras wird im Allgemeinen die Glutathion-S-Transferase (GST)-fusionierte RBD von Raf verwendet, die an Polymerpartikel (Beads) gebunden wird.

GST-RBD-Fusionsprotein beinhaltende Bakterienlysate wurden freundlicherweise von Herrn PD. Dr. Reza Ahmadian aus unserem Institut zur Verfügung gestellt. 100 μl Glutathion-Sepharose 4B Beads wurden viermal mit je 1 ml Waschpuffer (50 mM Tris; pH 7,5, 2 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,5 % NP40, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin und 1 mM PMSF) equilibriert und anschließend mit 50 μl GST-RBD-Lysat für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Beads erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen, in 500 μl Puffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Auf Ras-Aktivität zu untersuchende Zellen wurden wie unter 3.2.3.1 beschrieben in Waschpuffer lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt (s. 3.2.3.2). Die mit GST-RBD beladenen Glutathion-Sepharose-Beads wurden mit je 3 mg Gesamtprotein für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Präzipitation der Beads bei 1.000 x g für zwei Minuten wurden diese viermal mit Waschpuffer gewaschen und abschließend in je 30 μl einfach Laemmli-Puffer resuspendiert. Die Überstände wurden mittels einem 15 %igen SDS-Gel (s. 3.2.3.3) und Immunoblot (s. 3.2.3.4) analysiert.

4. Ergebnisse

4.1 Rezeptor/G-Protein-Spezifität der PI3-Kinase γ

Die PI3-Kinase γ nimmt als intrazelluläres Effektormolekül eine zentrale Rolle bei der Regulation von inflammatorischen und allergenen Immunantworten ein. So ist sie unter anderem an der Rezeptor-induzierten Migration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie der Degranulation von Mastzellen beteiligt (Hirsch et al., 2000; Sasaki et al., 2000; Li et al., 2000; Ruckle et al., 2006; Hawkins et al., 2006; Rommel et al., 2007). In diesem Zusammenhang wird sie als G_i -Protein-reguliertes Enzym diskutiert, da der überwiegende Teil dieser immunologischen Signaltransduktionsprozesse unter der Kontrolle von G_i PCRs steht und dementsprechend durch Pertussistoxin hemmbar ist (Hawkins et al., 2006; Hirsch et al., 2007).

In neueren Studien konnte jedoch auch die Expression der PI3-Kinase γ in weiteren Organen und Geweben nachgewiesen werden, so u.a. im Herz und in Blutgefäßen. Hier soll sie an der Regulation des Gefäßtonus sowie der Kontraktilität von Kardiomyozyten beteiligt sein, wobei die Mechanismen noch unverstanden sind (Macrez et al., 2001; Crackower et al., 2002; Patrucco et al., 2004; Vecchione et al., 2005; Hirsch et al., 2006). Die Regulation kardiovaskulärer Funktionen wird jedoch neben G_i -, vor allem durch G_s - und G_q -abhängige Signalwege sichergestellt. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob die PI3-Kinase γ nicht nur durch G_i PCRs, sondern auch durch G_s - und G_q PCRs reguliert werden kann. Hierzu wurden die entsprechenden Signalkomponenten in HEK293-Zellen überexprimiert und analysiert. Anschließend sollten die so erhaltenen Befunde auch in einem physiologisch relevanteren Zellmodell überprüft werden.

4.1.1 Das HEK293-Zellsystem

Die Fibroblasten-Zelllinie HEK293 (*human embryonic kidney cells*) wird häufig für die Untersuchung von heterolog in Säugerzellen exprimierten Proteinen verwendet, da sie sich einfach kultivieren und gut transfizieren lässt. Um die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft künftiger Ergebnisse gewährleisten zu können, wurde das HEK293-Zellsystem zunächst eingehend charakterisiert (s. 8.1 bzw. Abb. Anhang 8.1 bis Abb. Anhang 8.8). So wurde beispielsweise ein möglicher Einfluss der Passagezahl der Zellen auf zelluläre Lokalisation und Aktivität der PI3-Kinase γ (s. 8.1.1), sowie die endogene Expression der PI3-Kinasen untersucht (s. 8.1.2). Des Weiteren wurde die Lokalisation und Funktion der generierten p87-Konstrukte überprüft (s. 8.1.3).

4.1.2 Charakterisierung der Aktivität von endogenen PI3-Kinasen in HEK293-Zellen

Für den *in vivo* Nachweis der enzymatischen PI3-Kinase γ -Aktivität wurde ein Bioindikator in HEK293-Zellen verwendet, der auf der selektiven Detektion und Bindung an das Hauptprodukt der enzymatischen PI3-Kinase-Aktivität, dem Membranlipid PtdIns-3,4,5- P_3 , basiert. Hierbei wird die Signaltransduktionskaskade in HEK293-Zellen nachgebildet und die PI3-Kinase-Aktivität in Form der Rekrutierung der PtdIns-3,4,5- P_3 -sensitiven PH-Domäne von Grp1 (GFP-Grp1_{PH}; PIP₃-Sensor) an die Plasmamembran nachgewiesen (s. 3.2.2.3 und 3.2.2.4; Gray et al., 1999; Balla et al., 2000; Brock et al., 2003).

Zunächst wurde jedoch mittels RT-PCR-Analyse die endogene Expression der vier katalytischen Klasse I PI3-Kinase-Untereinheiten überprüft. Es ließen sich dabei die drei katalytischen Untereinheiten der Klasse I_A nachweisen, nicht jedoch die katalytische Untereinheit der Klasse I_B PI3-Kinase γ (s. 8.1.3 und Abb. Anhang 8.8). Damit waren HEK293-Zellen sehr gut geeignet, um die spezifische Funktion der PI3-Kinase γ untersuchen zu können.

Zur weiteren Absicherung unserer Befunde wurde die Rezeptor-induzierte Aktivierbarkeit endogener Kinasen mit Hilfe der GFP-Grp1_{PH}-Translokation überprüft (s. Abbildung 4.1). Eine Stimulation des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-Rezeptor; Brock et al., 2003; Bazley & Gullick, 2005) durch EGF führte erwartungsgemäß zu einer Translokation des PIP₃-Sensors an die Plasmamembran, was mit einer Aktivierung endogener Klasse I_A PI3-Kinasen durch den EGF-Rezeptor vereinbar ist (s. Abbildung 4.1 A, links). Die Stimulation des überexprimierten G_i-Protein-gekoppelten formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin-Rezeptors (fMLP-R) resultierte hingegen in keiner erkennbaren Translokation der GFP-Grp1_{PH}-Domäne (s. Abbildung 4.1 A, rechts). Gleiche Ergebnisse wurden auch für weitere untersuchte GPCRs erhalten (z.B. CXCR4-Rezeptor, β_1 -adrenerger Rezeptor und muskarinischer Acetylcholinrezeptor M₃; nicht gezeigt). GPCRs sind demnach weder direkt noch indirekt (z.B. durch Rezeptortransaktivierung) in der Lage, endogene PI3-Kinasen in HEK293-Zellen zu aktivieren. Hervorzuheben ist, dass die ebenfalls G $\beta\gamma$ -Komplex-sensitive PI3-Kinase β (Kurosu et al., 1997; Maier et al., 1999) in diesem System nicht für die PI3-Kinase γ substituieren kann.

Neben der Ligand-induzierten Stimulation, kann die PI3-Kinase γ auch konstitutiv durch die Überexpression von G $\beta\gamma$ -Komplexen aktiviert werden. Hierbei erfolgt eine Stimulation nicht erst nach Ligand-induzierter Aktivierung des Rezeptors, sondern konstitutiv durch die frei vorliegenden, überexprimierten G $\beta\gamma$ -Komplexe. Auch unter diesen Bedingungen war keine Stimulation der endogenen PI3-Kinasen nachweisbar (nicht gezeigt).

Auch die Expression der monomeren p110 γ reichte weder aus, um eine GPCR- noch um eine G $\beta\gamma$ -Komplex-induzierte Translokation des GFP-Grp1_{PH}-Konstruktes an die Plasmamembran zu erzielen (s. Abbildung 4.20 und Abbildung 4.1 B, links; Brock et al., 2003). Erst die vollständige Rekonstitution des heterodimeren Enzyms (PI3-Kinase γ_{p101}), durch Koexpression der p110 γ - und p101-Untereinheit führte zu einer Umverteilung des PIP₃-Sensors an die Plasmamembran (s. Abbildung 4.1 B, rechts und Abb. Anhang 8.4).

Dies bestätigte frühere Befunde, die zeigen, dass eine Translokation des PIP_3 -Sensors nach Stimulation eines GPCRs oder Kofunktion von $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexen ausschließlich auf der Aktivität der heterolog exprimierten PI3-Kinase γ beruht.

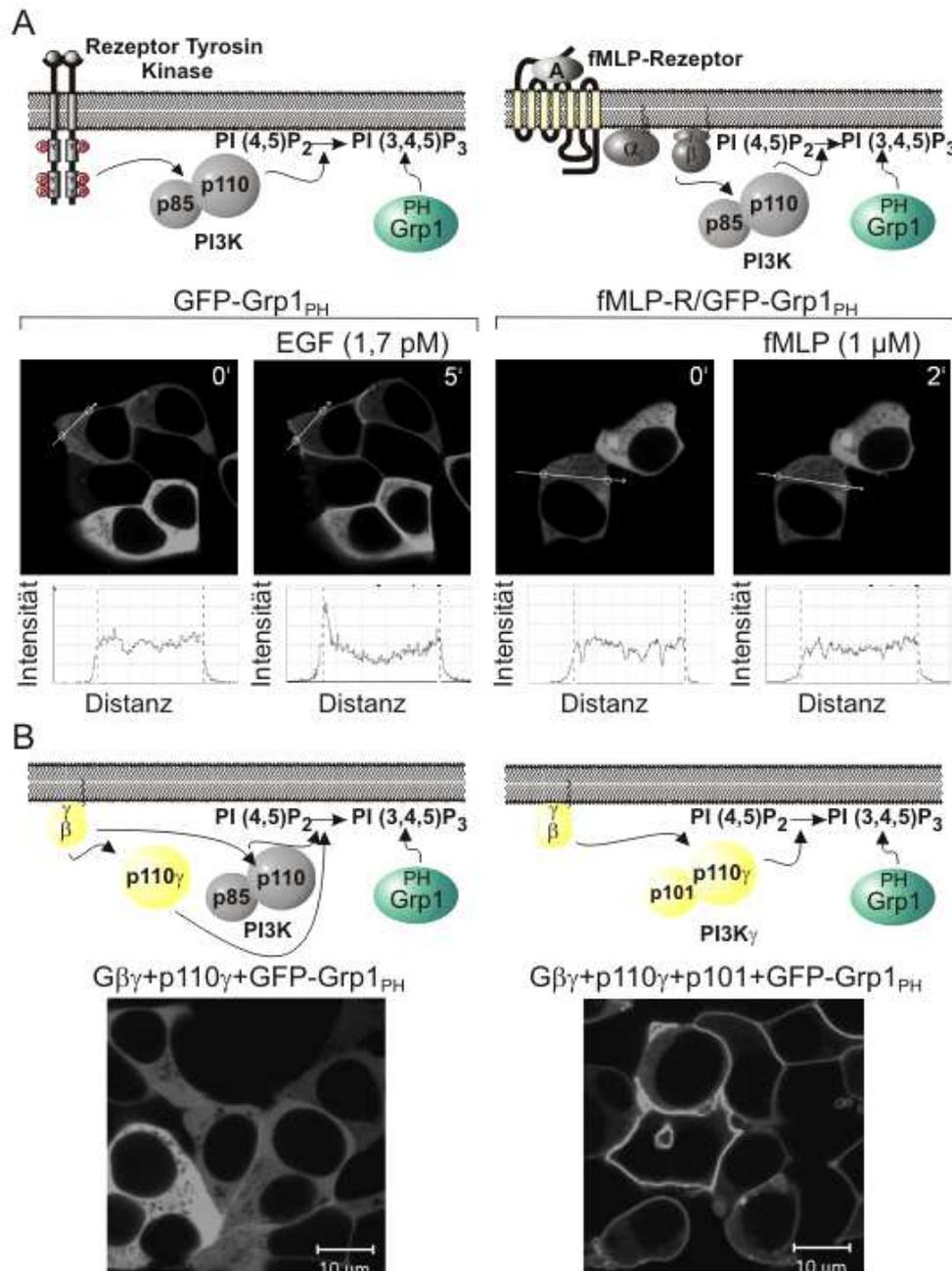


Abbildung 4.1: Endogene PI3-Kinasen werden durch EGF, aber nicht durch fMLP oder freie $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexe aktiviert. (A) HEK293-Zellen wurden mit der GFP-Grp1_{PH}-Domäne transfiziert und anschließend mit EGF (1,7 μM , 5 min) stimuliert. Die EGF-Stimulation induzierte eine Translokation des PIP_3 -Sensors an die Plasmamembran (A, links). Im Gegensatz dazu führt fMLP (1 μM , 2 min) auch in Gegenwart seines überexprimierten Rezeptors zu keiner Umverteilung des PIP_3 -Sensors (A, rechts). Der untere Teil der Abbildungen zeigt die Fluoreszenzintensität entlang der konfokalen Querschnitte. (B) Die zusätzliche Überexpression von freien $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexen resultierte ebenfalls in keiner sichtbaren Stimulation, weder der endogenen PI3-Kinasen, noch der überexprimierten p110 γ -Untereinheiten (B, links). Erst nach Koexpression beider PI3-Kinasen γ -Untereinheiten (p110 γ und p101) mit der GFP-markierten PH-Domäne und $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexen ließ sich eine Rekrutierung des PIP_3 -Sensors nachweisen (B, rechts). Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. **Der experimentelle Aufbau wird auch im Folgenden schematisch im oberen Teil der Abbildungen dargestellt, wobei die transient überexprimierten Proteine farblich markiert sind.**

4.1.3 G_iPCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits exemplarisch für den fMLP-Rezeptor gezeigt werden, dass G_iPCRs die PI3-Kinase γ aktivieren (s. Abb. Anhang 8.4; Brock et al., 2003). Zur Bestätigung und Ausweitung unserer Befunde haben wir einen weiteren G_iPCR, den CXCR4-Rezeptor, in unsere Untersuchungen einbezogen (Kucia et al., 2005).

Die Stimulation von Zellen mit dem spezifischen CXCR4-Liganden CXCL12 führte zu einer raschen Membrantranslokation des PIP₃-Sensors, unabhängig davon, welche PI3-Kinase γ -Isoform koexprimiert wurde (s. Abbildung 4.2, oben). Diese CXCL12-induzierte GFP-Grp1_{PH}-Rekrutierung konnte in beiden Fällen durch die selektive Inhibition von G_i-Proteinen mittels Pertussistoxin (PTX; Kaziro et al., 1991) vollständig unterbunden werden (s. Abbildung 4.2, unten). Diese Befunde bestätigen das Konzept, dass G_i-Proteingekoppelte Rezeptoren PI3-Kinase γ -Isoformen regulieren.

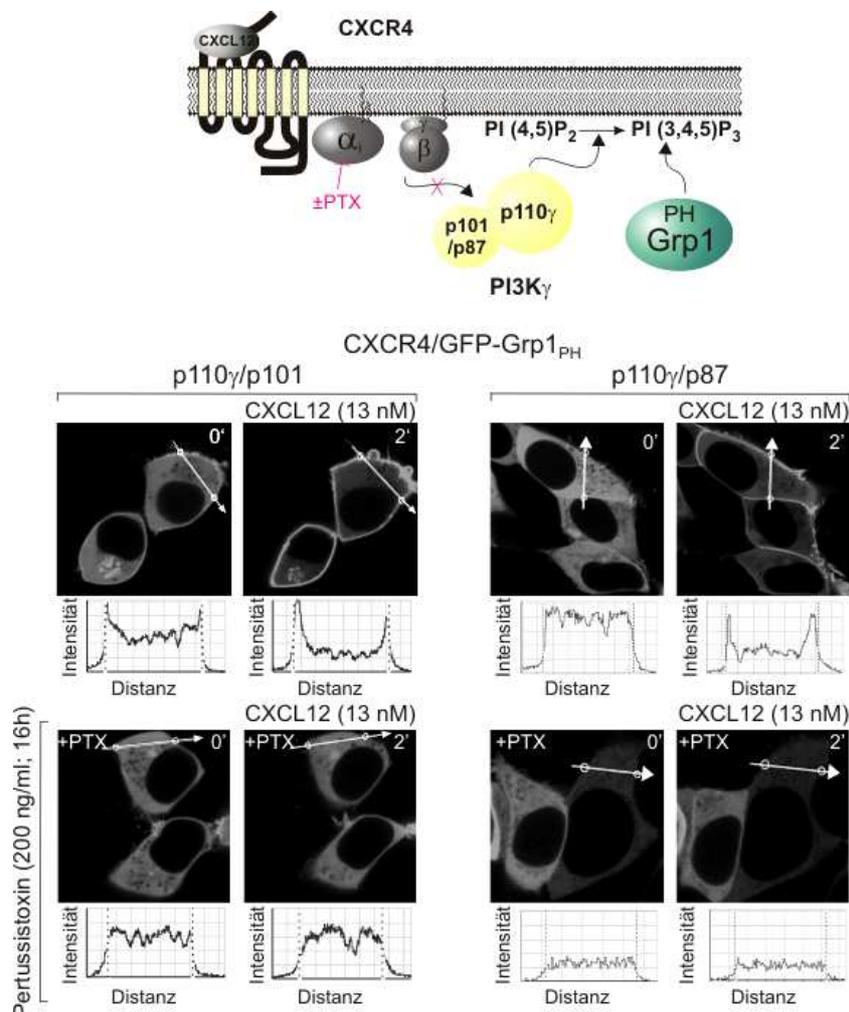


Abbildung 4.2: Die PI3-Kinase γ -Isoformen werden durch den G_i-Protein-gekoppelten CXCR4-Rezeptor aktiviert. HEK293-Zellen wurden mit GFP-Grp1_{PH}, p110 γ , p101 oder p87 und CXCR4 kotransfiziert. Die Gabe des Agonisten (13 nM CXCL12, 2 min) führte in beiden Fällen zu einer Aktivierung der PI3-Kinase γ . Die unteren Darstellungen zeigen Zellen, die zusätzlich mit PTX behandelt wurden (200 ng/ml, über Nacht). Die Vorbehandlung mit PTX unterdrückt sowohl die basale, als auch die Agonist-induzierte Membrantranslokation der GFP-Grp1_{PH}-Domäne. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

Interessanterweise führte bereits die Überexpression der beiden G_iPCRs in Abwesenheit der Liganden zu einer Membranlokalisation der GFP-Grp1_{PH}-Domäne in PI3-Kinase γ_{p101} , jedoch nicht in PI3-Kinase γ_{p87} exprimierenden HEK293-Zellen (s. Abbildung 4.2, links oben). Dieser Effekt auf die PI3-Kinase γ_{p101} konnte durch eine Liganden-induzierte Stimulation des Rezeptors weiter verstärkt werden (s. Abbildung 4.2, links oben). Diese basale PH-Domänen-Umverteilung war, analog der Ligand-induzierten Stimulation, durch PTX inhibierbar (s. Abbildung 4.2 A, links unten). Dies deutet auf eine basale Aktivität des überexprimierten CXCR4-Rezeptors hin, die offenbar in Abhängigkeit vom Effektor sichtbar wird.

Weiterhin zeigten unsere Untersuchung die bereits von (Voigt et al., 2006) beschriebene schwächere Rekrutierung des PIP₃-Sensors in Gegenwart der PI3-Kinase γ_{p87} (im Vergleich zur PI3-Kinase γ_{p101} ; vgl. Abbildung 4.2, links und rechts). Dies deutet entweder auf eine geringere Sensitivität oder einen anderen Regulationsmechanismus der PI3-Kinase γ_{p87} hin (s. 4.3).

4.1.4 G_sPCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen

Das regulatorische Potential von G_s-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf die PI3-Kinase γ wurde exemplarisch anhand des β_1 -adrenergen Rezeptors (β_1 -AR) nach heterologer Expression in HEK293-Zellen untersucht. Eine Stimulation des β_1 -AR führt zu einer nachfolgenden Aktivierung der Adenylylzyklase durch G α_s (Sunahara et al., 1996) und somit zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Zur Überprüfung der korrekten Expression und Funktionalität des β_1 -AR wurde der Isoprenalin-induzierte Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration nachgewiesen (s. Abb. Anhang 8.9).

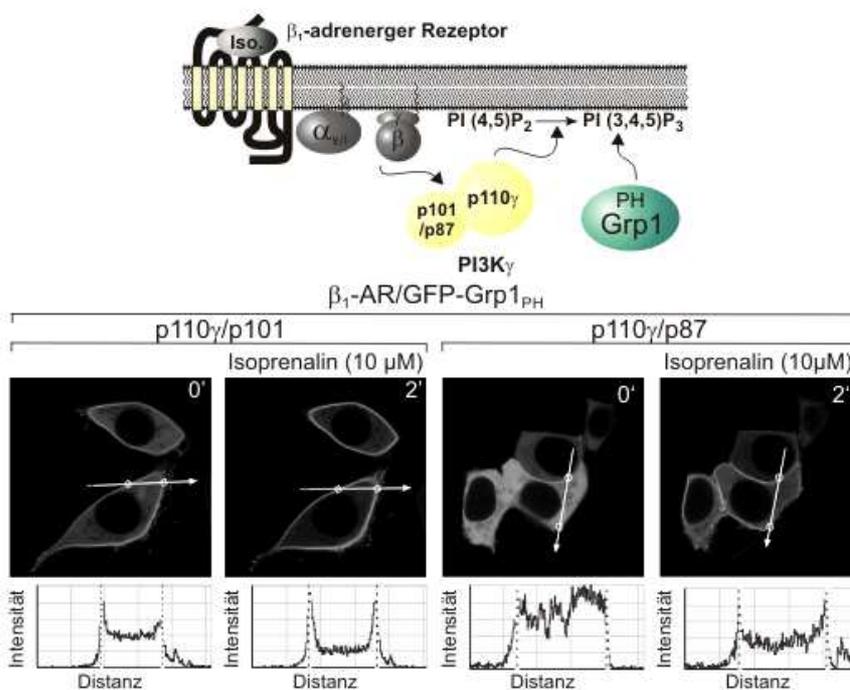


Abbildung 4.3: Der Ligand-aktivierte β_1 -adrenerge Rezeptor stimuliert die PI3-Kinase γ in HEK293-Zellen. Die Zellen wurden mit GFP-Grp1_{PH}, p110 γ , p101 oder p87 und dem β_1 -adrenergen Rezeptor kotransfiziert und mit 10 μ M Isoprenalin für 2 min stimuliert. Nach Zugabe des Agonisten wurde eine signifikante Rekrutierung der GFP-fusionierten PH-Domäne aus dem Zytosol an die Membran sichtbar. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

Da berichtet wird, dass möglicherweise auch G_i-Proteine an den β₁-adrenergen Rezeptor koppeln können (Martin et al., 2004), wurde eine Beteiligung von G_i-Proteinen durch Präinkubation der Zellen mit PTX verhindert. Die PTX-Vorbehandlung führte zu einer erwarteten Steigerung der cAMP-Konzentration (s. Abb. Anhang 8.9). Da dieser Anstieg der cAMP-Konzentration sowohl in den Isoprenalin-stimulierten, als auch in unstimulierten Zellen zu beobachten war, könnte eine tonische Hemmung der Adenylylzyklase durch konstitutiv aktive G_iPCRs zugrunde liegen.

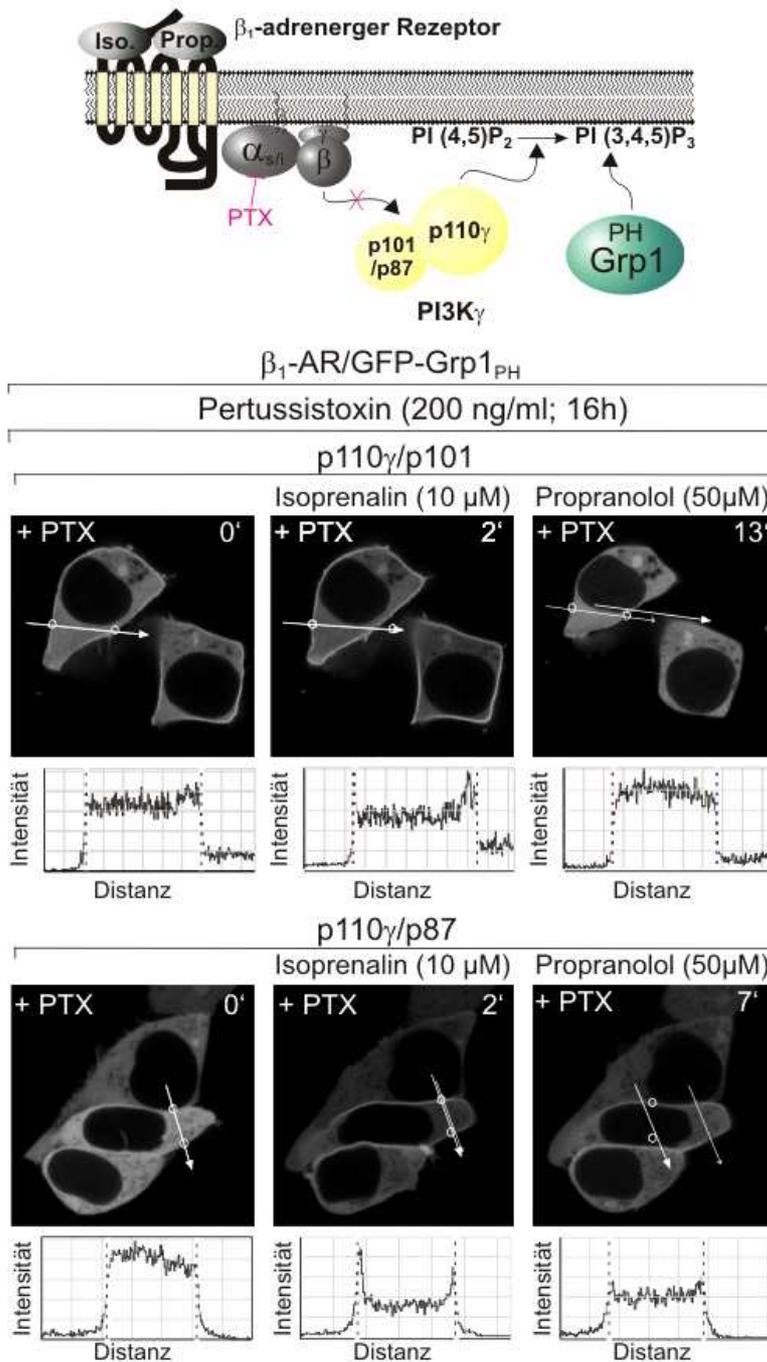


Abbildung 4.4: Der β_1 -adrenerge Rezeptor kann die PI3-Kinase γ unabhängig von G_i-Proteinen aktivieren. HEK293-Zellen wurden mit GFP-Grp1_{PH}, p110 γ , p101 oder p87 und dem β_1 -AR ko-transfiziert und anschließend mit PTX (200 ng/ml, über Nacht) inkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit dem β_1 -AR Agonisten Isoprenalin (10 μ M, 2 min, links) und nachfolgend mit dem inversen β_1 -AR Agonisten Propranolol (50 μ M, 2 min, rechts) behandelt. Die Gabe von Isoprenalin induzierte eine Umverteilung des PIP₃-Sensors zur Plasmamembran in Abwesenheit von funktionsfähigen G_i-Proteinen, welche durch Propranolol vollständig revertiert wurde (rechts). Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

Nach der Charakterisierung des Systems wurde nun getestet, ob der β_1 -AR eine Stimulation der PI3-Kinase γ -Isoformen induzieren kann und ob eine mögliche Aktivierung

hierbei über G_s -Proteine vermittelt wird. Tatsächlich ließ sich eine Isoprenalin-induzierte Membrantranslokation der GFP-Grp1_{PH}-Domäne für beide PI3-Kinase γ -Isoformen nachweisen (s. Abbildung 4.3). Damit ist der β_1 -adrenerge G_s PCR in der Lage, PI3-Kinase γ -Isoformen zu regulieren.

Um nun die Beteiligung von G_i -Proteinen auszuschließen, wurden diese durch PTX inaktiviert. Die Isoprenalin-induzierte Stimulation beider PI3-Kinase γ -Isoformen war weiterhin signifikant vorhanden, gleichwohl schwächer ausgeprägt (vgl. Abbildung 4.4, links und Abbildung 4.3). Die antagonistische Wirkung von Propranolol auf diese Isoprenalin-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ bestätigte zusätzlich die β_1 -adrenerg- und somit G_s -Protein-vermittelte Natur dieser Signale (s. Abbildung 4.4, rechts). In parallel untersuchten Zellen führte PTX zu einer vollständigen Inhibierung der G_i PCR-induzierten PtdIns-3,4,5- P_3 -Bildung (nicht gezeigt). Diese Resultate deuten darauf hin, dass eine PI3-Kinase γ -Aktivität nach Überexpression des β_1 -AR in HEK293-Zellen sowohl durch G_s -Proteine als auch, zumindest partiell, durch PTX-sensitive G_i -Proteine vermittelt wird. Eine Aktivierung der Klasse I_B PI3-Kinase γ durch G_s -Protein-freigesetzte $G\beta\gamma$ -Komplexe ist somit in einem zellulären Modell möglich.

4.1.5 G_q PCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen

Die G_q -Protein-gekoppelte Aktivierung der PI3-Kinase γ wurde am Beispiel des in HEK293-Zellen heterolog exprimierten muskarinischen Acetylcholinrezeptors M_3 (M_3 -Rezeptor) untersucht. Die Stimulation des Rezeptors durch Carbachol führt zu einer G_{α_q} -abhängigen Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β) sowie einer nachfolgenden Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration (Offermanns et al., 1994; Wess, 1996; Han et al., 2005). Dieser Carbachol-induzierte Kalzium-Einstrom wurde als Nachweis der korrekten Expression und Funktionalität des Rezeptors verwendet. Die Stimulation der Zellen mit Carbachol führte erwartungsgemäß zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (s. Abb. Anhang 8.10, unten links). Um eine G_i -Protein-induzierte Aktivierung der PLC β ausschließen zu können, wurden die Zellen wiederum mit PTX vorbehandelt. Hier ließ sich kein Unterschied in der Carbachol-induzierten Kalziumfreisetzung nachweisen, was mit einer G_q -Protein-vermittelten Aktivierung durch den M_3 -Rezeptor nach Überexpression in HEK293-Zellen in Einklang steht (s. Abb. Anhang 8.10, unten rechts).

Die Untersuchung der M_3 -Rezeptor-induzierten PI3-Kinase γ -Aktivierung zeigte nach transienter Überexpression des M_3 -Rezeptors keine Carbachol-induzierte Redistribution des PIP₃-Sensors. Dieses Ergebnis war unabhängig davon, ob PI3-Kinase γ_{p101} oder PI3-Kinase γ_{p87} vorlag (s. Abbildung 4.5).

Um eine mögliche unzureichende Expression des Rezeptors nach transienter Transfektion als Ursache auszuschließen, wurde die Expression des M_3 -Rezeptors in HEK293-Zellen mittels Immunfluoreszenz- und Immunoblot-Analysen im Vergleich zu einer

stabil-exprimierenden M₃-Zelllinie verglichen (s. Abb. Anhang 8.11). In der Tat war nur ein geringer Teil der erfolgreich transient transfizierten Zellen positiv für den M₃-Rezeptor (s. Abb. Anhang 8.11 A). Im Gegensatz hierzu kann in der stabil exprimierenden Zelllinie der M₃-Rezeptor in allen untersuchten Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abb. Anhang 8.11 A rechts und links). Die Immunoblot-Analyse erbrachte ein vergleichbares Ergebnis (s. Abb. Anhang 8.11 B). Der Ansatz mit Hilfe transients Proteinexpression wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

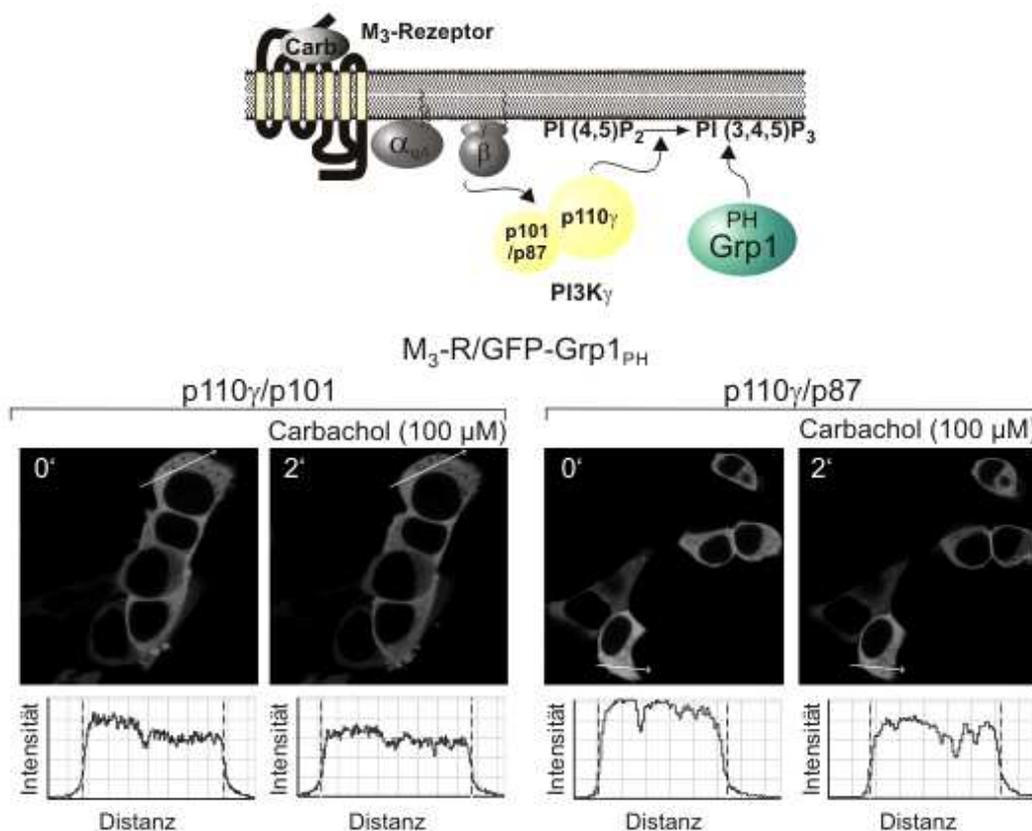


Abbildung 4.5: Der transient exprimierte muskarinische Acetylcholinrezeptor M₃ ist nicht in der Lage, die PI3-Kinase γ zu aktivieren. HEK293-Zellen wurden mit dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor M₃, der GFP-Grp1_{PH}-Domäne, p110_γ und p101 oder p87 kotransfiziert und mit Carbachol stimuliert (2 min, 100 μM). Der G_q-Protein-gekoppelte M₃-Rezeptor war nach transienter Überexpression in beiden Fällen nicht in der Lage, die PI3-Kinase γ zu aktivieren. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

Die weitere Analyse der M₃-Rezeptor-induzierten PI3-Kinase γ-Aktivität wurde daher an einer stabilen HEK293-M₃-Zelllinie (HEK293-M₃) vorgenommen. Eine Stimulation mit Carbachol führte zu einer signifikanten Translokation des PIP₃-Sensors an die Plasmamembran. Dieser Befund war unabhängig davon, ob die PI3-Kinase γ_{p87} oder PI3-Kinase γ_{p101} vorlag (s. Abbildung 4.6). G_q-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind also zu einer Ligand-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ fähig.

In der Literatur wurde beschrieben, dass der M₃-Rezeptor, zumindest nach Überexpression, neben PTX-insensitiven G_q-Proteinen zusätzlich auch G_i-Proteine aktiviert (Offermanns et al., 1994). Deshalb wurden die Zellen mit PTX vorbehandelt. Zur Kontrolle der G_i-Protein-Inhibierung wurde auch hier in einem parallelen Ansatz bestätigt, dass die

Behandlung der Zellen mit PTX zu einer vollständigen Unterbrechung der G_i -Protein-vermittelten Signaltransduktion führt (nicht gezeigt). Tatsächlich resultierte die Stimulation des M_3 -Rezeptors in Gegenwart von PTX in einer signifikanten GFP-Grp1_{PH}-Translokation (s. Abbildung 4.7). Vergleichbar mit der β_1 -adrenerg-induzierten PI3-Kinase γ -Stimulation fiel auch hier die Aktivierung der PI3-Kinase γ in Gegenwart von PTX schwächer aus. Auch war die Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} wiederum schwächer als die der PI3-Kinase γ_{p101} .

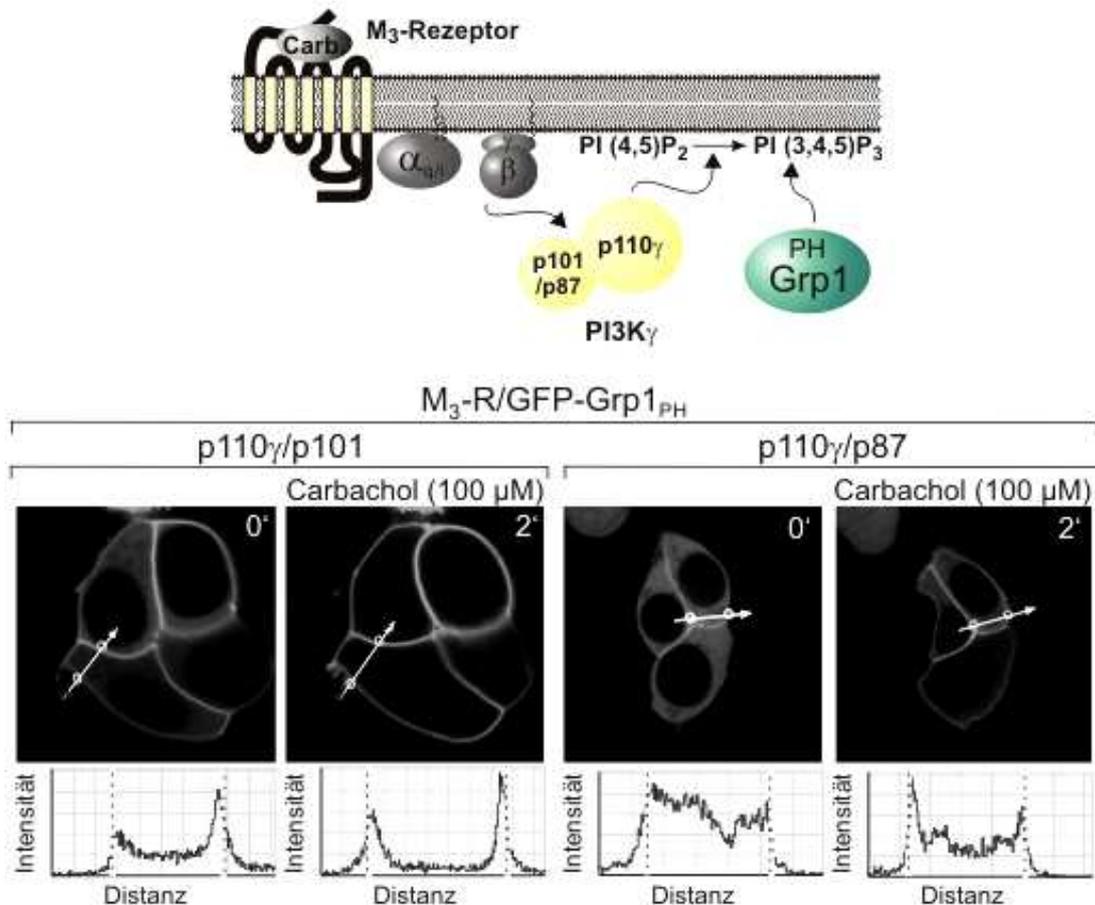


Abbildung 4.6: Der stabil exprimierte muskarinische Acetylcholinrezeptor M_3 aktiviert die PI3-Kinase γ . HEK293- M_3 -Zellen wurden zusätzlich mit GFP-Grp1_{PH}, p110 γ und p101 oder p87 kotransfiziert und für zwei Minuten mit 100 μ M Carbachol stimuliert. Der stabil überexprimierte G_q -Protein-gekoppelte M_3 -Rezeptor kann die PI3-Kinase γ aktivieren. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

In den PTX behandelten HEK293- M_3 -Zellen wurde die Carbachol-induzierte Stimulation der PI3-Kinase γ durch die Gabe des Muskarinrezeptor-Antagonisten Atropin vollständig revertiert (s. Abbildung 4.7).

Der G_q -abhängige Anteil konnte zudem durch den selektiven G_q -Protein-Inhibitor YM-254890 (Takasaki et al., 2004) identifiziert werden. Tatsächlich führte die Vorbehandlung der Zellen mit PTX und die Inhibition mit YM-254890 zu einer vollständigen Hemmung der Carbachol-induzierten PIP₃-Sensor-Umverteilung (s. Abb. Anhang 8.12). Zusammengekommen bestätigt dies eine M_3 -Rezeptor-induzierte G_q - und G_i -abhängige Aktivierung der PI3-Kinase γ .

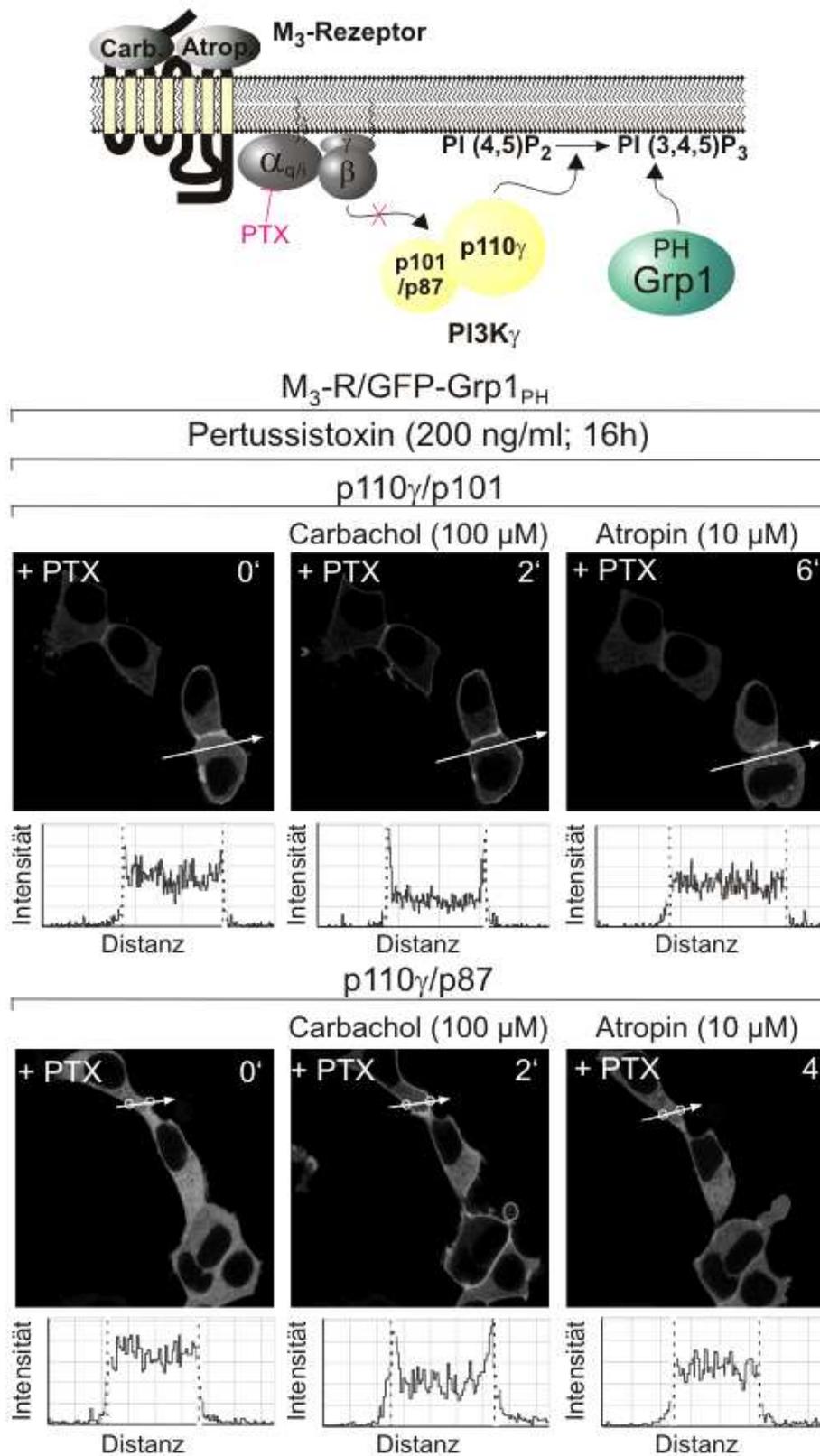


Abbildung 4.7: Der stabil exprimierte muskarinische Acetylcholinrezeptor M₃ aktiviert die PI3-Kinase γ unabhängig von G β -Proteinen. HEK293-M₃-Zellen wurden mit GFP-Grp1_{PH}, p110 γ und p101 oder p87 kotransfiziert und für zwei Minuten mit 100 μ M Carbachol in Gegenwart von PTX (200 ng/ml, über Nacht) stimuliert. Der primär G β -Protein-gekoppelte M₃-Rezeptor kann die PI3-Kinase γ auch unabhängig von G β -Proteinen aktivieren. Die Gabe von 10 μ M Atropin für zwei Minuten führte in den PTX-behandelten Zellen zu einer vollständigen Inhibierung der PI3-Kinase γ -Aktivität. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

4.1.6 Heart Like 1-Zellen (HL1) als Modellsystem zur Untersuchung der Rezeptor-Spezifität der PI3-Kinase γ

Ein Einfluss der PI3-Kinase γ auf die Kontraktilität des Herzens konnte anhand einer p110 γ -defizienten Maus nachgewiesen werden, wobei hier jedoch vor allem eine Kinase-unabhängige Funktion im Vordergrund stand (Crackower et al., 2002; Patrucco et al., 2004). Es ist jedoch davon auszugehen, dass die PI3-Kinase γ im Herzen, neben der vermuteten strukturellen Funktion, auch enzymatisch aktiv ist. Zudem ist der überwiegende Teil der maßgeblich an der Regulation kardiovaskulärer Prozesse beteiligten Rezeptoren G-Protein-gekoppelt. Hier sind vor allem die G_s-Protein-gekoppelten β -adrenergen Rezeptoren, die G_i-Protein-gekoppelten muskarinischen Acetylcholinrezeptoren vom M₂-Typ sowie die G_q-Protein-gekoppelten α_1 -adrenergen-, Angiotensin- und Endothelin-Rezeptoren zu nennen (Rockman et al., 2002). Die potentielle Interaktion dieser GPCRs mit der PI3-Kinase γ sollte nun in der murinen Kardiomyozyten-ähnlichen Zelllinie Heart Like 1 (HL-1) untersucht werden. HL-1-Zellen soll die erste in Kultur proliferierende Zelllinie von Herzmuskelzellen sein. Diese Zelllinie soll ihren differenzierten Phänotyp unter spezifischen Kulturbedingungen beibehalten (Claycomb et al., 1998) und dabei alle Eigenschaften eines adulten Kardiomyozyten, wie beispielsweise die Expression von α -MHC (myosin heavy chain), aber keinem β -MHC aufweisen. Des Weiteren sollen diese Zellen alle Komponenten des kontraktiven Apparates besitzen, was sie in Kultur zu synchronem Schlagen befähigt (Claycomb et al., 1998; White et al., 2004). Die HL-1-Zelllinie erscheint deshalb als ein geeignetes System für die Analyse kardialer Signaltransduktionsprozesse und wurde bereits für entsprechende Untersuchungen eingesetzt (White et al., 2004).

4.1.7 Endogene Expression der PI3-Kinase γ in HL-1-Zellen

Aus früheren Studien war bekannt, dass HL-1-Zellen α_1 - und β -adrenerge Rezeptoren exprimieren (McWhinney et al., 2000; Filipeanu et al., 2006). Zusätzlich konnten wir mit Hilfe eines RT-PCR-Ansatzes den G_i-Protein-gekoppelten muskarinischen Acetylcholinrezeptor M₂ nachweisen (nicht gezeigt).

Der Nachweis der Expression der PI3-Kinase γ -Untereinheiten erfolgte anhand der Real Time-PCR (s. 3.2.1.1.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.8 wiedergegeben. Es konnten alle drei PI3-Kinase γ -Untereinheiten sowohl in HL-1-Zellen, als auch in dem als Vergleich untersuchten murinen Herzgewebe detektiert werden. Um die Spezifität der Real Time-PCR-Signale zu gewährleisten, wurden die PCR-Ansätze zusätzlich in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abbildung 4.8). Es ließen sich lediglich die jeweils spezifischen Amplifikationsprodukte bei 60 (p110 γ), 82 (p101) und 57 (p87) Basenpaaren detektieren. HL-1-Zellen stellen somit ein geeignetes System für die Untersuchung der genannten Fragestellung dar.

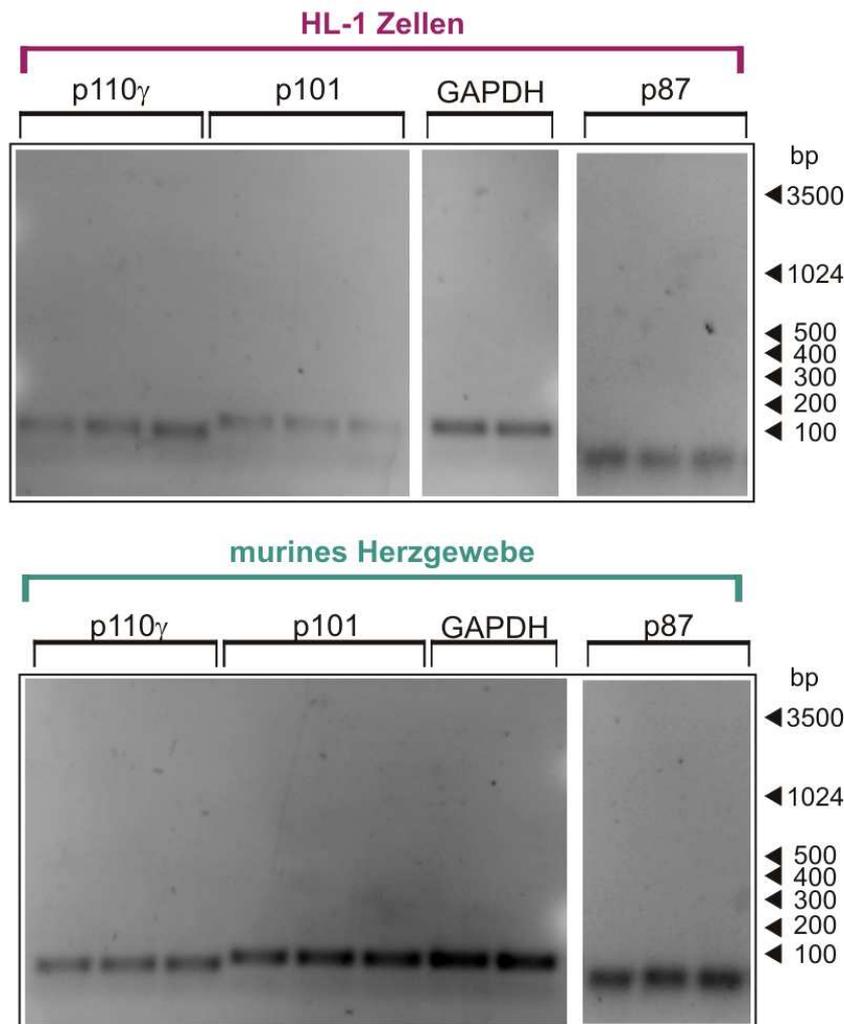


Abbildung 4.8: Real Time-PCR Analyse der Expression von PI3-Kinase γ -Untereinheiten in HL-1-Zellen und murinem Herzgewebe. Die elektrophoretische Auftrennung der Real Time-PCR Produkte im 2 %igen Agarosegel zeigte spezifische Amplifikationsprodukte für p110 γ , p101 und p87 sowohl in HL-1-Zellen, als auch in murinem Herzgewebe.

4.1.8 Aktivierung endogener PI3-Kinasen in HL-1-Zellen

Nun wurde in den HL-1-Zellen analog zu dem HEK293-Zellsystem die GPCR-induzierte Aktivierung der endogenen PI3-Kinasen durch G_q -, G_s - und G_i -gekoppelte Rezeptoren analysiert, wobei wiederum der bereits bekannte PIP_3 -Sensor als Nachweissystem diente. Zunächst wurde die Aktivität von Rezeptoren untersucht, bei denen eine Stimulation erfahrungsgemäß eine Translokation der PH-Domäne hervorruft. Tatsächlich führte eine Stimulation des endogenen EGF-Rezeptors zu einer deutlichen Translokation des PIP_3 -Sensors (s. Abbildung 4.9, links). Daraufhin wurde der G_i -Protein-gekoppelte M_2 -Rezeptor untersucht, da das G_i -Protein die mengenmäßig am häufigsten vorkommende G-Protein-Klasse darstellt und somit ein relativ starkes Signal zu erwarten war. Eine Stimulierung des M_2 -Rezeptors mit Carbachol führte auch in supramaximalen

Konzentrationen zu keiner detektierbaren Redistribution des PIP₃-Sensors (s. Abbildung 4.9, rechts). Offensichtlich reichte das endogene Expressionsniveaus der Signalkomponenten (z.B. Rezeptor, G-Protein, PI3-Kinase γ) nicht aus, um eine sichtbare PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung zu stimulieren.

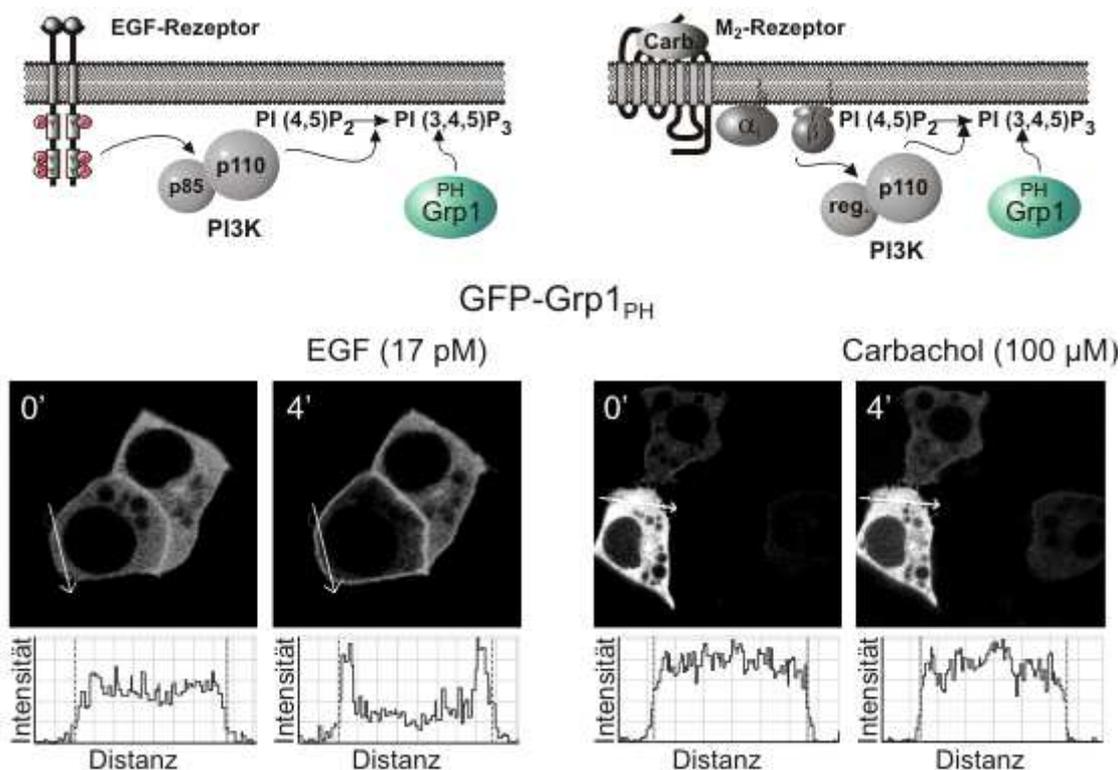


Abbildung 4.9: PIP₃-Sensor Umverteilung nach Aktivierung endogener PI3-Kinasen in HL-1-Zellen. HL-1-Zellen wurden mit der GFP-Grp1_{PH}-Domäne transfiziert und anschließend mit EGF (17 pM, 4 min) oder Carbachol (100 µM, 4 min) stimuliert. Die EGF-induzierte Aktivierung von Klasse I_A PI3-Kinasen wird in den HL-1-Zellen als Rekrutierung der GFP-markierten PH-Domäne sichtbar (links). Eine Carbachol-induzierte Aktivität der PI3-Kinase γ ließ sich nicht nachweisen (rechts). Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

4.1.9 G_iPCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ in HL-1-Zellen

Deshalb haben wir zunächst die PI3-Kinase γ -Isoformen überexprimiert. Für beide PI3-Kinase γ -Isoformen konnte einer Carbachol-induzierte PH-Domänen-Rekrutierung beobachtet werden (s. Abbildung 4.10 A und B). Diese Carbachol-induzierte Stimulation ließ sich durch den Muskarinrezeptor-Antagonisten Atropin revertieren, was den M₂-Rezeptor-induzierten Effekt belegt (s. Abbildung 4.10), zumal keine weiteren muskarinischen Rezeptoren im Herzen vorkommen (Bymaster et al., 2003).

Auffällig war wiederum eine schwächere Aktivität der PI3-Kinase γ_{p87} (s. Abbildung 4.10).

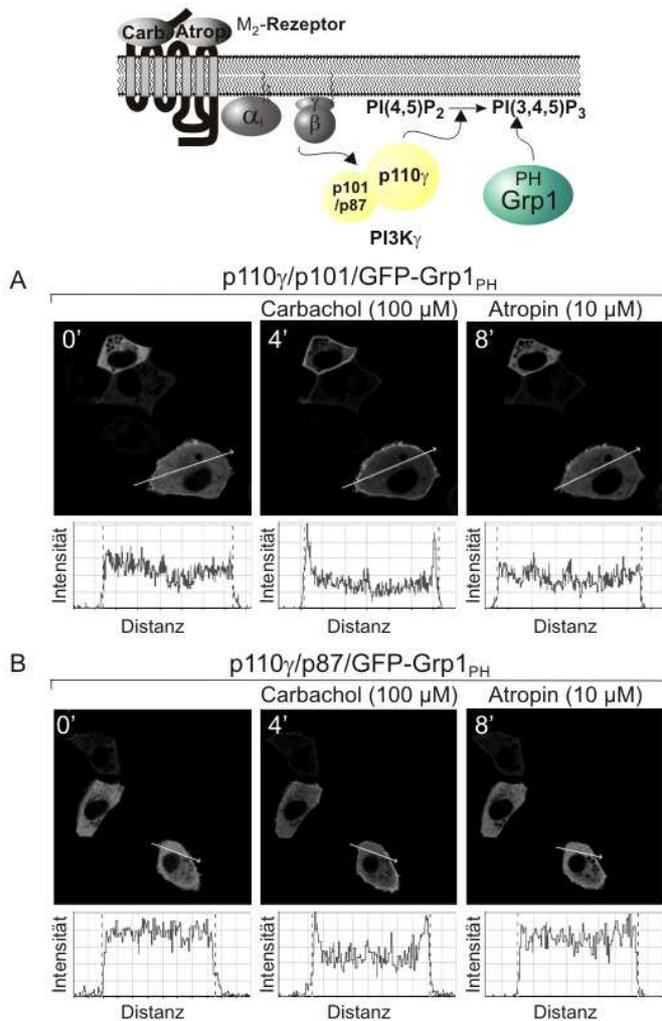


Abbildung 4.10: Aktivierung der PI3-Kinase γ mit Hilfe des endogenen G_i-Protein-gekoppelten M₂-Rezeptors in HL-1-Zellen. HL-1-Zellen wurden mit PI3-Kinase γ_{p87} oder PI3-Kinase γ_{p101} sowie der GFP-Grp1_{PH}-Domäne kotransfiziert und zunächst mit Carbachol (100 μ M, 4 min) und anschließend mit Atropin (10 μ M, 4 min) behandelt. Sowohl im Fall der (A) PI3-Kinase γ_{p101} , als auch der (B) PI3-Kinase γ_{p87} wurde durch Carbachol eine Redistribuktion des PIP₃-Sensors induziert, welche durch den Muskarinrezeptor-Antagonisten Atropin revertiert werden konnte. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

Um die Regulation der endogenen PI3-Kinase γ dennoch zu untersuchen, wurde anstelle der PH-Domänen-Rekrutierung in Einzelzellen hier die Phosphorylierung des PI3-Kinase-regulierten Akt durch Immunoblots analysiert. Akt wird PtdIns-3,4,5-P₃-abhängig an Serin 473 phosphoryliert und stellt einen zentralen Effektor von PI3-Kinasen dar (Downward, 2004; Song et al., 2005). Diese Phosphorylierung lässt sich anschließend im Immunoblot von Zelllysaten spezifisch nachweisen.

Tatsächlich war anhand der Immunoblot-Analyse nach Stimulation von HL-1-Zellen mit Carbachol ein deutlicher Anstieg von P-Akt im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle festzustellen (s. Abbildung 4.11 A). Um auch hier die G_i-Protein-Abhängigkeit des Signals zu testen, wurden HL-1-Zellen mit PTX vorbehandelt und nach Carbachol-induzierter Stimulation wiederum einer Immunoblot-Analyse unterzogen. Hier ließ sich im direkten Vergleich zur unstimulierten Kontrolle kein Carbachol-induziertes P-Akt-Signal mehr nachweisen, was die G_i-Protein-Abhängigkeit des Signals bestätigt (s. Abbildung 4.11 A).

Nicht nur die PI3-Kinase γ , sondern auch die PI3-Kinase β zeigt eine Sensitivität gegenüber G $\beta\gamma$ -Komplexen (Kurosu et al., 1997; Maier et al., 1999; Guillermet-Guibert et al., 2008). Zusätzlich wurde in weiteren Studien nachgewiesen, dass aktivierte GPCRs RTKs transaktivieren können (Daub et al., 1996; Downward, 2003; Piper & Zeuzem, 2004). Auf diese Weise könnten, neben der PI3-Kinase γ , auch die Klasse I_A PI3-Kinasen GPCR-abhängig aktiviert werden.

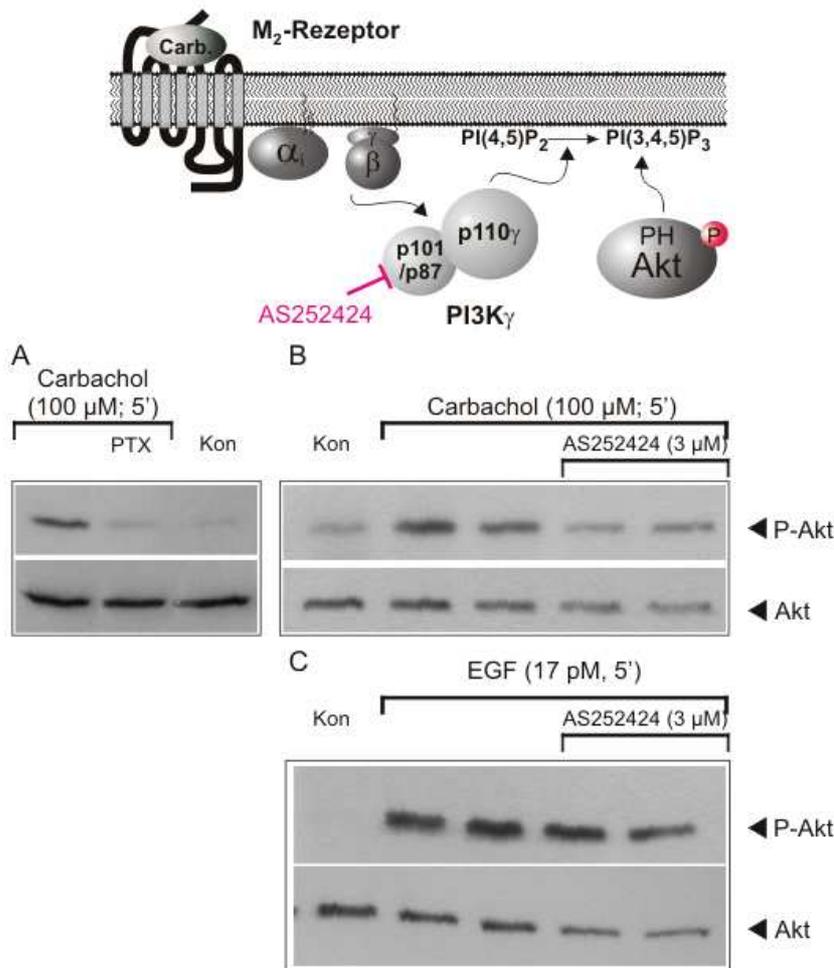


Abbildung 4.11: Der G_i-Protein-gekoppelte muskarinische Acetylcholinrezeptor M₂ induziert die Phosphorylierung von Akt. (A) Die Behandlung von 43 h gehungerten HL-1-Zellen mit Carbachol (100 μM, 5 min) führte zu einem deutlichen Anstieg des phosphorylierten Akts im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Kon). Eine Vorinkubation der Zellen mit PTX (200 ng/ml, über Nacht) inhibierte die Carbachol-induzierte Akt-Phosphorylierung, was für einen G_i-Protein-vermittelten Effekt spricht. (B) Die Behandlung der Zellen mit dem selektiven PI3-Kinase γ-Inhibitor AS252424 (3 μM, 20 min) blockierte die Carbachol-induzierte Akt-Phosphorylierung, was auf einen PI3-Kinase γ-vermittelten Effekt hinweist. (C) Die Behandlung der HL-1-Zellen mit AS252424 (3 μM, 20 min) hatte keinen Einfluss auf die Klasse I_A PI3-Kinase-induzierte Akt-Phosphorylierung nach Stimulation mit EGF (17 pM, 5 min).

In der vorliegenden Arbeit sollte eine mögliche Aktivierung von Klasse I_A PI3-Kinasen mit Hilfe des PI3-Kinase γ-selektiven Inhibitors AS252424 (Pomel et al., 2006) ausgeschlossen werden. Hierzu wurde die Selektivität des Inhibitors vorab in HEK293-Zellen mit Hilfe der PIP₃-Sensor-Translokation validiert. Die Inkubation von HEK293-Zellen mit AS252424 (1 μM) führte zu einer vollständigen Inhibition der fMLP-induzierten PI3-Kinase γ-Aktivierung, während die EGF-induzierte Stimulation der endogenen Klasse I_A PI3-Kinasen unverändert blieb (s. Abb. Anhang 8.13).

In HL-1-Zellen führte die Stimulation mit Carbachol nach Behandlung mit AS252424 (3 μM) zu keinem Anstieg der Akt-Phosphorylierung (s. Abbildung 4.11 B). Als weiterführende Kontrolle wurde die EGF-induzierte Stimulation von Klasse I_A PI3-Kinasen in HL-1-Zellen in An- und Abwesenheit des PI3-Kinase γ-Inhibitors untersucht. Hier konnte

unter gleichen Bedingungen keine Reduktion der EGF-induzierten Akt-Phosphorylierung beobachtet werden (s. Abbildung 4.11 C). Dieser Befund bestätigt die selektive PI3-Kinase γ -Inhibition in HL-1-Zellen durch AS252424. Somit konnte die G_i -vermittelte Aktivierung der endogenen PI3-Kinase γ durch einen ebenfalls endogen exprimierten GPCR schlüssig in HL-1-Zellen nachgewiesen werden.

4.1.10 G_s -PCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ in HL-1-Zellen

Die Analyse der G_s -Protein-abhängigen Stimulation der PI3-Kinase γ erfolgte zunächst nach zusätzlicher Überexpression der PI3-Kinase γ -Isoformen.

Die Isoprenalin-induzierte Aktivierung von endogenen β -adrenergen Rezeptoren führte sowohl nach Überexpression der PI3-Kinase γ_{p101} , als auch der PI3-Kinase γ_{p87} zu einer Translokation des PIP₃-Sensors an die Plasmamembran (s. Abbildung 4.12, A und B). Die nachfolgende Gabe von Propranolol führte zu einer vollständigen Rückverteilung der GFP-markierten PH-Domäne in das Zytosol, was den β -adrenerg-induzierten Charakter dieser Aktivierung bestätigt (s. Abbildung 4.12).

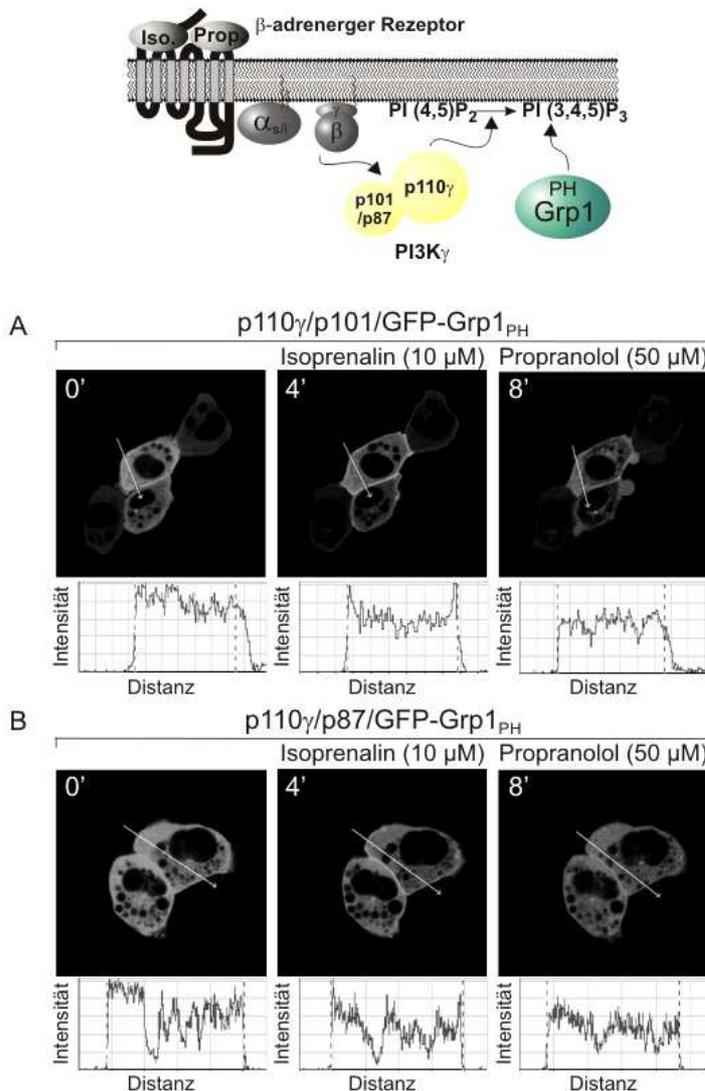


Abbildung 4.12: Stimulation der PI3-Kinase γ durch die endogenen G_s -Protein-gekoppelten β -adrenergen Rezeptoren in HL-1-Zellen. HL-1-Zellen wurden mit PI3-Kinase γ_{p87} oder PI3-Kinase γ_{p101} sowie der GFP-Grp1_{PH}-Domäne kotransfiziert und zunächst mit Isoprenalin (10 μ M, 4 min) und anschließend mit Propranolol (50 μ M, 4 min) behandelt. Sowohl im Fall der (A) PI3-Kinase γ_{p101} , als auch der (B) PI3-Kinase γ_{p87} führte die Isoprenalin-induzierte Stimulation zu einer Translokation des PIP₃-Sensors an die Plasmamembran und die Gabe von Propranolol zu einer Redistribuktion ins Zytosol. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

Für die weitere Überprüfung dieser Hypothese wurde das bereits eingeführte sensitivere Verfahren der Phospho-Akt-Immunoblot-Analyse herangezogen. Nach einer Stimulation von gehungerten HL-1-Zellen mit Isoprenalin ließ sich auch hier ein deutlicher Anstieg der Phospho-Akt-Niveaus beobachten (s. Abbildung 4.13 A). Weiterhin konnte die β -adrenerg-induzierte Akt-Phosphorylierung mit Hilfe des Inhibitors AS252424 eindeutig auf eine PI3-Kinase γ -Aktivität zurückgeführt werden, da in Gegenwart des Inhibitors keine vermehrte Phosphorylierung von Akt nach Isoprenalin Gabe detektierbar war (s. Abbildung 4.13 B). Eine Vorbehandlung der HL-1-Zellen mit Pertussis toxin hingegen führte zu einer teilweisen Inhibition der Isoprenalin-induzierten Akt-Phosphorylierung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die endogenen β -adrenergen Rezeptoren sowohl G_i -, als auch G_s -Protein-abhängig eine Aktivierung der PI3-Kinase γ vermitteln. Dies zeigt, dass auch G_s -Proteine im endogenen zellulären Kontext in der Lage sind, eine Aktivierung der PI3-Kinase γ zu vermitteln.

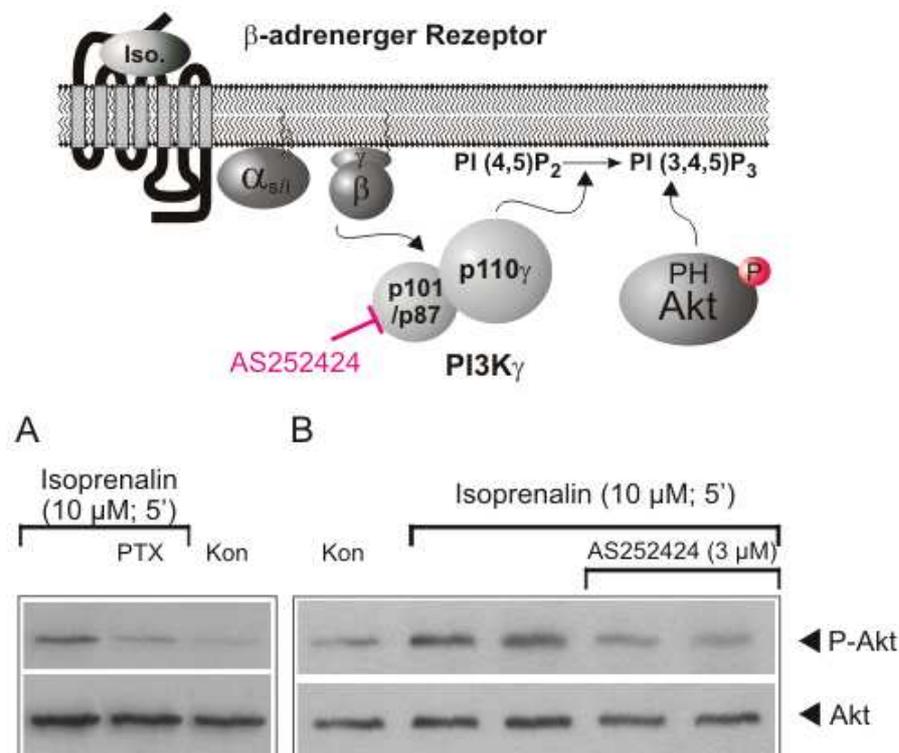


Abbildung 4.13: β -adrenerg-induzierte G_s -Protein-vermittelte Phosphorylierung von Akt. (A) Die Isoprenalin Behandlung (10 μ M, 5 min) von 43 h gehungerten HL-1-Zellen führte zu einer Anreicherung von phosphoryliertem Akt im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen (Kon). Diese Isoprenalin-abhängige Akt-Phosphorylierung wurde durch Vorinkubation der Zellen mit PTX (200 ng/ml, über Nacht) teilweise inhibiert, was für einen G_i - und G_s -Protein-vermittelten Effekt spricht. (B) Die PI3-Kinase γ -Abhängigkeit dieser Akt-Phosphorylierung konnte durch die Behandlung der Zellen mit AS252424 (3 μ M, 20 min) bestätigt werden, da der Isoprenalin-induzierte Effekt durch den PI3-Kinase γ -Inhibitor blockiert wurde.

4.1.11 G_qPCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ in HL-1-Zellen

Die G_q-Protein-vermittelte Stimulation der PI3-Kinase γ wurde in HL-1-Zellen mit Hilfe endogen vorkommender α_1 -adrenerger Rezeptoren zunächst ebenfalls nach zusätzlicher Überexpression der PI3-Kinase γ -Isoformen analysiert. Die Frage, ob G_qPCRs ebenfalls die PI3-Kinase γ stimulieren, war deshalb von besonderem Interesse, da G_q-Proteine im Vergleich zu G_i- und G_s-Proteinen einen wesentlich geringeren Anteil am zellulären G-Protein-Pools haben (Offermanns, 2003) und somit endogen exprimierte G_qPCRs vermutlich auch nur eine geringe Menge an G $\beta\gamma$ -Komplexen freisetzen.

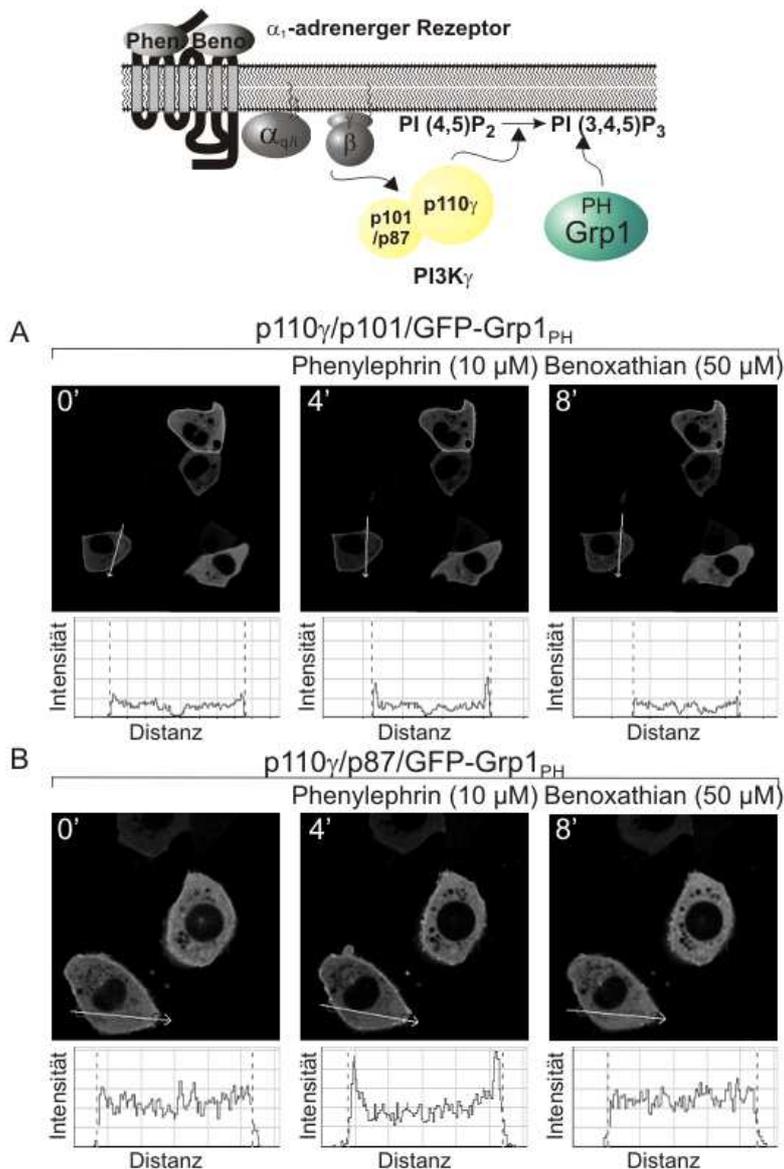


Abbildung 4.14: Primär G_q-Protein-vermittelte Phenylephrin-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen in HL-1-Zellen. HL-1-Zellen wurden mit (A) PI3-Kinase γ_{p101} oder (B) PI3-Kinase γ_{p87} sowie der GFP-Grp1_{PH}-Domäne kointransfiziert und zunächst mit Phenylephrin (10 μ M, 4 min) und anschließend mit Benoxathian (50 μ M, 4 min) behandelt. In beiden Fällen führte die Stimulation der Zellen mit dem α_1 -adrenergen Rezeptor-Agonisten Phenylephrin zu einer Translokation der PH-Domäne an die Plasmamembran. Mit Hilfe des α_1 -adrenergen Rezeptor-Agonisten Benoxathian war diese Translokation vollständig invertierbar, was für eine α_1 -adrenerg-induzierte Stimulation der PI3-Kinase γ_{p101} und PI3-Kinase γ_{p87} spricht. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM ge-hungert.

Die Stimulation von PI3-Kinase γ -überexprimierenden HL-1-Zellen mit dem α_1 -AR-Agonisten Phenylephrin führte zu einer schwachen Anreicherung des PIP₃-Sensors an der Plasmamembran (s. Abbildung 4.14), die insbesondere durch die Fluoreszenzintensitäts-Verläufe in den markierten Querschnitten gut sichtbar wurde. Auch hier konnte die

Membranrekrutierung mit Hilfe des α -adrenergen Rezeptor-Antagonisten Benoxathian auf einen α_1 -adrenerg-induzierten Effekt zurückgeführt werden (s. Abbildung 4.14, rechts). Es lässt sich festhalten, dass auch endogene α_1 -adrenerge Rezeptoren die überexprimierte PI3-Kinase γ in einem nachweisbaren Ausmaß stimulieren können.

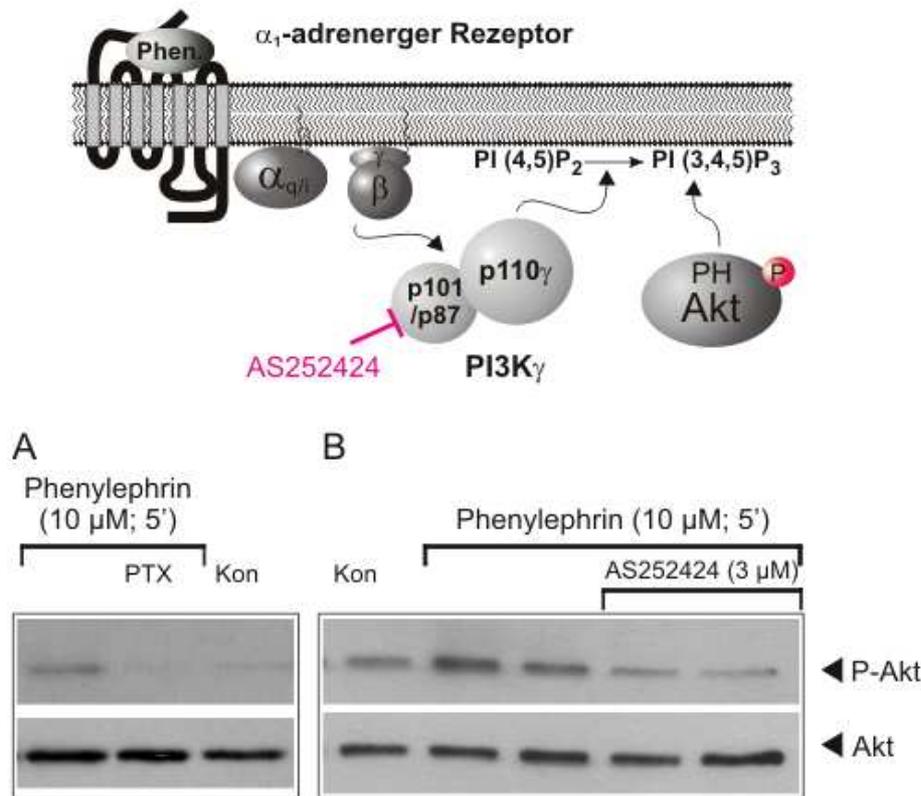


Abbildung 4.15: Akt-Phosphorylierung nach Stimulation der primär G_q -Protein-gekoppelten α_1 -adrenergen Rezeptoren. (A) Nach Stimulation von 43 h gehungerten HL-1-Zellen mit Phenylephrin (10 μ M, 5 min) war ein Anstieg der phosphorylierten Akt-Menge im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Kon) zu beobachten. Diese Phenylephrin-induzierte Akt-Phosphorylierung war nach Vorinkubation der Zellen mit PTX (200 ng/ml, über Nacht) vollständig inhibiert, was für einen G_i -Protein-vermittelten Effekt spricht. (B) Die PI3-Kinase γ -Abhängigkeit des Signals konnte mit Hilfe des selektiven PI3-Kinase γ -Inhibitors AS252424 (3 μ M, 20 min) belegt werden.

Um zu klären, ob auch die endogene PI3-Kinase γ durch α_1 -AR stimulierbar ist, wurde wiederum die Phosphorylierung von Akt nach Stimulation gehungerter HL-1-Zellen mittels Immunoblot-Analyse bestimmt. Nach einer Inkubation der Zellen mit Phenylephrin ließ sich eine Zunahme von Phospho-Akt detektieren, wenngleich diese Anreicherung im Vergleich zu Carbachol oder Isoprenalin schwächer ausfiel (s. Abbildung 4.15 A). Auch hier war die Akt-Phosphorylierung sensitiv gegenüber AS252424 (s. Abbildung 4.15 B). Erstaunlicherweise führte eine Präinkubation der Zellen mit PTX zu einer vollständigen Inhibition der Akt-Phosphorylierung (s. Abbildung 4.15 A). Dieser Befund legt nahe, dass der G_q -gekoppelte α_1 -AR die PI3-Kinase γ nur über G_i -Proteine stimulieren kann. Im Gegensatz zu G_i - und G_s -Proteinen scheint also in dem verwendeten System eine α_1 -adrenerg-induzierte Stimulation von G_q -Proteinen keine nachweisbare Aktivierung der PI3-Kinase γ zu vermitteln.

4.2 Die Ras-vermittelte Aktivierung der monomeren und heterodimeren PI3-Kinase γ -Isoformen

Neben der Rezeptor- und somit G $\beta\gamma$ -vermittelten Aktivierung der PI3-Kinase γ kann auch aktives Ras eine Stimulation des Enzyms induzieren. Bislang wurde allgemein angenommen, dass die *in vivo*-Regulation der PI3-Kinase γ -Aktivität hauptsächlich durch GPCRs und somit G $\beta\gamma$ -vermittelt reguliert wird, während Ras nur eine eher untergeordnete Rolle spielt. Neuere Studien an „knock-in“-Mäusen stellten dieses Konzept jedoch in Frage. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass Ras für die Aktivität der endogenen PI3-Kinase γ *in vivo* weitaus wichtiger ist, als bislang angenommen (Suire et al., 2006).

Deshalb sollte der Einfluss von Ras auf die Kinase-Aktivität der PI3-Kinase γ -Isoformen (p110 γ /p101 und p110 γ /p87) näher charakterisiert werden. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die verschiedenen Ras-Isoformen die PI3-Kinase γ mit unterschiedlicher Effizienz stimulieren können, wobei K- und R-Ras sehr potente Stimulatoren darstellen, und H- sowie N-Ras eher ein moderates Aktivierungspotential aufweisen (Suire et al., 2002). Aus diesem Grund wurde zunächst jeweils eine Ras-Isoform aus beiden Gruppen untersucht, das konstitutiv aktive R-Ras-V38 für die potenten Isoformen und das ebenfalls konstitutiv aktive H-Ras-V12 für die Gruppe mit nur schwachem Potential. Dabei stellte sich heraus, dass die Koexpression von R-Ras-V38 und p110 γ von den HEK293-Zellen nicht toleriert wurde und bereits über Nacht zum Absterben der transfizierten Zellen führte (nicht gezeigt). Übereinstimmend mit einer starken PI3-Kinase γ -Aktivität war der kotransfizierte PIP₃-Sensor an der Zellmembran angereichert (nicht gezeigt). Dieser Befund war unabhängig von der eingesetzten DNA-Konzentration des R-Ras-V38-Plasmids. Dieses Phänomen erinnert an die Wirkung einer Koexpression von G $\beta\gamma$ -Komplexen mit der PI3-Kinase γ_{p101} in HEK293-Zellen (Brock et al., 2003). Die weitere Analyse der Ras-vermittelten PI3-Kinase γ -Stimulation wurde deshalb mit der H-Ras-Isoform durchgeführt, die von HEK293-Zellen toleriert wurde.

Zunächst wurden die zur Verfügung stehenden H-Ras-Konstrukte in HEK293-Zellen auf ihre Funktion geprüft. Nach Überexpression ließ sich die basale Aktivität von H-Ras-wt (unfusioniert oder Fluoreszenz-markiert) durch EGF-Stimulation signifikant erhöhen (s. Abb. Anhang 8.14, links und Mitte links). Demgegenüber zeigte konstitutiv aktives H-Ras-V12 bereits in unstimulierten Zellen eine hohe Aktivität, die durch die Zugabe von EGF nicht weiter gesteigert werden konnte (s. Abb. Anhang 8.14, Mitte rechts). Dominant negatives H-Ras ließ sich weder basal noch nach Rezeptorstimulation präzipitieren und zeigt somit erwartungsgemäß keine Aktivität (s. Abb. Anhang 8.14, rechts).

Im Gegensatz zu G $\beta\gamma$ -Komplexen interagiert aktives, GTP-gebundenes Ras nur mit der katalytischen p110 γ -Untereinheit. Diese Interaktion führt zu einer Konformationsänderung und somit vermutlich zu einer allosterischen Aktivierung des Enzyms (Pacold et al., 2000; Suire et al., 2002). Um diese direkte Interaktion in dem hier verwendeten HEK293-Zellsystem zu bestätigen, wurde die Interaktion von N-Terminal YFP-markiertem H-Ras-wt mit p110 γ in lebenden Zellen mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) untersucht, wobei die Methode des „Akzeptor-Photobleach“ Verwendung fand (s. 3.2.2.5 und

Abb. Anhang 8.15). Es konnte eine signifikante FRET-Effizienz von 8 - 12 % im Vergleich zu Kontrollen (ca. 3 %) beobachtet werden. Interessanterweise gab es aber je nach Position der Fluoreszenz-Markierung der p110 γ quantitative Unterschiede (s. Abb. Anhang 8.15 A): Eine höhere Effizienz ergab sich für die C-terminal markierte p110 γ -Variante (12 % gegenüber 8 %). Da die FRET-Effizienz von der sechsten Potenz des Abstandes der beiden Proteine abhängig ist, würden diese Befunde auf eine größere räumliche Nähe des C- im Vergleich zum N-Terminus von p110 γ mit dem N-Terminus von Ras hindeuten. Dieses Ergebnis war zunächst unerwartet, da die Ras-Bindungsdomäne nahe des N-Terminus der p110 γ liegt (s. Abbildung 1.6 und Abb. Anhang 8.15 B). In Kristallisationsstudien von p110 γ mit N-Ras wurde jedoch eine zusätzliche Interaktionsstelle von Ras mit der C-terminalen katalytischen p110 γ -Domäne postuliert (Pacold et al., 2000).

Zunächst sollte die Stimulierbarkeit der monomeren p110 γ -Untereinheit durch H-Ras untersucht werden. Hier wurde die Akkumulation des GFP-markierten PIP₃-Sensors an der Plasmamembran als Maß für die Intensität der PI3-Kinase-Aktivität genutzt. Um eine semiquantitative Aussage über das Ausmaß der Stimulation treffen zu können, wurde das Verhältnis von membranärer zu intrazellulärer Fluoreszenz bestimmt (s. Methoden 3.2.2.4). Interessanterweise war die Koexpression von H-Ras-wt und p110 γ nicht ausreichend, um eine sichtbare Aktivität der p110 γ zu induzieren (s. Abbildung 4.16 A, Mitte links), während eine signifikante Stimulation durch Kotransfektion der konstitutiv aktiven H-Ras-V12-Mutante mit p110 γ induzierbar war (s. Abbildung 4.16 A, Mitte rechts). Eine Stimulation der p110 γ durch eine Koexpression mit dominant negativem H-Ras-N17 blieb erwartungsgemäß aus (s. Abbildung 4.16 A, rechts). Erwähnt werden sollte, dass nach Überexpression von H-Ras-wt aktives, GTP-gebundenes H-Ras nur in einem sehr geringen Umfang vorliegt, während die Transfektion von konstitutiv aktivem H-Ras-V12 fast ausschließlich aktives, GTP-gebundenes Ras zur Folge hat (vgl. Abb. Anhang 8.14, erste und fünfte Spur). In weiteren Kontrollversuchen wurde ausgeschlossen, dass eine Überexpression von H-Ras-V12 zu einer Aktivierung der endogen exprimierten Klasse I_A PI3-Kinasen in den gehungerten HEK293-Zellen führt (s. Abbildung 4.16 B). Dies war auch nicht zu erwarten, da Ras nur bei gleichzeitiger Desinhibition der p85 durch Tyrosinkinase seine Wirkung entfalten kann (s. 1.3.2.1). Somit war unter den gewählten Versuchsbedingungen die H-Ras-V12-induzierte Translokation des PIP₃-Sensors in Gegenwart von p110 γ ausschließlich auf die Aktivität der Klasse I_B PI3-Kinase γ zurückzuführen. Dieser Versuchsansatz ist somit geeignet, um die in der Literatur bereits beschriebene Aktivierung der p110 γ durch Ras nachzuweisen (s. Abbildung 4.16; Rubio et al., 1997; Suire et al., 2002; Rodriguez-Viciano et al., 2004).

Im Falle der G β γ -Komplex-vermittelten Aktivierung der PI3-Kinase γ führte die Interaktion mit p101 zu einer Rekrutierung der PI3-Kinase γ an die Plasmamembran. Dies ist eine unverzichtbare Voraussetzung für die Aktivierung der Kinase (Brock et al., 2003). Für Ras wurde zwar die direkte Stimulation der PI3-Kinase γ an der Membran beschrieben, jedoch wurde eine Enzym-rekrutierende Funktion von Ras verneint (Suire et al., 2002). Dies ist ungewöhnlich, da Ras typischerweise Effektormoleküle, wie beispielsweise Raf oder PLC ϵ an die Plasmamembran rekrutiert (Stokoe et al., 1994; Song et al., 2001).

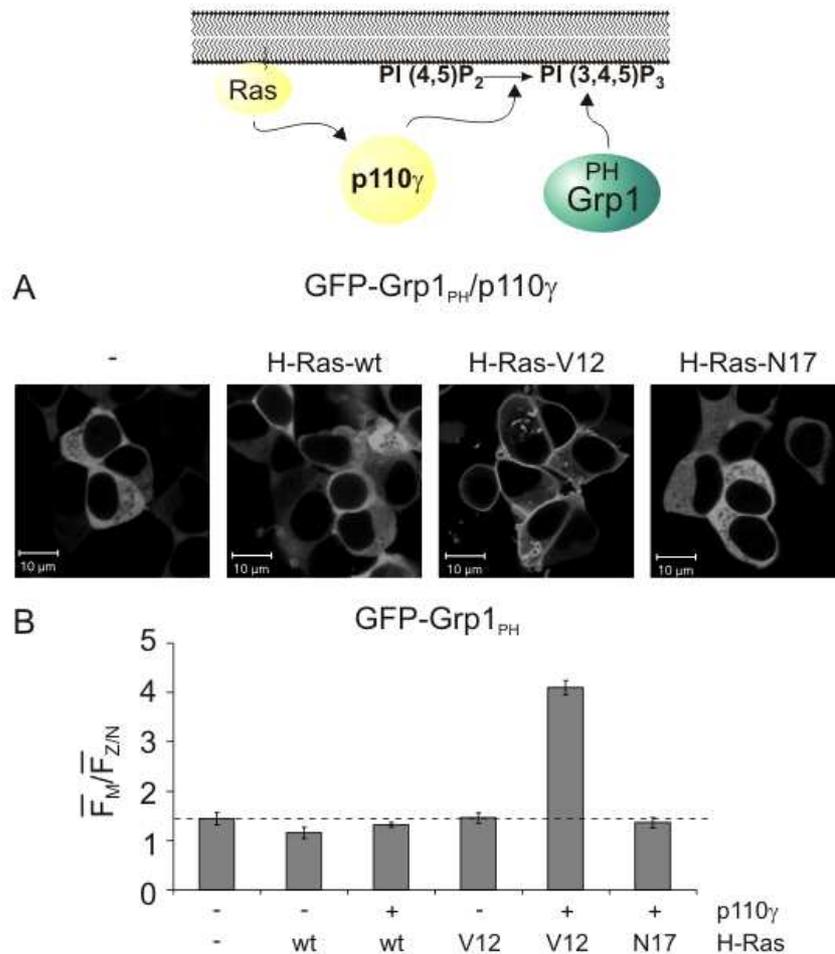


Abbildung 4.16: Ras-induzierte Aktivierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit. (A) HEK293-Zellen wurden mit p110 γ und GFP-Grp1_{PH} kotransfiziert. Hier führte nur die Kotransfektion mit konstitutiv aktivem H-Ras-V12, aber nicht mit H-Ras-wt oder dominant negativem H-Ras-N17 zu einer Aktivierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit. Die Zellen wurden 18 h in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Semi-quantitative Auswertung der PH-Domänen-Verteilung zwischen Membran und intrazellulärem Kompartiment aus drei unabhängigen Experimenten in 18 Zellen analog zu (A).

Um die Frage zu klären, ob die Ras-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase γ ebenfalls von einer Rekrutierung des Enzyms an die Plasmamembran abhängig ist, wurde ein konstitutiv mit der Membran assoziiertes p110 γ -CAAX-Konstrukt eingesetzt (Brock et al., 2003). Die Kotransfektion von H-Ras-wt mit p110 γ -wt führte zu keiner Aktivierung des Enzyms, während eine Kotransfektion mit membranständiger p110 γ -CAAX in einer deutlichen Aktivierung resultierte (s. Abbildung 4.17 A, links). Demgegenüber zeigte die konstitutiv aktive H-Ras-V12-Mutante in beiden Fällen eine starke Aktivierung der jeweiligen p110 γ -Variante (s. Abbildung 4.17 A, rechts). Das Ausmaß der Stimulation nach Koexpression von p110 γ und H-Ras-V12 war in etwa vergleichbar zu der Stimulation nach Expression der membranständigen p110 γ -CAAX und H-Ras-wt. Die Koexpression von p110 γ -CAAX mit konstitutiv aktivem H-Ras-V12 hatte eine weitere Aktivitätserhöhung zur Folge (s. Abbildung 4.17 A).

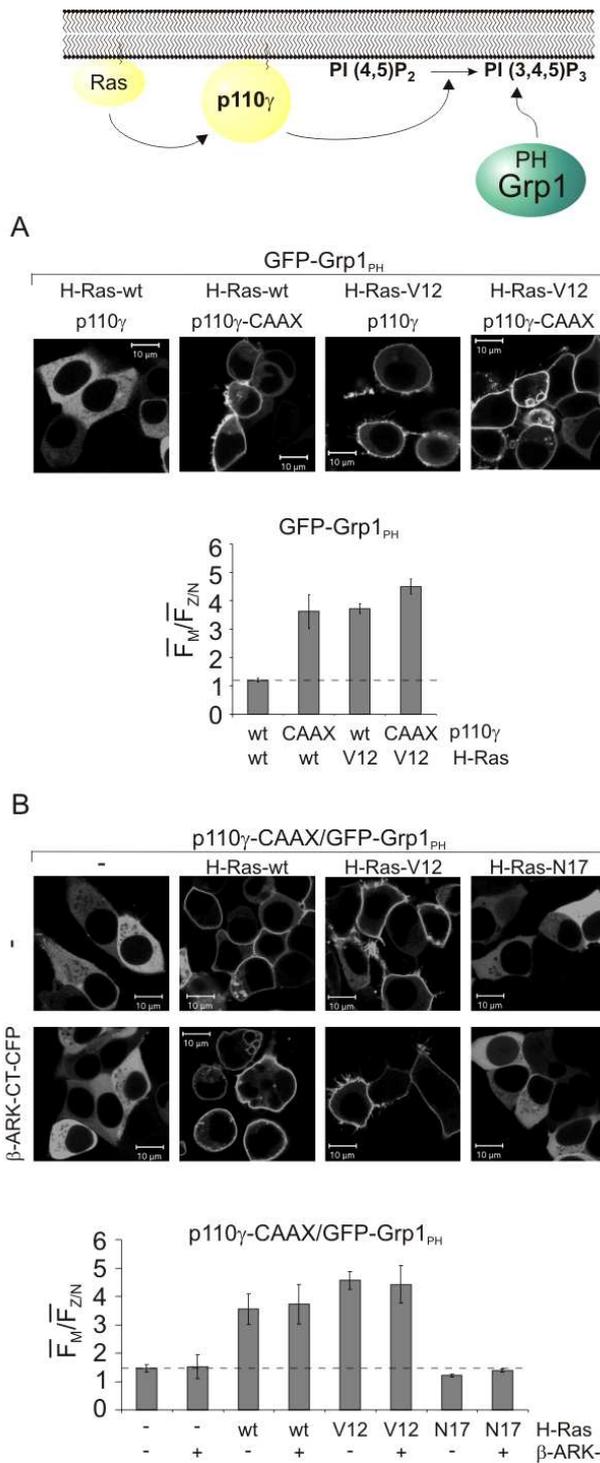


Abbildung 4.17: Ras-induzierte Aktivierung der membranständigen, katalytischen p110_γ-Untereinheit. (A+B) HEK293-Zellen wurden mit p110_γ-wt oder -CAAX, GFP-Grp1_{PH} und H-Ras-wt, H-Ras-V12 oder H-Ras-N17 ± β-ARK-CT-CFP kotransfiziert. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. Die Säulendiagramme zeigen die semi-quantitative Auswertung der PH-Domänen-Verteilung zwischen Membran und intrazellulärem Kompartiment aus drei unabhängigen Experimenten in 18 Zellen. Die Translokation des PIP₃-Sensors macht deutlich, dass im Fall der membranständigen p110_γ-CAAX schon die Koexpression von H-Ras-wt für eine starke Aktivität der katalytischen Untereinheit ausreichend ist. Die Anwesenheit von β-ARK-CT-CFP macht deutlich, dass die Aktivierung von p110_γ-CAAX durch H-Ras unabhängig von Gβγ-Komplexen erfolgt.

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass Zellen über einen gewissen Anteil an freien Gβγ-Komplexen verfügen (Lin et al., 1998). Dies ist möglicherweise auf konstitutiv aktive GPCRs zurückzuführen (s. 1.2.1; Lefkowitz et al., 1993; Seifert & Wenzel-Seifert, 2002). Um zu belegen, dass die beobachtete Aktivierung der p110_γ ausschließlich auf Ras und nicht auf einen synergistischen Effekt von Ras und frei vorliegenden Gβγ-Komplexen beruht, wurde der Gβγ-Scavenger β-ARK-CT-CFP eingesetzt. Bei β-ARK-CT-CFP handelt es sich um den CFP-markierten C-terminalen Teil der β-adrenergen Rezeptorkinase, welcher durch eine direkte Bindung an Gβγ-Komplexe deren kompetitive Inhibition bewirkt. Die Vollständigkeit dieser Inhibition wurde bereits in Vorversuchen getestet (s. Abb. Anhang 8.16). Die

Anwesenheit von β -ARK-CT-CFP hatte keinen Einfluss auf die Ras-induzierte Aktivierung von p110 γ -CAAX (s. Abbildung 4.17 B). Auch in diesem Fall war für die Stimulation der membranständigen p110 γ -CAAX bereits die Koexpression von H-Ras-wt ausreichend, während die dominant negative H-Ras-N17-Mutante in beiden Fällen keine Aktivierung der p110 γ auslösen konnte (s. Abbildung 4.17 B).

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass die Rekrutierung der p110 γ an die Plasmamembran eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierung des Enzyms durch Ras darstellt, wobei die Frage nach dem Mechanismus dieser Rekrutierung nachfolgend beantwortet werden sollte (s. Abbildung 4.25).

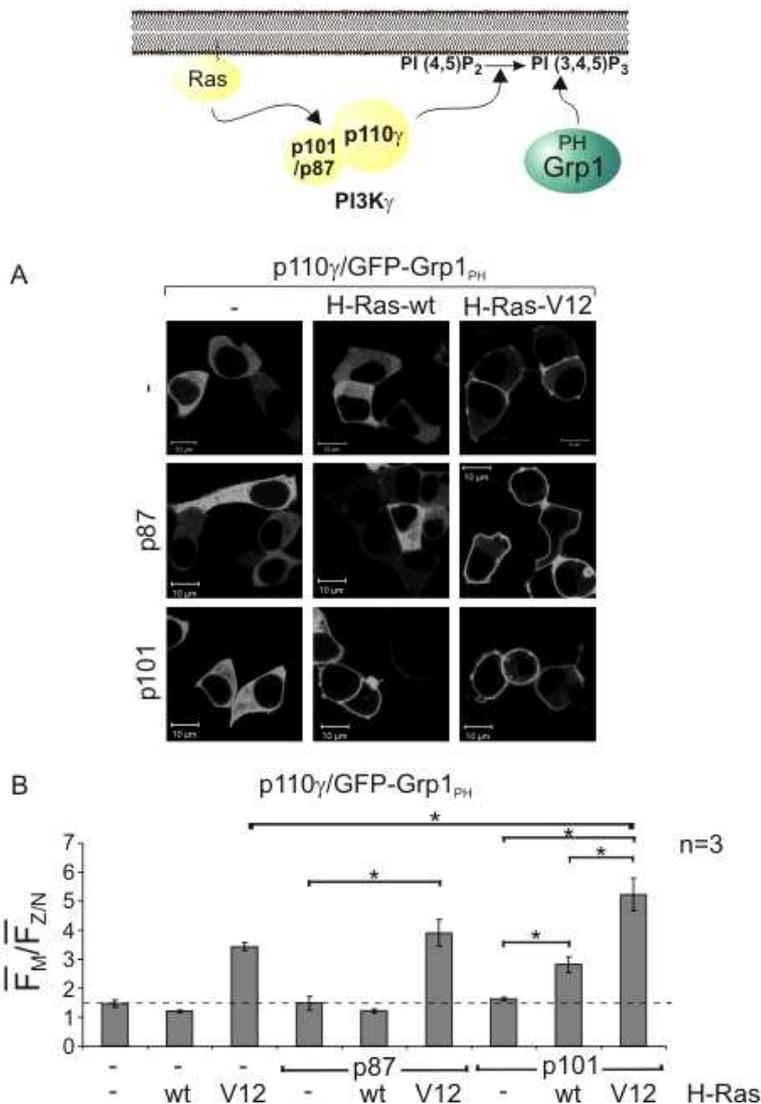


Abbildung 4.18: Ras-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen. (A) Untersuchung der H-Ras-wt oder H-Ras-V12-induzierten Aktivierung von monomerer p110 γ oder den Heterodimeren p110 γ /p101 bzw. p110 γ /p87 anhand der GFP-Grp1_{PH}-Rekrutierung in HEK293-Zellen. Nur im Fall der PI3-Kinase γ_{p101} führte bereits die Koexpression von H-Ras-wt zu einer Umverteilung des PIP₃-Sensors. Die Zellen wurden 18 h in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Semi-quantitative Auswertung der PH-Domänen-Verteilung zwischen Membran und intrazellulärem Kompartiment aus drei unabhängigen Experimenten in 18 Zellen analog zu (A).

Da die p110 γ unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich nicht als Monomer, sondern mit einer der beiden nicht-katalytischen Untereinheiten (p101 oder p87) heterodimerisiert vorliegt, sollte ein möglicher Einfluss von p101 bzw. p87 auf die Ras-vermittelte Aktivierung der p110 γ geprüft werden. Hierzu wurde die Wirkung von wildtypischem bzw. konstitutiv aktivem H-Ras auf die Aktivierung der monomeren p110 γ sowie der beiden Heterodimere (p110 γ /p101 oder p110 γ /p87) getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.18 zusammengefasst.

Sie belegen, dass die Koexpression der nicht-katalytischen Untereinheiten zu einer Aktivierungssteigerung der PI3-Kinase γ durch H-Ras führt (s. Abbildung 4.18 A). Während dieser Effekt für die p87 noch kein signifikantes Niveau erreichte, führt p101 zu einer deutlichen und signifikanten Steigerung der Aktivität (s. Abbildung 4.18 B). Die Sensitivierung der p110 γ gegenüber Ras durch p101 fand ihren Ausdruck nicht nur bei Einsatz des konstitutiv aktiven Ras, sondern bereits bei der wildtypischen Variante. Die Effektivität der Ras-induzierten p110 γ -Aktivierung scheint also durch die nicht-katalytischen Untereinheiten positiv beeinflusst zu werden.

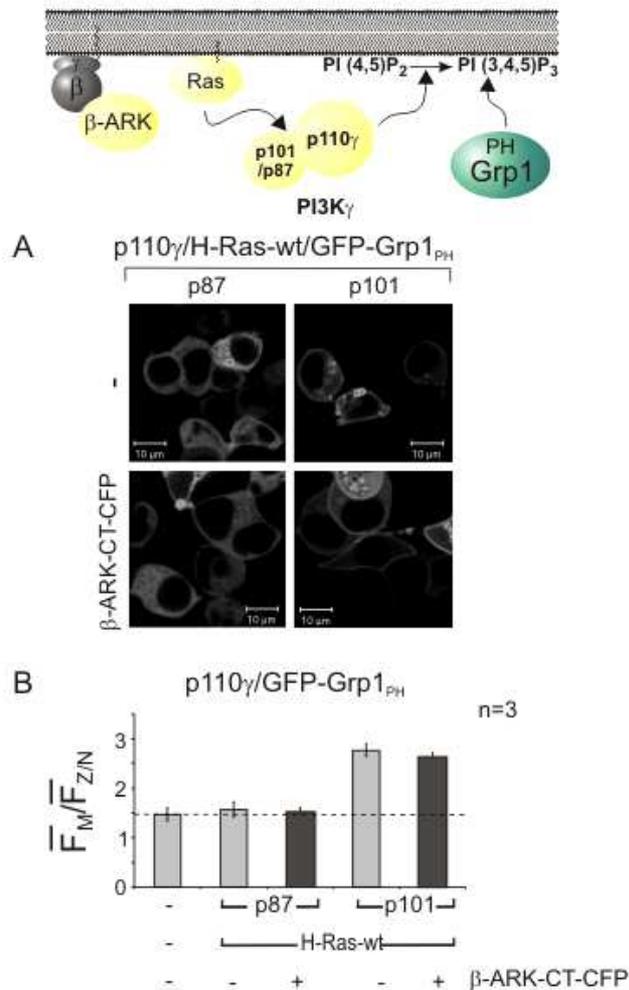


Abbildung 4.19: G β γ -Komplex-Abhängigkeit der H-Ras-wt-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p101} -Isoform. (A) HEK293-Zellen wurden mit H-Ras-wt, GFP-Grp1_{PH}, der PI3-Kinase γ (p110 γ /p87 oder p110 γ /p101) und β -ARK-CT-CFP kotransfiziert. Die einzelnen Ansätze zeigten in An- oder Abwesenheit von β -ARK-CT-CFP eine vergleichbare Aktivität. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Semi-quantitative Auswertung der PH-Domänen-Verteilung zwischen Membran und intrazellulärem Kompartiment aus drei unabhängigen Experimenten in 18 Zellen analog zu (A).

In einem weiteren Experiment wurde mit Hilfe von β -ARK-CT-CFP ausgeschlossen, dass die erhöhte Sensitivität der PI3-Kinase γ_{p101} auf einer Rekrutierung des Enzyms durch möglicherweise frei vorliegende G β γ -Komplexe basiert (s. Abbildung 4.19). Ebenfalls ausgeschlossen wurde, dass Ras funktionell mit p87 oder p101 in HEK293-Zellen interagiert (s. Abb. Anhang 8.17). Der beobachtete Einfluss von p101 auf die Ras-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ ist demnach unabhängig von G β γ -Komplexen und einer Interaktion von Ras mit der nicht-katalytischen Untereinheit. p101 fungiert also möglicherweise nicht nur als G β γ -Komplex-Adapter bei der Rezeptor-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ , sondern auch als eine auxiliäre Untereinheit, die die Sensitivität der PI3-Kinase gegenüber Ras erhöht.

4.3 Mechanismen der Rezeptor-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen

Die bisherigen Untersuchungen haben in Übereinstimmung mit der Literatur keinen qualitativen Unterschied hinsichtlich der Aktivierung beider PI3-Kinase γ -Isoformen erbracht (Suire et al., 2005; Voigt et al., 2006). Die Existenz zweier nicht-katalytischer PI3-Kinase γ -Untereinheiten lässt jedoch über einen funktionellen Unterschied beider Isoformen spekulieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, haben wir den Mechanismus der PI3-Kinase γ -Aktivierung untersucht.

4.3.1 Rezeptor-induzierte $G\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen

Die nicht-katalytische p101-Untereinheit ist als Adapter für $G\beta\gamma$ -Komplexe gut etabliert (Stephens et al., 1997; Brock et al., 2003). Die Interaktion von $G\beta\gamma$ -Komplexen und p101 ermöglicht die Rekrutierung der Kinase an die Plasmamembran, wodurch sie in räumliche Nähe zu ihrem Substrat gelangt und weiterhin durch $G\beta\gamma$ -Komplexe aktiviert werden kann. In der Tat ließ sich eine hohe Aktivität der PI3-Kinase γ_{p101} nach Stimulation des fMLP-Rezeptors beobachten, während die monomere p110 γ aufgrund einer fehlenden Rekrutierung keine Aktivität aufwies (s. Abbildung 4.20 A). Die kürzlich entdeckte nicht-katalytische p87-Untereinheit wurde ebenfalls als ein Adapter für $G\beta\gamma$ -Komplexe beschrieben (Voigt et al., 2006). Hiermit übereinstimmend zeigte die PI3-Kinase γ_{p87} im Gegensatz zu der monomeren p110 γ eine signifikante Rezeptor-induzierte Rekrutierung des PIP₃-Sensors an die Plasmamembran (s. Abbildung 4.20). Die Antwort der PI3-Kinase γ_{p87} war jedoch wesentlich schwächer als die der PI3-Kinase γ_{p101} . Interessanterweise konnte auch eine höhere Konzentration des Liganden (10 bzw. 100 μ M fMLP) keine weitere Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} bewirken (nicht gezeigt). Anhand der konfokalmikroskopischen Untersuchungen wird besonders die geringere Abnahme der zytosolischen Fluoreszenz nach fMLP-induzierter Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} deutlich (s. Abbildung 4.20 A). Im Gegensatz zur PI3-Kinase γ_{p101} , führt auch die konstitutive Aktivität des überexprimierten fMLP-Rezeptors zu keiner Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} (s. Abbildung 4.20 A, Abb. Anhang 8.4 und Abb. Anhang 8.7). In der kinetischen Analyse der fMLP-induzierten Stimulation von beiden PI3-Kinase γ -Isoformen über drei Minuten zeigte sich eine relative PH-Domänen-Umverteilung im Fall der PI3-Kinase γ_{p87} von ca. 40 %, wohingegen die Stimulation der PI3-Kinase γ_{p101} zu einer ~ 80 %igen Umverteilung führte (s. Abbildung 4.20 B und C).

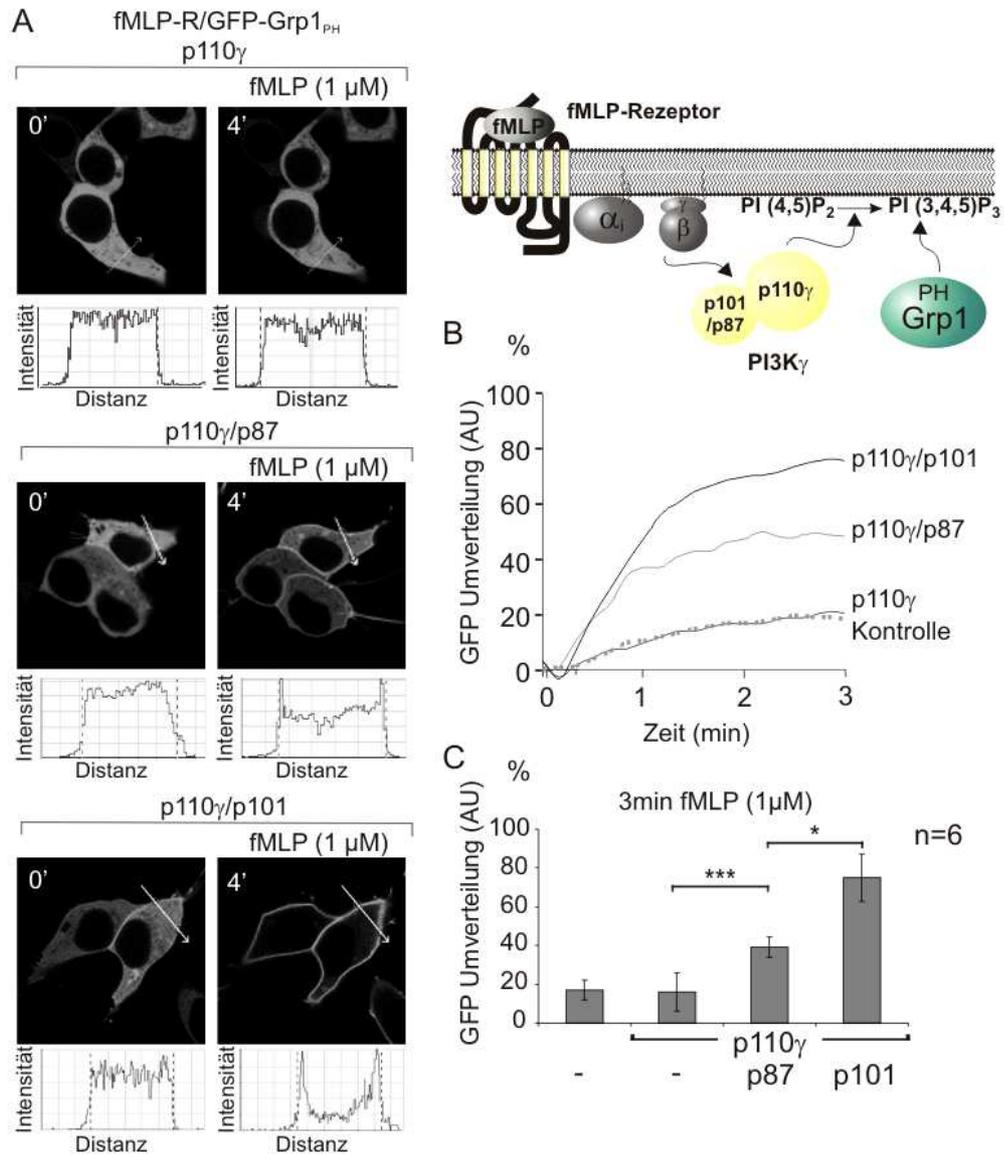


Abbildung 4.20: Vergleich einer Rezeptor-induzierten Aktivierung der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen. (A) HEK293-Zellen wurden mit dem fMLP-Rezeptor, der GFP-Grp1_{PH}-Domäne sowie der PI3-Kinase γ (p110 γ , oben; p110 γ /p87, Mitte; p110 γ /p101, unten) kotransfiziert und anschließend mit fMLP stimuliert (4 min, 1 μ M). Im direkten Vergleich wird deutlich, dass nur die heterodimere PI3-Kinase γ aktiviert werden kann. Zudem zeigt die PI3-Kinase γ_{p87} eine schwächere Aktivität. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Zeitkinetik der Rezeptor-induzierten Aktivierung von p110 γ , p110 γ /p87 und p110 γ /p101 im Vergleich. Während der Stimulation wurde alle 10 s ein Bild aufgenommen und anschließend semiquantitativ ausgewertet. (C) Statistische Auswertung von sechs unabhängigen Versuchen.

Um die Wirkung von G $\beta\gamma$ -Komplexen auf die PI3-Kinase γ_{p87} zu untersuchen, wurden beide Komponenten koexprimiert. Hier zeigte sich ein analoges Bild, wobei auch wieder eine deutlich stärkere Aktivität der PI3-Kinase γ_{p101} im Vergleich zur PI3-Kinase γ_{p87} zu beobachten war (s. Abbildung 4.21). Diese Ergebnisse belegen einerseits die deutlich höhere Sensitivität der PI3-Kinase γ_{p101} gegenüber einer Rezeptor-induzierten, G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelten Aktivierung in dem verwendeten zellulären System. Es wird andererseits gleichzeitig deutlich, dass auch die PI3-Kinase γ_{p87} , im Vergleich zur monomeren p110 γ signifikant sowohl durch G $\beta\gamma$ -Komplexe, als auch durch die nachgeschalteten G $\beta\gamma$ -Komplexe aktiviert wird (s. Abbildung 4.20 C und Abbildung 4.21 B). Insbesondere die Stimulation der

PI3-Kinase γ_{p87} durch die koexprimierten $G\beta\gamma$ -Komplexe lassen die bereits in der Literatur gezogene Schlussfolgerung zwingend erscheinen, dass die p87-Untereinheit auch als Adapter funktioniert, da sonst eine Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} nicht möglich wäre.

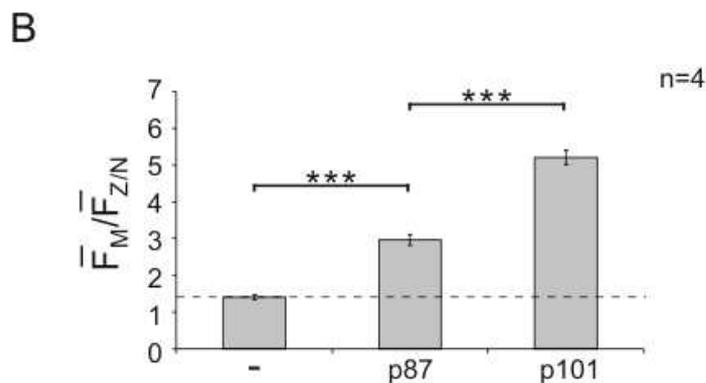
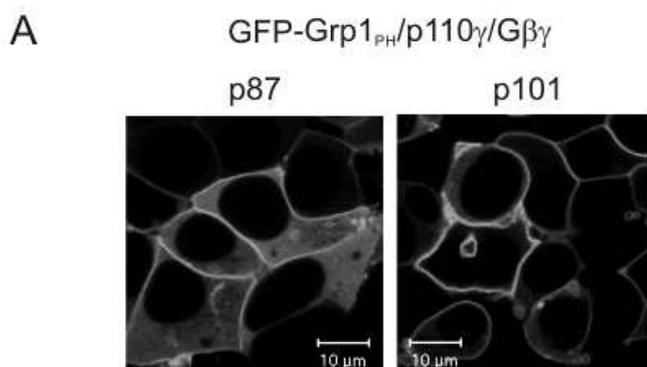
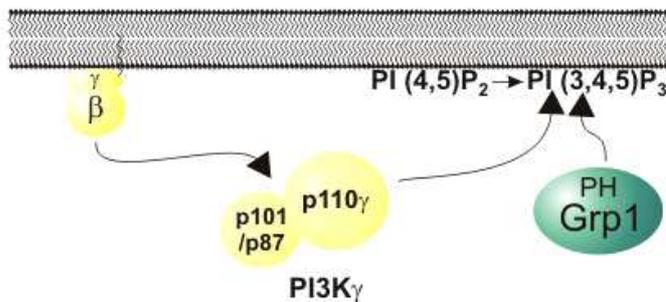


Abbildung 4.21: Stimulation der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen nach Über-expression von $G\beta\gamma$ -Komplexen. (A) HEK293-Zellen wurden mit GFP-Grp1_{PH} und der heterodimeren PI3-Kinase γ (p110 γ /p87, links; p110 γ /p101, rechts) kotransfiziert. Hier wurde die PI3-Kinase γ nicht durch Stimulation eines Rezeptors, sondern durch die Kotransfektion von $G\beta\gamma$ -Komplexen aktiviert. Analog zu Abbildung 4.20 wird auch hier eine schwächere $G\beta\gamma$ -induzierte Aktivierbarkeit der PI3-Kinase γ_{p87} deutlich. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Semi-quantitative Auswertung der PH-Domänen-Verteilung zwischen Membran und intrazellulärem Kompartiment aus drei unabhängigen Experimenten in 18 Zellen nach Aktivierung verschiedener PI3-Kinase γ -Isoformen.

Um diese in Zellen gewonnene Hypothese mit Hilfe einer aus definierten Komponenten rekonstituierten Signalkette zu verifizieren, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Aliaksei Shymanets aus unserer Arbeitsgruppe die $G\beta\gamma$ -Komplex-induzierte Stimulierbarkeit der PI3-Kinase γ -Isoformen mit Hilfe eines *in vitro* PI3-Kinase-Assays, unter Verwendung gereinigter Proteine, analysiert (s. 3.2.3.6.2; Maier et al., 1999).

Anhand der in Abbildung 4.22 dargestellten Konzentrationswirkungskurven wird deutlich, dass $G\beta\gamma$ -Komplexe die monomere p110 γ mit einer sehr geringen Potenz und Effizienz aktivieren, wodurch die fehlende Stimulation der monomeren p110 γ im zellulären System erklärbar ist (s. Abbildung 4.22, oben; Abbildung 4.20; Maier et al., 1999). Im Gegensatz dazu führt die Adapterfunktion der p101 für $G\beta\gamma$ -Komplexe zu einer deutlichen Erhöhung der Potenz und Effizienz der $G\beta\gamma$ -Komplex-induzierten Aktivierung der

PI3-Kinase γ_{p101} um den Faktor 17 bzw. 60 (s. Abbildung 4.22, unten; Maier et al., 1999). Die Untersuchung der $G\beta\gamma$ -Komplex-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} ergab jedoch einen unerwarteten Befund (s. Abbildung 4.22, Mitte). Überraschenderweise war die Potenz der $G\beta\gamma$ -Komplex-induzierten Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} , vergleichbar mit der der monomeren $p110\gamma$, nur gering. Lediglich die Effizienz war geringfügig erhöht (Faktor 5).

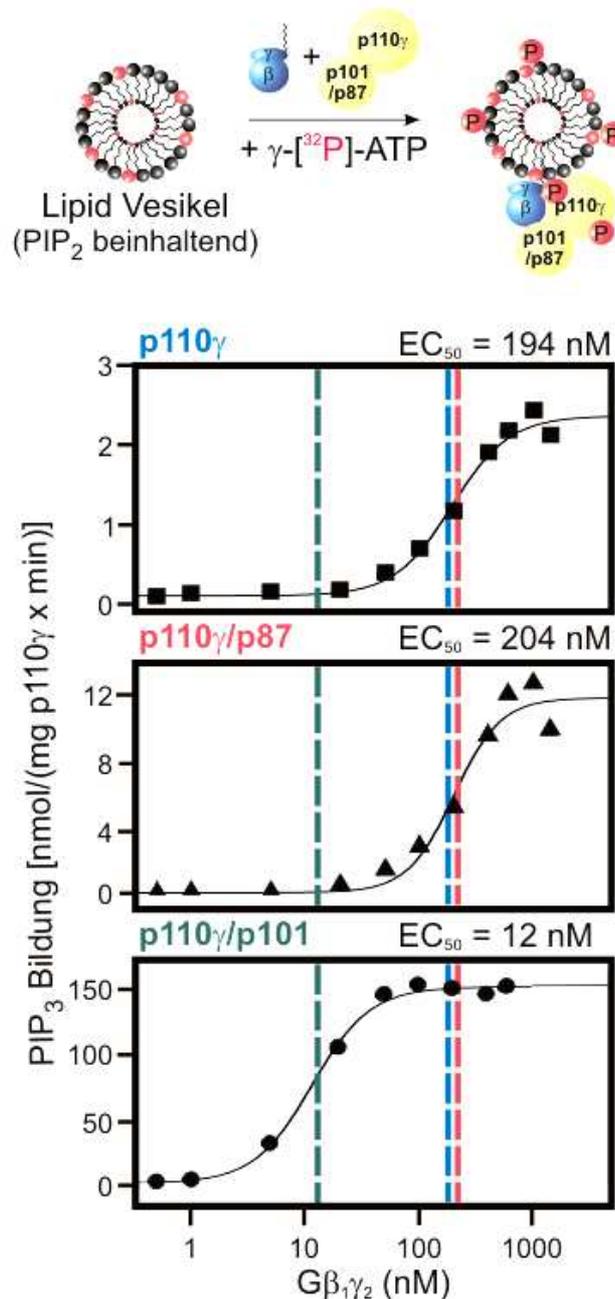


Abbildung 4.22: $G\beta\gamma$ -induzierte Aktivierung der monomeren und heterodimeren PI3-Kinase γ -Isoformen *in vitro*. Die Lipidkinase-Aktivität von gereinigter, rekombinanter monomere $p110\gamma$ und $p110\gamma/p87$ - bzw. $p110\gamma/p101$ -Heterodimeren wurde in Anwesenheit von γ - $[^{32}P]$ -ATP und PtdIns-4,5- P_2 -haltigen Phospholipidvesikeln in Abhängigkeit der Konzentration an rekombinanten $G\beta_1\gamma_2$ -HIS-Komplexen bestimmt. Das gebildete ^{32}P -markierte PtdIns-3,4,5- P_3 wurde dünnenschicht-chromatographisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Imaging Systems quantifiziert. Dargestellt sind repräsentative Konzentrationswirkungskurven aus fünf unabhängigen Experimenten. Auffällig ist eine starke Linksverschiebung der Konzentrationswirkungskurve in Gegenwart von $p101$, wobei der Effekt in Gegenwart von $p87$ ausbleibt (diese Daten wurden freundlicherweise von Dr. Aliaksei Shymanets zur Verfügung gestellt).

Die G β γ -Adapterfunktion der p101 korreliert also mit einer erhöhten Sensitivität der PI3-Kinase γ_{p101} gegenüber G β γ -Komplexen *in vitro*. Das Fehlen einer vergleichbaren Sensitivität der PI3-Kinase γ_{p87} stellt dagegen die postulierte G β γ -Adapterfunktion für p87 in Frage.

4.3.2 G β γ -Komplex-vermittelte Rekrutierung der PI3-Kinase γ -Isoformen

Um die direkte Interaktion von G β γ -Komplexen mit der p87-Untereinheit näher zu untersuchen, wurde geprüft, ob G β γ -Komplexe die p87-Untereinheit an Lipidmembranen rekrutieren können. Dazu wurde in Kooperation mit Dr. Aliaksei Shymanets aus unserer Arbeitsgruppe zunächst die Menge an p110 γ bestimmt, die G β γ -Komplex-abhängig *in vitro* an Lipidvesikel rekrutiert wird (s. Abbildung 4.23). Hierzu wurden die Lipidvesikel mit steigenden Konzentrationen an G β γ -Komplexen beladen und anschließend eine definierte Konzentration an monomerer oder heterodimerer p110 γ zugesetzt. Nach Zentrifugation wurden sowohl die isolierten Vesikel, als auch der Überstand mittels SDS-Page und Immunoblot-Analyse auf die enthaltene Menge an p110 γ und G β γ -Komplexen untersucht. Zur semi-quantitativen Erfassung der an die Lipidvesikel rekrutierten p110 γ wurden die im Immunoblot erhaltenen Signale densitometrisch ausgewertet. Die Gesamtmenge an p110 γ wurde als Summe der PI3-Kinase γ in der festen und flüssigen Phase bestimmt und dieser Wert als 100 % an p110 γ angenommen. Die Menge an p110 γ an den Lipidvesikeln wurde prozentual zur Gesamtmenge berechnet.

Monomeres p110 γ wurde auch bei hohen G β γ -Komplex-Konzentrationen nur in geringem Maß an Lipidvesikel rekrutiert (s. Abbildung 4.23 A, links). Demgegenüber wurde die PI3-Kinase γ_{p101} mit hoher Effizienz durch G β γ -Komplexe rekrutiert (s. Abbildung 4.23 A, rechts). Interessanterweise zeigte die PI3-Kinase γ_{p87} eine ähnlich mäßige Rekrutierung, wie die monomere p110 γ (s. Abbildung 4.23 A, Mitte). Während bei der PI3-Kinase γ_{p101} bereits 50 nM G β γ -Komplexe für eine Rekrutierung von etwa 15 % ausreichend waren, wurde im Fall der PI3-Kinase γ_{p87} dieser Grad an Rekrutierung erst nach 800 nM G β γ erreicht (s. Abbildung 4.23 B). Vergleicht man wiederum diese G β γ -Komplex-Konzentrationen mit den Konzentrationen, die zum Erreichen einer maximalen Stimulation der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen notwendig sind (vgl. Abbildung 4.22 und Abbildung 4.23), so wird deutlich, dass die Fähigkeit der nicht-katalytischen Untereinheiten zur Vermittlung einer Vesikelrekrutierung genau mit der Aktivität des entsprechenden Heterodimers korreliert. Für eine schwache p87-Rekrutierung ist also eine sehr hohe Konzentration an G β γ -Komplexen notwendig.

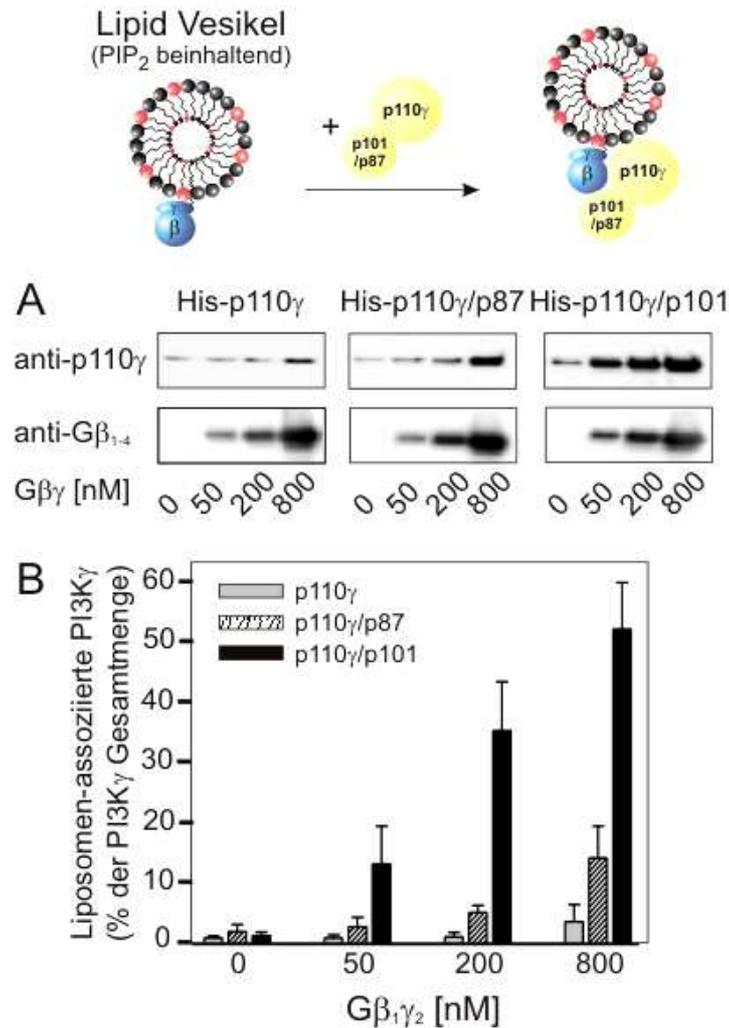


Abbildung 4.23: G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Rekrutierung der monomeren und heterodimeren PI3-Kinase γ -Isoformen *in vitro*. Rekrutierung der gereinigten, rekombinanten PI3-Kinase γ -Isoformen an Phospholipidvesikel in Abhängigkeit von der Konzentration an rekombinanten G $\beta_{1\gamma_2}$ -HIS-Komplexen. (A) Die Immunoblots zeigen die Menge an p110 γ und G $\beta\gamma$ -Komplexen an den isolierten Lipidvesikeln in Abhängigkeit von der G $\beta\gamma$ -Komplex-Konzentration. Nur in Gegenwart der nicht-katalytischen p101-Untereinheit kann G $\beta\gamma$ -Komplex-abhängig eine signifikante Menge von p110 γ an die Vesikel rekrutiert werden. (B) Statistische Auswertung der p110 γ -Vesikelrekrutierung. Gezeigt ist der prozentuale Anteil an vesikelgebundener p110 γ in Abhängigkeit zum Gesamtgehalt. Diese Daten wurden freundlicherweise von Dr. Aliaksei Shymanets zur Verfügung gestellt.

Um zu testen, ob die ermittelte Konzentration an freien G $\beta\gamma$ -Komplexen im zellulären System erreichbar und somit physiologisch relevant ist, wurde die Rekrutierung von monomeren, YFP-markierten PI3-Kinase γ -Untereinheiten nach Koexpression mit G $\beta\gamma$ -Komplexen in HEK293-Zellen untersucht (s. Abbildung 4.24). Während die solitäre p101 sowohl im Zytosol, als auch im Nukleus zu finden war, lokalisierten solitäre p110 γ und p87 hauptsächlich im Zytosol (s. Abbildung 4.24, oben; Abb. Anhang 8.1 und Abb. Anhang 8.5; Brock et al., 2003; Voigt et al., 2006). Nach Koexpression von G $\beta\gamma$ -Komplexen erfolgte eine subzelluläre Umverteilung sowie eine gleichzeitige Akkumulation der p101-Untereinheit an membranären Strukturen (s. Abbildung 4.24, unten links; Brock et al., 2003; Voigt et al., 2005). Eine Lokalisierung der überexprimierten G $\beta\gamma$ -Komplexe an Endo- und Plasmamembranen wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt (Brock et al., 2003). Erstaunlicherweise führte die Koexpression von G $\beta\gamma$ -Komplexen mit der nicht-katalytischen

p87 zu keiner nachweisbaren Umverteilung des Fusionsproteins, und zwar unabhängig von der Position der Fluoreszenz-Markierung (s. Abbildung 4.24, unten Mitte). Wie bereits bekannt, ließ sich auch die katalytische p110 γ -Untereinheit nicht durch G $\beta\gamma$ -Komplexe an membranäre Strukturen rekrutieren (s. Abbildung 4.24, unten rechts; Brock et al., 2003). Wir schließen deshalb, dass die p87 im Gegensatz zu p101 nicht als Adapter für eine G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Rekrutierung der p110 γ agiert.

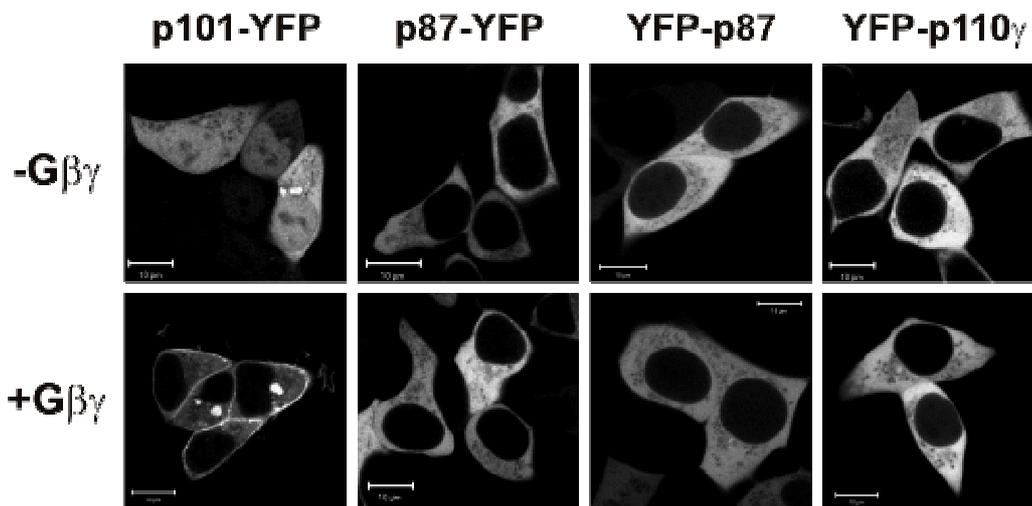


Abbildung 4.24: Rekrutierung der YFP-markierten PI3-Kinase γ -Untereinheiten durch G $\beta\gamma$ -Komplexe an die Plasmamembran. Solitär exprimierte PI3-Kinase γ -Untereinheiten lassen sich sowohl im Zytosol (p87, p110 γ , p101) als auch im Nukleus (p101) von HEK293-Zellen nachweisen. Die Koexpression von G $\beta\gamma$ -Komplexen führte nur im Fall der nicht-katalytischen p101 zu einer zytosolischen Umverteilung mit einer gleichzeitigen Akkumulation an membranären Strukturen. Die Lokalisation der katalytischen p110 γ , sowie der nicht-katalytischen p87-Untereinheit ist und bleibt auch in Gegenwart von G $\beta\gamma$ -Komplexen weiterhin zytosolisch. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

4.3.3 Ras-Abhängigkeit der Rezeptor-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ

Die fehlende Adapterfunktion der p87 für G $\beta\gamma$ -Komplexe könnte die reduzierte Sensitivität der PI3-Kinase γ_{p87} im Vergleich zur PI3-Kinase γ_{p101} gegenüber einer Rezeptor-induzierten Aktivierung des Enzyms erklären. Allerdings bleibt weiterhin unklar, wie es überhaupt zu einer signifikanten Rezeptor- bzw. G $\beta\gamma$ -Komplex-induzierten Stimulation (s.-Abbildung 4.20 und Abbildung 4.21) der PI3-Kinase γ_{p87} im zellulären System kommt, da die Rekrutierung der Kinase an die Plasmamembran eine unerlässliche Voraussetzung im Aktivierungsprozess des Enzyms darstellt. Da G $\beta\gamma$ -Komplexe dies offensichtlich nicht leisten können, müssen weitere Komponenten an der Rezeptor-induzierten Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} beteiligt sein. Einen naheliegenden Kandidaten stellt die kleine GTPase Ras dar, deren regulatorische Wirkung auf die PI3-Kinase γ -Aktivität bereits beschrieben wurde (s. 4.2; Rubio et al., 1997; Pacold et al., 2000; Suire et al., 2002). Obwohl bislang eine Ras-

abhängige Rekrutierung der PI3-Kinase γ an die Plasmamembran verneint wurde (Suire et al., 2002), haben wir dies aufgrund unserer Befunde überprüft (s. 4.2).

Da die bisherigen Daten zur Ras-abhängigen p110 γ -Rekrutierung ausschließlich biochemisch auf der Analyse von lysierten Zellen nach Membranfraktionierung basieren, könnte es hierbei zu einer Störung der Interaktion zwischen aktivem Ras und der p110 γ durch Detergentien gekommen sein. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die Lokalisation einer YFP-markierten p110 γ in An- und Abwesenheit von H-Ras-Mutanten in lebenden Zellen untersucht. Eine Lebendzellanalyse zeigte, dass die sonst zytosolisch lokalisierte p110 γ in der Gegenwart von konstitutiv aktivem H-Ras eine subzelluläre Umverteilung erfuh und auf membranären Strukturen akkumulierte (s. Abb. Anhang 8.18, oben). Durch die Koexpression von dominant negativem Ras wurde die zytosolische Lokalisation der p110 γ hingegen nicht beeinflusst (s. Abb. Anhang 8.18, unten). Dieser Befund zeigt eindeutig die Fähigkeit von aktivem Ras, eine Translokation der katalytischen Untereinheit an membranäre Strukturen im zellulären System vermitteln zu können.

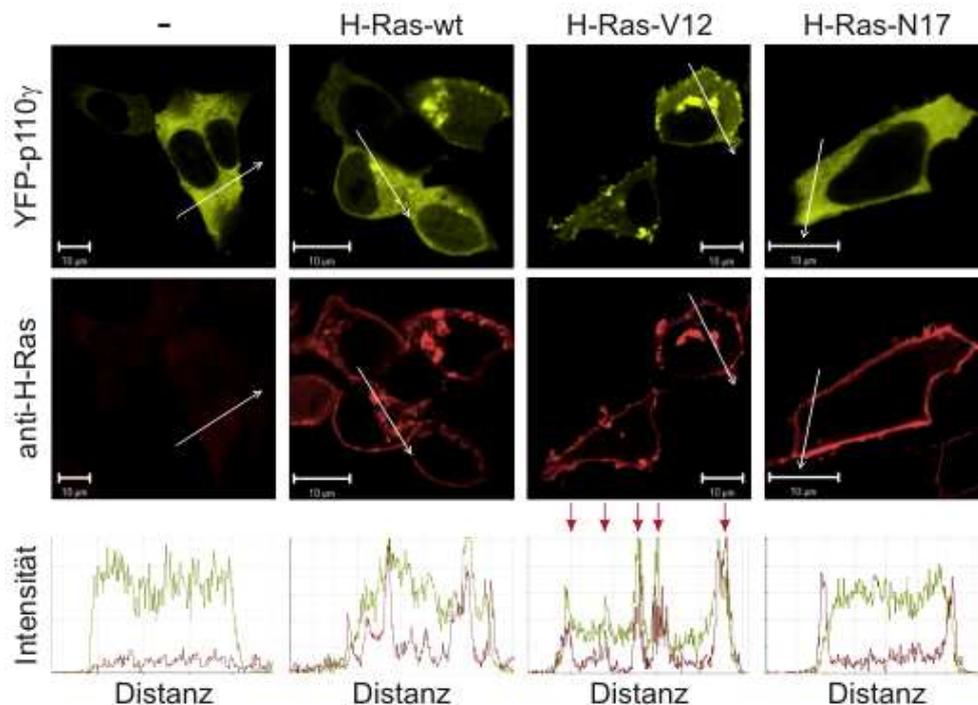


Abbildung 4.25: Membranrekrutierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit durch konstitutiv aktives H-Ras-V12. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für YFP-p110 γ (oben) und verschiedene H-Ras-Mutanten kotransfiziert. Zur Untersuchung der Kolokalisation wurde die Lokalisation von H-Ras mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert (rot, Mitte). Die Auswertung der Kolokalisation erfolgte anhand der Fluoreszenzintensität entlang des als Pfeil markierten Querschnitts (unten). Eine Kolokalisation ist durch das gleichzeitige Auftreten von Immunfluoreszenzpeaks in beiden Kanälen gekennzeichnet. Aktives Ras bewirkte eine Redistribution von p110 γ an Ras-haltige membranäre Strukturen.

Zusätzlich haben wir die Kolokalisation von p110 γ und Ras untersucht. Dazu wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analyse auf die Lokalisation von Ras mit spezifischen Antikörpern untersucht (s. Abbildung 4.25 und Abb. Anhang 8.17). Auch hier akkumulierte die p110 γ , H-Ras-V12-abhängig, an membranären Strukturen und eine Kolokalisation mit H-Ras war nachweisbar. Besonders deutlich wird dies durch das gleichzeitige

Auftreten von Fluoreszenzintensitätspeaks in beiden Farbkanälen in der graphischen Darstellung des Fluoreszenzintensitätsverlaufs (s. Abbildung 4.25, Mitte rechts).

Hieraus schließen wir, dass die Proteine nicht zufällig kolokalisieren, sondern auf denselben zellulären Strukturen angereichert vorliegen. Die Analyse von H-Ras-wt, das überwiegend in der inaktiven, GDP-gebundenen Form und nur zu einem geringen Anteil in der aktiven, GTP-gebundenen Form vorliegt, zeigte eine schwache Kolokalisation an Endomembranen (s. Abbildung 4.25, Mitte links), wohingegen dominant negatives H-Ras keine Kolokalisation mit der zytosolisch lokalisierten katalytischen PI3-Kinase γ -Untereinheit zeigte (vgl. Abbildung 4.25, rechts und links). Wie bereits erwähnt, wurde die Möglichkeit einer Interaktion von aktivem Ras mit den nicht-katalytischen Untereinheiten ausgeschlossen (s. Abb. Anhang 8.17).

Ras bewirkt nicht nur eine zelluläre Umverteilung der p110 γ -Untereinheit, sondern darüber hinaus auch eine Umverteilung der PI3-Kinase γ_{p87} . Dies lässt vermuten, dass die für eine Rezeptor-induzierte PI3-Kinase γ_{p87} -Aktivierung notwendige Rekrutierung des Enzyms durch aktives Ras erfolgen kann. Sollte sich diese Annahme als richtig erweisen, so müsste die Ras-induzierte Rekrutierung selbst in Abwesenheit der p101-Untereinheit eine G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Stimulation der p110 γ ermöglichen.

Um diese Hypothese zu testen, wurde die G $\beta\gamma$ -Komplex-induzierte Aktivierung der monomeren p110 γ in Gegenwart von wildtypischem oder konstitutiv aktivem Ras in HEK293-Zellen untersucht (s. Abbildung 4.26). Die Koexpression von p110 γ mit konstitutiv aktivem H-Ras resultierte in einer Akkumulation des PIP₃-Sensors an Zellmembranen und führte somit zu einer Aktivierung der monomeren p110 γ (s. Abbildung 4.26 A, oben rechts und B). Diese Aktivität ließ sich durch Koexpression von G $\beta\gamma$ -Komplexen weiter steigern (s. Abbildung 4.26 A, unten rechts und B). Während eine Überexpression von H-Ras-wt oder G $\beta\gamma$ -Komplexen für eine nachweisbare Aktivierung der p110 γ nicht ausreichend war (s. Abbildung 4.26 A, oben Mitte, unten links und B), konnte durch die Koexpression von H-Ras und G $\beta\gamma$ -Komplexen eine signifikante Aktivierung der katalytischen PI3-Kinase γ induziert werden (s. Abbildung 4.26 A, unten Mitte und B). Aktives Ras scheint also eine Rekrutierung der p110 γ an die Plasmamembran zu vermitteln und so eine Stimulation der Kinase durch G $\beta\gamma$ -Komplexe zu ermöglichen.

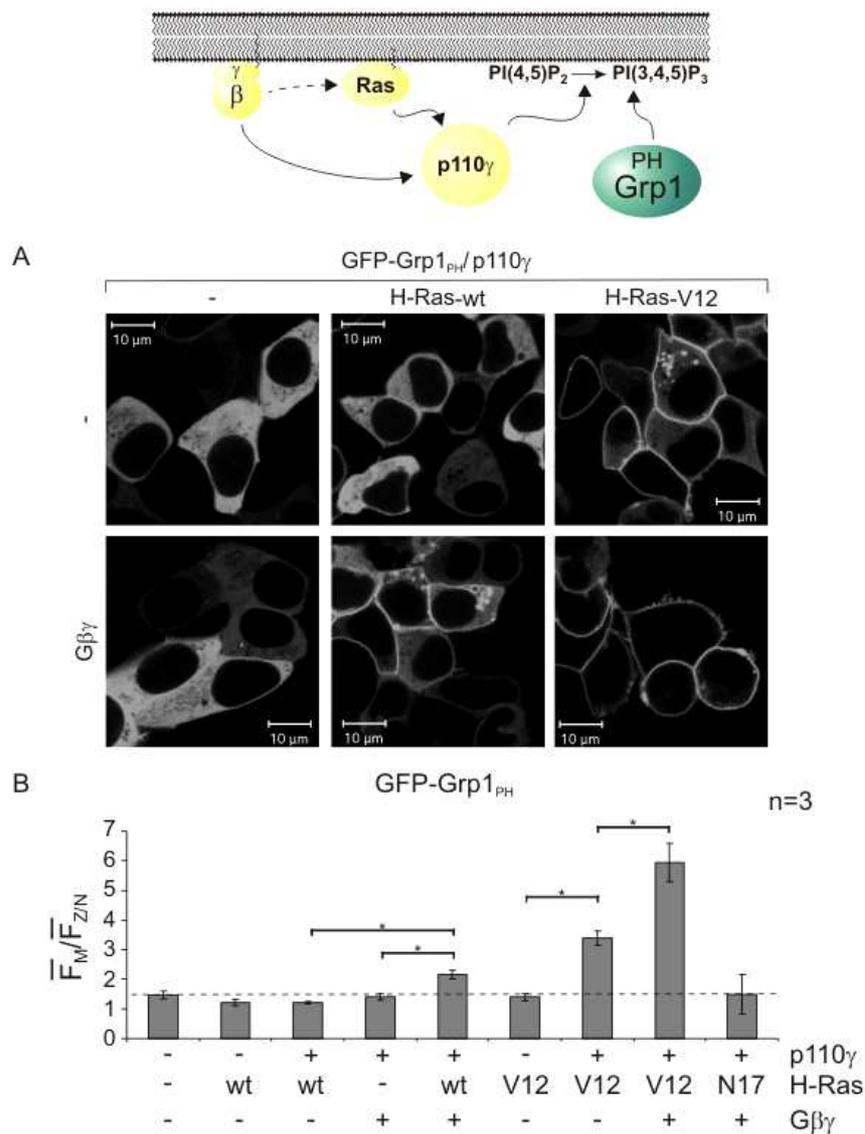


Abbildung 4.26: Synergismus der Ras- und Gβ_γ-Komplex-induzierten Aktivierung der p110_γ. (A) HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für p110_γ, GFP-Grp1_{PH} und H-Ras-wt oder H-Ras-V12 ± Gβ_γ und Gγ₂ kotransfiziert. Eine Aktivierung der solitär exprimierten p110_γ-Untereinheit erfolgte nur durch konstitutiv aktives H-Ras-V12 und nicht durch H-Ras-wt. Die alleinige Stimulation der solitären p110_γ durch koexprimierte Gβ_γ-Komplexe war nicht ausreichend für eine Stimulation der katalytischen Untereinheit. Die H-Ras-V12-induzierte Aktivität konnte jedoch durch Gβ_γ-Komplexe weiter verstärkt werden. Interessanterweise ermöglichte schon die Koexpression von H-Ras-wt mit Gβ_γ-Komplexen eine Aktivierung der monomeren p110_γ. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Semi-quantitative Auswertung der PH-Domänen-Verteilung zwischen Membran und intrazellulärem Kompartiment aus drei unabhängigen Experimenten in 18 Zellen analog zu (A).

Sollte sich das Ausmaß dieser Ras-vermittelten Rekrutierung der p110_γ-Untereinheit als ausreichend erweisen, um ebenfalls eine Rezeptor-induzierte Stimulation der monomeren p110_γ-Untereinheit zu ermöglichen, würde dies eine hypothetische Beteiligung von Ras an der GPCR-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} weiter erhärten. Aus diesem Grund wurde die GPCR-induzierte Aktivierung der monomeren p110_γ-Untereinheit in der Gegenwart von wildtypischem oder konstitutiv aktivem H-Ras untersucht. Die Koexpression der p110_γ-Untereinheit und H-Ras-wt führte nach Stimulation mit fMLP zu einer schwachen Membrantranslokation des PIP₃-Sensors in einem Teil der Zellen (s. Abbildung 4.27 A, oben links), welche in Abwesenheit von exogenem H-Ras nicht zu

beobachten war (s. Abbildung 4.27 A, unten links). Wurde nun die Konzentration an aktivem Ras durch Koexpression der H-Ras-V12 Mutante erhöht, ließ sich bereits vor der Rezeptorstimulation eine signifikante Ras-induzierte p110 γ -Aktivierung beobachten, die durch eine Agonist-induzierte Aktivierung des Rezeptors deutlich gesteigert werden konnte (s. Abbildung 4.27 A, oben rechts). Aktives Ras ist somit konzentrationsabhängig in der Lage, eine Rezeptor-induzierte und G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Aktivierung der monomeren p110 γ zu ermöglichen. Die Aktivierungskinetik in Gegenwart von H-Ras-wt war schwächer als in Gegenwart des Heterodimers (s. Abbildung 4.27 B). Demgegenüber führte die Kotransfektion von H-Ras-V12 zu einer Aktivitätssteigerung, die in ihrem Ausmaß mit der der PI3-Kinase γ_{p101} vergleichbar war. Die statistische Auswertung bestätigte diesen Befund (s. Abbildung 4.27 C).

Hieraus wird deutlich, dass aktives Ras neben seiner PI3-Kinase γ -aktivierenden auch eine PI3-Kinase γ -rekrutierende Wirkung hat. Zusätzlich konnten Evidenzen erbracht werden, dass diese Rekrutierung sowohl für eine G $\beta\gamma$ -Komplex- als auch eine GPCR-induzierte Aktivierung der monomeren p110 γ in Abwesenheit einer nicht-katalytischen Untereinheit ausreichend ist. Basierend auf diesen Befunden liegt die Vermutung nahe, dass die fehlende Adapterfunktion der p87 für die GPCR-induzierte und G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} theoretisch durch Ras kompensiert werden kann. Während die Rolle von G $\beta\gamma$ -Komplexen bei der Signalweiterleitung von GPCRs gut untersucht ist, ist über die Signaltransduktion von GPCRs durch Ras nur wenig bekannt. Interessanterweise zeigen einige Studien, dass Ras durch GPCRs direkt (Bockaert et al., 2003; McGarrigle & Huang, 2007; Ma & Pei, 2007; Violin & Lefkowitz, 2007; Richter et al., 2008) oder indirekt (Daub et al., 1996; Daub et al., 1997; Luttrell et al., 1997; Piiper & Zeuzem, 2004) aktiviert werden kann.

Aus diesem Grund sollte geprüft werden, ob endogenes Ras durch den fMLP-Rezeptor aktiviert werden kann. In der Tat konnte eine fMLP-induzierte Stimulation von Ras nachgewiesen werden, die jedoch in ihrem Ausmaß geringer war, als die EGF-induzierte Stimulation (s. Abb. Anhang 8.19). Somit sollte der fMLP-Rezeptor in der Lage sein, über eine Stimulation von endogenem Ras auch solche PI3-Kinase γ -Isoformen zu aktivieren, die nicht über den p101-G $\beta\gamma$ -Adapter verfügen.

Um diese Hypothese zu stützen, wurde die fMLP-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ in Abwesenheit von GTP-gebundenem Ras analysiert. Da die PI3-Kinase γ prinzipiell durch verschiedene Ras-Isoformen aktiviert werden kann, wurde hier ein Ansatz gewählt, welcher die Inaktivierung aller Ras-Isoformen erlaubt. Dies wird durch eine Überexpression der katalytischen Domäne des Ras-GAPs Neurofibromin 1 (NF1) ermöglicht (Ahmadian et al., 1997). NF1 wirkt aktivierend auf die GTPase-Aktivität von Ras, wodurch dieses in seiner GDP-gebundenen, inaktiven Form gehalten wird (s. Abb. Anhang 8.20).

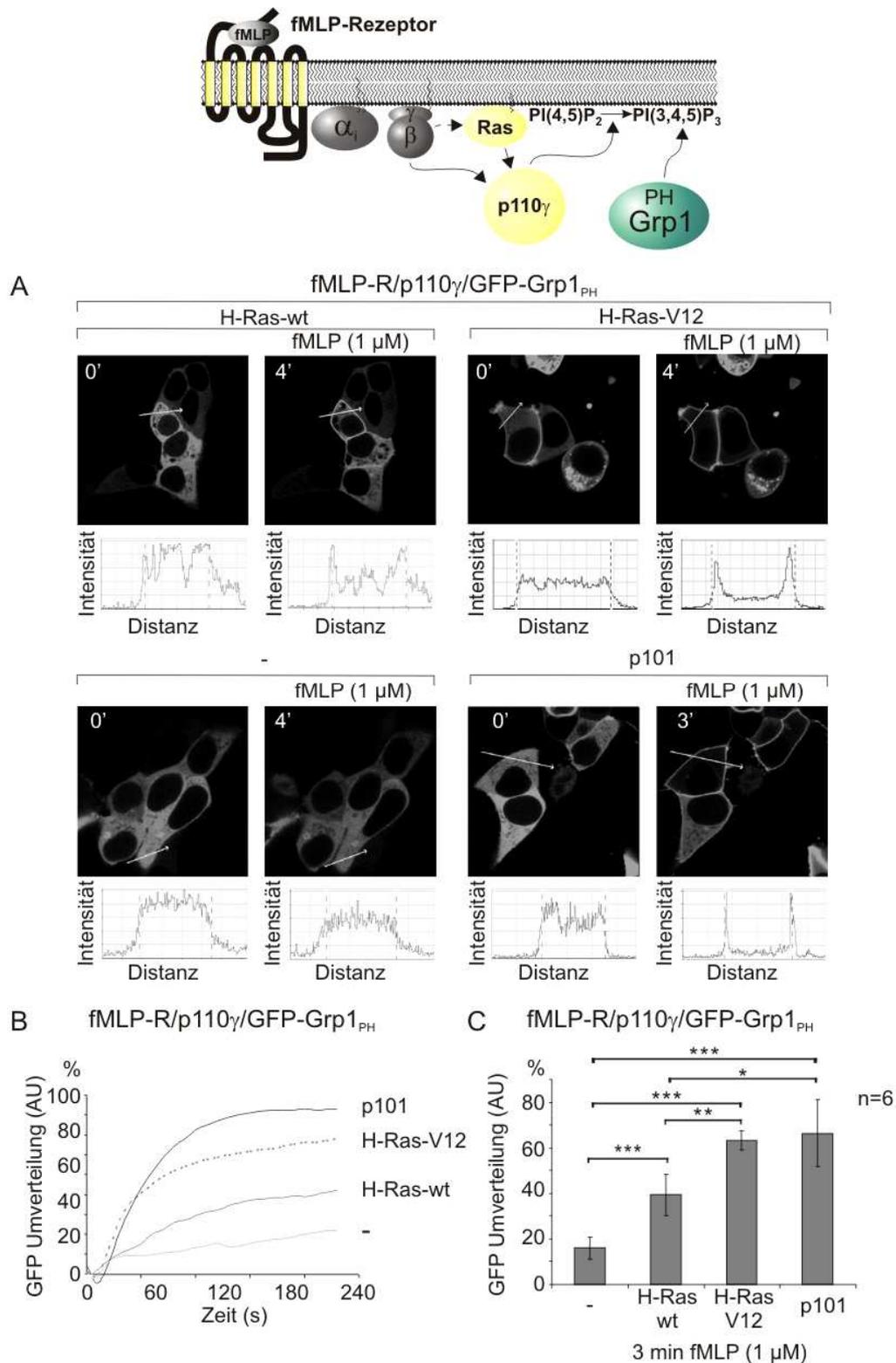


Abbildung 4.27: Die Ras-vermittelte Rekrutierung der p110 γ -Untereinheit ermöglicht eine Rezeptor-induzierte Aktivierung der Kinase. (A) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für den fMLP-Rezeptor, p110 γ , p101, H-Ras-wt oder H-Ras-V12 und GFP-Grp1_{PH} kotransfiziert und die Zellen anschließend mit fMLP (4 min, 1 μ M) stimuliert. Die monomere p110 γ ließ sich nur in Gegenwart von koexprimiertem H-Ras durch fMLP stimulieren. Eine Stimulation der p101-exprimierenden Zellen mit fMLP (4 min, 1 μ M) führte erwartungsgemäß ebenfalls zu einer PIP₃-Sensor-Umverteilung. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Zeitkinetik der Stimulationen aus (A) über vier Minuten. Es wird eine schwache Aktivierung der monomeren p110 γ in der Gegenwart von H-Ras-wt, und eine mit der der PI3-Kinase γ_{p101} vergleichbare Aktivierung nach Koexpression von konstitutiv aktivem Ras deutlich. (C) Statistische Auswertung von sechs unabhängigen Versuchen. # Hier wurden nur Zellen zur Auswertung herangezogen, welche eine Redistribution des PIP₃-Sensors zeigten.

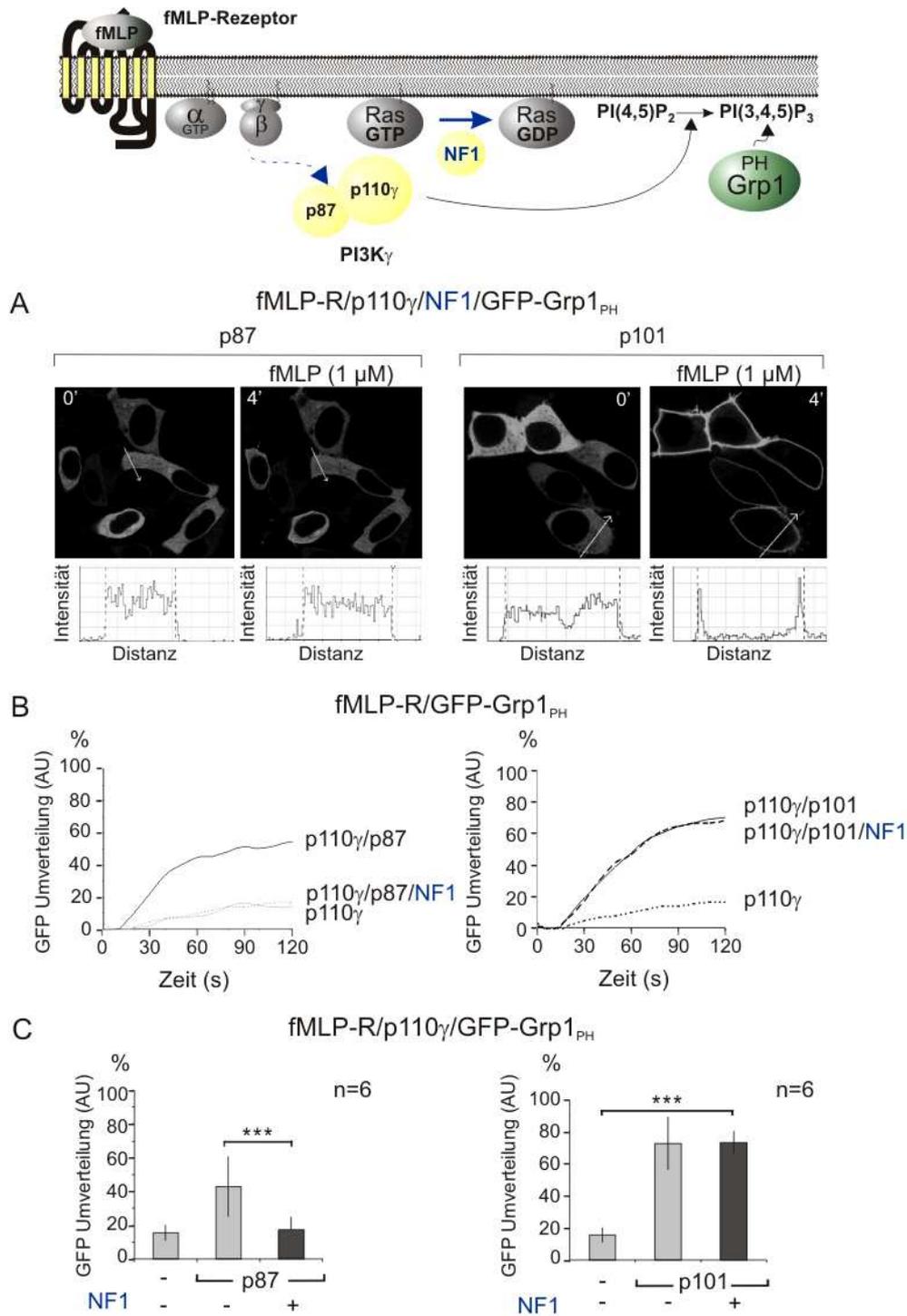


Abbildung 4.28: Der Einfluss von GTP-gebundenem Ras auf die Rezeptor-induzierte Aktivierung der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen. (A) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für den fMLP-Rezeptor, die GFP-Grp1 $_{PH}$, die PI3-Kinase γ (p110 $_{\gamma}$ /p87, links; p110 $_{\gamma}$ /p101, rechts) und der Ras-GAP Domäne des Neurofibromin 1 (NF1) kotransfiziert. Die Liganden-induzierte Stimulation des fMLP-Rezeptors führt zu einer starken Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p101} (rechts). Demgegenüber ist die Rezeptor-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} in Anwesenheit von NF1 vollständig inhibiert (links). Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Die kinetische Auswertung der unter (A) gezeigten Stimulation macht deutlich, dass in Anwesenheit von NF1 die PI3-Kinase γ_{p87} , vergleichbar mit der monomeren p110 $_{\gamma}$ in Abwesenheit von NF1, nicht durch fMLP aktivierbar war. Im Fall der PI3-Kinase γ_{p101} ist kein Unterschied der Rezeptor-induzierten Aktivierung in An- und Abwesenheit der Ras-GAP Domäne zu erkennen. (C) Statistische Auswertung von sechs unabhängigen Versuchen.

Die Liganden-induzierte Stimulation des fMLP-Rezeptors in Anwesenheit von NF1 führte zu einer unverändert starken Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p101} (vgl. Abbildung 4.20 A, unten und Abbildung 4.28, rechts). Demgegenüber war jedoch die fMLP-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} nach Kotransfektion von NF1 vollständig inhibiert (vgl. Abbildung 4.20 A, Mitte und Abbildung 4.28, links). Die zeitabhängige Darstellung der Aktivierung verdeutlicht sehr gut, dass die PI3-Kinase γ_{p87} in Anwesenheit von NF1 nicht aktivierbar war (s. Abbildung 4.28 B, links). Somit hat die Inaktivierung von Ras im Fall der PI3-Kinase γ_{p101} unter den von uns angewendeten Versuchsbedingungen offenbar keinen Einfluss auf die Rezeptor-induzierte Aktivierung der Kinase (s. Abbildung 4.28 B, rechts), während aktives Ras für die Rezeptor-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} essentiell ist (s. Abbildung 4.28 C).

Betrachtet man auf der Basis der Ras-Befunde die eingangs dieses Kapitels gezeigten Versuche (s. Abbildung 4.20 und Abbildung 4.21) so wird deutlich, dass die bisherige Interpretation dieser und analoger Befunde (Suire et al., 2005; Voigt et al., 2006) ergänzt werden muß. Da die p87 keine G β γ -Komplex-Adapter-Funktion erfüllen kann, und die notwendige Rekrutierung der Kinase im Zuge einer GPCR-induzierten Aktivierung durch Ras übernommen wird, bleibt ungeklärt, wie die Koexpression von G β γ -Komplexen mit der PI3-Kinase γ_{p87} ebenfalls zu einer Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} führt (s. Abbildung 4.21). Eine mögliche Erklärung wäre, dass auch hier Ras zur G β γ -Komplex-Wirkung beiträgt, obwohl Ras nicht durch die Überexpression von G β γ -Komplexen aktiviert wird (s. Abb. Anhang 8.20 B)

Um diese Hypothese zu testen, wurde der Effekt von NF1 auf die G β γ -Komplex-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen untersucht. In Anwesenheit von NF1 konnte die PI3-Kinase γ_{p101} , jedoch nicht die PI3-Kinase γ_{p87} , durch G β γ -Komplexe aktiviert werden (s. Abbildung 4.29).

Da das Fehlen von aktivem Ras zu einem Verlust der Rezeptor-induzierten und G β γ -Komplex-vermittelten Stimulierbarkeit der PI3-Kinase γ_{p87} führt, sollte im Umkehrschluss eine Erhöhung der Konzentration von Ras zu einer verstärkten Aktivierbarkeit führen. Tatsächlich ermöglicht die Kotransfektion von Ras eine maximale GPCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} (s. 4.4; Abbildung 4.31).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die p87-Untereinheit offenbar keine Adapterfunktion für G β γ -Komplexe besitzt, wie sie für die p101 beschrieben wurde. Stattdessen bewirkt aktives Ras eine Rekrutierung der PI3-Kinase γ_{p87} an die Plasmamembran, wodurch die Aktivierung der Kinase durch G β γ -Komplexe ermöglicht wird. Für eine Rekrutierung an die Plasmamembran sowie die nachfolgende Rezeptor-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} stellt also die gleichzeitige Anwesenheit von G β γ -Komplexen und aktivem Ras eine essentielle Notwendigkeit dar.

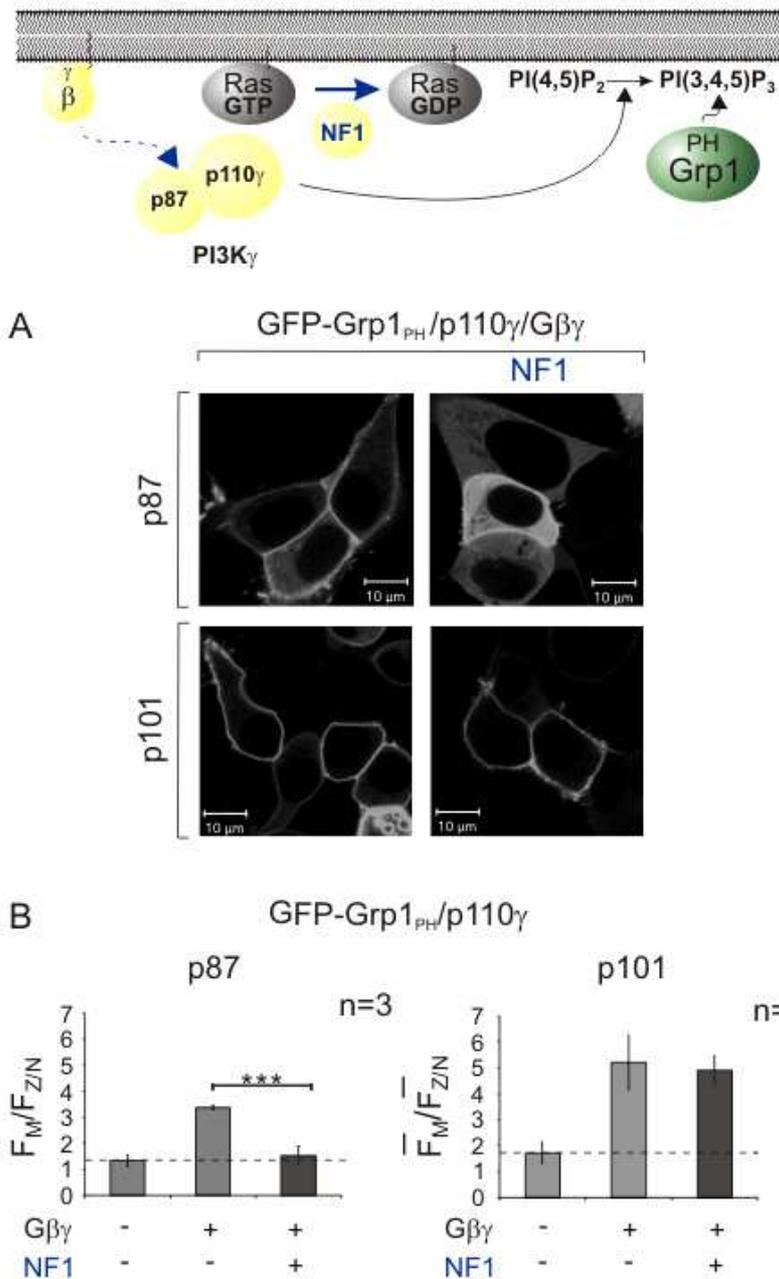


Abbildung 4.29: Einfluss von aktivem Ras auf die Gβ_γ-Komplex-induzierte Aktivierung der beiden PI3-Kinase γ-Isoformen. (A) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für Gβ₁γ₂-Komplexe, die PI3-Kinase γ (p110_γ/p87, oben; p110_γ/p101, unten), GFP-Grp1_{PH} und ± NF1 kotransfiziert. NF1 inhibiert die Gβ_γ-Komplex-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87}, aber nicht der PI3-Kinase γ_{p101}. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Semi-quantitative Auswertung der PH-Domänen-Verteilung zwischen Membran und intrazellulärem Kompartiment aus drei unabhängigen Experimenten in 18 Zellen analog zu (A).

4.4 Kostimulatorische Funktion der nicht-katalytischen PI3-Kinase γ -Untereinheiten

Die in Kapitel 4.2 vorgestellten Untersuchungen zur Ras-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen ließen einen kostimulatorischen Einfluss der p101 auf die Ras-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ vermuten. Zusätzlich lassen *in vitro*-Befunde unserer Arbeitsgruppe einen kostimulatorischen Effekt der p101-Untereinheit auf die G β γ -Komplex-vermittelte und die basale Aktivität der PI3-Kinase γ vermuten.

Aus diesem Grund sollte geprüft werden, ob die nicht-katalytischen Untereinheiten im zellulären System einen stimulatorischen Effekt auf die Basalaktivität der p110 γ ausüben. Hierzu wurde die katalytische Untereinheit durch Einsatz des p110 γ -CAAX Konstruktes an der Membran fixiert (s. Abbildung 4.30). Die membranassoziierte p110 γ zeigte eine schwache basale Aktivität, die durch die Kotransfektion der nicht-katalytischen Untereinheiten signifikant erhöht wurde (s. Abbildung 4.30).

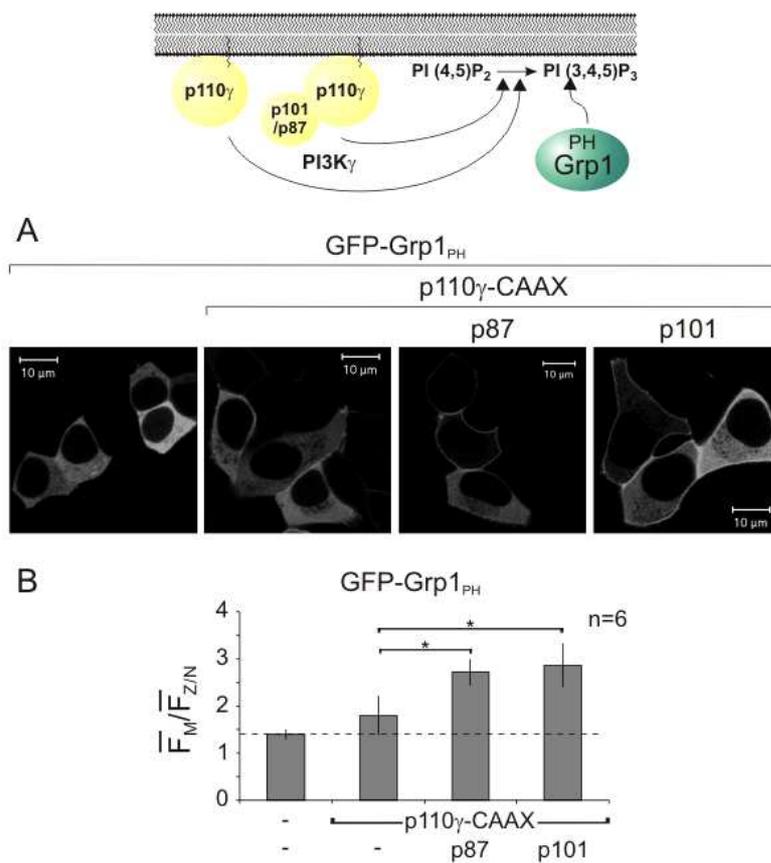


Abbildung 4.30: Aktivität der membranständigen p110 γ -CAAX-Untereinheit in An- und Abwesenheit der nicht-katalytischen p101- oder p87-Untereinheit. (A) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für p110 γ -CAAX, GFP-Grp1_{PH} und p87 oder p101 in den oben angegebenen Kombinationen kotransfiziert. (A) Die Rekrutierung des PIP₃-Sensors an die Plasmamembran zeigt, dass die membranständige p110 γ -CAAX-Untereinheit unter Basalbedingungen kaum aktiv ist, während die Heterodimerisierung mit der nicht-katalytischen p87- oder p101-Untereinheit zu einer Erhöhung der basalen Aktivität führte. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Semi-quantitative Auswertung der PH-Domänen-Verteilung zwischen Membran und intrazellulärem Kompartiment aus drei unabhängigen Experimenten in 18 Zellen analog zu (A).

Da die p87-Untereinheit einen stimulierenden Effekt auf die basale enzymatische Aktivität der membranständigen p110 γ -Untereinheit zeigt, sollte weiterhin getestet werden, ob ein analoger Effekt auch für die Rezeptor-induzierte Aktivierung nachzuweisen ist. Deshalb wurde die fMLP-induzierte Aktivierung der monomeren p110 γ und der PI3-Kinase γ_{p87} verglichen (s. Abbildung 4.31). Wie bereits zuvor gezeigt ist die monomere

p110 γ -Untereinheit im zellulären System nicht GPCR-induziert stimulierbar, während die heterodimere PI3-Kinase γ_{p87} eine deutliche Aktivität aufweist (s. Abbildung 4.20 und Abbildung 4.31). Auch in Anwesenheit von exogenem H-Ras ist die monomere p110 γ deutlich schwächer aktivierbar als die heterodimere PI3-Kinase γ_{p87} .

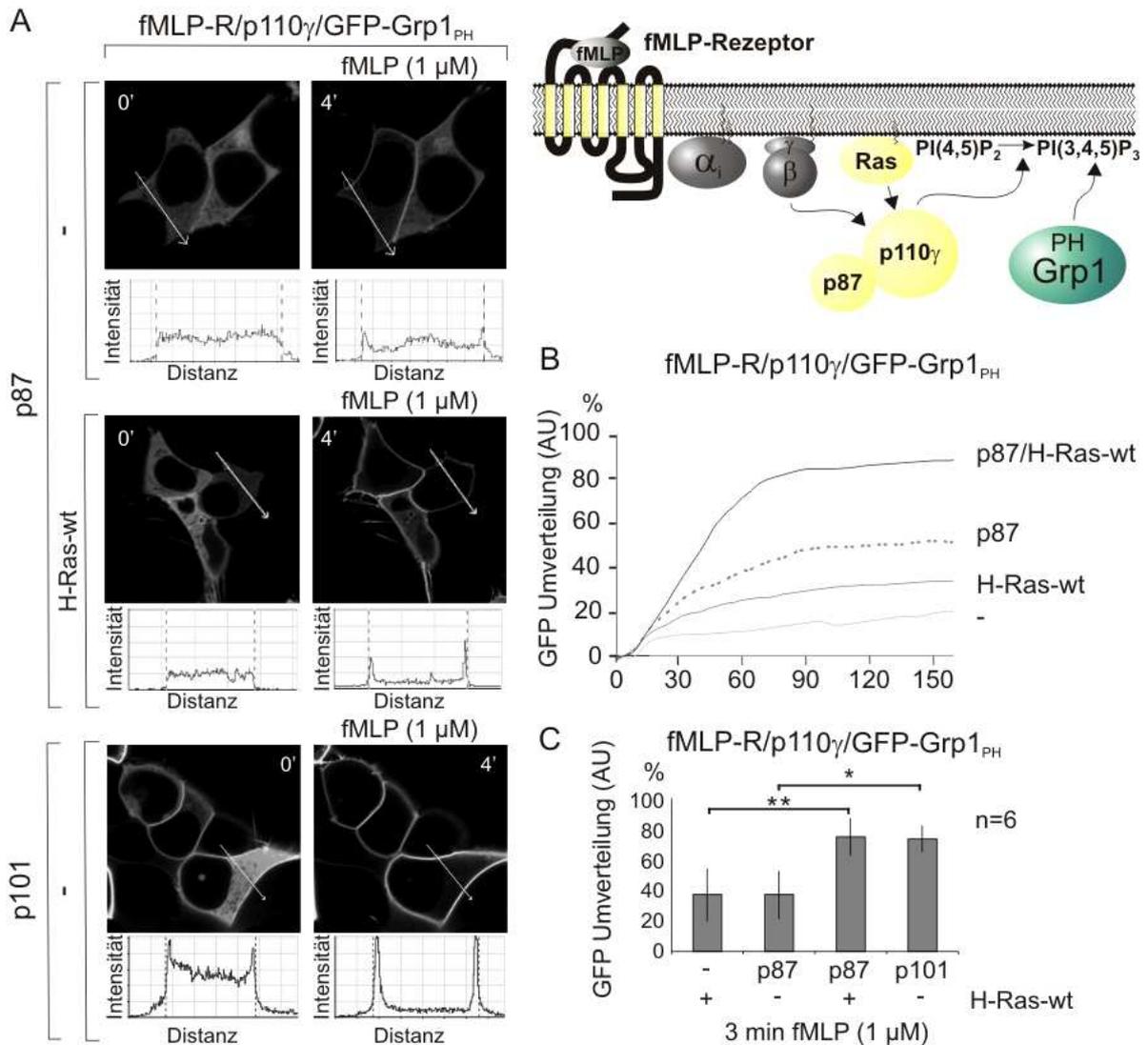


Abbildung 4.31: Einfluss von p87 auf die H-Ras und Rezeptor-induzierte Aktivierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für den fMLP-Rezeptor, die PI3-Kinase γ (p110 γ /p87, oben und p110 γ /p101, unten), H-Ras-wt und GFP-Grp1_{PH} in den angegebenen Kombinationen kotransfiziert und die Zellen mit fMLP (1 μ M, 4 min) stimuliert (A). Nach Koexpression von H-Ras-wt ist die sonst eher schwache fMLP-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} vergleichbar mit der Aktivität der PI3-Kinase γ_{p101} in Abwesenheit von zusätzlich exprimiertem H-Ras. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Zeitkinetik der Stimulationen aus (A) und Abbildung 4.27 über drei Minuten. Es zeigte sich im Vergleich der fMLP-induzierten Aktivierungen von p110 γ + H-Ras-wt in An- und Abwesenheit der nicht-katalytischen p87-Untereinheit eine stark erhöhte Effizienz der Aktivierung in Gegenwart von p87. (C) Statistische Auswertung von sechs unabhängigen Versuchen.

Wurden anstelle des Rezeptors $G\beta\gamma$ -Komplexe als Stimulus exprimiert, ergab sich ein analoges Bild: Die PI3-Kinase γ_{p87} zeigte auch hier eine generell höhere Aktivität, als die monomere $p110\gamma$ -Untereinheit (s. Abbildung 4.32).

Diese Befunde weisen auf eine kostimulatorische Funktion der $p87$ -Untereinheiten hin.

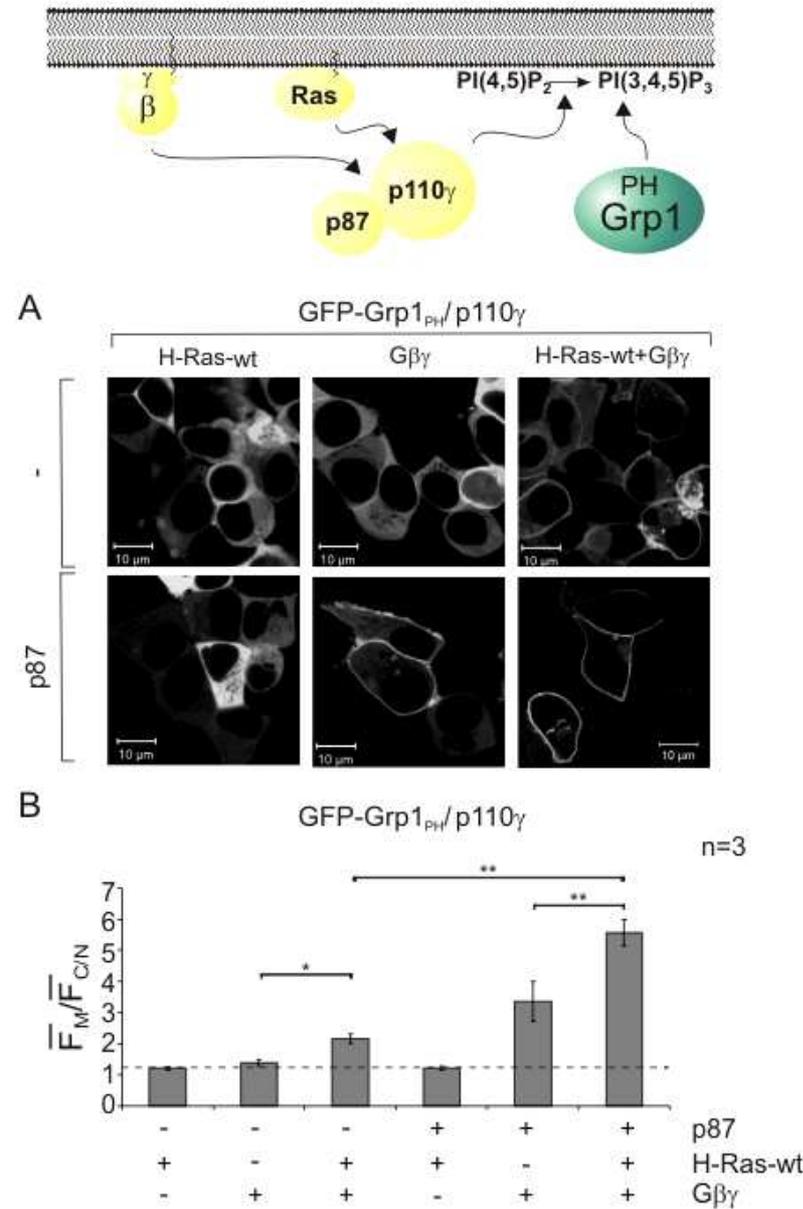


Abbildung 4.32: Einfluss von p87 auf die $G\beta\gamma$ -Komplex und H-Ras-induzierte Aktivierung der $p110\gamma$ -Untereinheit. (A) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für $G\beta\gamma$ -Komplexe, die PI3-Kinase γ ($p110\gamma$, oben und $p110\gamma/p101$, unten), H-Ras-wt und GFP-Grp1_{PH} in den links angegebenen Kombinationen kotransfiziert. Die Ko-expression von p87 führte zu einer deutlich verstärkten $G\beta\gamma$ -Komplex- und H-Ras-wt-induzierten Aktivierung der katalytischen $p110\gamma$ -Untereinheit. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Semi-quantitative Auswertung der PH-Domänen-Verteilung zwischen Membran und intrazellulärem Kompartiment aus drei unabhängigen Experimenten in 18 Zellen analog zu (A).

5. Diskussion

Die Klasse I PI3-Kinasen sind zentrale Bestandteile ubiquitärer Signaltransduktionskaskaden, die an der Regulation essentieller zellulärer Prozesse, wie beispielsweise Differenzierung, Überleben, Proliferation, Migration, Vesikelbildung und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sind (Vanhaesebroeck et al., 2001; Hawkins et al., 2006). Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass die Beteiligung PI3-Kinase-abhängiger Signalwege bei einer Vielzahl von Erkrankungen vermutet wird. Hier wären Tumorerkrankungen, Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskuläre Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoide Arthritis oder Lupus Erythematodes zu nennen (Ruckle et al., 2006; Hirsch et al., 2006; Hirsch et al., 2007; Marone et al., 2008).

Bereits die Entdeckung der ersten PI3-Kinase-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 machte das Potential dieser Wirkstoffe für den Einsatz bei den genannten Erkrankungen deutlich (Arcaro & Wymann, 1993; Yano et al., 1993; Vlahos et al., 1994). Jedoch fehlten zu dieser Zeit Inhibitoren mit einer spezifischen Isoformselektivität. Darüber hinaus gab es lange Zeit keinerlei Informationen über die spezifischen biologischen Rollen der einzelnen Isoformen, was das Risiko eines zu breiten Wirkungsspektrums derartiger Wirkstoffe zunächst relativ hoch erscheinen ließ. Erst der genetische „knock-out“ der verschiedenen p110-Untereinheiten erbrachte den notwendigen Fortschritt. Die frühe embryonale Letalität konstitutiver p110 α - und p110 β -defizienter Mäuse wurde als Hinweis auf spezifische Aufgaben der beiden PI3-Kinase-Isoformen gedeutet (Bi et al., 1999 und 2002). Parallele Studien mit Hilfe Isoform-spezifischer, inhibitorischer Antikörper erbrachten weitere Evidenzen für die spezifischen Funktionen der Klasse I_A PI3-Kinasen (Vanhaesebroeck et al., 1999; Hooshmand-Rad et al., 2000; Bony et al., 2001; Leverrier et al., 2003). Jedoch kann aufgrund des letalen Phänotyps der p110 α ^{-/-} und p110 β ^{-/-}-Mausmodelle nicht ausgeschlossen werden, dass entsprechende Inhibitoren starke Nebenwirkungen aufweisen könnten. Im Gegensatz hierzu sind sowohl die PI3-Kinase γ , als auch die PI3-Kinase δ bevorzugt in Immunzellen exprimiert und maßgeblich an inflammatorischen Prozessen beteiligt. Zudem ist die Inaktivierung beider Gene mit dem Leben vereinbar. Diese Tatsachen machen die PI3-Kinasen γ und δ zu viel versprechenden Zielstrukturen und führten zu einem Aufleben des industriellen Interesses an dieser Proteinfamilie (Hirsch et al., 2000; Sasaki et al., 2000; Li et al., 2000; Clayton et al., 2002; Jou et al., 2002; Okkenhaug et al., 2002; Ali et al., 2004).

Parallel wurde deutlich, dass PTEN, eine der PI3-Kinase-Aktivität entgegenwirkende Phosphatase, als Tumorsuppressor fungiert (Liaw et al., 1997; Li et al., 1997; Cully et al., 2006). Komplementär hierzu werden Mutationen der PI3-Kinase α ebenfalls häufig in Tumoren gefunden (Bachman et al., 2004; Samuels et al., 2004; Cully et al., 2006). Somit

werden PI3-Kinasen ebenfalls als pharmakotherapeutisch relevante Zielstrukturen („Drug targets“) zur Behandlung von malignen Tumorentartungen angesehen. Umgekehrt führt die Entwicklung Isoform-selektiver Inhibitoren zu einem immer größeren Wissen um die spezifischen Funktionen der PI3-Kinasen. Gegenwärtig befinden sich bereits mehrere Substanzen in den ersten Phasen der klinischen Erprobung (Marone et al., 2008).

Die Prototypen für diese Inhibitoren stellen die bereits bekannten PI3-Kinase-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 dar, wobei diese an der ATP-Bindungsstelle der Kinase angreifen und somit die Bindung von ATP verhindern (Knight et al., 2004; Pomel et al., 2006; Hayakawa et al., 2006). Der hohe Grad der Aminosäure-Identität innerhalb der ATP-Bindungsstasche der vier p110-Isoformen erschwert jedoch die Auffindung von Inhibitoren, die eine therapeutisch notwendige Isoformselektivität aufweisen. Die Entwicklung zweier innerhalb der Klasse I PI3-Kinasen sehr selektiver Inhibitoren (IC87114 - PI3-Kinase δ und UCB1311236 - PI3-Kinase γ), gab zunächst große Hoffnung (Sadhu et al., 2003; Crabbe, 2007). Doch weitere Analysen machten deutlich, dass diese Wirkstoffe auch PI3-Kinase-verwandte Kinasen inhibieren (z.B. DNA-dependent protein kinase; DNA-PK) und somit nicht als selektive Inhibitoren verwendet werden können. Eine Struktur-Wirkungs-Beziehung, die diese hohe Selektivität zwischen den Klasse I PI3-Kinasen erklärt, konnte jedoch nicht gefunden werden. Somit erscheint derzeit die Entwicklung von selektiven Inhibitoren auf der Basis von ATP-Analoga wenig erfolgreich (Crabbe, 2007), und es stellt sich die Frage, ob die Hemmung der ATP-Bindungsstelle eine geeignete Strategie darstellt, oder ob hierfür nicht die Regulator- bzw. Effektordomänen der PI3-Kinasen besser geeignet sind. Deshalb könnte das genaue Verständnis der molekularen Regulationsmechanismen und Isoform-spezifischer Signalwege eine wesentliche Grundlage für aussichtsreiche pharmakologische Interventionen sein.

Die Regulationsmechanismen der einzelnen PI3-Kinase-Isoformen sind jedoch nur unzureichend bekannt. So wird bislang weder die Rezeptorspezifität, noch die Effektorspezifität der PI3-Kinasen verstanden (Vanhaesebroeck et al., 2005; Hawkins et al., 2006; Hirsch et al., 2007). Die Klasse I_B PI3-Kinase γ wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) reguliert. Hierbei erfolgt die Aktivierung der Kinase nicht durch die Rezeptor-aktivierte G α -Untereinheit, sondern durch den freigesetzten G $\beta\gamma$ -Komplex. Bisher wurde jedoch eine PI3-Kinase γ -Aktivierung nur für G_iPCRs nachgewiesen (Hawkins et al., 2006; Rommel et al., 2007; Andrews et al., 2007a). Unbekannt ist, ob weitere G-Protein-Isoformen die PI3-Kinase γ aktivieren können.

Ungeklärt ist auch die Funktion der erst kürzlich entdeckten zweiten nicht-katalytischen PI3-Kinase γ -Untereinheit p87. Erste Untersuchungen ergaben, dass die p87-, wie die p101-Untereinheit, mit der p110 γ -Untereinheit komplexiert. Eine Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} war analog der PI3-Kinase γ_{p101} möglich, wenn auch schwächer ausgeprägt. Deshalb wird derzeit angenommen, dass die p87-, ähnlich der p101-Untereinheit, an

G $\beta\gamma$ -Komplexe bindet und so die GPCR-induzierte Aktivierung vermittelt (Suire et al., 2005; Voigt et al., 2006). Der direkte Beweis wurde bisher jedoch noch nicht erbracht. Zudem weisen die p101- und die p87-Untereinheit sehr große Sequenzunterschiede auf, was für unterschiedliche Funktionen dieser beiden Proteine spricht.

Neben der Rezeptor-induzierten Aktivierung der PI3-Kinasen enthalten die katalytischen Untereinheiten aller Klasse I PI3-Kinasen ebenfalls eine Ras-Bindungs-Domäne und können somit ebenfalls durch GTP-gebundenes Ras aktiviert werden (Vanhaesebroeck et al., 2001). Im Fall der Klasse I_A PI3-Kinasen ist bekannt, dass eine Ras-vermittelte Aktivierung der Kinase nur nach RTK-induzierter Lockerung des Dimers erfolgen kann (Jimenez et al., 2002). Für die PI3-Kinase γ ist neben der regulatorischen Funktion von Ras auch die Kristallstruktur eines Komplexes aus p110 γ und N-Ras bekannt (Pacold et al., 2000; Suire et al., 2002). Die physiologische Relevanz einer Ras-induzierten PI3-Kinase γ -Stimulation ist jedoch unklar (Hawkins et al., 2006). Des Weiteren ist nicht bekannt, ob die PI3-Kinase γ , ähnlich wie die Klasse I_A PI3-Kinasen, nur synergistisch durch GPCRs und Ras aktiviert werden kann, oder ob auch eine rein Ras-vermittelte Stimulation des Enzyms möglich ist.

Aus diesem Grund wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Regulation der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen durch GPCRs und Ras eingehend untersucht. Da besonders die Untersuchungen zur Ras-vermittelten Regulation bisher nur *ex vivo* oder *in vitro* vorliegen, wurde hier eine Analysemethode gewählt, die es ermöglicht, die Aktivität der Kinase im intakten zellulären System zu untersuchen.

5.1 Regulierbarkeit der PI3-Kinase γ durch verschiedene G-Proteine

Die Effektorspezifität von GPCRs, welche durch die G α -Untereinheiten der verschiedenen G-Protein-Isoformen determiniert wird, ist gut verstanden. Aus diesem Grund sind GPCRs nach ihrem Kopplungsmuster in primär G_{i/o}-, G_s- oder G_{q/11}-Protein-koppelnde Rezeptoren unterteilt (Offermanns, 2000; Neves et al., 2002; Offermanns, 2003). Initial wurde angenommen, dass nur G α -Untereinheiten Signale weitergeben können, doch konnte auch für den G $\beta\gamma$ -Komplex eine Signal-weiterleitende Funktion nachgewiesen werden (s. Tabelle 1.1; Clapham & Neer, 1997). Eine Spezifität der G $\beta\gamma$ -Komplex-abhängigen Signaltransduktion wurde bisher jedoch kaum belegt. Ebenfalls ist es bisher nicht gelungen, ein Kopplungsmuster distinkter G $\beta\gamma$ -Komplexe an spezifische G α -Untereinheiten oder eine Präferenz von Effektoren für bestimmte G $\beta\gamma$ -Kombinationen zu zeigen (Cabrera-Vera et al., 2003; Jones et al., 2004; Robishaw & Berlot, 2004; Smrcka, 2008). Erste Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass die G γ -Untereinheit zu einer Rezeptor-Spezifität des

G-Proteins beitragen kann (Schwindinger et al., 2003; Schwindinger et al., 2004; Leung et al., 2006; Trusov et al., 2007). Auch für die PI3-Kinase γ konnte ein Einfluss der $G\gamma$ -Untereinheit auf die Fähigkeit von $G\beta\gamma$ -Komplexen, die Kinase *in vitro* zu aktivieren, gezeigt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass nur die $G\beta\gamma$ -Komplexe, die eine C20-isoprenylierte $G\gamma$ -Untereinheit enthalten, eine suffiziente Stimulation der PI3-Kinase γ vermitteln können (Maier et al., 2000; Kerchner et al., 2004). Jedoch ist unklar, ob dies auch *in vivo* der Fall ist.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde nun systematisch die Fähigkeit von G_s PCRs und G_q PCRs im Vergleich zu G_i PCRs untersucht, die beiden PI3-Kinase γ -Isoformen in lebenden Zellen zu stimulieren. Die konfokalmikroskopische Visualisierung einer GFP-markierten PH-Domäne, die nach Aktivierung von Klasse I PI3-Kinasen an die Plasmamembran transloziert, ermöglichte hier die direkte Auswertung der PI3-Kinase-Stimulation in Echtzeit (Lietzke et al., 2000; Brock et al., 2003). Um die Validität des Analyseverfahrens zu prüfen, wurde zunächst neben dem fMLP-Rezeptor ein weiterer G_i PCR (CXCR4) auf seine Fähigkeit zur PI3-Kinase γ -Aktivierung getestet. Auch der CXCR4-Rezeptor war in der Lage, eine PI3-Kinase-Aktivität zu induzieren, wenn die PI3-Kinase γ koexprimiert wurde. Die vorherige Behandlung dieser Zellen mit PTX führte zu einer vollständigen Inhibition dieser Aktivierung und bestätigte somit, dass diese Rezeptoren die PI3-Kinase γ G_i -Protein-vermittelt aktivieren (s. Abbildung 4.2; Abb. Anhang 8.4 und Abb. Anhang 8.7). Die Analyse des G_s -Protein-gekoppelten β_1 -adrenergen oder des G_q -gekoppelten muskarinischen Acetylcholinrezeptor M_3 in HEK293-Zellen erbrachte, dass sowohl der G_s -, als auch der G_q -Protein-gekoppelte Rezeptor die beiden PI3-Kinase γ -Isoformen prinzipiell aktivieren kann (s. Abbildung 4.3 und Abbildung 4.6). Jedoch reichte im Fall des G_q -gekoppelten- M_3 Rezeptors das niedrige Expressionsniveau des Rezeptors nach transienter Koexpression nicht aus, um eine Stimulation der PI3-Kinase γ zu bewirken (s. Abbildung 4.5 und Abb. Anhang 8.11). Erst die stabile Transfektion der Zellen mit diesem Rezeptor führte zu einer deutlichen und reproduzierbaren Kinase-Aktivität (s. Abbildung 4.6). Die Tatsache, dass erst eine hohe Konzentration an Rezeptoren zu einer PI3-Kinase γ -Stimulation führte, könnte für die Abhängigkeit der PI3-Kinase γ -Aktivierung von der Menge an freigesetzten $G\beta\gamma$ -Komplexen sprechen. Diese Hypothese würde ebenfalls erklären, warum hauptsächlich G_i -Proteine als Aktivatoren von $G\beta\gamma$ -Komplex-Effektoren gefunden werden, da die G_i -Proteine in den meisten Geweben die quantitativ häufigste G-Protein-Isoform darstellen (Wettschureck & Offermanns, 2005).

In der Literatur wurde bereits die G_s - und G_q PCR-induzierte Aktivierung des PI3-Kinase-Effektors Akt beschrieben. Jedoch scheinen hierfür andere Mechanismen als die $G\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte PI3-Kinase γ -Aktivierung verantwortlich zu sein. So wird zum Beispiel eine $G\alpha$ -abhängige Rezeptortransaktivierung von RTKs diskutiert, welche zu einer Aktivierung von Klasse I_A PI3-Kinasen führt (New et al., 2007). Es konnte beispielsweise in

Cos-7- bzw. HEK293-Zellen neben einer G_i -Protein-gekoppelten muskarinischen Acetylcholinrezeptor M_2 , eine G_s -Protein-gekoppelte β_2 -adrenerg- bzw. eine G_q -Protein-gekoppelte muskarinische Acetylcholinrezeptor M_1 -induzierte Aktivierung von Akt gezeigt werden (Murga et al., 1998; Bommakanti et al., 2000). Jedoch wurde hier die PI3-Kinase-Isoform, welche das Signal vermittelt, nicht eindeutig bestimmt. Weiterführende Studien lassen vermuten, dass es sich um eine Aktivierung der ebenfalls $G\beta\gamma$ -Komplex-sensitiven PI3-Kinase β handelt (Murga et al., 2000; Guillermet-Guibert et al., 2008), zumal zumindest die in dieser Arbeit verwendeten HEK293-Zellen die PI3-Kinase γ nicht endogen exprimieren (s. Abb. Anhang 8.8). Die $G\beta\gamma$ -Komplex-abhängige Regulation der PI3-Kinase β ist aber bisher unverstanden und könnte von anderen Faktoren als die PI3-Kinase γ -Aktivierung abhängen (Maier et al., 1999). Um den Beitrag von G_s - und G_q -Proteinen zur Stimulation der PI3-Kinase γ zu erfassen, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die PI3-Kinase γ -Stimulation durch G_s - und G_q -gekoppelte Rezeptoren nach Vorbehandlung mit PTX untersucht. Die Abwesenheit funktionsfähiger G_i -Proteine führte zwar zu einer schwächeren Aktivierung der PI3-Kinase γ , jedoch war die Stimulation der Kinase deutlich sichtbar, unabhängig davon, ob der G_s - oder der G_q -Protein-gekoppelte Rezeptor verwendet wurde (s. Abbildung 4.4 und Abbildung 4.7). Darüber hinaus konnte mit Hilfe des G_q -Protein selektiven Inhibitors YM-254890 die M_3 -Rezeptor-induzierte, G_i -Protein-unabhängige PI3-Kinase γ -Aktivierung durch G_q -Proteine bestätigt werden (s. Abb. Anhang 8.12).

Diese Befunde sind interessant, da für andere $G\beta\gamma$ -Effektoren, wie beispielsweise GIRKs bekannt ist, dass diese nur durch G-Proteine der $G_{i/o}$ -Familie reguliert werden (s. 1.2.2.2; Mark & Herlitze, 2000; Hommers et al., 2003; Lei et al., 2003; Robishaw & Berlot, 2004; Smrcka, 2008). Jedoch ist allgemein akzeptiert, dass die Spezifität im Fall von GIRKs durch eine direkte Interaktion der GDP-gebundenen $G\alpha_i$ -Untereinheit mit dem Kanal zustande kommt. Wird das entsprechende G_i -Protein aktiviert, so kommt es zu einer schnellen Aktivierung des Kanals durch die vor Ort freigesetzten $G\beta\gamma$ -Komplexe. Da die PI3-Kinasen jedoch in der Hauptsache zytosolisch lokalisiert sind, ist hier eine vergleichbare Interaktion mit den entsprechenden G-Proteinen vor der Stimulation unwahrscheinlich. Vielmehr ist das zytosolische Enzym frei beweglich und kann zu jedem Punkt der Plasmamembran rekrutiert werden, während die GIRK-Kanäle durch ihre Integration in die Plasmamembran erstens schon an der Membran lokalisiert und zweitens hier recht unbeweglich sind, da sie sich innerhalb der Plasmamembran fortbewegen müssten.

5.2 Bedeutung der G-Protein-Isoform für die Regulation der PI3-Kinase γ im endogenen Modellsystem

Die PI3-Kinase γ ist bevorzugt im hämatopoetischen System exprimiert und wird hier durch G_i -Protein-gekoppelte Chemokin- oder chemotaktische Rezeptoren reguliert (Hawkins et al., 2006). Außerdem konnte eine Expression der PI3-Kinase γ im Kardiovaskularsystem nachgewiesen werden. Funktionell scheint hier die PI3-Kinase γ zur Regulation der myokardialen Kontraktilität beizutragen (Hirsch et al., 2006; Oudit & Kassiri, 2007). Die Herzfunktion wird wesentlich durch Rezeptoren reguliert, die zu der Superfamilie der GPCRs gehören (Rockman et al., 2002). Welche dieser Rezeptoren jedoch an der Regulation der PI3-Kinase γ beteiligt sind, ist weitgehend ungeklärt. In Portalvenenmyozyten der Ratte konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass der AT_{1A} -Rezeptor über $G\beta\gamma$ -Komplexe und die PI3-Kinase γ L-Typ Kalziumkanäle stimuliert (Viard et al., 1999; Maier et al., 2000; Macrez et al., 2001; Quignard et al., 2001). Nachfolgende Untersuchungen an aortalen Gefäßmuskelzellen der Maus lassen vermuten, dass diese Aktivierung Pertussistoxin-sensitiv und somit G_i -Protein-vermittelt ist, obwohl der AT_{1A} -R primär an G_q -Proteine koppelt (Vecchione et al., 2005). Auch für die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation wurde eine PI3-Kinase γ -Abhängigkeit gezeigt, die durch den G_i -Protein-gekoppelten $P2Y_{12}$ -ADP-Rezeptor induziert wird (Hirsch et al., 2001). Untersuchungen zur β -adrenerg-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ zeigen, dass diese an der Internalisierung der β -adrenergen Rezeptoren beteiligt ist (Naga Prasad et al., 2005). Unklar ist in diesem Zusammenhang jedoch, ob diese Aktivierung G_s - oder G_i -Protein-abhängig vermittelt wird. Beide Möglichkeiten bestehen, da der β_1 -adrenerge Rezeptor eine Umschaltung von einer Kopplung an G_s - auf G_i -Proteine erfahren kann und der β_2 -AR konstitutiv an G_s - und G_i -Proteine koppelt (Zamah et al., 2002; Martin et al., 2004). Es gibt weiterhin erste Hinweise, dass G_q PCRs die PI3-Kinase γ aktivieren können. Jedoch fehlen in diesen Studien entweder direkte Kontrollen der G_q -Protein-Abhängigkeit, oder aber die so aktivierte PI3-Kinase-Isoform wurde nicht eindeutig bestimmt (Naga Prasad et al., 2000; Lian et al., 2005). So könnte es sich auch um eine Aktivierung von Klasse I_A PI3-Kinasen handeln (New et al., 2007).

Im Herzen werden beide PI3-Kinase γ -Isoformen in Kardiomyozyten exprimiert, wobei ihre Regulation hier weitgehend unklar ist. Zur Untersuchung der Regulation der PI3-Kinase γ im Herzen wurde die den Kardiomyozyten ähnliche HL-1-Zelllinie verwendet (s. 4.1.6; Claycomb et al., 1998; White et al., 2004). In diesem Zellsystem zeigte die Aktivierung der überexprimierten PI3-Kinase γ -Isoformen mit Agonisten der endogen exprimierten M_2 -, β -adrenergen- und α_1 -adrenergen-Rezeptoren, dass auch nicht überexprimierte Rezeptoren diese Kinase unabhängig von ihrem jeweiligen G-Protein-Kopplungsmuster aktivieren können (s. Abbildung 4.10, Abbildung 4.12 und Abbildung 4.14).

Interessanterweise war eine Umverteilung des PIP₃-Sensors durch Stimulation endogener Rezeptoren jedoch erst nach Überexpression der PI3-Kinase γ möglich. Als eine mögliche Ursache konnte eine relativ geringe Sensitivität der Messmethodik nicht ausgeschlossen werden. Zur Analyse der endogenen PI3-Kinase γ -Aktivität wurde deshalb zusätzlich ein signalintegrierendes Analyseverfahren verwendet (s. Abbildung 4.11). So konnte durch Bestimmung der Akt-Phosphorylierung mittels Immunoblotanalyse auf die Überexpression der Signalkomponenten verzichtet werden, da die endogene PI3-Kinase γ sowohl durch den M₂-, als auch die β - und α_1 -adrenergen-Rezeptoren aktiviert werden konnte (s. Abbildung 4.11, Abbildung 4.13 und Abbildung 4.15). Eine Aktivierung der ebenfalls G $\beta\gamma$ -Komplex-sensitiven PI3-Kinase β , sowie die mögliche Aktivierung anderer Klasse I_A PI3-Kinasen durch eine Rezeptortransaktivierung wurde mit Hilfe eines Isoform-selektiven PI3-Kinase γ -Inhibitors ausgeschlossen. Somit haben wir erstmals nachgewiesen, dass eine Aktivierung der PI3-Kinase γ ebenfalls durch G_s- und G_qPCRs im endogenen System erfolgen kann. Ebenfalls ungeklärt war, ob auch tatsächlich G_s- und G_q-Proteine zu dieser Aktivierung beitragen können. Deshalb wurden die Zellen mit Pertussistoxin vorbehandelt. Hier zeigte sich, dass die β -adrenerg-induzierte PI3-Kinase γ -Aktivierung sowohl G_i-, als auch G_s-abhängig vermittelt wird. Im Fall der α_1 -adrenergen Rezeptor-Stimulation war nach Inhibition von G_i-Proteinen keine Aktivierung der PI3-Kinase γ mehr nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass neben G_iPCRs auch G_s- und G_qPCRs die PI3-Kinase γ aktivieren können, wobei dies prinzipiell ebenfalls durch die an diese Rezeptoren koppelnden G_s- und G_q-Proteine erfolgen kann. In der Literatur sind jedoch auch Ausnahmen beschrieben. So kann beispielsweise Thrombin keine G $\beta\gamma$ -Komplex-abhängige PI3-Kinase-Stimulation bewirken, obwohl der entsprechende Rezeptor neben G_q- und G_{12/13}- auch an G_i-Proteine koppelt (Hirsch et al., 2001). Wie schon zuvor erwähnt wäre hypothetisch vorstellbar, dass GPCRs nicht nur ein G α -, sondern auch ein G $\beta\gamma$ -Komplex-Kopplungsmuster aufweisen (Robishaw & Berlot, 2004; Smrcka, 2008) und die PI3-Kinase γ ebenfalls eine Selektivität gegenüber distinkten G $\beta\gamma$ -Komplex-Kombinationen zeigt (Kerchner et al., 2004). Es scheint jedoch wahrscheinlicher, dass die Regulation der PI3-Kinase γ weitgehend unabhängig von den signalisierenden G-Protein-Spezies allein durch die Konzentration bzw. Menge der durch den Rezeptor freigesetzten G $\beta\gamma$ -Komplexe bestimmt wird. Hierfür sprechen mehrere Argumente:

So war die G_i-Protein-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase γ in beiden Zellsystemen (HEK293- und HL-1-Zellen), unabhängig davon, ob die Signalkomponenten rekonstituiert oder endogen vorlagen, grundsätzlich stärker ausgeprägt, als die G_s- bzw. G_qPCR-induzierte Aktivierung. In Anbetracht der Tatsache, dass G_i-Proteine quantitativ die wichtigsten G-Proteine darstellen, während G_q-Proteine, abgesehen von den G_{12/13}-Proteinen, den geringsten Anteil an der Gesamtmenge an G-Proteinen ausmachen (Rockman et al., 2002;

Wettschureck & Offermanns, 2005; Smrcka, 2008), kann man vermuten, dass eine Rezeptor-induzierte Stimulation von G_i -Proteinen zu einer mengenmäßig stärkeren Freisetzung an $G\beta\gamma$ -Komplexen führt, als die von G_s - und G_q -Proteinen. Damit übereinstimmend zeigten die G_s -Protein-gekoppelten Rezeptoren auch nach Behandlung mit Pertussistoxin eine zwar schwächere, aber dennoch reproduzierbare Aktivierung der PI3-Kinase γ , während die G_q PCR-induzierte Aktivierung unter allen untersuchten Bedingungen entweder sehr gering ausfiel oder aber nicht nachweisbar war.

Des Weiteren zeigte sich, dass die PI3-Kinase γ -Stimulation durch den G_q -Protein-gekoppelten muskarinischen Acetylcholinrezeptor M_3 in HEK293-Zellen stark von seinem Expressionsniveau (transiente oder stabile Transfektion; s. Abb. Anhang 8.11) und somit wahrscheinlich ebenfalls von der Menge an aktivierten G-Proteinen abhängig war.

Da G_q PCRs im Herzen verhältnismäßig gering exprimiert sind, liegt es nahe, dass auch HL-1-Zellen nur eine geringe Menge dieser Rezeptoren aufweisen (Rockman et al., 2002). Tatsächlich führte die Stimulation von α_1 -adrenergen Rezeptoren in den HL-1-Zellen nur zu einer moderaten Aktivierung der Lipidkinase, die in Abwesenheit funktionsfähiger G_i -Proteine vollständig ausblieb.

Dies könnte bedeuten, dass der gleiche Rezeptor je nach Expressions- und Kopplungsmuster Gewebe-spezifisch unterschiedlich zu einer PI3-Kinase γ -Stimulation beiträgt.

5.3 Ras-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase γ

Die Stimulation der PI3-Kinase γ kann nicht nur durch $G\beta\gamma$ -Komplexe, sondern auch durch GTP-gebundenes Ras vermittelt werden. Hierfür ist die direkte Interaktion von Ras mit der katalytischen $p110\gamma$ -Untereinheit verantwortlich, die bereits ausreichend für eine Stimulation der $p110\gamma$ ist und in Kombination mit $G\beta\gamma$ -Komplexen synergistisch wirken kann (Rubio et al., 1997; Pacold et al., 2000). Der Signalweg sowie der Mechanismus der Aktivierung sind jedoch nicht eindeutig geklärt. Ungeachtet der ungeklärten Frage, ob Ras die $p110\gamma$ -Untereinheit allosterisch oder durch eine Reorientierung zur Membran und somit zu ihrem Substrat hin aktiviert, ist eine notwendige Voraussetzung für eine Aktivierung die Rekrutierung der zytosolisch lokalisierten PI3-Kinase γ an die Plasmamembran (Pacold et al., 2000; Suire et al., 2002; Hawkins et al., 2006; Marone et al., 2008). Jedoch gelang es bislang nicht, eine Ras-vermittelte Rekrutierung der $p110\gamma$ -Untereinheit an zelluläre Membranen zu zeigen (Rubio et al., 1997; Suire et al., 2002), obwohl Ras andere Effektoren rekrutieren kann (Stokoe et al., 1994; Song et al., 2001). Mit Hilfe des *in vivo*-Imaging konnte in dieser Arbeit tatsächlich gezeigt werden, dass eine Membranlokalisation ein

entscheidender Faktor für die Ras-vermittelte Stimulation der PI3-Kinase γ ist. Es kommt zu einer gesteigerten Sensitivität der p110 γ gegenüber aktivem Ras, wenn der PI3-Kinase γ -Anteil an der Plasmamembran durch die Fusion eines CAAX-Motives mit der p110 γ erhöht wird (s. Abbildung 4.17). So ist bei einer zytosolisch lokalisierten p110 γ das H-Ras-wt nicht in der Lage, eine Kinase-Aktivität zu induzieren, während eine membranständige p110 γ -CAAX von H-Ras-wt deutlich aktiviert wird (s. Abbildung 4.17). Eine mögliche Beteiligung von freien G $\beta\gamma$ -Komplexen an der Ras-induzierten Aktivierung der p110 γ -CAAX erscheint unwahrscheinlich, da die Koexpression von β -ARK keinen Effekt zeigte (s. Abbildung 4.17). Obwohl in früheren Untersuchungen festgestellt wurde, dass ein signifikanter Anteil der PI3-Kinase γ bereits im unstimulierten Zustand mit der Membran assoziiert zu sein scheint (Czapalla, 2002), lassen unsere Befunde den Schluss zu, dass eine Rekrutierung der p110 γ für die Ras-induzierte Stimulation der PI3-Kinase γ notwendig ist und darüber hinaus einen limitierenden Faktor für diese Aktivierung darstellt. Die bisher fehlende Nachweisbarkeit einer möglichen Ras-vermittelten p110 γ -Rekrutierung könnte auf methodischen Ursachen beruhen. So sind die bisherigen Untersuchungen an Zellextrakten und nicht in lebenden Zellen durchgeführt worden (Rubio et al., 1997; Suire et al., 2002). Die verwendeten Nachweismethoden könnten zu einem Verlust der Interaktion geführt haben. Außerdem wurde für die Interaktion von p110 γ und Ras eine recht geringe Dissoziationskonstante ermittelt, welche den Nachweis einer Translokation ebenfalls erschweren dürfte (Pacold et al., 2000). Des Weiteren legen diese Befunde nahe, dass die aktivierende Wirkung von Ras eher auf die Konformationsänderung als auf eine Reorientierung der p110 γ zur Plasmamembran hin erfolgt, da die isoprenylierte p110 γ vermutlich schon relativ zur Membran hin ausgerichtet ist und dies nur schwer veränderbar sein dürfte (Brock, 2002).

Für die zunächst vermutete Existenz einer monomeren p110 γ *in vivo* gibt es bislang jedoch keine überzeugenden Daten, wodurch den nicht-katalytischen Untereinheiten eine wichtige Bedeutung für die Regulation der PI3-Kinase γ zukommt (Baier et al., 1999; Suire et al., 2005; Voigt et al., 2006). Ras interagiert mit der katalytische p110 γ -Untereinheit und stimuliert diese. Ein Einfluss der nicht-katalytischen p101- und p87-Untereinheiten war bislang weder untersucht noch bekannt. Zwar wurde sowohl die Ras-induzierte Aktivierung der monomeren p110 γ , als auch der PI3-Kinase γ_{p101} untersucht, jedoch fehlen vergleichende Studien (Rubio et al., 1997; Pacold et al., 2000; Suire et al., 2002). Die in dieser Arbeit gezeigte vergleichende Studie der Ras-induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ -Isoformen ergab, dass die nicht-katalytischen Untereinheiten die Ras-induzierte Aktivierbarkeit der Kinase fördern (s. Abbildung 4.18). Im Fall der PI3-Kinase γ_{p87} zeigte die p110 γ eine leicht erhöhte Effizienz der durch konstitutiv aktives Ras induzierten Stimulation, während bei der PI3-Kinase γ_{p101} die Effizienz signifikant erhöht war (s. Abbildung 4.18). Eventuell freie G $\beta\gamma$ -Komplexe hatten keinen Einfluss (s. Abbildung 4.19). Darüber hinaus fällt auf, dass ebenfalls wildtyp H-Ras eine Stimulation der PI3-Kinase γ_{p101} -Isoform induzieren kann,

während im Fall der PI3-Kinase γ_{p87} keine Aktivität nachweisbar war. Dies könnte darauf hindeuten, dass die p101- Untereinheit einen stärkeren Effekt als die p87-Untereinheit auf die katalytische Untereinheit ausübt, was an die Situation der $G\beta\gamma$ -vermittelten Stimulation dieser beiden Isoformen erinnert. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die nicht-katalytischen PI3-Kinase γ -Untereinheiten p87 und p101 auxiliäre und/oder modulatorische Funktionen haben könnten.

5.4 Unterschiedliche Mechanismen der Rezeptor-induzierten Regulation der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen

Die Existenz von zwei nicht-katalytischen Untereinheiten, aber nur einer katalytischen Untereinheit der Klasse I_B PI3-Kinasen impliziert, dass die Diversität der PI3-Kinase γ -abhängigen Signaltransduktion über die nicht-katalytischen Untereinheiten sichergestellt sein könnte (Stephens et al., 1997; Suire et al., 2005; Voigt et al., 2005). Jedoch zeigten die initialen Charakterisierungen anderer Arbeitsgruppen lediglich quantitative, jedoch keine qualitativen Unterschiede. So war lediglich eine geringere Aktivität der PI3-Kinase γ_{p87} nach GPCR-induzierter Stimulation zu beobachten (Suire et al., 2005; Voigt et al., 2006). Deshalb wurde die p87- analog der p101-Untereinheit als ein Adapter für die Rekrutierung der PI3-Kinase γ durch $G\beta\gamma$ -Komplexe an die Plasmamembran angesehen (Voigt et al., 2006). Unsere eigenen, initialen Untersuchungen bestätigten zunächst diese Vorbefunde (s. Abbildung 4.20). Auch die Daten zur Stimulation der Kinase-Aktivität durch die Koexpression freier $G\beta\gamma$ -Komplexe ließ eine $G\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Natur der PI3-Kinase γ_{p87} -Stimulation vermuten (s. Abbildung 4.21). Nachfolgend interessierten wir uns jedoch für die direkte Wirkung von $G\beta\gamma$ -Komplexen auf die PI3-Kinase γ -Isoformen, wofür wir ein rekonstituiertes System mit definierten, gereinigten Komponenten verwendet haben (s. Abbildung 4.22). Hier hatten Stephens und Mitarbeiter Daten vorgelegt, die zeigten, dass die PI3-Kinase γ_{p87} weniger potent und effizient durch $G\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert wurde, als die PI3-Kinase γ_{p101} (Suire et al., 2005). Unklar blieb jedoch das Ausmaß der postulierten Adapterfunktion der p87, die nur durch einen direkten Vergleich der PI3-Kinase γ_{p87} mit der monomeren p110 γ abzuschätzen war. Mit Hilfe eines derartigen Versuchsansatzes hatten wir bereits zeigen können, dass die PI3-Kinase γ_{p101} eine wesentlich höhere Potenz und Effizienz gegenüber einer $G\beta\gamma$ -Komplex-vermittelten Stimulation als die monomere p110 γ aufweist, was auf die Adapterfunktion und die damit verbundene Rekrutierung der Kinase an die Vesikeln zurückgeführt werden kann (s. Abbildung 4.22; Maier et al., 1999; Brock et al., 2003). In der hier vorliegenden Arbeit konnten wir nun erstmals zeigen, dass die PI3-Kinase γ_{p87} im Vergleich zur monomeren p110 γ erstaunlicherweise keine erhöhte Sensitivität

gegenüber G β γ -Komplexen aufweist. Lediglich die Effizienz der Stimulation war geringfügig erhöht (s. Abbildung 4.22). Dieser Befund stellt die postulierte Adapterfunktion der p87-Untereinheit in Frage. Tatsächlich bestätigte die Analyse der G β γ -Komplex-induzierten Rekrutierung, dass p87 weder *in vitro* noch im zellulären System signifikant durch G β γ -Komplexe an Lipidmembranen transloziert wird (s. Abbildung 4.23 und Abbildung 4.24). Zudem zeigte sich, dass das Ausmaß der Rekrutierung proportional zur Fähigkeit der G β γ -Komplexe war, die Kinase-Aktivität zu stimulieren (vgl. Abbildung 4.22 und Abbildung 4.23). Wesentlich erscheint jedoch die Schlussfolgerung, dass im zellulären System der Rezeptor nicht ausschließlich über freigesetzte G β γ -Komplexe in der Lage ist, die PI3-Kinase γ_{p87} zu aktivieren. Vielmehr ist ein G β γ -Komplex-unabhängiger Rekrutierungsmechanismus zu postulieren, um eine GPCR-induzierte Stimulation zu ermöglichen. Tatsächlich zeigten unsere Daten zum ersten Mal, dass aktives H-Ras die PI3-Kinase γ ebenfalls an Membranen translozieren kann (s. Abbildung 4.25; Abb. Anhang 8.17 und Abb. Anhang 8.18). Dies wurde in Gegenwart von aktivem Ras anhand einer deutlichen Akkumulation einer Fluoreszenz-markierten p110 γ an der Plasmamembran lebender HEK293-Zellen und darüber hinaus durch eine Kollokalisierung von p110 γ mit H-Ras-V12 nach Immunfluoreszenz-Analyse nachgewiesen (s. Abbildung 4.25 und Abb. Anhang 8.18).

Vorraussetzung für eine Ras-abhängige Vermittlung der Rezeptor-induzierten Rekrutierung der PI3-Kinase γ_{p87} an die Membran ist jedoch zunächst, dass Ras durch diese Rezeptoren aktiviert werden kann. Tatsächlich bewirkt der fMLP-Rezeptor eine erhöhte Bildung von aktivem Ras (s. Abb. Anhang 8.19; Gutkind, 1998; Suire et al., 2006). Allerdings zeigen unsere Versuche auch, dass diese Ras-Aktivierung relativ moderat ausfällt. Möglicherweise sind deshalb weitere Mechanismen oder andere Ras-Isoformen involviert. Zusätzlich konnte die Hypothese, dass Ras die Rezeptor-induzierte Rekrutierung der PI3-Kinase γ_{p87} vermittelt, dadurch untermauert werden, dass sogar die monomeren p110 γ im zellulären System, nach Koexpression von H-Ras, GPCR-induziert stimulierbar war (s. Abbildung 4.26 und Abbildung 4.27). Somit scheint Ras prinzipiell die Adapter-Funktion der p101 substituieren zu können. Um die Beteiligung von Ras an der Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} zu bestätigen, wurde dessen Stimulation nach Inaktivierung von endogenem Ras untersucht. Tatsächlich führte die Abwesenheit von aktivem Ras zu einer vollständigen Inhibition der fMLP-Rezeptor-induzierten Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} (s. Abbildung 4.28).

Unsere Daten lassen den Schluss zu, dass Ras neben seiner aktivierenden auch eine rekrutierende Wirkung auf die PI3-Kinase γ hat. Beide Aktivierungsqualitäten von Ras wirken auf die p110 γ -Untereinheit. Im Gegensatz hierzu wirken G β γ -Komplexe sowohl auf die katalytische p110 γ - als auch auf die nicht-katalytische p101-Untereinheit. Interessanterweise konnten wir erstmals einen qualitativ bedeutsamen Unterschied in der Regulation der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen aufzeigen. In dem hier verwendeten System ist die Anwesenheit von aktivem Ras eine notwendige Voraussetzung für die Rezeptor-induzierte Aktivierung der

PI3-Kinase γ_{p87} , jedoch nicht für die der PI3-Kinase γ_{p101} . Hieraus ergibt sich, dass die in initialen Studien und in dieser Arbeit gezeigte GPCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} auf einer Mitwirkung von endogenem Ras basiert (s. Abbildung 4.20). Gleiches gilt für die $G\beta\gamma$ -Komplex-induzierte Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} (s. Abbildung 4.21). Da die Überexpression von $G\beta\gamma$ -Komplexen zu keiner Aktivierung von Ras in unserem System geführt hat (s. Abb. Anhang 8.20 B), die Stimulation von PI3-Kinase γ_{p87} nach Koexpression von $G\beta\gamma$ -Komplexen jedoch ebenfalls durch NF1 inhibierbar war (s. Abbildung 4.29), scheint hier die Anwesenheit von endogenem, basal aktivem Ras notwendig. Dies könnte eine Erklärung für die frühere Annahme, dass p87 als Adapter für $G\beta\gamma$ -Komplexe fungieren kann, sein.

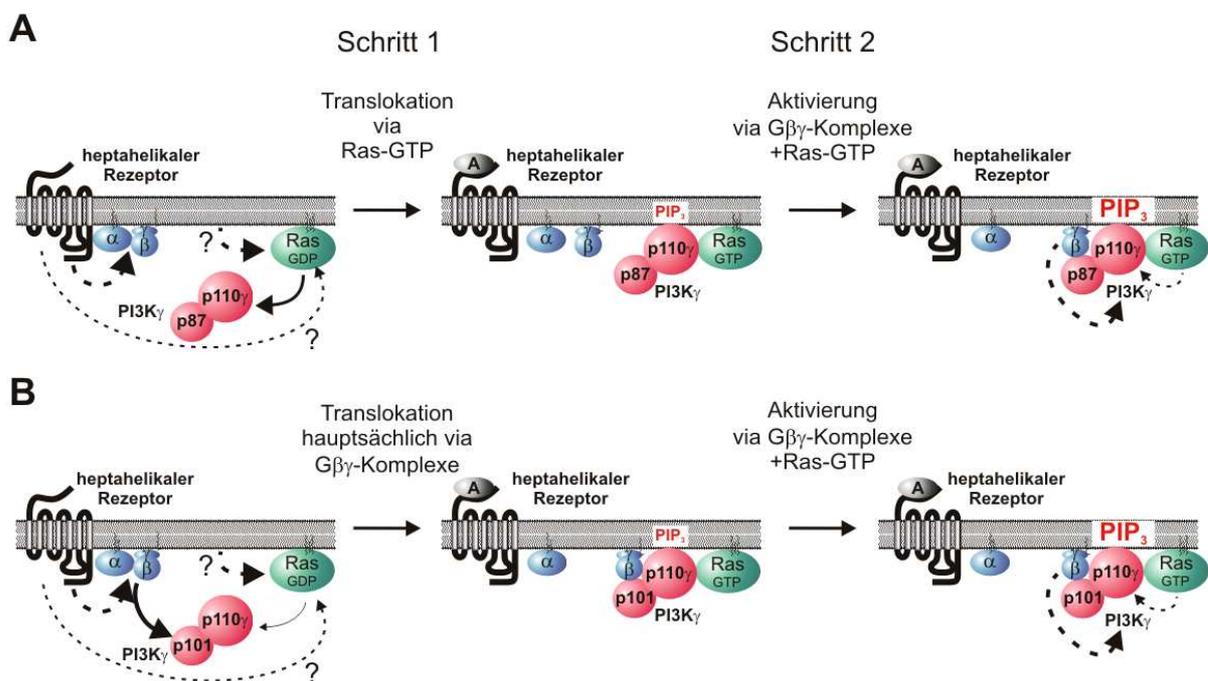


Abbildung 5.1: Modell der Aktivierungsmechanismen der beiden bekannten PI3-Kinase γ -Isoformen. (A) Nach Ligand-induzierter Stimulation von GPCRs wird die PI3-Kinase γ_{p87} durch aktives Ras, aber nicht durch $G\beta\gamma$ -Komplexe an die Plasmamembran transloziert, wo sie sowohl durch aktives Ras als auch hauptsächlich durch $G\beta\gamma$ -Komplexe aktiviert werden kann. Somit ist aktives Ras unabdingbar für eine Rezeptor-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} -Isoform. (B) Demgegenüber kann die PI3-Kinase γ_{p101} hinreichend durch $G\beta\gamma$ -Komplexe rekrutiert und aktiviert werden. Eine Beteiligung von Ras ist wahrscheinlich, aber in dem untersuchten System offensichtlich unbedeutend.

Auf der Basis unserer Daten schlagen wir somit ein 2-Schritt-Modell für die Rezeptor-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} , ähnlich der PI3-Kinase γ_{p101} (Brock et al., 2003), vor (s. Abbildung 5.1). Hierbei führt im ersten Schritt die Aktivierung von Ras zu einer Rekrutierung der PI3-Kinase γ_{p87} an die Plasmamembran als Voraussetzung für eine Ras- und $G\beta\gamma$ -Komplex-abhängige Aktivierung. Eine entscheidende Rolle von Ras würde hierbei die Rekrutierung darstellen, da hierdurch die Stimulation der Kinase überhaupt erst ermöglicht wird. Für diese Annahme spricht, dass zumindest in unserem zellulären Modell

endogenes Ras alleine nicht ausreichend ist, um eine maximale Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} zu bewirken. Umgekehrt führt das Abfangen freier $G\beta\gamma$ -Komplexe zu einem weitgehenden Verlust der PI3-Kinase γ -stimulierenden Wirkung von $G\beta\gamma$ -Komplexen bzw. GPCRs (s. Abb. Anhang 8.16; Voigt et al., 2006). Hierbei sollte erwähnt werden, dass überexprimierte $G\beta\gamma$ -Komplexe nicht Ras aktivieren (s. Abb. Anhang 8.20 B), sondern direkt auf die Kinase wirkt. Unsere Hypothese zur Bedeutung der Ras-Wirkung steht im Einklang mit bereits beschriebenen weiteren Effektor-Interaktionen von Ras. Für den Ras-Effektor Raf wird beispielsweise angenommen, dass hier die Funktion von Ras im Aktivierungsprozess von Raf die Rekrutierung und ebenfalls eine Konformationsänderung von Raf ist, die die weitere Aktivierung von Raf durch beispielsweise Src-Kinasen ermöglicht (Marais et al., 1995; Avruch et al., 2001; Leicht et al., 2007).

Die physiologische Bedeutung der Ras-vermittelten PI3-Kinase γ -Regulation war lange Zeit vollkommen unklar. Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung zeigte jedoch erstmals eine spezifische Rolle von Ras bei der Regulation der PI3-Kinase γ (Suire et al., 2006). In dieser Arbeit wurde eine $p101^{-/-}$ -Maus als Surrogat für einen Verlust der $G\beta\gamma$ -Komplex-Stimulierbarkeit und eine Ras-bindungsinsuffiziente $p110\gamma^{DASAA/DASAA}$ -„knock-in“-Maus als Modell für den Verlust der Ras-induzierten Stimulierbarkeit der PI3-Kinase γ verwendet. Die hieraus gewonnenen Resultate lassen den Schluss zu, dass eine synergistische Stimulation der PI3-Kinase γ durch aktives Ras und $G\beta\gamma$ -Komplexe notwendig zu sein scheint. Diese Notwendigkeit ist für die PI3-Kinase γ_{p87} -Isoform kompatibel mit dem von uns postulierten Aktivierungsmechanismus. Jedoch schlussfolgern die Autoren, dass dies auch für die PI3-Kinase γ_{p101} zutrifft. Diese Vermutung bedarf einer direkten experimentellen Bestätigung. Zumindest in unserem System kann die PI3-Kinase γ_{p101} entweder durch Ras oder durch $G\beta\gamma$ -Komplexe maximal aktiviert werden. Allerdings sollte geprüft werden, inwieweit PI3-Kinase γ_{p101} -abhängige Effektorsysteme (z.B. NADPH-Oxidase) durch $G\beta\gamma$ -Komplexe und/oder Ras aktiviert werden.

Dennoch scheint zunächst ein Widerspruch zu unseren Daten zu existieren. Als mögliche Gründe sind einerseits methodische Ursachen zu nennen. So könnte die verringerte Expression der von Suire und Mitarbeitern untersuchten $p110\gamma$ -DASAA-Mutante im Vergleich zum Wildtyp oder aber eine veränderte $G\beta\gamma$ -Komplex-induzierte Aktivierbarkeit der Mutante ursächlich sein. Die Autoren haben die Aktivierbarkeit der Mutante durch $G\beta\gamma$ -Komplexe nur exemplarisch an einer Konzentration von $G\beta\gamma$ -Komplexen getestet und darauf verzichtet Konzentrationswirkungskurven zu zeigen. Dies erscheint uns wichtig, da immerhin fünf Aminosäuren ausgetauscht sind, die prinzipiell auch Auswirkungen auf die in diesem Bereich gelegene $G\beta\gamma$ -Interaktionsstelle haben könnten (Leopoldt et al., 1998). Somit wäre es denkbar, dass die $p110\gamma$ -DASAA neben dem Verlust der Interaktion mit aktivem Ras zusätzliche Unterschiede zur $p110\gamma$ -wt aufweist.

Weiterhin sind mögliche konzeptionelle Gründe zu nennen: (1.) Der durch Geninaktivierung erreichte Verlust des Gβγ-Adapters p101 wurde in seinen Auswirkungen gleichgesetzt mit einem Verlust der Gβγ-Wirkung auf die PI3-Kinase γ. Hierbei wurde vernachlässigt, dass Gβγ-Komplexe nicht nur über die p101-Untereinheit wirken, sondern auch die katalytische Untereinheit direkt stimulieren (Stoyanov et al., 1995; Leopoldt et al., 1998; Maier et al., 1999; Brock et al., 2003). (2.) Ras ist in der Lage, die PI3-Kinase γ über eine Interaktion mit der katalytischen p110γ-Untereinheit an die Membran zu rekrutieren. Hierfür sind weder Gβγ-Komplexe noch die p101-Untereinheit notwendig. Nachfolgend sind jedoch Gβγ-Komplexe in der Lage, eine Ras-rekrutierte PI3-Kinase γ auch in Abwesenheit von p101 zu stimulieren. (3.) Es wurde vermutet, dass in den untersuchten Zellen (neutrophile Granulozyten) das Verhältnis der PI3-Kinase γ_{p101} zu PI3-Kinase γ_{p87} 20:1 ist. Hierfür werden nur Daten kolportiert (Suire et al., 2006). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass doch funktionell relevante Mengen an p87 vorhanden sind.

Durch dieses sehr komplexe Regulationsmuster ist, entgegen des von Stephens und Mitarbeitern zu Grunde gelegten Szenarios auch folgende Interpretation vorstellbar: Ein Verlust der p101-Untereinheit und damit der Fähigkeit von Gβγ-Komplexen, die PI3-Kinase γ an die Membran zu rekrutieren, kann durch Ras ausgeglichen werden. Als Folge kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotz Verlusts der p101 die aktivierende Wirkung von Gβγ-Komplexen auf beide PI3-Kinase γ-Isoformen weitgehend erhalten bleibt. Die Wirkung von Gβγ-Komplexen würde somit unterschätzt werden. Umgekehrt könnte der Verlust der Ras-Bindung in der p110γ^{DASAA/DASAA}-Mauslinie zu einem signifikanten Verlust der PI3-Kinase γ_{p87}⁻, nicht jedoch der PI3-Kinase γ_{p101}-Stimulierbarkeit durch GPCRs führen. Zusammenfassend kann auf der Basis der „knock-out/knock-in“-Daten der Arbeitsgruppe von Dr. Len Stephens und unserer hier gezeigten Befunde spekuliert werden, dass die selektiven Wirkungen in den beiden Mauslinien durch spezifische Funktionen erklärbar sind, die selektiv durch die PI3-Kinase γ_{p87} bzw. PI3-Kinase γ_{p101} sichergestellt werden.

Die hier vorgelegte Arbeit zeigt erstmals einen qualitativen Unterschied in der Regulation der beiden PI3-Kinase γ-Isoformen. Die p101-Untereinheit ist Ziel der Gβγ-Komplex-induzierten Aktivierung der Kinase, indem sie im Sinne eines Adapters die Rekrutierung der PI3-Kinase γ an die Plasmamembran vermittelt, während der p87 keine derartige Funktion zukommt. Aufgrund der hier gezeigten fehlenden Interaktion von p87 mit Gβγ-Komplexen schlagen wir vor, die p87 nicht als p87^{PIKAP} (*PI3-Kinase adapter protein*) zu bezeichnen. In unserem Zellsystem ist die Rezeptor-induzierte Stimulation der PI3-Kinase γ_{p101} alleinig durch Gβγ-Komplexe vermittelbar, während im Fall der PI3-Kinase γ_{p87} die Anwesenheit von aktivem Ras und Gβγ-Komplexen für eine Aktivierung erforderlich ist. Hierbei könnten verschiedene Ras-Isoformen unterschiedliche Einflüsse auf die PI3-Kinase γ-Aktivität haben und somit eine Diversität der PI3-Kinase γ_{p87}-Regulation bewirken. Weiterhin wäre denkbar, dass die durch GPCRs induzierte schwächere Aktivität der

PI3-Kinase γ_{p87} durch eine simultane Stimulation von GPCRs und RTKs durch die zu vermutende erhöhte Ras-Aktivität verstärkt und mit der PI3-Kinase γ_{p101} nach reiner GPCR Stimulation vergleichbar wird. Eine ähnliche koinzidente Stimulation konnte für die PI3-Kinase β gefunden werden (s. Abb. Anhang 8.21 und Abb. Anhang 8.22). Die Klasse I_A PI3-Kinase wird klassischerweise durch RTKs stimuliert (Hu et al., 1993). Schon früh gab es jedoch Hinweise, dass diese PI3-Kinase zusätzlich responsiv gegenüber G $\beta\gamma$ -Komplexen sein könnte (Kurosu et al., 1997; Maier et al., 1999). Neueste Untersuchungen bestätigten die physiologische Relevanz der GPCR-induzierte Regulation der PI3-Kinase β *in vivo*, konnten jedoch keine weiteren Aussagen über den Aktivierungsmechanismus machen (Graupera et al., 2008; Guillermet-Guibert et al., 2008). Im Zuge dieser Arbeit wurden jedoch Daten erhoben, die darauf hindeuten, dass die im physiologischen System gezeigte ausschließliche Regulation der PI3-Kinase β durch GPCRs (Graupera et al., 2008; Guillermet-Guibert et al., 2008) tatsächlich durch die Notwendigkeit der koinzidenten Stimulation sowohl durch G $\beta\gamma$ -Komplexe, als auch durch Tyrosinkinase bedingt sein könnte. Somit wäre es denkbar, dass für eine physiologisch relevante Stimulation der PI3-Kinase β Signale beider Rezeptorklassen notwendig sind. Demgegenüber ist die Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} auch durch eine alleinige GPCR-induzierte Stimulation möglich, da diese Rezeptoren sowohl G $\beta\gamma$ -Komplexe freisetzen, als auch Ras aktivieren können. Dennoch könnte auch hier die synergistische Stimulation von GPCRs und RTK durch die so erhöhte Stimulation von Ras zu einer veränderten Aktivität der Kinase und somit einer Signalweiterleitung an andere PI3-Kinase-Effektoren oder einer Signalverstärkung führen.

Infolgedessen könnte die unterschiedliche Regulation der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen zu der Ramifizierung der Signalwege beitragen.

5.5 Funktionen der nicht-katalytischen Untereinheiten

Während die Funktion der regulatorischen Untereinheiten der Klasse I_A PI3-Kinasen recht gut verstanden ist, ist die Rolle der nicht-katalytischen PI3-Kinase γ -Untereinheiten unzureichend untersucht. Die katalytischen p110-Untereinheiten der Klasse I_A PI3-Kinasen weisen eine relativ hohe basale Aktivität auf, welche durch die Dimerisierung mit einer Untereinheit der p85-Familie maskiert wird (Yu et al., 1998b). Erst die Lockerung (Desinhibition) dieser Interaktion durch Tyrosinkinase führt zu einer Freigabe dieser Aktivität, was eine PI3-Kinase-induzierte Signaltransduktion ermöglicht (Songyang et al., 1993; Yu et al., 1998a; Shekar et al., 2005). Die katalytische Untereinheit der Klasse I_B PI3-Kinase γ hingegen weist zwar ebenfalls eine geringe basale Aktivität auf, jedoch ist deren Ausmaß nicht mit dem der Klasse I_A PI3-Kinasen vergleichbar (Leopoldt et al., 1998;

Maier et al., 1999; Krugmann et al., 2002; Brock et al., 2003). Während die Aktivierung der p110-Untereinheiten der Klasse I_A PI3-Kinasen durch die Interaktion des Rezeptors mit der regulatorischen Untereinheit und einer dadurch bedingten Desinhibition der p110-Aktivität erfolgt, konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass p110 γ *in vitro* direkt an G $\beta\gamma$ -Komplexe bindet und auch als Monomer stimuliert werden kann (Leopoldt et al., 1998). Nach der Entdeckung der p101-Untereinheit deuteten weitere *in vitro*-Befunde daraufhin, dass die Funktion der p101 eine Sensitivierung der p110 γ gegenüber G $\beta\gamma$ -Komplexen bewirkt (Stephens et al., 1997; Maier et al., 1999). Die Untersuchung der PI3-Kinase γ_{p101} in lebenden Zellen zeigte eine zusätzliche Interaktion von G $\beta\gamma$ -Komplexen mit der p101-Untereinheit, die weitaus stärker ist, als die mit p110 γ . Die Interaktion mit p101 führt zu einer Redistribution der heterodimeren Kinase an die Plasmamembran und somit zu ihrem Substrat. Eine ausschließliche Interaktion von p110 γ mit G $\beta\gamma$ -Komplexen ist nicht ausreichend, um das Enzym an die Plasmamembran zu rekrutieren, und es gelang folgerichtig auch nicht, die monomere p110 γ im zellulären System zu stimulieren. Weiterhin erbrachten diese Untersuchungen keinen Hinweis auf eine regulatorische Funktion der nicht-katalytischen Untereinheit, die anhand der dargelegten Befunde jedoch auch nicht auszuschließen war (Brock et al., 2003).

Die im Rahmen dieser Arbeit (s. Kapitel 4.3) vorgestellten Befunde zeigen jedoch, dass die PI3-Kinase γ_{p87} im Vergleich zur monomeren p110 γ *in vitro* selbst in Abwesenheit von Ras zu einer erhöhten Effizienz der G $\beta\gamma$ -Komplex-induzierten Aktivierung führt (s. Abbildung 4.22). Dies deutet auf eine spezifische Funktion der p87-Untereinheit hin, nämlich die einer auxiliären oder sogar regulatorischen Untereinheit, die für die p101 ebenfalls vermutet wurde, bisher jedoch noch nicht bestätigt werden konnte. Um diese Annahme zu testen, wurde die PI3-Kinase γ_{p87} mit der monomeren p110 γ in Gegenwart und Abwesenheit von zusätzlich exprimiertem H-Ras verglichen (s. Abbildung 4.31 und Abbildung 4.32). Sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von koexprimiertem H-Ras zeigte die PI3-Kinase γ_{p87} eine wesentlich höhere Rezeptor-induzierte Aktivität (s. Abbildung 4.31). Auch nach Koexpression von H-Ras zeigt die G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} eine höhere Aktivität, als die der monomeren p110 γ -Untereinheit (s. Abbildung 4.31). Unklar bleibt jedoch, wie diese Wirkung zustande kommt. Möglicherweise handelt es sich um eine p87-bedingte Konformationsänderung der p110 γ , welche die G $\beta\gamma$ -Komplex-induzierte Stimulation erleichtert. Klarheit könnte ein Vergleich der Kristallstrukturen beider heterodimeren PI3-Kinase γ -Isoformen mit der einer monomeren p110 γ -Untereinheit erbringen.

Möglicherweise erleichtert die nicht-katalytische Untereinheit die enzymatische Aktivität der katalytischen Untereinheit. Zur Überprüfung wurde erneut, wie schon in (Brock et al., 2003), eine durch ein CAAX-Motiv membranständige p110 γ verwendet. Während unsere Arbeitsgruppe in früheren Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied in der

basalen Aktivität der p110 γ im Vergleich zur PI3-Kinase γ_{p101} feststellen konnte (Brock et al., 2003), standen in der hier vorliegenden Arbeit sensitivere Bedingungen zur Verfügung. So wurde jetzt nicht bei Raumtemperatur, sondern bei einer physiologisch relevanten Temperatur von 37 °C gemessen. Des Weiteren erlaubt die hier eingesetzte semi-quantitative Auswertung eine bessere quantitative Abschätzung der Translokation, wodurch auch kleinere Unterschiede feststellbar werden. Unter diesen Bedingungen wurde tatsächlich eine geringe, aber signifikante Erhöhung der basalen Aktivität von p110 γ sichtbar, wenn diese im Heterodimer mit p87 vorlag (s. Abbildung 4.30). Die für die p101-Untereinheit vermutete auxiliäre Funktion konnte hier ebenfalls anhand einer leichten, aber signifikanten Steigerung der basalen Aktivität gezeigt werden (s. Abbildung 4.30). Weitergehende Untersuchungen einer G β γ -Komplex-induzierten Stimulation bereits membranständiger p110 γ in An- und Abwesenheit der nicht-katalytischen Untereinheit waren jedoch leider nicht möglich, da die monomere p110 γ -CAAX durch G β γ -Komplexe schon maximal stimuliert wird.

Darüber hinaus zeigte sich, wie in Abbildung 4.18 dargestellt, eine erhöhte Aktivität sowohl der PI3-Kinase γ_{p87} als auch der PI3-Kinase γ_{p101} nach H-Ras-induzierter Stimulation im Vergleich zum monomeren Enzym, wobei zusätzlich für die PI3-Kinase γ_{p101} schon die geringe Menge an aktivem Ras, die nach Koexpression von H-Ras-wt erzielt wird, für die Stimulation ausreichend war. Die beiden nicht-katalytischen PI3-Kinase γ -Untereinheiten p101 und p87 bewirken somit nicht nur eine Erhöhung der basalen p110 γ -Aktivität, sondern haben einen auxiliären Einfluss sowohl auf die G β γ -Komplex- als auch die Ras-vermittelten Stimulation der PI3-Kinase γ (s. Abbildung 4.30; Abbildung 4.22 und Abbildung 4.18).

Die Frage, ob p101 und p87 konstitutiv auxiliäre oder sogar regulatorische Funktionen besitzen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. In diesem Zusammenhang sind erste Befunde aus unserer Arbeitsgruppe von Interesse, die eine PI3 Kinase γ -induzierte, Akt-vermittelte Phosphorylierung der p87 zeigen (Prajwal, persönliche Mitteilung).

5.6 Regulationsmechanismen der PI3-Kinase γ -Isoformen und mögliche pharmakologische Konsequenzen

Die potentielle Rolle von PI3-Kinasen bei verschiedenen Krankheitsbildern hat die Mitglieder dieser Proteinfamilie zu attraktiven Zielstrukturen für pharmakologische Eingriffe gemacht. Jedoch ist fraglich, ob die bisher gewählte Strategie für die Entwicklung von Isoform-selektiven PI3-Kinase-Inhibitoren tatsächlich eine ausreichende Selektivität sowohl gegenüber verwandten Kinasen als auch innerhalb der Klasse I PI3-Kinasen gewährleisten kann (s. Seite 95; Crabbe, 2007; Marone et al., 2008). Auch wenn prognostiziert wurde, dass

in einigen Fällen, wie beispielsweise Prophylaxe von Thrombosen oder von Nekrosen nach Herzinfarkten sowie der Degranulation von Mastzellen im Rahmen der Immunantwort, die kombinierte Inhibition von Klasse I_A und I_B PI3-Kinasen wünschenswert sein könnte, so ist doch im Regelfall schon aufgrund möglicher unerwünschter Nebenwirkungen eine Isoform-selektivität dieser Inhibitoren vorzuziehen. Die in der hier vorliegenden Arbeit erbrachten Erkenntnisse über die Isoform-spezifischen Regulations-mechanismen der PI3-Kinase γ eröffnen neue Ansatzmöglichkeiten für die Entwicklung entsprechender Inhibitoren.

Vorteilhaft könnte die Verwendung der heterodimeren PI3-Kinase γ -Isoformen, anstelle der monomeren katalytischen Untereinheit, als Zielstruktur für die Suche nach potentiellen Inhibitoren sein. Ein derartiger Ansatz würde die selektive Inhibition der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen erlauben, die möglicherweise Gewebe- bzw. Isoform-spezifische Funktionen erfüllen.

Die Strategie, ATP-Analoga einzusetzen, ermöglicht neben der Abschaltung der induzierten auch die der basalen Enzymaktivität. Da die PI3-Kinase γ jedoch keine signifikante Basalaktivität zeigt, erscheint dies wenig bedeutsam. Somit könnte die Blockade der Wirkung von PI3-Kinase γ -Regulatoren wie G $\beta\gamma$ -Komplexen (möglicherweise über die p101-Untereinheit) und/oder Ras möglicherweise einen spezifischeren Ansatz darstellen. Weiterhin wäre auch ein Ansatz denkbar, der die auxiliäre Wirkung der nicht-katalytischen Untereinheiten beeinflusst.

5.7 Ausblick

Die hier vorgestellten Befunde zur GPCR-induzierten Regulation der PI3-Kinase γ lassen vermuten, dass möglicherweise alle GPCRs unabhängig von ihrem G-Protein-Kopplungsmuster fähig sind, die PI3-Kinase γ zu stimulieren. Unsere Daten legen nahe, dass diese Fähigkeit von der durch den jeweiligen Rezeptor freigesetzten Menge/Konzentration an G $\beta\gamma$ -Komplexen abhängt. Allerdings steht ein direkter Beweis aus und muss zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben. In diesem Zusammenhang bleibt die Frage nach den Mechanismen, mit denen GPCRs *in vivo* die PI3-Kinase γ -Isoformen regulieren. Neben den Signaltransduktoren G $\beta\gamma$ -Komplexe und Ras könnten weitere Komponenten, die noch nicht identifiziert sind, zu einer PI3-Kinase γ -Isoform-, Rezeptor-, Zeit- und Gewebespezifität beitragen.

Darüber hinaus konnten erstmals Hinweise erhalten werden, die zeigen, dass die nicht-katalytischen Untereinheiten eine auxiliäre Wirkung auf die katalytische Untereinheit der PI3-Kinase γ haben. Ob diese Wirkungen nur konstitutiv sind oder ob beide nicht-katalytischen Untereinheiten regulatorische Funktionen besitzen, ist noch nicht geklärt. Ein

ambitioniertes Ziel in diesem Zusammenhang stellt sicherlich die Kristallisation der heterodimeren Kinasen in Ab- und Anwesenheit der beiden Regulatoren Ras und G β γ -Komplexe dar.

Die Tatsache, dass die Rezeptor-induzierte Regulation der PI3-Kinase γ_{p87} essentiell von aktivem Ras abhängt, eröffnet weitere Regulationsmöglichkeiten dieser PI3-Kinase γ -Isoform. Die verschiedenen Ras-Isoformen können quantitativ, möglicherweise auch qualitativ unterschiedlich auf die PI3-Kinase γ -Isoformen wirken. Darüber hinaus kann die Ras-Diversität zu einer spatialen Spezifität beitragen (Wolfman, 2001).

Weiterhin zeigen die im Verlauf dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur differenzierten Regulation der beiden PI3-Kinase γ -Isoform neue Ansatzpunkte zur selektiven Inhibition auf. Eine Beeinflussung der Interaktion von p101 mit G β γ -Komplexen würde die Aufklärung von PI3-Kinase γ_{p101} -spezifischen Funktionen erlauben, während die Inhibition der Interaktion von Ras und p110 γ möglicherweise einen Einblick in die Funktionen der PI3-Kinase γ_{p87} erlauben könnte.

6. Zusammenfassung

Die heterodimere PI3-Kinase γ ist in Zellen des hämatopoetischen Systems stark exprimiert und an zentralen Prozessen der Immunantwort beteiligt. Sie wird aber auch in geringerem Ausmaß in anderen Organsystemen, wie beispielsweise dem Kardiovaskularsystem gefunden, wo sie eine essentielle Rolle bei der Regulation verschiedener Funktionen einnimmt. Aus diesem Grund wird die PI3-Kinase γ von der pharmazeutischen Industrie als viel versprechende Zielstruktur für die Behandlung von Autoimmun- und kardiovaskulären Erkrankungen angesehen. Die PI3-Kinase γ besteht aus einer katalytischen p110 γ -Untereinheit sowie einer nicht-katalytischen Untereinheit, der p101 oder der erst kürzlich identifizierten p87 und ist der einzige Vertreter der Klasse I_B PI3-Kinasen. Die Existenz von zwei nicht-katalytischen Untereinheiten bedingt eine Heterogenität dieser PI3-Kinase-Subfamilie, wobei die PI3-Kinase γ_{p87} -Isoform jedoch bisher nur unzureichend charakterisiert wurde.

Die Regulation der PI3-Kinase γ erfolgt GPCR-induziert durch freigesetzte G $\beta\gamma$ -Komplexe, die sowohl mit der nicht-katalytischen, als auch der katalytischen Untereinheit interagieren können. Die Interaktion von G $\beta\gamma$ -Komplexen mit der p101-Untereinheit führt dabei zu einer Rekrutierung der Kinase an die Plasmamembran, wo G $\beta\gamma$ vermutlich durch eine zusätzliche Interaktion mit der p110 γ -Untereinheit die Kinase stimuliert. Für die PI3-Kinase γ_{p87} wird aufgrund initialer Befunde ein analoger Mechanismus vermutet. Es ist unklar, ob diese Regulation nur auf G_iPCRs beschränkt ist. Einen weiteren Regulator stellt GTP-gebundenes Ras dar, dessen direkte Interaktion mit der katalytischen p110 γ -Untereinheit und die daraus resultierende aktivierende Wirkung gut belegt sind. Bislang wurde eine rekrutierende Wirkung von Ras jedoch verneint. Auch ist die Bedeutung dieses Regulationsmechanismus für die *in vivo*-Aktivität der PI3-Kinase γ unverstanden.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher (1.) eine mögliche Regulation der PI3-Kinase γ durch primär G_i-, G_s- und G_q-Protein-gekoppelte Rezeptoren vergleichend zu untersuchen. (2.) Weiterhin sollte der Wirkung von Ras auf die verschiedenen PI3-Kinase γ -Isoformen analysiert werden. (3.) Die Existenz zweier nicht-katalytischer Untereinheiten deutet auf eine differenzierte Funktion der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen hin. Jedoch konnte bislang lediglich ein quantitativer Unterschied in der Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} gegenüber der PI3-Kinase γ_{p101} nachgewiesen werden. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die Regulation der PI3-Kinase γ_{p87} detailliert untersucht werden. (4.) Des Weiteren wurde ein möglicher Einfluss der nicht-katalytischen Untereinheiten auf die Aktivität der Kinase charakterisiert.

Die Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Klasse I PI-3-Kinasen in lebenden Zellen erfolgte anhand der konfokalmikroskopischen Visualisierung der Membrantranslokation einer Fluoreszenz-markierten PtdIns-3,4,5-P₃-erkennenden PH-Domäne. Als

weitere Analyseverfahren dienten die Bestimmung der Phosphorylierung des PI3-Kinase-Effektors Akt mittels Immunoblot-Analyse und die radioaktive Messung von *in vitro* gebildetem PtdIns-3,4,5-P₃ unter Verwendung von gereinigten Proteinen.

Die dargelegten Befunde lassen vermuten, dass alle GPCRs unabhängig von ihrem Kopplungsmuster prinzipiell zu einer Gβγ-Komplex-vermittelten Stimulation der PI3-Kinase γ in der Lage sind. Die Verwendung von Pertussistoxin ergab weiterhin, dass diese Stimulation auch über G_s- bzw. G_q-Proteine möglich ist. Dennoch existieren Studien die zeigen, dass nicht alle GPCRs die PI3-Kinase γ *in vivo* aktivieren können. Zusammengenommen deuten die in der Literatur beschriebenen sowie die hier gezeigten Befunde daraufhin, dass die Fähigkeit von GPCRs zur PI3-Kinase γ-Stimulation von der Menge an freigesetzten Gβγ-Komplexen abhängt.

Neben Gβγ-Komplexen kann auch Ras die PI3-Kinase γ stimulieren. Hierbei erfolgt die Aktivierung durch eine Interaktion von Ras mit der katalytischen Untereinheit. Unsere Untersuchungen legen nahe, dass eine membranäre Lokalisation der p110γ-Untereinheit entscheidend für die Ras-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase γ ist. Darüber hinaus konnte erstmals eine H-Ras-abhängige Membranrekrutierung der p110γ an die Plasmamembran in lebenden Zellen nachgewiesen werden. Hierbei erwies sich H-Ras als ein schwächerer Rekrutator als Stimulator, da die membranständige Kinase wesentlich effektiver stimulierbar war. Somit stellt die Rekrutierung der Kinase durch H-Ras den entscheidenden Schritt in der H-Ras-vermittelten Aktivierung der PI3-Kinase γ dar. Die Steigerung der Effizienz dieser H-Ras-abhängigen Stimulation durch die Heterodimerisierung der p110γ mit einer nicht-katalytischen Untereinheit gab zudem einen ersten Hinweis auf eine mögliche auxiliäre oder sogar regulatorische Funktionen der nicht-katalytischen PI3-Kinase γ-Untereinheiten.

Die Analyse der Regulation der PI3-Kinase γ_{p87} erbrachte interessanterweise, dass die p87 *in vitro* nur schwach durch Gβγ-Komplexe an Lipidvesikel rekrutiert wird, wobei sich eine solche Rekrutierung in lebenden Zellen nicht nachweisen ließ. Somit kann die p87-Untereinheit, entgegen bisheriger Vermutungen, nicht als Gβγ-Komplex-Adapter fungieren. Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Ras-vermittelte Rekrutierung für die Adapterfunktion der p101-Untereinheit substituieren und die Rezeptor-induzierte Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} ermöglichen kann. Infolgedessen war in dem hier verwendeten System eine Rezeptor-induzierte Stimulation der PI3-Kinase γ_{p87} nur durch eine koinzidenten Stimulation durch Gβγ-Komplexe und Ras möglich, während die PI3-Kinase γ_{p101} auch durch die alleinige Interaktion mit jeweils einem der beiden Regulatoren effizient stimulierbar war. Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine differenzierte Regulation der beiden PI3-Kinase γ-Isoformen gezeigt.

Mit Hilfe einer konstitutiv membranständigen p110γ-Untereinheit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Heterodimerisierung mit einer nicht-katalytischen Untereinheit einen stimulierenden Effekt auf die Basalaktivität der p110γ hat. Infolgedessen scheinen die nicht-katalytischen Untereinheiten einen bisher unbekanntem auxiliären Effekt auf die

katalytische Untereinheit zu besitzen. Der Vergleich von Ras- und/oder G $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelter Stimulation der monomeren p110 γ mit den PI3-Kinase γ_{p87} - und PI3-Kinase γ_{p101} -Isoformen lässt darüber hinaus vermuten, dass diese nicht nur auf die basale sondern auch auf die stimulierte Aktivität der PI3-Kinase γ einen auxiliären Effekt besitzen. Möglicherweise üben die nicht-katalytischen Untereinheiten sogar einen regulatorischen Effekt auf die p110 γ -Untereinheit aus.

Die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese zum Regulationsmechanismus der PI3-Kinase γ_{p87} sowie der Nachweis einer unterschiedlichen Regulation der beiden Isoformen, lässt auf der einen Seite die Existenz unterschiedlicher Funktionen der beiden PI3-Kinase γ -Isoformen wahrscheinlich erscheinen, andererseits liefern diese neuen Erkenntnisse möglicherweise die Grundlage für eine gezieltere Isoform-, Rezeptor-, Zeit- oder Gewebe-spezifische Inhibition der PI3-Kinase γ .

7. Literaturverzeichnis

- Ahmadian, M. R., Hoffmann, U., Goody, R. S. & Wittinghofer, A. (1997). Individual rate constants for the interaction of Ras proteins with GTPase-activating proteins determined by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, *36*, 4535-4541.
- al Aoukaty, A., Rolstad, B. & Maghazachi, A. A. (1999). Recruitment of pleckstrin and phosphoinositide 3-kinase γ into the cell membranes, and their association with G $\beta\gamma$ after activation of NK cells with chemokines. *J. Immunol.*, *162*, 3249-3255.
- Ali, K., Bilancio, A., Thomas, M., Pearce, W., Gilfillan, A. M., Tkaczyk, C., Kuehn, N., Gray, A., Giddings, J., Peskett, E., Fox, R., Bruce, I., Walker, C., Sawyer, C., Okkenhaug, K., Finan, P. & Vanhaesebroeck, B. (2004). Essential role for the p110 δ phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. *Nature*, *431*, 1007-1011.
- Amiri, H., Schultz, G. & Schaefer, M. (2003). FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry. *Cell Calcium*, *33*, 463-470.
- Andrews, S., Stephens, L. R. & Hawkins, P. T. (2007a). PI3K class IB pathway. *Sci. STKE.*, *407*, cm2.
- Andrews, S., Stephens, L. R. & Hawkins, P. T. (2007b). PI3K class IB pathway in neutrophils. *Sci. STKE.*, *407*, cm3.
- Anis, Y., Nürnberg, B., Visochek, L., Reiss, N., Naor, Z. & Cohen-Armon, M. (1999). Activation of G $_o$ -proteins by membrane depolarization traced by in situ photoaffinity labeling of G α_o -proteins with [$\alpha^{32}\text{P}$]GTP-azidoanilide. *J. Biol. Chem.*, *274*, 7431-7440.
- Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K. & Juliano, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.*, *50*, 197-263.
- 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., 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.
- Arshavsky, V. Y., Lamb, T. D. & Pugh, E. N., Jr. (2002). G-proteins and phototransduction. *Annu. Rev. Physiol*, *64*, 153-187.
- Arshavsky, V. Y. & Pugh, E. N., Jr. (1998). Lifetime regulation of G-protein-effector complex: emerging importance of RGS proteins. *Neuron*, *20*, 11-14.
- Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D. & Zhang X. F. (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res.*, *56*, 127-155.
- Bachman, K. E., Argani, P., Samuels, Y., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Konishi, H., Karakas, B., Blair, B. G., Lin, C., Peters, B. A., Velculescu, V.E. & Park, B. H. (2004). The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol. Ther.*, *3*, 772-775.

- Baggiolini, M., Dewald, B., Schnyder, J., Ruch, W., Cooper, P. H. & Payne, T. G. (1987). Inhibition of the phagocytosis-induced respiratory burst by the fungal metabolite wortmannin and some analogues. *Exp. Cell Res.*, *169*, 408-418.
- Baier, R., Bondeva, T., Klinger, R., Bondev, A. & Wetzker, R. (1999). Retinoic acid induces selective expression of phosphoinositide 3-kinase γ in myelomonocytic U937 cells. *Cell Growth Differ.*, *10*, 447-456.
- Balla, T., Bondeva, T. & Varnai, P. (2000). How accurately can we image inositol lipids in living cells? *Trends Pharmacol. Sci.*, *21*, 238-241.
- Bar-Sagi, D. (2001). A Ras by any other name. *Mol. Cell Biol.*, *21*, 1441-1443.
- Barbacid, M. (1987). Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.*, *56*, 779-827.
- Barber, M. A., Donald, S., Thelen, S., Anderson, K. E., Thelen, M. & Welch, H. C. (2007). Membrane translocation of P-Rex1 is mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, *282*, 29967-29976.
- Barberis, L. & Hirsch, E. (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase γ to fight inflammation and more. *Thromb. Haemost.*, *99*, 279-285.
- Bastepe, M., Gunes, Y., Perez-Villamil, B., Hunzelman, J., Weinstein, L. S. & Juppner, H. (2002). Receptor-mediated adenylyl cyclase activation through XL $\alpha_{(s)}$, the extra-large variant of the stimulatory G-protein α -subunit. *Mol. Endocrinol.*, *16*, 1912-1919.
- Bazley, L. A. & Gullick, W. J. (2005). The epidermal growth factor receptor family. *Endocr. Relat Cancer*, *12 Suppl 1*, S17-S27.
- Beer S., Reis B., Alferink J., Hirsch E., Pfeffer K., Nürnberg B. & Piekorz R. P. (2008). B-cell development and LPS-induced proliferation requires the presence of the p110 γ and p110 δ catalytic isoforms of PI3-kinase. Eingereicht.
- Bestvater, F., Dallner, C. & Spiess, E. (2005). The C-terminal subunit of artificially truncated human cathepsin B mediates its nuclear targeting and contributes to cell viability. *BMC. Cell Biol.*, *6*, 16.
- Bi, L., Okabe, I., Bernard, D. J. & Nussbaum, R. L. (2002). Early embryonic lethality in mice deficient in the p110 β catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm. Genome*, *13*, 169-172.
- 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 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, *274*, 10963-10968.
- Bivona, T. G. & Philips, M. R. (2003). Ras pathway signaling on endomembranes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, *15*, 136-142.
- Blitzer, R. D. (2005). Teaching resources. Ligand-gated ion channels. *Sci. STKE.*, *2005*, tr12.
- Blume-Jensen, P. & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, *411*, 355-365.
- Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A. & Fagni, L. (2003). The 'magic tail' of G-protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.*, *546*, 65-72.
- Bommakanti, R. K., Vinayak, S. & Simonds, W. F. (2000). Dual regulation of Akt/protein kinase B by heterotrimeric G-protein subunits. *J. Biol. Chem.*, *275*, 38870-38876.

- Bony, C., Roche, S., Shuichi, U., Sasaki, T., Crackower, M. A., Penninger, J., Mano, H. & Puc at, M. (2001). A specific role of phosphatidylinositol 3-kinase γ . A regulation of autonomic Ca^{2+} oscillations in cardiac cells. *J. Cell Biol.*, 152, 717-728.
- Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J. (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature*, 394, 337-343.
- Bos, J. L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.*, 49, 4682-4689.
- Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C. M., Pacold, M. E., Ellson, C. D., Anderson, K. E., Butler, P.J., Lavenir, I., Perisic, O., Hawkins, P.T., Stephens, L. & Williams, R.L. (2001). The crystal structure of the PX domain from p40phox bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol. Cell*, 8, 829-839.
- Brazil, D. P. & Hemmings, B. A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.*, 26, 657-664.
- Brock, C. (2002). Untersuchungen zur Regulation von Klasse I Phosphoinositid 3-Kinasen *in vivo*. *Dissertation im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin*.
- Brock, C., Schaefer, M., Reusch, H. P., Czapalla, C., Michalke, M., Spicher, K., Schultz, G. & Nürnberg, B. (2003). Roles of $G\beta\gamma$ in membrane recruitment and activation of p110 γ /p101 phosphoinositide 3-kinase γ . *J. Cell Biol.*, 160, 89-99.
- Brown, R. A., Domin, J., Arcaro, A., Waterfield, M. D. & Shepherd, P. R. (1999). Insulin activates the α isoform of class II phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 274, 14529-14532.
- Brown, R. A. & Shepherd, P. R. (2001). Growth factor regulation of the novel class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem. Soc. Trans.*, 29, 535-537.
- Brugge, J., Hung, M. C. & Mills, G. B. (2007). A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell*, 12, 104-107.
- Bulenger, S., Marullo, S. & Bouvier, M. (2005). Emerging role of homo- and hetero-dimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol. Sci.*, 26, 131-137.
- Burelout, C., Thibault, N., Levasseur, S., Simard, S., Naccache, P. H. & Bourgoin, S. G. (2004). Prostaglandin E2 inhibits the phospholipase D pathway stimulated by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. Involvement of EP2 receptors and phosphatidylinositol 3-kinase γ . *Mol. Pharmacol.*, 66, 293-301.
- Bymaster, F. P., McKinzie, D. L., Felder, C. C. & Wess, J. (2003). Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochem. Res.*, 28, 437-442.
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R. & Hamm, H. E. (2003). Insights into G-protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.*, 24, 765-781.
- Carpenter, C. L. (2004). Btk-dependent regulation of phosphoinositide synthesis. *Biochem. Soc. Trans.*, 32, 326-329.
- Casey, P. J. (1994). Lipid modifications of G-proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 219-225.

- Casey, P. J., Fong, H. K., Simon, M. I. & Gilman, A. G. (1990). G_z, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties. *J. Biol. Chem.*, *265*, 2383-2390.
- Chalfie, M. (1995). Green fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.*, *62*, 651-656.
- Chiu, V. K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J. B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R. L. 2nd, Cox A. D. & Philips M. R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat. Cell Biol.*, *4*, 343-350.
- Cho, H. & Kehrl, J. H. (2007). Localization of G α_i -proteins in the centrosomes and at the midbody: implication for their role in cell division. *J. Cell Biol.*, *178*, 245-255.
- Chong, H., Vikis, H. G. & Guan, K. L. (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal.*, *15*, 463-469.
- Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (2002). Endocytosis of G-protein-coupled receptors: roles of G-protein-coupled receptor kinases and β -arrestin proteins. *Prog. Neurobiol.*, *66*, 61-79.
- Clapham, D. E. & Neer, E. J. (1997). G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *37*, 167-203.
- Clarke, S. (1992). Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu. Rev. Biochem.*, *61*, 355-386.
- Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A. & Izzo, N. J. Jr. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *95*, 2979-2984.
- Clayton, E., Bardi, G., Bell, S. E., Chantry, D., Downes, C. P., Gray, A., Humphries, L. A., Rawlings, D., Reynolds, H., Vigorito, E. & Turner, M. (2002). A crucial role for the p110 δ subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J. Exp. Med.*, *196*, 753-763.
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E. & Rudy, B. (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *868*, 233-285.
- Cohen, G. B., Ren, R. & Baltimore, D. (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*, *80*, 237-248.
- Cook, L. A., Schey, K. L., Wilcox, M. D., Dingus, J. & Hildebrandt, J. D. (1998). Heterogeneous processing of a G-protein γ subunit at a site critical for protein and membrane interactions. *Biochemistry*, *37*, 12280-12286.
- Costa, T. & Herz, A. (1989). Antagonists with negative intrinsic activity at δ opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *86*, 7321-7325.
- Crabbe, T. (2007). Exploring the potential of PI3K inhibitors for inflammation and cancer. *Biochem. Soc. Trans.*, *35*, 253-256.
- Crackower, M. A., Oudit, G. Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., Sah, R., Cheng, H. Y., Rybin, V. O., Lembo, G., Fratta, L., Oliveira-dos-Santos, A. J., Benovic, J. L., Kahn, C. R., Izumo, S., Steinberg, S. F.,

- Wymann, M. P., Backx, P. H. & Penninger, J. M. (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*, 110, 737-749.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378, 785-789.
- Cully, M., You, H., Levine, A. J. & Mak, T. W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 6, 184-192.
- Czupalla, C. (2002). Isoform-spezifische Funktion und Regulation der Proteinkinase-Aktivität G-Protein-regulierter Phosphatidylinositol-3-Kinasen. *Dissertation an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena*.
- Czupalla, C., Culo, M., Muller, E. C., Brock, C., Reusch, H. P., Spicher, K., Krause, E. & Nürnberg, B. (2003). Identification and characterization of the autophosphorylation sites of Phosphoinositide 3-kinase isoforms β and γ . *J. Biol. Chem.*, 278, 11536-11545.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G-proteins by protein kinase A. *Nature*, 390, 88-91.
- Das, B., Shu, X., Day, G. J., Han, J., Krishna, U. M., Falck, J. R. & Broek, D. (2000). Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J. Biol. Chem.*, 275, 15074-15081.
- Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A. & Ullrich, A. (1997). Signal characteristics of G-protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.*, 16, 7032-7044.
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C. & Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379, 557-560.
- Del Prete, A., Vermi, W., Dander, E., Otero, K., Barberis, L., Luini, W., Bernasconi, S., Sironi, M., Santoro, A., Garlanda, C., Facchetti, F., Wymann, M. P., Vecchi, A., Hirsch, E., Mantovani, A. & Sozzani, S. (2004). Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3K γ -deficient mice. *EMBO J.*, 23, 3505-3515.
- Domin, J., Gaidarov, I., Smith, M. E., Keen, J. H. & Waterfield, M. D. (2000). The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2 α is concentrated in the trans-Golgi network and present in clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.*, 275, 11943-11950.
- Dorsam, R. T. & Gutkind, J. S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 7, 79-94.
- Downes, G. B. & Gautam, N. (1999). The G-protein subunit gene families. *Genomics*, 62, 544-552.
- Downward, J. (1997). Cell cycle: routine role for Ras. *Curr. Biol.*, 7, R258-R260.
- Downward, J. (1998). Lipid-regulated kinases: some common themes at last. *Science*, 279, 673-674.
- Downward, J. (2003). Role of receptor tyrosine kinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways? *Biochem. J.*, 376, e9-10.
- Downward, J. (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 15, 177-182.

- Ebinu, J. O., Bottorff, D. A., Chan, E. Y., Stang, S. L., Dunn, R. J. & Stone, J. C. (1998). RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science*, *280*, 1082-1086.
- Ehrhardt, A., Ehrhardt, G. R., Guo, X. & Schrader, J. W. (2002). Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. *Exp. Hematol.*, *30*, 1089-1106.
- Ehrhardt, C., Marjuki, H., Wolff, T., Nürnberg, B., Planz, O., Pleschka, S. & Ludwig, S. (2006). Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cell Microbiol.*, *8*, 1336-1348.
- Emptage, N. J. (2001). Fluorescent imaging in living systems. *Curr. Opin. Pharmacol.*, *1*, 521-525.
- Engelman, J. A., Luo, J. & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.*, *7*, 606-619.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, *240*, 889-895.
- Exner, T., Jensen, O. N., Mann, M., Kleuss, C. & Nürnberg, B. (1999). Posttranslational modification of G α_{o1} generates G α_{o3} , an abundant G-protein in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *96*, 1327-1332.
- Exton, J. H. (1996). Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G-proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *36*, 481-509.
- Exton, J. H. (1997). Cell signalling through guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G-proteins) and phospholipases. *Eur. J. Biochem.*, *243*, 10-20.
- Falasca, M., Logan, S. K., Lehto, V. P., Baccante, G., Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. (1998). Activation of Phospholipase C γ by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.*, *17*, 414-422.
- Falasca, M. & Maffucci, T. (2007). Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. *Biochem. Soc. Trans.*, *35*, 211-214.
- Fantl, W. J., Johnson, D. E. & Williams, L. T. (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, *62*, 453-481.
- Feng, X. H. & Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *21*, 659-693.
- Filipeanu, C. M., Zhou, F., Lam, M. L., Kerut, K. E., Claycomb, W. C. & Wu, G. (2006). Enhancement of the recycling and activation of β -adrenergic receptor by Rab4 GTPase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, *281*, 11097-11103.
- Flanagan, C. A., Schnieders, E. A., Emerick, A. W., Kunisawa, R., Admon, A. & Thorner, J. (1993). Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science*, *262*, 1444-1448.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physik*, *2*, 55-67.

- Foster, F. M., Traer, C. J., Abraham, S. M. & Fry, M. J. (2003). The phosphoinositide PI 3-kinase family. *J. Cell Sci.*, 116, 3037-3040.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A. & Palczewski, K. (2003). Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature*, 421, 127-128.
- Franke, T. F. & Cantley, L. C. (1997). Apoptosis. A Bad kinase makes good. *Nature*, 390, 116-117.
- Fruman, D. A., Meyers, R. E. & Cantley, L. C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 481-507.
- Fry, M. J., Panayotou, G., Dhand, R., Ruiz-Larrea, F., Gout, I., Nguyen, O., Courtneidge, S. A. & Waterfield, M. D. (1992). Purification and characterization of a phosphatidylinositol 3-kinase complex from bovine brain by using phosphopeptide affinity columns. *Biochem. J.*, 288, 383-393.
- Fu, H. W. & Casey, P. J. (1999). Enzymology and biology of CaaX protein prenylation. *Recent Prog. Horm. Res.*, 54, 315-342.
- Gaidarov, I., Smith, M. E., Domin, J. & Keen, J. H. (2001). The class II Phosphoinositide 3-kinase C2 α is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Mol. Cell*, 7, 443-449.
- Gauld, S. B., Dal Porto, J. M. & Cambier, J. C. (2002). B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science*, 296, 1641-1642.
- Gautam, N., Downes, G. B., Yan, K. & Kisselev, O. (1998). The G-protein $\beta\gamma$ complex. *Cell Signal.*, 10, 447-455.
- Gavi, S., Shumay, E., Wang, H. Y. & Malbon, C. C. (2006). G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol. Metab*, 17, 48-54.
- Geyer, M. & Wittinghofer, A. (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7, 786-792.
- Giehl, K. (2005). Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol. Chem.*, 386, 193-205.
- Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science*, 312, 217-224.
- Giliani, S., Mella, P., Savoldi, G. & Mazzolari, E. (2005). Cytokine-mediated signalling and early defects in lymphoid development. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 5, 519-524.
- Gillooly, D. J., Morrow, I. C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N. J., Gaullier, J. M., Parton, R. G. & Stenmark, H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.*, 19, 4577-4588.
- Gohla, A., Klement, K. & Nürnberg, B. (2007a). The heterotrimeric G-protein G $_{i3}$ regulates hepatic autophagy downstream of the insulin receptor. *Autophagy*, 3, 393-395.

- Gohla, A., Klement, K., Piekorz, R. P., Pexa, K., vom, D. S., Spicher, K., Dreval, V., Häussinger, D., Birnbaumer, L. & Nürnberg, B. (2007b). An obligatory requirement for the heterotrimeric G-protein G₁₃ in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *104*, 3003-3008.
- Gohla, A., Offermanns, S., Wilkie, T. M. & Schultz, G. (1999). Differential involvement of G α_{12} and G α_{13} in receptor-mediated stress fiber formation. *J. Biol. Chem.*, *274*, 17901-17907.
- Gomez-Rodriguez, J., Readinger, J. A., Viorritto, I. C., Mueller, K. L., Houghtling, R. A. & Schwartzberg, P. L. (2007). Tec kinases, actin, and cell adhesion. *Immunol. Rev.*, *218*, 45-64.
- Graham, S. M., Oldham, S. M., Martin, C. B., Drugan, J. K., Zohn, I. E., Campbell, S. & Der, C. J. (1999). TC21 and Ras share indistinguishable transforming and differentiating activities. *Oncogene*, *18*, 2107-2116.
- Graupera, M., Guillermet-Guibert, J., Foukas, L. C., Phng, L. K., Cain, R. J., Salpekar, A., Pearce, W., Meek, S., Millan, J., Cutillas, P. R., Smith, A. J., Ridley, A. J., Ruhrberg, C., Gerhardt, H. & Vanhaesebroeck, B. (2008). Angiogenesis selectively requires the p110 α isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature*, *453*, 662-666.
- Gray, A., Van Der, K. J. & Downes, C. P. (1999). The pleckstrin homology domains of protein kinase B and GRP1 (general receptor for phosphoinositides-1) are sensitive and selective probes for the cellular detection of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and/or phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in vivo. *Biochem. J.*, *344*, 929-936.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, *260*, 3440-3450.
- Guillermet-Guibert, J., Bjorklof, K., Salpekar, A., Gonella, C., Ramadani, F., Bilancio, A., Meek, S., Smith, A. J., Okkenhaug, K. & Vanhaesebroeck, B. (2008). The p110 β isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G-protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Guillou, H., Lecureuil, C., Anderson, K. E., Suire, S., Ferguson, G. J., Ellson, C. D., Gray, A., Divecha, N., Hawkins, P. T. & Stephens, L. R. (2007a). Use of the GRP1 PH domain as a tool to measure the relative levels of PtdIns(3,4,5)P₃ through a protein-lipid overlay approach. *J. Lipid Res.*, *48*, 726-732.
- Guillou, H., Stephens, L. R. & Hawkins, P. T. (2007b). Quantitative measurement of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Methods Enzymol.*, *434*, 117-130.
- Gupta, S., Ramjaun, A. R., Haiko, P., Wang, Y., Warne, P. H., Nicke, B., Nye, E., Stamp, G., Alitalo, K. & Downward, J. (2007). Binding of Ras to phosphoinositide 3-kinase p110 α is required for Ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell*, *129*, 957-968.
- Gutkind, J. S. (1998). The pathways connecting G-protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.*, *273*, 1839-1842.
- 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*, *279*, 558-560.
- Han, S. J., Hamdan, F. F., Kim, S. K., Jacobson, K. A., Brichta, L., Bloodworth, L. M., Li, J. H. & Wess, J. (2005). Pronounced conformational changes following agonist activation of the M₃ muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.*, *280*, 24870-24879.
- Hancock, J. F. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *4*, 373-384.
- Harhammer, R., Nürnberg, B., Harteneck, C., Leopoldt, D., Exner, T. & Schultz, G. (1996). Distinct biochemical properties of the native members of the G₁₂ G-protein subfamily. Characterization of G α_{12} purified from rat brain. *Biochem. J.*, *319*, 165-171.
- Harhammer, R., Nürnberg, B., Spicher, K. & Schultz, G. (1994). Purification of the G-protein G₁₃ from rat brain membranes. *Biochem. J.*, *303*, 135-140.
- Harrison-Findik, D., Susa, M. & Varticovski, L. (1995). Association of Phosphatidylinositol 3-kinase with SHC in chronic myelogenous leukemia cells. *Oncogene*, *10*, 1385-1391.
- Harvey, J. J. (1964). An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature*, *204*, 1104-1105.
- Haslam, R. J., Koide, H. B. & Hemmings, B. A. (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature*, *363*, 309-310.
- Hawkins, P. T., Anderson, K. E., Davidson, K. & Stephens, L. R. (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.*, *34*, 647-662.
- Hayakawa, M., Kaizawa, H., Moritomo, H., Koizumi, T., Ohishi, T., Okada, M., Ohta, M., Tsukamoto, S., Raynaud, F. I., Parker, P., Workman, P. & Waterfield, M. D. (2006). Synthesis and biological evaluation of 4-morpholino-2-phenylquinazolines and related derivatives as novel PI3 kinase p110 α inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, *14*, 6847-6858.
- Heim, R. & Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.*, *6*, 178-182.
- Heldin, C. H. & Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.*, *79*, 1283-1316.
- Herrmann, C. (2003). Ras-effector interactions: after one decade. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, *13*, 122-129.
- Hiles, I. D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M. J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Ruiz-Larrea, F., Thompson, A., Totty, N. F., Justin Hsuan, 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.
- Hill, S. J. (2006). G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br. J. Pharmacol.*, *147 Suppl 1*, S27-S37.
- Hirsch, E., Bosco, O., Tropel, P., Laffargue, M., Calvez, R., Altruda, F., Wymann, M. & Montrucchio, G. (2001). Resistance to thromboembolism in PI3K γ -deficient mice. *FASEB J.*, *15*, 2019-2021.

- Hirsch, E., Costa, C. & Ciruolo, E. (2007). Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J. Endocrinol.*, 194, 243-256.
- 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 γ in inflammation. *Science*, 287, 1049-1053.
- Hirsch, E., Lembo, G., Montrucchio, G., Rommel, C., Costa, C. & Barberis, L. (2006). Signaling through PI3K γ : a common platform for leukocyte, platelet and cardiovascular stress sensing. *Thromb. Haemost.*, 95, 29-35.
- Ho, M. K. & Wong, Y. H. (2001). G_z signaling: emerging divergence from G_i signaling. *Oncogene*, 20, 1615-1625.
- Holgado-Madruga, M., Emllet, D. R., Moscatello, D. K., Godwin, A. K. & Wong, A. J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature*, 379, 560-564.
- Hommers, L. G., Lohse, M. J. & Bunemann, M. (2003). Regulation of the inward rectifying properties of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels by G $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.*, 278, 1037-1043.
- Hooshmand-Rad, R., Hajkova, L., Klint, P., Karlsson, R., Vanhaesebroeck, B., Claesson-Welsh, L. & Heldin, C. H. (2000). The PI 3-kinase isoforms p110 α and p110 β have differential roles in PDGF- and insulin-mediated signaling. *J. Cell Sci.*, 113 Pt 2, 207-214.
- Howes, A. L., Miyamoto, S., Adams, J. W., Woodcock, E. A. & Brown, J. H. (2006). G α_q expression activates EGFR and induces Akt mediated cardiomyocyte survival: dissociation from G α_q mediated hypertrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 40, 597-604.
- Hu, P., Mondino, A., Skolnik, E. Y. & Schlessinger, J. (1993). Cloning of a novel, ubiquitously expressed human 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. *Nat. Struct. Biol.*, 5, 422-426.
- Hunter, T. (1995). When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase. *Cell*, 83, 1-4.
- Huntington, N. D. & Tarlinton, D. M. (2004). CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol. Lett.*, 94, 167-174.
- Ihle, J. N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature*, 377, 591-594.
- Iiri, T., Farfel, Z. & Bourne, H. R. (1998). G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature*, 394, 35-38.
- Irie-Sasaki, J., Sasaki, T. & Penninger, J. M. (2003). CD45 regulated signaling pathways. *Curr. Top. Med. Chem.*, 3, 783-796.
- Ise, K., Nakamura, K., Nakao, K., Shimizu, S., Harada, H., Ichise, T., Miyoshi, J., Gondo, Y., Ishikawa, T., Aiba, A. & Katsuki, M. (2000). Targeted deletion of the H-Ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene*, 19, 2951-2956.

- Jelsema, C. L. & Axelrod, J. (1987). Stimulation of phospholipase A₂ activity in bovine rod outer segments by the $\beta\gamma$ subunits of transducin and its inhibition by the α subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *84*, 3623-3627.
- Jenkins, G. M. & Frohman, M. A. (2005). Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol. Life Sci.*, *62*, 2305-2316.
- Ji, T. H., Grossmann, M. & Ji, I. (1998). G-protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.*, *273*, 17299-17302.
- Jimenez, C., Hernandez, C., Pimentel, B. & Carrera, A. C. (2002). The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *J. Biol. Chem.*, *277*, 41556-41562.
- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R. T., Umanoff, H., Edelmann, W., Kucherlapati, R. & Jacks, T. (1997). K-Ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-Ras. *Genes Dev.*, *11*, 2468-2481.
- Jones, G. E., Prigmore, E., Calvez, R., Hogan, C., Dunn, G. A., Hirsch, E., Wymann, M. P. & Ridley, A. J. (2003). Requirement for PI 3-kinase γ in macrophage migration to MCP-1 and CSF-1. *Exp. Cell Res.*, *290*, 120-131.
- Jones, M. B., Siderovski, D. P. & Hooks, S. B. (2004). The G $\beta\gamma$ dimer as a novel source of selectivity in G-protein Signaling: GGL-ing at convention. *Mol. Interv.*, *4*, 200-214.
- Jones, M. K. & Jackson, J. H. (1998). Ras-GRF activates Ha-Ras, but not N-Ras or K-Ras 4B, protein in vivo. *J. Biol. Chem.*, *273*, 1782-1787.
- Jou, S. T., Carpino, N., Takahashi, Y., Piekorz, R., Chao, J. R., Carpino, N., Wang, D. & Ihle, J. N. (2002). Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110 δ in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol. Cell Biol.*, *22*, 8580-8591.
- Kavanaugh, W. M., Turck, C. W. & Williams, L. T. (1995). PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science*, *268*, 1177-1179.
- Kavran, J. M., Klein, D. E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y. & Lemmon, M. A. (1998). Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.*, *273*, 30497-30508.
- 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.
- Kenakin, T. (2001). Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J.*, *15*, 598-611.
- Kenworthy, A. K. (2001). Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods*, *24*, 289-296.
- Kerchner, K. R., Clay, R. L., McCleery, G., Watson, N., McIntire, W. E., Myung, C. S. & Garrison, J. C. (2004). Differential sensitivity of phosphatidylinositol 3-kinase p110 γ to isoforms of G-protein $\beta\gamma$ dimers. *J. Biol. Chem.*, *279*, 44554-44562.
- Khosravi-Far, R., Campbell, S., Rossman, K. L. & Der, C. J. (1998). Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv. Cancer Res.*, *72*, 57-107.

- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. (2001). Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.*, 2, 330-335.
- Kirsch, C., Wetzker, R. & Klinger, R. (2001). Anionic phospholipids are involved in membrane targeting of PI 3-kinase γ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, 691-696.
- Kirsten, W.H. & Mayer, L.A. (1967). Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 39, 311-355.
- Kisselev, O. G., Meyer, C. K., Heck, M., Ernst, O. P. & Hofmann, K. P. (1999). Signal transfer from rhodopsin to the G-protein: evidence for a two-site sequential fit mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 4898-4903.
- Klarlund, J. K., Rameh, L. E., Cantley, L. C., Buxton, J. M., Holik, J. J., Sakelis, C., Patki, V., Corvera, S. & Czech, M. P. (1998). Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, 273, 1859-1862.
- Klemke, M., Pasolli, H. A., Kehlenbach, R. H., Offermanns, S., Schultz, G. & Huttner, W. B. (2000). Characterization of the extra-large G-protein α -subunit XL α_s . II. Signal transduction properties. *J. Biol. Chem.*, 275, 33633-33640.
- Klippel, A., Escobedo, J. A., Fantl, W. J. & Williams, L. T. (1992). The C-terminal SH2 domain of p85 accounts for the high affinity and specificity of the binding of phosphatidylinositol 3-kinase to phosphorylated platelet-derived growth factor β receptor. *Mol. Cell Biol.*, 12, 1451-1459.
- Klippel, A., Escobedo, J. A., Hu, Q. & Williams, L. T. (1993). A region of the 85-kilodalton (kDa) subunit of phosphatidylinositol 3-kinase binds the 110-kDa catalytic subunit in vivo. *Mol. Cell Biol.*, 13, 5560-5566.
- Knight, Z. A., Chiang, G. G., Alaimo, P. J., Kenski, D. M., Ho, C. B., Coan, K., Abraham, R. T. & Shokat, K. M. (2004). Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors from an arylmorpholine scaffold. *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 4749-4759.
- Knight, Z. A., Gonzalez, B., Feldman, M. E., Zunder, E. R., Goldenberg, D. D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., Balla, A., Toth, B., Balla, T., Weiss, W. A., Williams, R. L. & Shokat, K. M. (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in insulin signaling. *Cell*, 125, 733-747.
- Konrad, S., Ali, S. R., Wiege, K., Syed, S. N., Engling, L., Piekorz, R. P., Hirsch, E., Nürnberg, B., Schmidt, R. E. & Gessner, J. E. (2008). PI3K γ and PI3K δ : Linkers of coordinate C5aR-Fc γ R activation and immune complex-induced inflammation. *J. Biol. Chem.* In Druck.
- Kops, G. J., Medema, R. H., Glassford, J., Essers, M. A., Dijkers, P. F., Coffey, P. J., Lam, E. W. & Burgering, B. M. (2002). Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol. Cell Biol.*, 22, 2025-2036.
- Krasel, C., Vilardaga, J. P., Bunemann, M. & Lohse, M. J. (2004). Kinetics of G-protein-coupled receptor signalling and desensitization. *Biochem. Soc. Trans.*, 32, 1029-1031.
- Kroeze, W. K., Sheffler, D. J. & Roth, B. L. (2003). G-protein-coupled receptors at a glance. *J. Cell Sci.*, 116, 4867-4869.

- Krugmann, S., Cooper, M. A., Williams, D. H., Hawkins, P. T. & Stephens, L. R. (2002). Mechanism of the regulation of type IB phosphoinositide 3-OH-kinase by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Biochem. J.*, *362*, 725-731.
- Krugmann, S., Hawkins, P. T., Pryer, N. & Braselmann, S. (1999). Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110 γ phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.*, *274*, 17152-17158.
- Kucia, M., Reza, R., Miekus, K., Wanzeck, J., Wojakowski, W., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J. & Ratajczak, M. Z. (2005). Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*, *23*, 879-894.
- Kurosu, H., Hazeki, O., Kukimoto, I., Honzawa, S., Shibasaki, M., Nakada, M., Ui, M. & Katada, T. (1995). Radiolabeling of catalytic subunits of PI 3-kinases with 17 β -hydroxy-16 α (-)[125I]iodo-wortmannin: identification of the G $\beta\gamma$ -sensitive isoform as a complex composed of 46-kDa and 100-kDa subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *216*, 655-661.
- 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 β is synergistically activated by the $\beta\gamma$ subunits of G-proteins and phosphotyrosyl peptide. *J. Biol. Chem.*, *272*, 24252-24256.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.
- Lambert, N. A. (2008). Dissociation of heterotrimeric G-proteins in cells. *Sci. Signal.*, *1*, re5.
- Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E. & Sigler, P. B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G-protein. *Nature*, *379*, 311-319.
- Lane, K. T. & Beese, L. S. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J. Lipid Res.*, *47*, 681-699.
- 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.
- Laude, A. J. & Prior, I. A. (2008). Palmitoylation and localisation of Ras isoforms are modulated by the hypervariable linker domain. *J. Cell Sci.*, *121*, 421-427.
- Lawlor, M. A. & Alessi, D. R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.*, *114*, 2903-2910.
- Lee, J. W. & Juliano, R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol. Cells*, *17*, 188-202.
- Leemhuis, J., Boutillier, S., Barth, H., Feuerstein, T. J., Brock, C., Nürnberg, B., Aktories, K. & Meyer, D. K. (2004). Rho GTPases and phosphoinositide 3-kinase organize formation of branched dendrites. *J. Biol. Chem.*, *279*, 585-596.
- Leevers, S. J., Paterson, H. F. & Marshall, C. J. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, *369*, 411-414.

- Lefkowitz, R. J., Cotecchia, S., Samama, P. & Costa, T. (1993). Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol. Sci.*, *14*, 303-307.
- Lei, Q., Jones, M. B., Talley, E. M., Garrison, J. C. & Bayliss, D. A. (2003). Molecular mechanisms mediating inhibition of G-protein-coupled inwardly-rectifying K⁺ channels. *Mol. Cells*, *15*, 1-9.
- Leicht, D. T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M. & Tzivion, G. (2007). Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, *1773*, 1196-1212.
- Lemmon, M. A. (2007). Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem. Soc. Symp.*, 81-93.
- Lemmon, M. A. & Ferguson, K. M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.*, *350*, 1-18.
- Lenz, J. C., Reusch, H. P., Albrecht, N., Schultz, G. & Schaefer, M. (2002). Ca²⁺-controlled competitive diacylglycerol binding of protein kinase C isoenzymes in living cells. *J. Cell Biol.*, *159*, 291-302.
- Leopoldt, D., Hanck, T., Exner, T., Maier, U., Wetzker, R. & Nürnberg, B. (1998). Gβγ stimulates phosphoinositide 3-kinase-γ by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J. Biol. Chem.*, *273*, 7024-7029.
- Leung, T., Chen, H., Stauffer, A. M., Giger, K. E., Sinha, S., Horstick, E. J., Humbert, J. E., Hansen, C. A. & Robishaw, J. D. (2006). Zebrafish G-protein γ₂ is required for VEGF signaling during angiogenesis. *Blood*, *108*, 160-166.
- Leverrier, Y., Okkenhaug, K., Sawyer, C., Bilancio, A., Vanhaesebroeck, B. & Ridley, A. J. (2003). Class I phosphoinositide 3-kinase p110β is required for apoptotic cell and Fcγ receptor-mediated phagocytosis by macrophages. *J. Biol. Chem.*, *278*, 38437-38442.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., Guillaume, J. L. & Jockers, R. (2006). Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep.*, *7*, 1094-1098.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareis, 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-β₂ and -β₃ and PI3Kγ in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*, *287*, 1046-1049.
- Lian, L., Wang, Y., Draznin, J., Eslin, D., Bennett, J. S., Poncz, M., Wu, D. & Abrams, C. S. (2005). The relative role of PLCβ and PI3Kγ in platelet activation. *Blood*, *106*, 110-117.
- Liaw, D., Marsh, D. J., Li, J., Dahia, P. L., Wang, S. I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K. M., Tsou, H. C., Peacocke, M., Eng, C. & Parsons, R. (1997). Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet.*, *16*, 64-67.

- Liebmann, C. & Bohmer, F. D. (2000). Signal transduction pathways of G-protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. *Curr. Med. Chem.*, 7, 911-943.
- Lietzke, S. E., Bose, S., Cronin, T., Klarlund, J., Chawla, A., Czech, M. P. & Lambright, D. G. (2000). Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol. Cell*, 6, 385-394.
- Lin, H. C., Duncan, J. A., Kozasa, T. & Gilman, A. G. (1998). Sequestration of the G-protein $\beta\gamma$ subunit complex inhibits receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 5057-5060.
- Lindmo, K. & Stenmark, H. (2006). Regulation of membrane traffic by Phosphoinositide 3-kinases. *J. Cell Sci.*, 119, 605-614.
- 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^+ channel in heart. *Nature*, 325, 321-326.
- Lowe, D. G., Capon, D. J., Delwart, E., Sakaguchi, A. Y., Naylor, S. L. & Goeddel, D. V. (1987). Structure of the human and murine R-Ras genes, novel genes closely related to Ras proto-oncogenes. *Cell*, 48, 137-146.
- Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D. & Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein Grb2 links receptor tyrosine kinases to Ras signaling. *Cell*, 70, 431-442.
- 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.
- Lowy, D. R. & Willumsen, B. M. (1993). Function and regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 851-891.
- Luo, A. H., Cannon, E. H., Wekesa, K. S., Lyman, R. F., Vandenberg, J. G. & Anholt, R. R. (2002). Impaired olfactory behavior in mice deficient in the α subunit of $G_{(o)}$. *Brain Res.*, 941, 62-71.
- 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. A scaffold for G-protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J. Biol. Chem.*, 272, 4637-4644.
- Ma, L. & Pei, G. (2007). β -arrestin signaling and regulation of transcription. *J. Cell Sci.*, 120, 213-218.
- 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.
- MacDougall, L. K., Domin, J. & Waterfield, M. D. (1995). A family of Phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction. *Curr. Biol.*, 5, 1404-1415.
- 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^{2+} channels. *Circ. Res.*, 89, 692-699.

- 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.
- 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 β and γ . *J. Biol. Chem.*, 274, 29311-29317.
- Malarkey, K., Belham, C. M., Paul, A., Graham, A., McLees, A., Scott, P. H. & Plevin, R. (1995). The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.*, 309, 361-375.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2003). Ras oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 459-465.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F. & Marshall, C. J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.*, 14, 3136-3145.
- Margolskee, R. F. (2002). Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J. Biol. Chem.*, 277, 1-4.
- Mark, M. D. & Herlitze, S. (2000). G-protein mediated gating of inward-rectifier K^+ channels. *Eur. J. Biochem.*, 267, 5830-5836.
- Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B. & Wymann, M. P. (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1784, 159-185.
- Marrari, Y., Crouthamel, M., Irannejad, R. & Wedegaertner, P. B. (2007). Assembly and trafficking of heterotrimeric G-proteins. *Biochemistry*, 46, 7665-7677.
- Marte, B. M., Rodriguez-Viciano, P., Wennstrom, S., Warne, P. H. & Downward, J. (1997). R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Curr. Biol.*, 7, 63-70.
- Martin, N. P., Whalen, E. J., Zamah, M. A., Pierce, K. L. & Lefkowitz, R. J. (2004). PKA-mediated phosphorylation of the β_1 -adrenergic receptor promotes G_s/G_i switching. *Cell Signal.*, 16, 1397-1403.
- Matsuda, M., Paterson, H. F., Rodriguez, R., Fensome, A. C., Ellis, M. V., Swann, K. & Katan, M. (2001). Real time fluorescence imaging of PLC γ translocation and its interaction with the epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.*, 153, 599-612.
- 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.
- Mayeenuddin, L. H., McIntire, W. E. & Garrison, J. C. (2006). Differential sensitivity of P-Rex1 to isoforms of G-protein $\beta\gamma$ dimers. *J. Biol. Chem.*, 281, 1913-1920.
- McGarrigle, D. & Huang, X. Y. (2007). GPCRs signaling directly through Src-family kinases. *Sci. STKE.*, 2007, e35.
- McKenna, N. J. & O'Malley, B. W. (2001). Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 949, 3-5.

- McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J. & Margolskee, R. F. (1992). Gustducin is a taste-cell-specific G-protein closely related to the transducins. *Nature*, *357*, 563-569.
- McWhinney, C. D., Hansen, C. & Robishaw, J. D. (2000). α_1 -adrenergic signaling in a cardiac murine atrial myocyte (HL-1) cell line. *Mol. Cell Biochem.*, *214*, 111-119.
- Meunier, F. A., Osborne, S. L., Hammond, G. R., Cooke, F. T., Parker, P. J., Domin, J. & Schiavo G. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase C2 α is essential for ATP-dependent priming of neurosecretory granule exocytosis. *Mol. Biol. Cell*, *16*, 4841-4851.
- Michaelson, D., Ali, W., Chiu, V. K., Bergo, M., Silletti, J., Wright, L., Young, S. G. & Philips, M. (2005). Postprenylation CAAX processing is required for proper localization of Ras but not Rho GTPases. *Mol. Biol. Cell*, *16*, 1606-1616.
- Milburn, C. C., Deak, M., Kelly, S. M., Price, N. C., Alessi, D. R. & van Aalten, D. M. (2003). Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem. J.*, *375*, 531-538.
- Miller, A. T. & Berg, L. J. (2002). New insights into the regulation and functions of Tec family tyrosine kinases in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, *14*, 331-340.
- Milligan, G. & Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.*, *147 Suppl 1*, S46-S55.
- Mirshahi, T., Jin, T. & Logothetis, D. E. (2003). G $\beta\gamma$ and KACH: old story, new insights. *Sci. STKE.*, *2003*, E32.
- Misra, S. & Hurley, J. H. (1999). Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell*, *97*, 657-666.
- Mitin, N., Rossman, K. L. & Der, C. J. (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr. Biol.*, *15*, R563-R574.
- Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A. & Matsuda M. (2001). Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature*, *411*, 1065-1068.
- Molendijk, A. J. & Irvine, R. F. (1998). Inositide signalling in Chlamydomonas: characterization of a phosphatidylinositol 3-kinase gene. *Plant Mol. Biol.*, *37*, 53-66.
- Moore, C. A., Milano, S. K. & Benovic, J. L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.*, *69*, 451-482.
- Morris, A. J. & Malbon, C. C. (1999). Physiological regulation of G-protein-linked signaling. *Physiol Rev.*, *79*, 1373-1430.
- Munzberg, H. & Myers, M. G., Jr. (2005). Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat. Neurosci.*, *8*, 566-570.
- Murga, C., Fukuhara, S. & Gutkind, J. S. (2000). A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase β in signaling from G-protein-coupled receptors to Akt. *J. Biol. Chem.*, *275*, 12069-12073.
- 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 α and $\beta\gamma$ subunits of

- heterotrimeric G-proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase γ . *J. Biol. Chem.*, 273, 19080-19085.
- 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 γ . *J. Biol. Chem.*, 275, 23636-23641.
- Naga Prasad, S. V., Esposito, G., Mao, L., Koch, W. J. & Rockman, H. A. (2000). G $\beta\gamma$ -dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J. Biol. Chem.*, 275, 4693-4698.
- Naga Prasad, S. V., Jayatilleke, A., Madamanchi, A. & Rockman, H. A. (2005). Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates β -adrenergic receptor endocytosis. *Nat. Cell Biol.*, 7, 785-796.
- 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 c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature*, 375, 554-560.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R. & Smith, T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 371, 297-300.
- Neves, S. R., Ram, P. T. & Iyengar, R. (2002). G-protein pathways. *Science*, 296, 1636-1639.
- New, D. C., Wu, K., Kwok, A. W. & Wong, Y. H. (2007). G-protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis. *FEBS J.*, 274, 6025-6036.
- Nore, B. F., Vargas, L., Mohamed, A. J., Branden, L. J., Backesjo, C. M., Islam, T. C., Mattsson, P. T., Hultenby, K., Christensson, B. & Smith, C. I. (2000). Redistribution of Bruton's tyrosine kinase by activation of Phosphatidylinositol 3-kinase and Rho-family GTPases. *Eur. J. Immunol.*, 30, 145-154.
- Novotny, J. & Svoboda, P. (1998). The long (G α_s -L) and short (G α_s -S) variants of the stimulatory guanine nucleotide-binding protein. Do they behave in an identical way? *J. Mol. Endocrinol.*, 20, 163-173.
- Nürnberg, B (2000). Pertussis toxin as a Pharmacological Tool. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 145; 187-206.
- Nürnberg B. (2004). Classification and functional properties of G-proteins. The nature reviews drug discovery GPCR questionnaire participants. In: The state of GPCR research in 2004. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3, 577-626.
- Nürnberg, B. & Ahnert-Hilger, G. (1996). Potential roles of heterotrimeric G-proteins of the endomembrane system. *FEBS Lett.*, 389, 61-65.
- 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.
- Nürnberg, B & Jeanslos, E (2008). Phospholipid kinases. In: Offermanns S., Rosenthal W. (Hrsg.), *Molekular Pharmakology, an Encyclopedic Reference*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, In Druck.

- Offermanns, S. (2000). Mammalian G-protein function in vivo: new insights through altered gene expression. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.*, 140, 63-133.
- Offermanns, S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 83, 101-130.
- Offermanns, S., Wieland, T., Homann, D., Sandmann, J., Bombien, E., Spicher, K., Schultz, G. & Jakobs, K. H. (1994). Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to G_i-type G-proteins and G_{q/11}. *Mol. Pharmacol.*, 45, 890-898.
- Ohba, Y., Mochizuki, N., Yamashita, S., Chan, A. M., Schrader, J. W., Hattori, S., Nagashima, K. & Matsuda, M. (2000). Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J. Biol. Chem.*, 275, 20020-20026.
- Okkenhaug, K., Ali, K. & Vanhaesebroeck, B. (2007). Antigen receptor signalling: a distinctive role for the p110 δ isoform of PI3K. *Trends Immunol.*, 28, 80-87.
- Okkenhaug, K., Bilancio, A., Farjot, G., Priddle, H., Sancho, S., Peskett, E., Pearce, W., Meek, S. E., Salpekar, A., Waterfield, M. D., Smith, A. J. & Vanhaesebroeck, B. (2002). Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110 δ PI 3-kinase mutant mice. *Science*, 297, 1031-1034.
- Okkenhaug, K. & Vanhaesebroeck, B. (2001). New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 α . *Sci. STKE*, 2001, E1.
- Oldham, W. M. & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G-protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 60-71.
- Oldham, W. M., Van Eps, N., Preininger, A. M., Hubbell, W. L. & Hamm, H. E. (2006). Mechanism of the receptor-catalyzed activation of heterotrimeric G-proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 772-777.
- Omerovic, J., Laude, A. J. & Prior, I. A. (2007). Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol. Life Sci.*, 64, 2575-2589.
- Ono, F., Nakagawa, T., Saito, S., Owada, Y., Sakagami, H., Goto, K., Suzuki, M., Matsuno, S. & Kondo, H. (1998). A novel class II phosphoinositide 3-kinase predominantly expressed in the liver and its enhanced expression during liver regeneration. *J. Biol. Chem.*, 273, 7731-7736.
- Orme, M. H., Alrubaie, S., Bradley, G. L., Walker, C. D. & Leever, S. J. (2006). Input from Ras is required for maximal PI(3)K signalling in Drosophila. *Nat. Cell Biol.*, 8, 1298-1302.
- Oudit, G. Y., Crackower, M. A., Eriksson, U., Sarao, R., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Gidrewicz, D., Rybin, V. O., Wada, T., Steinberg, S. F., Backx, P. H. & Penninger, J. M. (2003). Phosphoinositide 3-kinase γ -deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure. *Circulation*, 108, 2147-2152.
- Oudit, G. Y. & Kassiri, Z. (2007). Role of PI3 kinase γ in excitation-contraction coupling and heart disease. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.*, 7, 295-304.
- Overington, J. P., Al Lazikani, B. & Hopkins, A. L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5, 993-996.

- 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 γ . *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, J. H., Scheerer, P., Hofmann, K. P., Choe, H. W. & Ernst, O. P. (2008). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*, 454, 183-187.
- Parker, M. G. (1993). Steroid and related receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 499-504.
- Pasolli, H. A., Klemke, M., Kehlenbach, R. H., Wang, Y. & Huttner, W. B. (2000). Characterization of the extra-large G-protein α -subunit XL α_s . I. Tissue distribution and subcellular localization. *J. Biol. Chem.*, 275, 33622-33632.
- Passador, L. & Iglewski, W. (1994). ADP-ribosylating toxins. *Methods Enzymol.*, 235, 617-631.
- Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S. D., Silengo, L., Altruda, F., Wetzker, R., Wymann, M. P., Lembo, G. & Hirsch, E. (2004). PI3K γ modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*, 118, 375-387.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature*, 373, 573-580.
- Pawson, T. & Gish, G. D. (1992). SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell*, 71, 359-362.
- Perez, d. C., I, Bivona, T. G., Philips, M. R. & Pellicer, A. (2004). Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol. Cell Biol.*, 24, 3485-3496.
- Peterson, G. L. (1983). Determination of total protein. *Methods Enzymol.*, 91, 95-119.
- Pfeuffer, T. (1977). GTP-binding proteins in membranes and the control of adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.*, 252, 7224-7234.
- Piiper, A. & Zeuzem, S. (2004). Receptor tyrosine kinases are signaling intermediates of G-protein-coupled receptors. *Curr. Pharm. Des.*, 10, 3539-3545.
- Pinho, V., Souza, D. G., Barsante, M. M., Hamer, F. P., De Freitas, M. S., Rossi, A. G. & Teixeira, M. M. (2005). Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 77, 800-810.
- 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 β -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science*, 257, 1264-1267.

Plowman, S. J. & Hancock, J. F. (2005). Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta*, 1746, 274-283.

Pollok, B. A. & Heim, R. (1999). Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol.*, 9, 57-60.

Pomel, V., Klicic, J., Covini, D., Church, D. D., Shaw, J. P., Roulin, K., Burgat-Charvillon, F., Valognes, D., Camps, M., Chabert, C., Gillieron, C., Françon, B., Perrin, D., Leroy, D., Gretener, D., Nichols, A., Vitte, P. A., Carboni, S., Rommel, C., Schwarz, M. K. & Rückle, T. (2006). Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent, and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase γ . *J. Med. Chem.*, 49, 3857-3871.

Porath, J. & Flodin, P. (1959). Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, 183, 1657-1659.

Pouyssegur, J. & Lenormand, P. (2003). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur. J. Biochem.*, 270, 3291-3299.

Prasad, K. V., Janssen, O., Kapeller, R., Raab, M., Cantley, L. C. & Rudd, C. E. (1993a). Src-homology 3 domain of protein kinase p59fyn mediates binding to phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 90, 7366-7370.

Prasad, K. V., Kapeller, R., Janssen, O., Repke, H., Duke-Cohan, J. S., Cantley, L. C. & Rudd, C. E. (1993b). Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and PI 4-kinase binding to the CD4-p56lck complex: the p56lck SH3 domain binds to PI 3-kinase but not PI 4-kinase. *Mol. Cell Biol.*, 13, 7708-7717.

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.

Puri, K. D., Doggett, T. A., Huang, C. Y., Douangpanya, J., Hayflick, J. S., Turner, M., Penninger, J. & Diacovo, T. G. (2005). The role of endothelial PI3K γ activity in neutrophil trafficking. *Blood*, 106, 150-157.

Pyriochou, A. & Papapetropoulos, A. (2005). Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. *Cell Signal.*, 17, 407-413.

Qanbar, R. & Bouvier, M. (2003). Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Ther.*, 97, 1-33.

Quignard, J. F., Mironneau, J., Carricaburu, V., Fournier, B., Babich, A., Nürnberg, B., Mironneau, C. & Macrez, N. (2001). Phosphoinositide 3-kinase γ mediates angiotensin II-induced stimulation of L-type calcium channels in vascular myocytes. *J. Biol. Chem.*, 276, 32545-32551.

Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I. & Kobilka, B. K. (2007). Crystal structure of the human β_2 -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450, 383-387.

Rebecchi, M. J. & Scarlata, S. (1998). Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 27, 503-528.

- Reif, K., Okkenhaug, K., Sasaki, T., Penninger, J. M., Vanhaesebroeck, B. & Cyster, J. G. (2004). Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110 γ and p110 δ , in lymphocyte chemotaxis and homing. *J. Immunol.*, *173*, 2236-2240.
- Repasky, G. A., Chenette, E. J. & Der, C. J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol.*, *14*, 639-647.
- Rey, I., Taylor-Harris, P., van Erp, H. & Hall, A. (1994). R-Ras interacts with RasGAP, neurofibromin and c-Raf but does not regulate cell growth or differentiation. *Oncogene*, *9*, 685-692.
- Rhee, S. G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.*, *70*, 281-312.
- Ribeiro-Neto, F. A., Mattera, R., Hildebrandt, J. D., Codina, J., Field, J. B., Birnbaumer, L. & Sekura RD. (1985). ADP-ribosylation of membrane components by pertussis and cholera toxin. *Methods Enzymol.*, *109*, 566-572.
- Richter, W., Day, P., Agrawal, R., Bruss, M. D., Granier, S., Wang, Y. L., Rasmussen, S. G., Horner, K., Wang, P., Lei, T., Patterson, A. J., Kobilka, B. & Conti, M. (2008). Signaling from β_1 - and β_2 -adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J.*, *27*, 384-393.
- Robinson, M. J. & Cobb, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, *9*, 180-186.
- Robishaw, J. D. & Berlot, C. H. (2004). Translating G-protein subunit diversity into functional specificity. *Curr. Opin. Cell Biol.*, *16*, 206-209.
- Rockman, H. A., Koch, W. J. & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, *415*, 206-212.
- Rodriguez-Viciano, P., Sabatier, C. & McCormick, F. (2004). Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol. Cell Biol.*, *24*, 4943-4954.
- 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.
- Rommel, C., Camps, M. & Ji, H. (2007). PI3K δ and PI3K γ : partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat. Rev. Immunol.*, *7*, 191-201.
- Rubio, I., Rodriguez-Viciano, P., Downward, J. & Wetzker, R. (1997). Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase γ . *Biochem. J.*, *326*, 891-895.
- Ruckle, T., Schwarz, M. K. & Rommel, C. (2006). PI3K γ inhibition: towards an 'aspirin of the 21st century'? *Nat. Rev. Drug Discov.*, *5*, 903-918.
- Rusten, T. E. & Stenmark, H. (2006). Analyzing phosphoinositides and their interacting proteins. *Nat. Methods*, *3*, 251-258.
- Sadhu, C., Masinovsky, B., Dick, K., Sowell, C. G. & Staunton, D. E. (2003). Essential role of phosphoinositide 3-kinase δ in neutrophil directional movement. *J. Immunol.*, *170*, 2647-2654.

- Salom, D., Lodowski, D. T., Stenkamp, R. E., Le, T., I, Golczak, M., Jastrzebska, B., Harris, T., Ballesteros, J. A. & Palczewski, K. (2006). Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *103*, 16123-16128.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold; Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Velculescu, V. E. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, *304*, 554.
- 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. (2000). Function of PI3K γ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*, *287*, 1040-1046.
- Sasaki, T., Sasaki, J., Sakai, T., Takasuga, S. & Suzuki, A. (2007). The physiology of phosphoinositides. *Biol. Pharm. Bull.*, *30*, 1599-1604.
- Scheerer, P., Park, J. H., Hildebrand, P. W., Kim, Y. J., Krauss, N., Choe, H. W., Hofmann, K. P. & Ernst, O. P. (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, *455*, 497-502.
- 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.
- Schulz, R. (2001). The pharmacology of phosducin. *Pharmacol. Res.*, *43*, 1-10.
- Schwartz, T. W. & Hubbell, W. L. (2008). Structural biology: A moving story of receptors. *Nature*, *455*, 473-474.
- Schwindinger, W. F., Betz, K. S., Giger, K. E., Sabol, A., Bronson, S. K. & Robishaw, J. D. (2003). Loss of G γ_7 alters behavior and reduces striatal α_{off} level and cAMP production. *J. Biol. Chem.*, *278*, 6575-6579.
- Schwindinger, W. F., Giger, K. E., Betz, K. S., Stauffer, A. M., Sunderlin, E. M., Sim-Selley, L. J., Selley, D. E., Bronson, S. K. & Robishaw, J. D. (2004). Mice with deficiency of G γ_3 are lean and have seizures. *Mol. Cell Biol.*, *24*, 7758-7768.
- Schwindinger, W. F. & Robishaw, J. D. (2001). Heterotrimeric G-protein $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene*, *20*, 1653-1660.
- Seifert, R. & Wenzel-Seifert, K. (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, *366*, 381-416.
- Self, A. J., Paterson, H. F. & Hall, A. (1993). Different structural organization of Ras and Rho effector domains. *Oncogene*, *8*, 655-661.
- Shekar, S. C., Wu, H., Fu, Z., Yip, S. C., Nagajyothi, Cahill, S. M., Girvin, M. E. & Backer, J. M. (2005). Mechanism of constitutive phosphoinositide 3-kinase activation by oncogenic mutants of the p85 regulatory subunit. *J. Biol. Chem.*, *280*, 27850-27855.

- Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A. & Der, C. J. (2000). Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol.*, *10*, 147-154.
- Shimomura, O. (2006). Discovery of green fluorescent protein. *Methods Biochem. Anal.*, *47*, 1-13.
- 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.
- Siderovski, D. P. & Willard, F. S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein α subunits. *Int.J.Biol.Sci.*, *1*, 51-66.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P. & Gautam, N. (1991). Diversity of G-proteins in signal transduction. *Science*, *252*, 802-808.
- Sly, L. M., Ho, V., Antignano, F., Ruschmann, J., Hamilton, M., Lam, V., Rauh, M. J. & Krystal, G. (2007). The role of SHIP in macrophages. *Front Biosci.*, *12*, 2836-2848.
- Sly, L. M., Rauh, M. J., Kalesnikoff, J., Buchse, T. & Krystal, G. (2003). SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp. Hematol.*, *31*, 1170-1181.
- Smrcka, A. V. (2008). G-protein $\beta\gamma$ subunits: central mediators of G-protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol. Life Sci.*, *65*, 2191-2214.
- Soltoff, S. P. & Cantley, L. C. (1996). p120^{cb1} is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J. Biol. Chem.*, *271*, 563-567.
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E. & Sigler, P. B. (1996). Crystal structure of a G-protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1Å resolution. *Nature*, *379*, 369-374.
- Song, C., Hu, C. D., Masago, M., Kariyai, K., Yamawaki-Kataoka, Y., Shibatohe, M., Wu, D., Satoh, T. & Kataoka, T. (2001). Regulation of a novel human phospholipase C, PLC ϵ , through membrane targeting by Ras. *J. Biol. Chem.*, *276*, 2752-2757.
- Song, G., Ouyang, G. & Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell Mol. Med.*, *9*, 59-71.
- Songyang, Z. & Cantley, L. C. (1995). Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem. Sci.*, *20*, 470-475.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., Neel, B. G., Birge, R. B., Fajardo, J. E., Chou, M. M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B. & Cantley, L. C. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, *72*, 767-778.
- Spicher, K., Kalkbrenner, F., Zobel, A., Harhammer, R., Nürnberg, B., Soling, A., Söling, A. & Schultz, G. (1994). G₁₂ and G₁₃ α -subunits are immunochemically detectable in most membranes of various mammalian cells and tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *198*, 906-914.
- Sprang, S. R. (1997). G-protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.*, *66*, 639-678.

- Stephens, L., Milne, L. & Hawkins, P. (2008). Moving towards a Better Understanding of Chemotaxis. *Curr. Biol.*, 18, R485-R494.
- Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F. T., Jackson, T. R., Sternweis, P. C. & Hawkins, P. T. (1994). A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Cell*, 77, 83-93.
- 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., Jackson, T. R. & Hawkins, P. T. (1993). Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim. Biophys. Acta*, 1179, 27-75.
- Sternweis, P. C. (1986). The purified α subunits of G_o and G_i from bovine brain require $\beta\gamma$ for association with phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.*, 261, 631-637.
- Stokoe, D., Macdonald, S. G., Cadwallader, K., Symons, M. & Hancock, J. F. (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, 264, 1463-1467.
- 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 kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ : structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem. J.*, 324, 489-495.
- Strathmann, M. & Simon, M. I. (1990). G-protein diversity: a distinct class of α subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 9113-9117.
- Strathmann, M. P. & Simon, M. I. (1991). G α_{12} and G α_{13} subunits define a fourth class of G-protein α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, 5582-5586.
- Suire, S., Coadwell, J., Ferguson, G. J., Davidson, K., Hawkins, P. & Stephens, L. (2005). p84, a new G $\beta\gamma$ -activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110 γ . *Curr. Biol.*, 15, 566-570.
- Suire, S., Condliffe, A. M., Ferguson, G. J., Ellson, C. D., Guillou, H., Davidson, K., Welch, H., Coadwell, J., Turner, M., Chilvers, E. R., Hawkins, P. T. & Stephens, L. (2006). G $\beta\gamma$ s and the Ras binding domain of p110 γ are both important regulators of PI(3)K γ signalling in neutrophils. *Nat. Cell Biol.*, 8, 1303-1309.
- Suire, S., Hawkins, P. & Stephens, L. (2002). Activation of phosphoinositide 3-kinase γ by Ras. *Curr. Biol.*, 12, 1068-1075.
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W. & Gilman, A. G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36, 461-480.
- Suzuki, A., Nakano, T., Mak, T. W. & Sasaki, T. (2008). Portrait of PTEN: messages from mutant mice. *Cancer Sci.*, 99, 209-213.

- Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H., & Kozasa, T. (2003). $G\alpha_{12}$ activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *100*, 733-738.
- Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.*, *81*, 153-208.
- Takasaki, J., Saito, T., Taniguchi, M., Kawasaki, T., Moritani, Y., Hayashi, K., & Kobori, M. (2004). A novel $G\alpha_{q/11}$ -selective inhibitor. *J. Biol. Chem.*, *279*, 47438-47445.
- Takesono, A., Finkelstein, L. D., & Schwartzberg, P. L. (2002). Beyond calcium: new signaling pathways for Tec family kinases. *J. Cell Sci.*, *115*, 3039-3048.
- ten Dijke, P. & Hill, C. S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.*, *29*, 265-273.
- Tesmer, V. M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T. & Tesmer, J. J. (2005). Snapshot of activated G-proteins at the membrane: the $G\alpha_q$ -GRK2- $G\beta\gamma$ complex. *Science*, *310*, 1686-1690.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, *24*, 145-149.
- Trusov, Y., Rookes, J. E., Tilbrook, K., Chakravorty, D., Mason, M. G., Anderson, D., Chen, J. G., Jones, A. M. & Botella, J. R. (2007). Heterotrimeric G-protein γ subunits provide functional selectivity in $G\beta\gamma$ dimer signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, *19*, 1235-1250.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, *67*, 509-544.
- Tsien, R. Y. & Miyawaki, A. (1998). Seeing the machinery of live cells. *Science*, *280*, 1954-1955.
- 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 α . *J. Biol. Chem.*, *273*, 25987-25995.
- Ueda, H., Nagae, R., Kozawa, M., Morishita, R., Kimura, S., Nagase, T., Ohara, O., Yoshida, S. & Asano, T. (2008). Heterotrimeric G-protein $\beta\gamma$ subunits stimulate FLJ00018, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J. Biol. Chem.*, *283*, 1946-1953.
- Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, *61*, 203-212.
- Umanoff, H., Edelman, W., Pellicer, A. & Kucherlapati, R. (1995). The murine N-Ras gene is not essential for growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *92*, 1709-1713.
- van Biesen, T., Hawes, B. E., Luttrell, D. K., Krueger, K. M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (1995). Receptor-tyrosine-kinase- and $G\beta\gamma$ -mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature*, *376*, 781-784.

- van der, G. P. & Pawson, T. (1995). The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem. Sci.*, 20, 277-280.
- Van Eps, N., Oldham, W. M., Hamm, H. E. & Hubbell, W. L. (2006). Structural and dynamical changes in an α -subunit of a heterotrimeric G-protein along the activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 16194-16199.
- van Roessel, P. & Brand, A. H. (2002). Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nat. Cell Biol.*, 4, E15-E20.
- Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B. & Foukas, L. C. (2005). Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem. Sci.*, 30, 194-204.
- Vanhaesebroeck, B., Jones, G. E., Allen, W. E., Zicha, D., Hooshmand-Rad, R., Sawyer, C., Wells, C., Waterfield, M. D. & Ridley, A. J. (1999). Distinct PI3Ks mediate mitogenic signalling and cell migration in macrophages. *Nat. Cell Biol.*, 1, 69-71.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J. & Waterfield, M. D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 535-602.
- 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 δ , a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 4330-4335.
- Varnai, P., Rother, K. I. & Balla, T. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 10983-10989.
- Vecchione, C., Patrucco, E., Marino, G., Barberis, L., Poulet, R., Aretini, A., Maffei, A., Gentile, M. T., Storto, M., Azzolino, O., Brancaccio, M., Colussi, G. L., Bettarini, U., Altruda, F., Silengo, L., Tarone, G., Wymann, M. P., Hirsch, E. & Lembo, G. (2005). Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3K γ . *J. Exp. Med.*, 201, 1217-1228.
- Viard, P., Exner, T., Maier, U., Mironneau, J., Nürnberg, B. & Macrez, N. (1999). G $\beta\gamma$ dimers stimulate vascular L-type Ca²⁺ channels via phosphoinositide 3-kinase. *FASEB J.*, 13, 685-694.
- Vignali, S., Leiss, V., Karl, R., Hofmann, F. & Welling, A. (2006). Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells. *J. Physiol.*, 572, 691-706.
- Violin, J. D. & Lefkowitz, R. J. (2007). β -arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 28, 416-422.
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. & Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.*, 269, 5241-5248.
- Vogel, L. B. & Fujita, D. J. (1993). The SH3 domain of p56lck is involved in binding to phosphatidylinositol 3'-kinase from T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.*, 13, 7408-7417.
- Voice, J. K., Klemke, R. L., Le, A. & Jackson, J. H. (1999). Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J. Biol. Chem.*, 274, 17164-17170.

- Voigt, P., Brock, C., Nürnberg, B. & Schaefer, M. (2005). Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase γ . *J. Biol. Chem.*, *280*, 5121-5127.
- Voigt, P., Dorner, M. B. & Schaefer, M. (2006). Characterization of p87^{PIKAP}, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase γ that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J. Biol. Chem.*, *281*, 9977-9986.
- Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., MacDougall, 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.
- Walker, E. H., Pacold, M. E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P. T., Wymann, M. P. & Williams, R. L. (2000). Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol. Cell*, *6*, 909-919.
- 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.
- Wang, S. & Hazelrigg, T. (1994). Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature*, *369*, 400-403.
- Welch, H. C., Coadwell, W. J., Ellson, C. D., Ferguson, G. J., Andrews, S. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P. T. & Stephens, L. R. (2002). P-Rex1, a PtdIns (3,4,5)P₃- and G $\beta\gamma$ -regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*, *108*, 809-821.
- Welch, H. C., Coadwell, W. J., Stephens, L. R. & Hawkins, P. T. (2003). Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett.*, *546*, 93-97.
- Wellbrock, C., Karasarides, M. & Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *5*, 875-885.
- Wennerberg, K. & Der, C. J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell Sci.*, *117*, 1301-1312.
- Wess, J. (1996). Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit. Rev. Neurobiol.*, *10*, 69-99.
- Wettschureck, N. & Offermanns, S. (2005). Mammalian G-proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.*, *85*, 1159-1204.
- White, S. M., Constantin, P. E. & Claycomb, W. C. (2004). Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, *286*, H823-H829.
- Wolfman, A. (2001). Ras isoform-specific signaling: location, location, location. *Sci. STKE.*, *2001*, E2.
- Wong, Y. H., Conklin, B. R. & Bourne, H. R. (1992). G_z-mediated hormonal inhibition of cyclic AMP accumulation. *Science*, *255*, 339-342.
- Woodgett, J. R. (2001). Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci. STKE.*, *2001*, RE12.

- Woscholski, R. & Parker, P. J. (1997). Inositol lipid 5-phosphatases--traffic signals and signal traffic. *Trends Biochem. Sci.*, *22*, 427-431.
- Wreggett, K. A. (1986). Bacterial toxins and the role of ADP-ribosylation. *J. Recept. Res.*, *6*, 95-126.
- Wright, L. P. & Philips, M. R. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J. Lipid Res.*, *47*, 883-891.
- 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.
- Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A. & Hancock, J. F. (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, *273*, 24052-24056.
- Yano, H., Nakanishi, S., Kimura, K., Hanai, N., Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y. & Matsuda, Y. (1993). Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.*, *268*, 25846-25856.
- Yarfitz, S. & Hurley, J. B. (1994). Transduction mechanisms of vertebrate and invertebrate photoreceptors. *J. Biol. Chem.*, *269*, 14329-14332.
- Yu, H., Chen, J. K., Feng, S., Dalgarno, D. C., Brauer, A. W. & Schreiber, S. L. (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell*, *76*, 933-945.
- Yu, J., Wjasow, C. & Backer, J. M. (1998a). Regulation of the p85/p110 α 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 α catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol. Cell Biol.*, *18*, 1379-1387.
- Zamah, A. M., Delahunty, M., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (2002). Protein kinase A-mediated phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor regulates its coupling to G_s and G_i. Demonstration in a reconstituted system. *J. Biol. Chem.*, *277*, 31249-31256.
- Zebedin, E., Simma, O., Schuster, C., Putz, E. M., Fajmann, S., Warsch, W., Eckelhart, E., Stoiber, D., Weisz, E., Schmid, J. A., Pickl, W. F., Baumgartner, C., Valent, P., Piekorz, R. P., Freissmuth, M. & Sexl, V. (2008). Leukemic challenge unmasks a requirement for PI3K δ in NK-cell-mediated tumor surveillance. *Blood*.
- Zeng, X., Overmeyer, J. H. & Maltese, W. A. (2006). Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J. Cell Sci.*, *119*, 259-270.

8. Anhang:

8.1 Systemvalidierung

8.1.1 Charakterisierung der HEK293-Zelllinie

Um Veränderungen durch zu hohe Passagezahlen der verwendeten HEK293-Zelllinien auszuschließen, wurden neue HEK293-Zellen von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) verwendet. Die Zellen wurden zunächst expandiert und in frühen Passagen in flüssigem N₂ eingelagert. Um die Reproduzierbarkeit der erhaltenden Ergebnisse zu gewährleisten, wurden spätestens nach Erreichen der Passage 20 der Erhaltungskultur neue Zellen aus der N₂-Lagerung aufgetaut.

Die Methodik zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen in lebenden Zellen wurde 1994 durch die heterologe Expression von Fusionsproteinen mit dem grün fluoreszierenden Protein (*green fluorescent protein*, GFP) der Qualle *Aequorea Victoria* (bzw. andersfarbigen Varianten hiervon) revolutioniert (Wang & Hazelrigg, 1994; Chalfie, 1995; Tsien & Miyawaki, 1998; Giepmans et al., 2006; Shimomura, 2006).

Da unsere Arbeitsgruppe von Berlin nach Düsseldorf umgezogen war, wurde zunächst das Imaging-Labor neu etabliert und Schlüsselexperimente (Brock et al., 2003) unserer Arbeitsgruppe wiederholt. Die Lokalisation der solitär exprimierten p101-Untereinheit, der monomeren p110 γ -Untereinheit und der heterodimeren PI3-Kinase γ_{p101} war übereinstimmend (s. Abb. Anhang 8.1; Brock et al., 2003). Auch die Überprüfung eines möglichen Einflusses von G $\beta\gamma$ -Komplexen auf die Lokalisation der p101-Untereinheit zeigte die Interaktion der beiden Proteine anhand einer Umverteilung der p101-Untereinheit an die Plasmamembran. Die Untersuchung der PI3-Kinase γ in Gegenwart koexprimierter G $\beta\gamma$ -Komplexe zeigte jedoch ein abweichendes Ergebnis. In den HEK293-„alt“-Zellen ergab sich eine membranäre Lokalisation der heterodimeren PI3-Kinase γ in der Gegenwart von G $\beta\gamma$ -Komplexen, die in den HEK293-„DSMZ“-Zellen jedoch nicht beobachtet werden konnte (s. Abb. Anhang 8.1). Die in HEK293-„alt“-Zellen gefundene Abrundung der Zellen, welche auf eine erhöhte Aktivität der PI3-Kinase γ hindeutet, blieb in diesen Zellen ebenfalls aus (s. Abb. Anhang 8.1). Es wird somit deutlich, dass die Interaktion der monomeren p101-Untereinheit mit G $\beta\gamma$ -Komplexen wesentlich stärker ist, als die der heterodimeren PI3-Kinase γ_{p101} (erstmalig bei Brock et al., 2003 aufgefallen). Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die Heterodimere Kinase eine veränderte G $\beta\gamma$ -Komplex-Bindungsstelle aufweist. Möglicherweise ist diese reduzierte Interaktion nötig, um eine zeitnahe Abschaltung der Kinaseaktivität zu ermöglichen.

Neben einer erhöhten Akkumulation der heterodimeren PI3-Kinase γ an der Plasmamembran, war in den HEK293-„alt“-Zellen auch eine Membranakkumulation des PIP₃-Sensors nach Serumentzug bereits unter Ruhebedingungen auffällig (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen auf eine veränderte Signaltransduktion in den HEK293-„alt“-Zellen schließen, wodurch diese Zellen für weitere Untersuchungen ungeeignet sind.

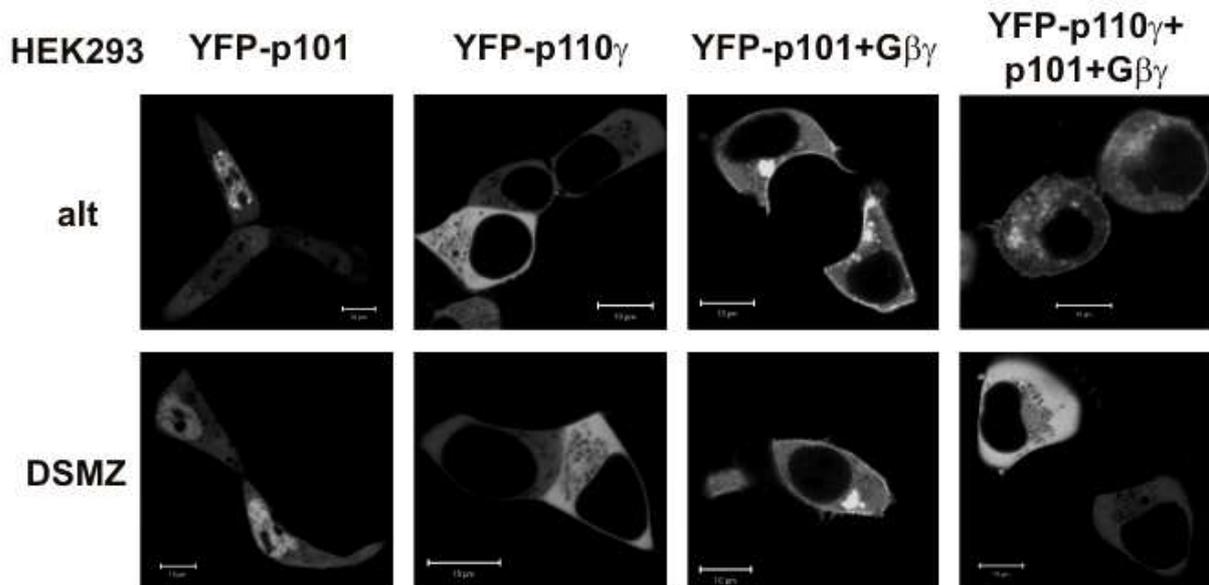


Abb. Anhang 8.1: Subzelluläre Lokalisation von PI3-Kinase-Untereinheiten. Vergleich der Lokalisation von überexprimierten YFP-markierten PI3-Kinase-Untereinheiten in HEK293-„alt“- und „DSMZ“-Zellen. Die Lokalisation von p101 (nukleär und zytosolisch) und p110 γ (zytosolisch) ist in beiden Zelllinien identisch. Die Akkumulation der p101 an der Plasmamembran in Gegenwart von G $\beta\gamma$ -Komplexen ist ebenfalls vergleichbar. Die membranäre Lokalisation der p110 γ in Gegenwart von p101 und G $\beta\gamma$ -Komplexen ist hingegen nur in den HEK293-„alt“-Zellen zu beobachten, während das YFP-p110 γ /p101-Heterodimer in den HEK293-„DSMZ“-Zellen stets unverändert zytosolisch lokalisiert ist.

Im weiteren Verlauf wurde die bereits in HEK293-„alt“-Zellen nachgewiesene Heterodimerisierung und Funktionsfähigkeit der überexprimierten PI3-Kinase γ (Brock et al., 2003) auch in der neuen HEK293-„DSMZ“-Zelllinie mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie überprüft. Dazu wurden in den HEK293-„DSMZ“-Zellen YFP-markierte und unmarkierte PI3-Kinase-Untereinheiten in den in Abb. Anhang 8.2 indizierten Kombinationen miteinander koexprimiert und anschließend die Zytosole einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Die Elutionsprofile der koexprimierten PI3-Kinase γ -Untereinheiten wurden miteinander, sowie mit dem Profil einer monomer exprimierten p110 γ -Untereinheit verglichen. Bei der gewählten Einstellung des Chromatographie-Systems lag das Elutionsmaximum des p110 γ -Monomers bei Fraktion 25 (s. Abb. Anhang 8.2). Im Vergleich hierzu war das Elutionsprofil der mit der p101 koexprimierten p110 γ vollständig zu früheren Fraktionen mit einem Elutionsmaximum bei Fraktion 22 verschoben (s. Abb. Anhang 8.2). Der Vergleich der beiden Elutionsprofile zeigt also, dass die beiden koexprimierten PI3-Kinase γ -Untereinheiten praktisch vollständig als p110 γ /p101-Heterodimer vorlagen.

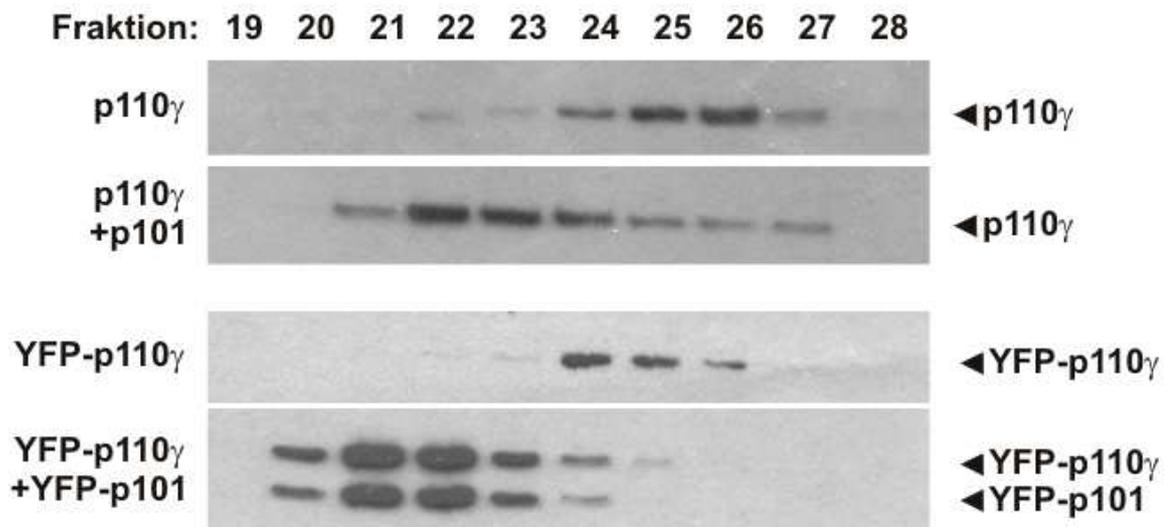


Abb. Anhang 8.2: Größenausschlußchromatographische Analyse der p110 γ /p101-Heterodimerisierung. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für YFP-markierte und/oder unmarkierte p110 γ - und p101-Untereinheiten kotransfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche ausschließlich mit YFP-markierter bzw. unmarkierter p110 γ transfiziert wurden. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zytosole der Zellen präpariert und auf eine Superdex-200 Säule geladen. Zum Vergleich der Elutionsprofile wurden Aliquots der eluierten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Immunoblot untersucht: Die Proteine wurden entweder mit dem anti-p110 γ oder dem anti-GFP-Antikörper detektiert. Je größer das Molekulargewicht eines Proteins ist, desto eher eluierte dieses bei der Größenausschlußchromatographie. Aufgrund dessen wird im direkten Vergleich zur monomeren p110 γ die Elution der p110 γ im Komplex mit p101 zu früheren Fraktionen hin verschoben.

Die Funktionsfähigkeit des PI3-Kinase-Heterodimers nach Expression in den HEK293-„DSMZ“-Zellen wurde weiterhin nach Immunpräzipitation in einem rekonstituierten *in vitro* Lipidvesikel-System unter Verwendung von rekombinanten, gereinigten G β γ -Komplexen getestet (s. Abb. Anhang 8.3; Maier et al., 1999; Czupalla et al., 2003). Dabei wurden die Präzipitate mit PtdIns-4,5-P₂-haltigen Lipidvesikeln und radioaktiv markiertem [γ -³²P]ATP sowie ggfs. seinem Stimulus (G β γ -Komplexe) inkubiert und anschließend das gebildete radioaktive PtdIns-3,4,5-P₃ mittels Dünnschicht-Chromatographie und Autoradiographie nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente gereinigte, heterodimere PI3-Kinase γ . Die Immunoblot-Analyse ergab eine gleichmäßige Beladung der Versuchsansätze mit p110 γ aus gereinigter, heterodimerer PI3-Kinase γ und präzipitierter p110 γ , bzw. p110 γ /p101 (s. Abb. Anhang 8.3 A und B, oben). Im Autoradiogramm der Dünnschicht-Chromatographie wird deutlich, dass solitäre p101 erwartungsgemäß keinerlei Aktivität aufweist, während die monomere p110 γ eine sehr schwache, G β γ -Komplex-abhängige Aktivität zeigt (s. Abb. Anhang 8.3 A und B). Die Präzipitate der heterodimeren PI3-Kinase γ weisen dagegen bereits eine basale Lipidkinase-Aktivität auf, welche G β γ -Komplex-abhängig signifikant stimuliert werden kann (s. Abb. Anhang 8.3 A und B, unten). Dieser Befund stimmte mit dem Resultat der Positivkontrolle überein. Somit konnte die G β γ -Komplex-induzierte enzymatische Aktivität der überexprimierten heterodimeren PI3-Kinase γ in diesen Zellen belegt werden.

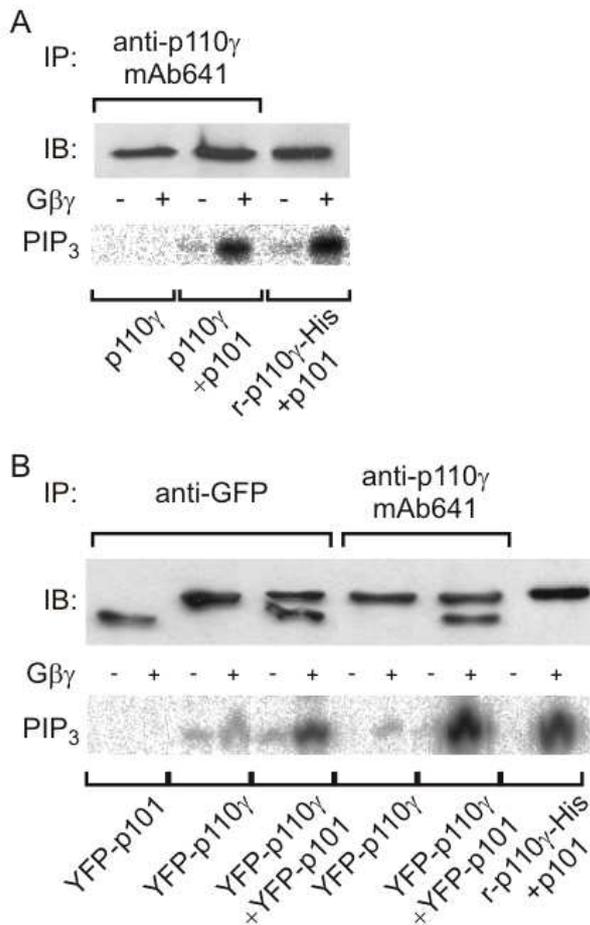


Abb. Anhang 8.3: Immunpräzipitation überexprimierter PI3-Kinase-Untereinheiten und anschließende *in vitro*-Aktivitätsbestimmung. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für eine YFP-markierte und unmarkierte p110 γ - und p101-Untereinheiten kotransfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die entweder YFP-markierte bzw. unmarkierte p101 oder p110 γ überexprimieren. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zytosole der Zellen präpariert und die überexprimierten Proteine mit Hilfe des anti-p110 γ mAb641 oder eines anti-GFP Antikörpers immunpräzipitiert (IP). Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse mit Hilfe eines zweiten anti-p110 γ -Antikörpers überprüft. Zur Bestimmung der präzipitierten PI3-Kinase-Aktivität wurde die Bildung von ³²P-PtdIns-3,4,5-P₃ nach Inkubation mit 200 nM gereinigten G $\beta\gamma$ -Komplexen dünn-schicht-chromatographisch bestimmt (15 min, 37 °C). (A) Zeigt die Analyse unmarkierter und (B) die Analyse YFP-markierter Proteine.

Zusätzlich sollte mit Hilfe der PH-Domänen-Translokation auch die Aktivierbarkeit der PI3-Kinase γ durch GPCRs in den HEK293-„DSMZ“-Zellen getestet werden (s. Abb. Anhang 8.4; Brock et al., 2003). Bereits vor Zugabe von fMLP war eine schwache basale Membranassoziation der überwiegend zytosolisch lokalisierten PH-Domäne auffallend. Die Zugabe von fMLP führte zu einer deutlichen Rekrutierung der GFP-Grp1_{PH} aus dem Zytosol an die Membran (s. Abb. Anhang 8.4, links). Erwartungsgemäß konnte sowohl die basale, als auch die fMLP-induzierte Translokation des PIP₃-Sensors mit Hilfe von Pertussistoxin (PTX) inhibiert werden (s. Abb. Anhang 8.4, rechts). Diese Befunde bestätigen die Rezeptor-induzierte G γ -Protein-vermittelte Aktivierbarkeit der rekombinanten PI3-Kinase γ in HEK293-„DSMZ“-Zellen.

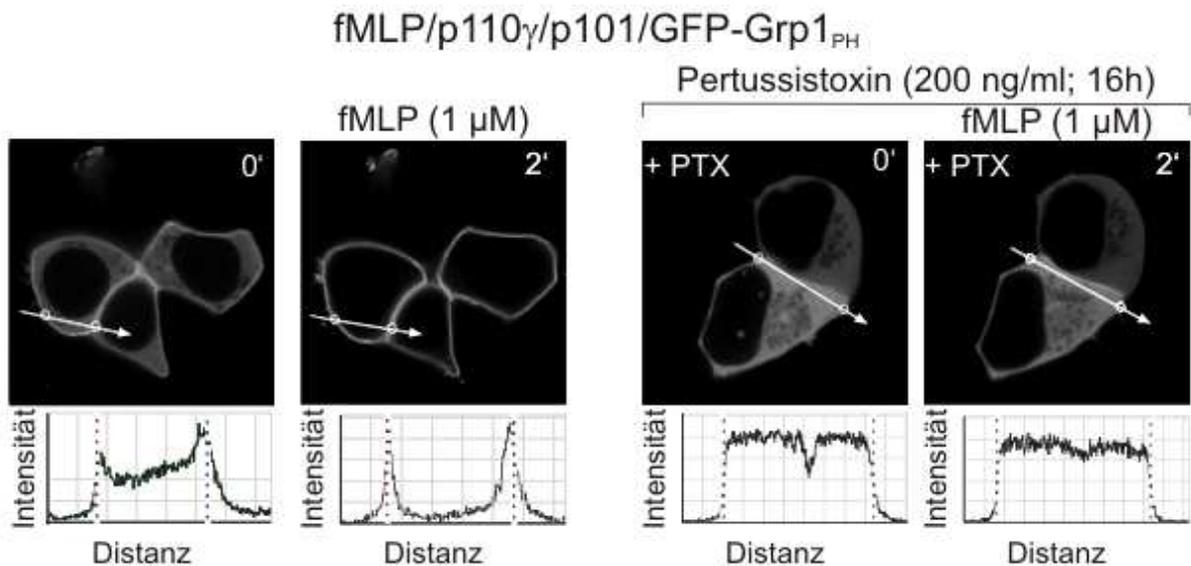


Abb. Anhang 8.4: G_i-Protein-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase γ nach fMLP-Stimulation als Membrantranslokation der GFP-markierten PtdIns-3,4,5-P₃-sensitiven PH-Domäne von Grp1 (GFP-Grp1_{PH}). HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für den G_i-Protein-gekoppelten fMLP-Rezeptor, p110 γ , p101 und GFP-Grp1_{PH} kotransfiziert. Die Gabe des Agonisten (1 μ M fMLP, 2 min) führte zu einer Aktivierung der PI3-Kinase γ (links). Die Darstellung auf der rechten Seite zeigt Zellen, welche zusätzlich mit Pertussis toxin (PTX) vorbehandelt wurden (200 ng/ml, über Nacht). Die Vorbehandlung mit PTX unterdrückt sowohl die basale, als auch die Agonist-induzierte Membrantranslokation der GFP-Grp1_{PH} Domäne. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

8.1.2 Charakterisierung der p87-Konstrukte

Zur Analyse einer zweiten p110 γ -assoziierten PI3-Kinase γ -Untereinheit, der p84 oder p87^{PIKAP} (Suire et al., 2005; Voigt et al., 2006) wurde die p87-cDNA amplifiziert, in einen für die Expression in Säugerzellen geeigneten Vektor umklontiert und das Expressionsprodukt auf Lokalisation, Interaktion mit der p110 γ und Aktivität der PI3-Kinase γ _{p87} untersucht.

In der Literatur wird die zelluläre Distribution der p87 als zytosolisch beschrieben (Voigt et al., 2006). Die Untersuchung unserer N- und C-terminal YFP-markierten p87-Konstrukte ergab ebenfalls eine zytosolische Lokalisation (s. Abb. Anhang 8.5 A). Auch die Koexpression der gleichfalls zytosolisch vorkommenden p110 γ resultierte erwartungsgemäß in einer unveränderten Lokalisation der p87. Die Dimerisierung im Fall der PI3-Kinase γ _{p101} konnte im zellulären System eindeutig anhand einer veränderten Lokalisation der p101, von prädominant nukleär zu zytosolisch, nachgewiesen werden. Da sowohl die p110 γ , als auch die p87 im Zytosol lokalisieren, konnte diese Auswertung nicht zur Prüfung einer Dimerisierung der beiden PI3-Kinase γ -Untereinheiten herangezogen werden. Aus diesem Grund wurde hier eine artifiziell an Membranen verankerte p110 γ -CAAX verwendet, um eine mögliche Redistribution der p87 nach Dimerisierung mit der p110 γ analysieren zu können.

Tatsächlich führte die Koexpression von p110 γ -CAAX mit den nicht-katalytischen Untereinheiten p101 und p87 zu einer Akkumulation beider Proteine an der Plasmamembran

(s. Abb. Anhang 8.6 A). Weiterhin konnte nach Koexpression einer YFP-markierten, nicht-katalytischen Untereinheit und einer CFP-fusionierten p110 γ -CAAX die Kolokalisation der beiden Proteine gezeigt werden (s. Abb. Anhang 8.5 B). Diese Kolokalisation ist anhand der Grünfärbung in der Überlagerung beider Kanäle (merge) erkennbar und liefert einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Heterodimerisierung von p110 γ und p87. Des Weiteren wurde die Interaktion der p110 γ und der p87-Untereinheit durch eine FRET-Analyse bestätigt, bei der die FRET-Effizienz des p110 γ /p87-Heterodimers in etwa der des p110 γ /p101-Heterodimers entsprach (s. Abb. Anhang 8.6; Brock et al., 2003; Voigt et al., 2006).

Die abschließende Analyse zur Funktionsfähigkeit der PI3-Kinase γ_{p87} ergab, dass p110 γ sowohl mit unmarkierter, als auch mit YFP-markierter p87 in lebenden HEK293-Zellen ein stimulierbares Heterodimer bildet (s. Abb. Anhang 8.7). Die Aktivität der PI3-Kinase γ_{p87} ist dabei in Übereinstimmung mit initialen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen schwächer als die der PI3-Kinase γ_{p101} (vgl. Abb. Anhang 8.4 und Abb. Anhang 8.7; Suire et al., 2005; Voigt et al., 2006).

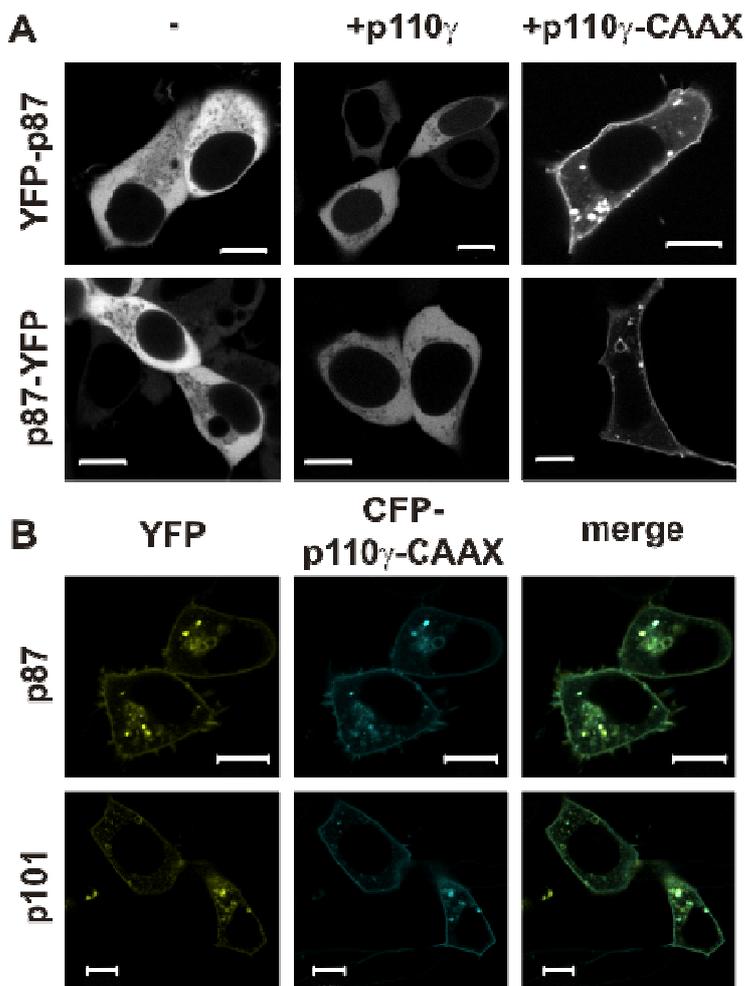


Abb. Anhang 8.5: Subzelluläre Lokalisation der p87-Untereinheit. (A) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für N- oder C-terminal YFP-markierte p87 in An- oder Abwesenheit von p110 γ oder p110 γ -CAAX transfiziert. Die subzelluläre Verteilung der YFP-Fusionsproteine wurde anschließend konfokalmikroskopisch analysiert. Die zytosolische Lokalisation der p87 wird durch Koexpression von ebenfalls zytosolisch vorkommender p110 γ nicht verändert. Die Kotransfektion von p110 γ -CAAX und p87 führt hingegen zu einer Akkumulation der p87 an p110 γ -CAAX-haltigen membranären Strukturen. (B) Koexpression von YFP-p87 oder -p101 mit CFP-markierter p110 γ -CAAX in HEK293-Zellen. Im Mergebild ist die Kolokalisation anhand der grünen Färbung erkennbar. Weiße Balken = 10 μ m.

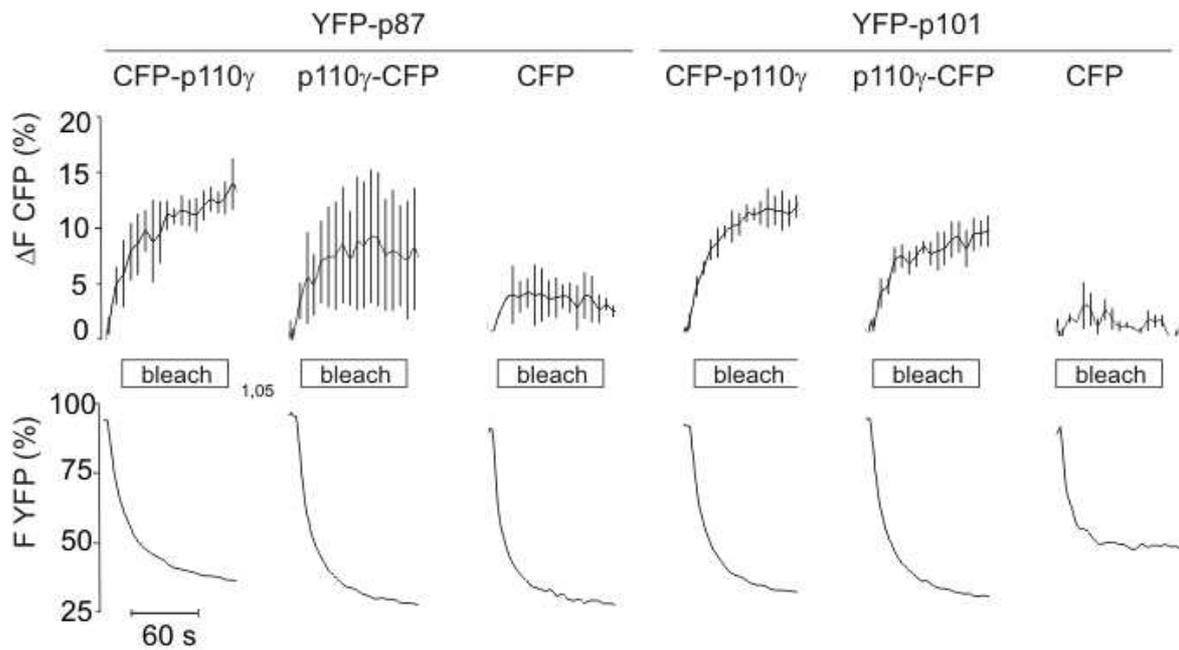


Abb. Anhang 8.6: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen Fluoreszenz-markierten PI3-Kinase γ -Untereinheiten. HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden für N-terminal YFP-markierte p87 oder p101 und N- oder C-terminal CFP-markierte p110 γ kotransfiziert. Der FRET zwischen den beiden Fluorophoren wurde einen Tag nach Transfektion mittels „*Acceptor photobleach*“ bestimmt: Das Akzeptor-Fluorophor (YFP) wurde hierzu durch Ausbleichen zerstört, wodurch FRET unterbunden und die Gesamtfluoreszenz des Donor-Fluorophors (CFP) messbar wird. Die Zunahme der Donor-Fluoreszenz durch völliges Ausbleichen des Akzeptors ist proportional zur FRET-Effizienz. Dargestellt sind die CFP- (oben) und die YFP-Fluoreszenz (unten) während des Ausbleichens von YFP ("YFP bleach"). Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) von acht analysierten Zellen aus unabhängigen Experimenten.

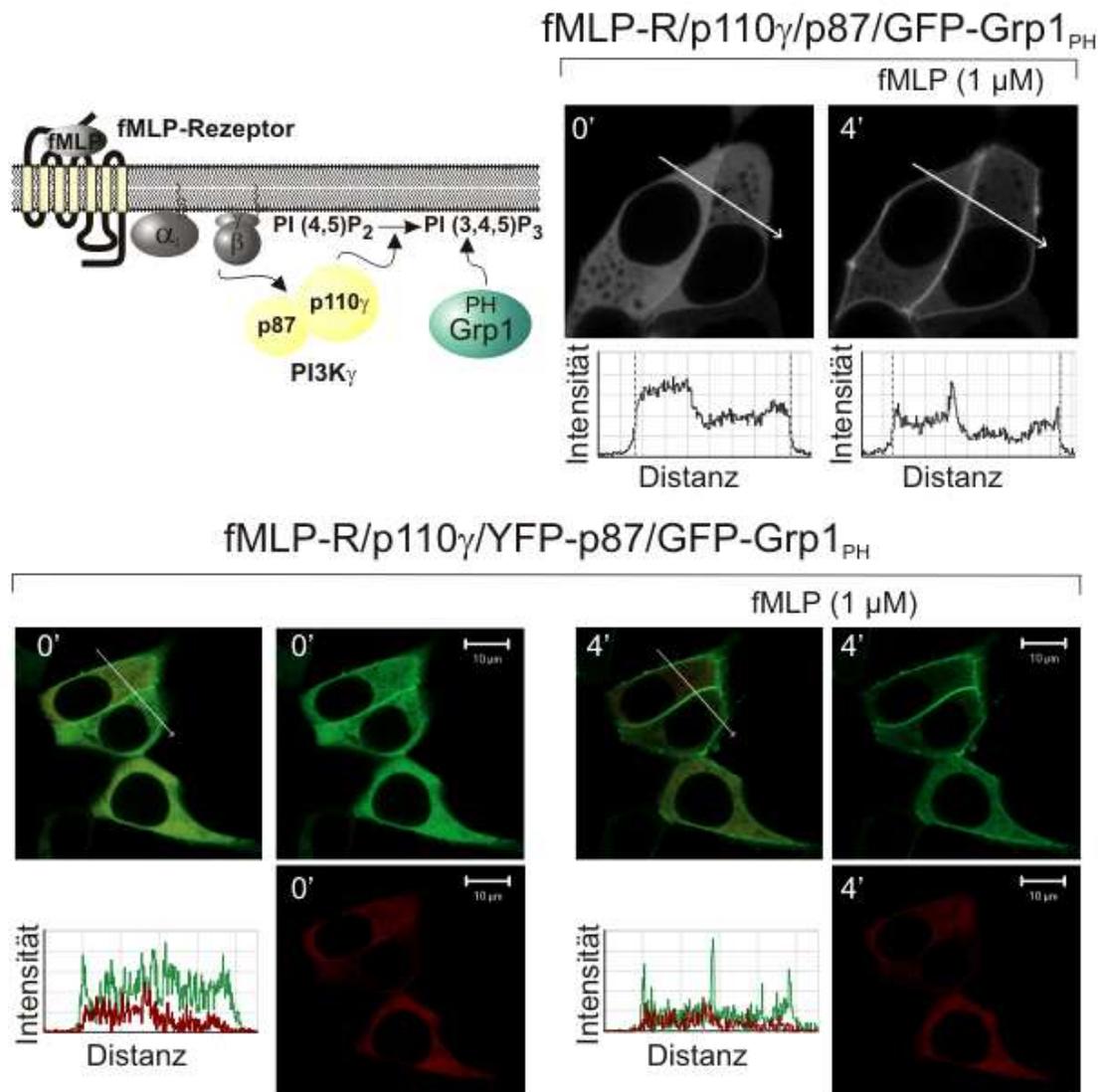


Abb. Anhang 8.7: fMLP-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ_{p87} in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für den G_i-Protein-gekoppelten fMLP-Rezeptor, die p110 γ , die unmarkierte (oben) bzw. YFP-markierte (unten) p87 sowie die GFP-markierte PtdIns-3,4,5-P₃-bindende PH-Domäne des Grp1 (GFP-Grp1_{PH}) kotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation von YFP-p87 und GFP-Grp1_{PH} wurde wie zuvor beschrieben (Brock et al., 2003; Voigt et al., 2005; Voigt et al., 2006) einen Tag nach Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Die Stimulation mit fMLP (1 μ M, 4 min) führte zu einer Aktivierung des p110 γ /p87- und des p110 γ /YFP-p87-Heterodimers, ersichtlich anhand der Translokation des PIP₃-Sensors an die Plasmamembran. Der Versuchsaufbau ist schematisch oberhalb der konfokalen Aufnahmen abgebildet, wobei die überexprimierten Komponenten farbig dargestellt sind. Die unteren Darstellungen zeigen die Fluoreszenzintensitäten entlang der im konfokalen Bild gezeigten Pfeile. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

8.1.3 Endogene Expression von PI3-Kinasen und G $\beta\gamma$ -Komplexen in HEK293-Zellen

Die endogene Transkription und Expression von PI3-Kinase-Untereinheiten in HEK293-Zellen wurde mittels RT-PCR- (s. Abb. Anhang 8.8 A) und Immunoblot-Analysen (s. Abb. Anhang 8.8 B) untersucht. Hierzu wurden für die verschiedenen Untereinheiten spezifische Primer bzw. Antikörper eingesetzt. Bei der RT-PCR dienten cDNAs, die für die entsprechenden PI3-Kinase-Untereinheiten kodierten, als Positivkontrollen. Die RT-PCR Analyse zeigte die Transkription aller katalytischer Untereinheiten der Klasse I_A in HEK293-Zellen, nicht jedoch der katalytischen Klasse I_B-Untereinheit (s. Abb. Anhang 8.8 A). Zusätzlich wurde auch die Expression der G-Protein-sensitiven PI3-Kinasen β und γ anhand von Immunoblot-Analysen untersucht. Es konnte die Proteinsynthese beider PI3-Kinase β -Untereinheiten (p110 β und p85 α) nachgewiesen werden, nicht jedoch die der katalytischen p110 γ oder der nicht-katalytischen p101- und p87-Untereinheiten (s. Abb. Anhang 8.8 B), was in Übereinstimmung mit den gewonnenen RT-PCR-Daten stand (s. Abb. Anhang 8.8 A). Auch nach Anreicherung der Proteinmenge durch Immunpräzipitation war in HEK293-Zellen, im Gegensatz zu humanen Leukämie (HL-60)-Zellen, die p110 γ per Immunoblot-Analyse nicht nachweisbar (s. Abb. Anhang 8.8 C). Ein parallel zur Immunoblot-Analyse durchgeführter *in vitro* Lipidkinase-Assay erbrachte für HEK293-Zellen ebenfalls keine Aktivität, wohl aber für HL-60-Zellen (s. Abb. Anhang 8.8 C). Diese Daten machen deutlich, dass in untransfizierten HEK293-Zellen die Aktivität der PI3-Kinasen nur auf die der Klasse I_A PI3-Kinasen, nicht aber auf die der Klasse I_B PI3-Kinase γ zurückzuführen ist. Der Vergleich der PI3-Kinase-Aktivität von untransfizierten Zellen mit der von PI3-Kinase γ überexprimierenden Zellen erlaubt somit den Nachweis einer reinen PI3-Kinase γ -Aktivität.

Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, dass nach Überexpression der für unsere Untersuchungen notwendigen Komponenten, d.h. GPCRs, PI3-Kinase γ sowie GFP-Grp1_{PH}-Domäne, die Konzentration an G $\beta\gamma$ -Komplexen hochreguliert wird (s. Abb. Anhang 8.8 D). Dies schließt zwar nicht aus, dass eine größere Menge an G $\beta\gamma$ -Komplexen nach Aktivierung eines überexprimierten Rezeptors freigesetzt wird, aber die absolute Menge an insgesamt freisetzbaren G $\beta\gamma$ -Komplexen scheint unverändert zu bleiben.

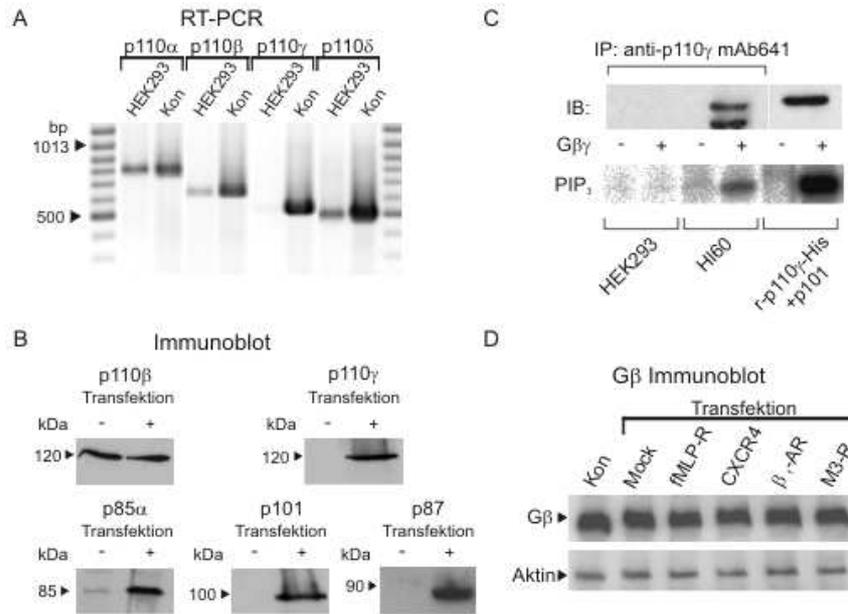


Abb. Anhang 8.8: Die PI3-Kinasen α , β und δ , aber nicht die PI3-Kinase γ sind endogen in HEK293-Zellen detektierbar. A) Die total-RNA von HEK293-Zellen wurde mittels RT-PCR Analyse auf die Expression von p110 α , - β , - γ und - δ untersucht. Als Kontrolle (Kon) wurden Plasmide, die für die betreffende Untereinheit kodieren, verwendet. Alle katalytischen Klasse I_A Untereinheiten konnten nachgewiesen werden, während keine mRNA für die p110 γ detektierbar war. B) Die Expression der PI3-Kinasen β und γ wurde zusätzlich durch Immunoblot-Analysen überprüft. Hierbei dienten Zelllysate von HEK293-Zellen, welche die jeweilige Untereinheit überexprimieren, als Kontrolle (+). Auch hier ließ sich keine endogene PI3-Kinase γ nachweisen. C) Die Immunpräzipitate endogener p110 γ aus HEK293- und HL-60-Zellen wurden per Immunoblot-Analyse und *in vitro* Lipidkinase-Aktivitäts Analysen untersucht. Als Kontrolle diente rekombinant gereinigtes Protein aus SF9 Zellen, welches freundlicherweise von Aliaksei Shymanets zur Verfügung gestellt wurde. Endogene p110 γ ließ sich aus HL-60-, nicht jedoch aus HEK293-Zellen präzipitieren. **Die Überexpression von GPCRs führt zu keiner Hochregulation endogener G β -Level.** D) Die Immunoblot-Analyse zeigt die endogene Expression von G β -Untereinheiten in HEK293-Zellen, welche die GFP-Grp1_{PH} Domäne, die PI3-Kinase γ und den jeweils aufgeführten Rezeptor überexprimieren. Die Expression von G β -Untereinheiten blieb bei allen untersuchten Bedingungen unverändert.

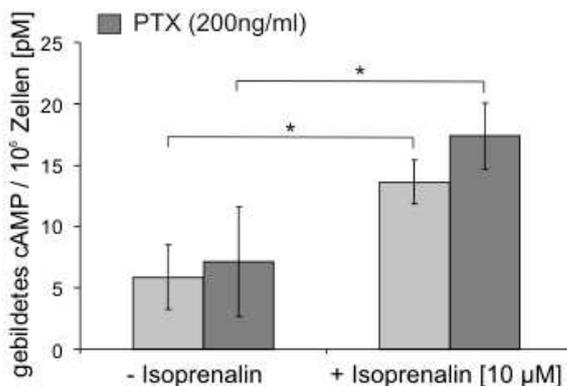
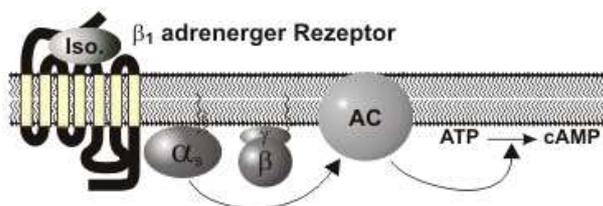


Abb. Anhang 8.9: Der in HEK293-Zellen überexprimierte β_1 -adrenerge Rezeptor ist funktionell an G_s-Proteine gekoppelt. HEK293-Zellen wurden mit einem Plasmid für den β_1 -adrenergen Rezeptor transfiziert. Die Stimulation der Zellen mit dem β -AR Agonisten Isoprenalin (10 μ M, 1 min) induzierte die Bildung von cAMP. Die Produktion von cAMP wurde mit Hilfe eines radioaktiv markierten kompetitiven Proteinbindungs-Ansatz gemessen (Patrucco et al., 2004). Die Vorbehandlung der Zellen mit PTX (200 ng/ml, über Nacht) resultierte allgemein in einer leicht erhöhten cAMP Bildung, welche sich durch den Verlust der G_i-vermittelten basalen Inhibition der Adenylzyklase-Aktivität erklären lässt. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

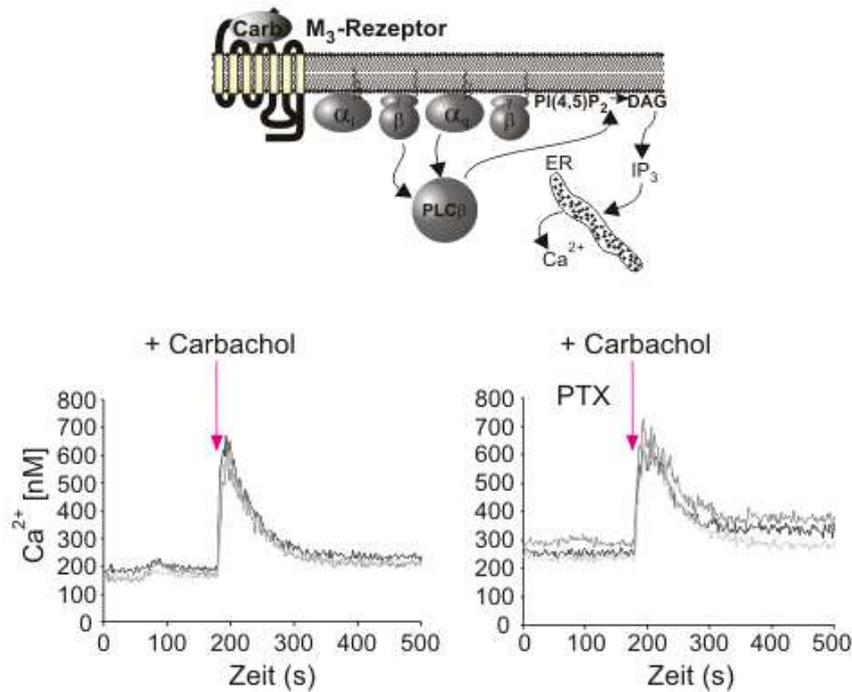


Abb. Anhang 8.10: Die M₃-Rezeptor-induzierte Ca²⁺-Mobilisierung ist G_{α_i}-vermittelt. HEK293-M₃-Zellen wurden mit 50 μM Carbachol in An- oder Abwesenheit von PTX (200 ng/ml, über Nacht) stimuliert. Die Zellen wurden mit dem Ca²⁺-Indikator Fura-2 AM beladen und der Carbachol-induzierte Ca²⁺-Einstrom wurde fluorimetrisch bestimmt. Jede Linie repräsentiert die zytosolischen Ca²⁺-Werte, welche in einer Zellsuspension von 2x10⁵ Zellen pro Ansatz gemessen wurden. Gezeigt sind drei unabhängig voneinander gemessene Versuchsansätze. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

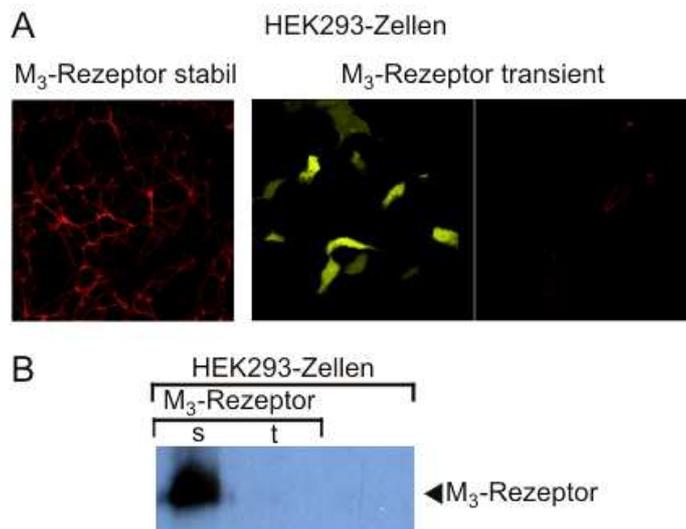


Abb. Anhang 8.11: M₃-Rezeptor Expression in stabil und transient überexprimierenden HEK293-Zellen. (A) Nachweis der M₃-Rezeptor Überexpression in transient und stabil exprimierenden HEK293-Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analyse. Stabil exprimierende Zellen zeigen eine starke M₃-Rezeptor-abhängige Immunfluoreszenz in allen Zellen. Im Gegensatz dazu zeigen transient transfizierte Zellen (gelber Kanal: YFP Koexpression) nur in einigen Zellen eine M₃-Rezeptor-abhängige Immunfluoreszenz, die zudem schwächer ausgeprägt ist, als in den stabil exprimierenden Zellen. (B) Immunoblot-Analyse von stabil und transient M₃-Rezeptor überexprimierenden HEK293-Zelllysaten. Die stabil exprimierenden Zellen zeigen eine deutliche Expression des M₃-Rezeptors, wohingegen in transient transfizierten Zellen keine Expression des Rezeptors mit Hilfe des verwendeten Antikörpers detektierbar war.

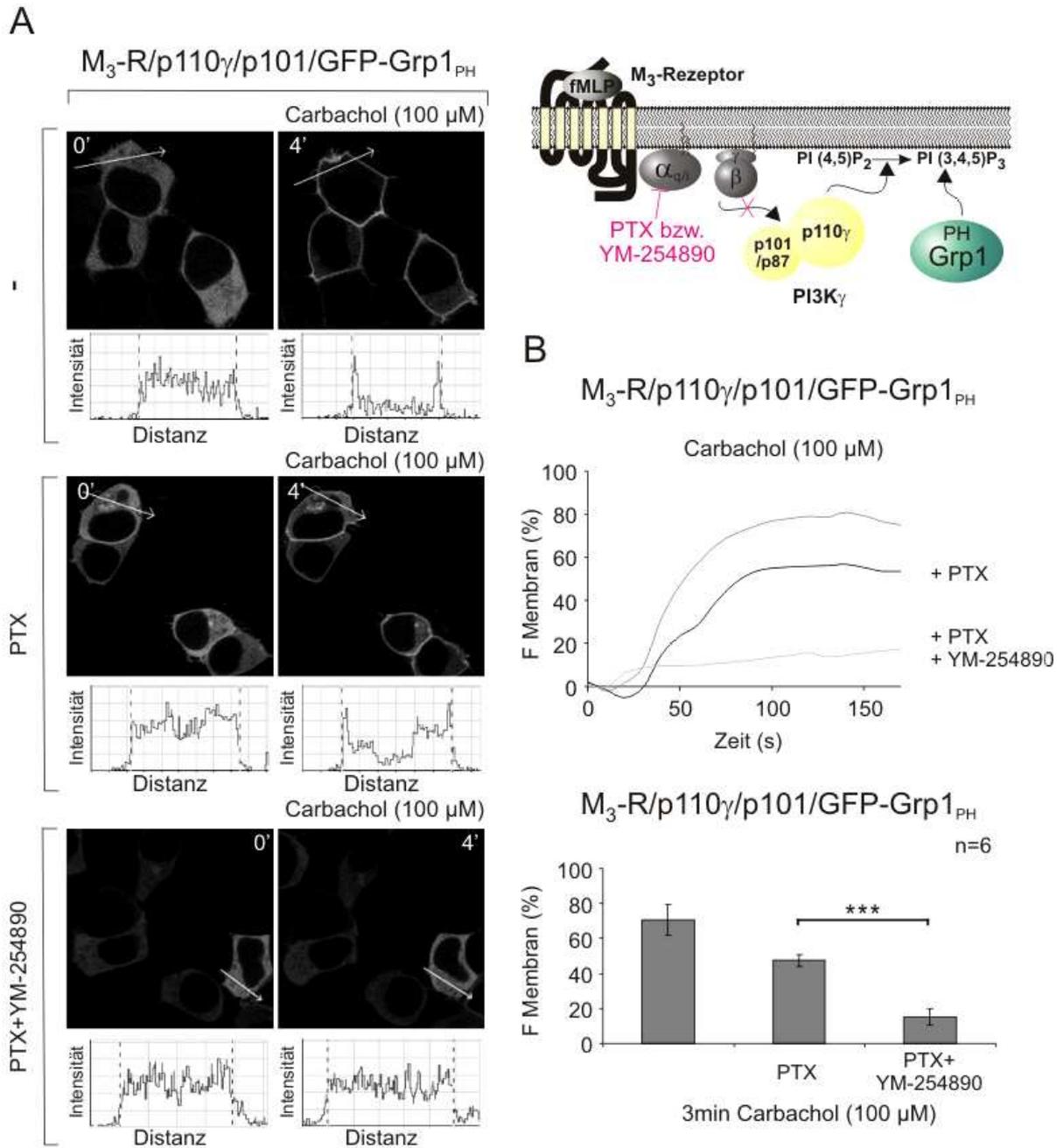


Abb. Anhang 8.12: Die M_3 -Rezeptor-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ ist G_q -Protein-vermittelt. (A) HEK293- M_3 -Zellen wurden mit Plasmiden für GFP-Grp1_{PH}, p110 γ und p101 kotransfiziert. Die Stimulation mit Carbachol (100 μ M, 2 min) zeigt eine deutliche Aktivierung der PI3-Kinase γ , während in der Gegenwart von PTX (200 ng/ml, über Nacht) eine etwas schwächere G_i -Protein-unabhängige Stimulation sichtbar wird. Die parallele Behandlung der Zellen mit PTX (200 ng/ml, über Nacht) und YM-254890 (1 μ M, 15 min) führte hingegen zu einer vollständigen Inhibition der Carbachol-induzierten PI3-Kinase Aktivierung. Hier wird deutlich, dass die G_i -Protein-unabhängige Stimulation der PI3-Kinase γ durch den M_3 -Rezeptor G_q -Protein-vermittelt wird. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Zeitlicher Verlauf der Stimulation jeweils einer Referenzzelle und die semi-quantitative Auswertung der PH-Domänen-Umverteilung nach drei minütiger Stimulation der Zellen mit Carbachol in sechs Zellen aus unabhängigen Experimenten.

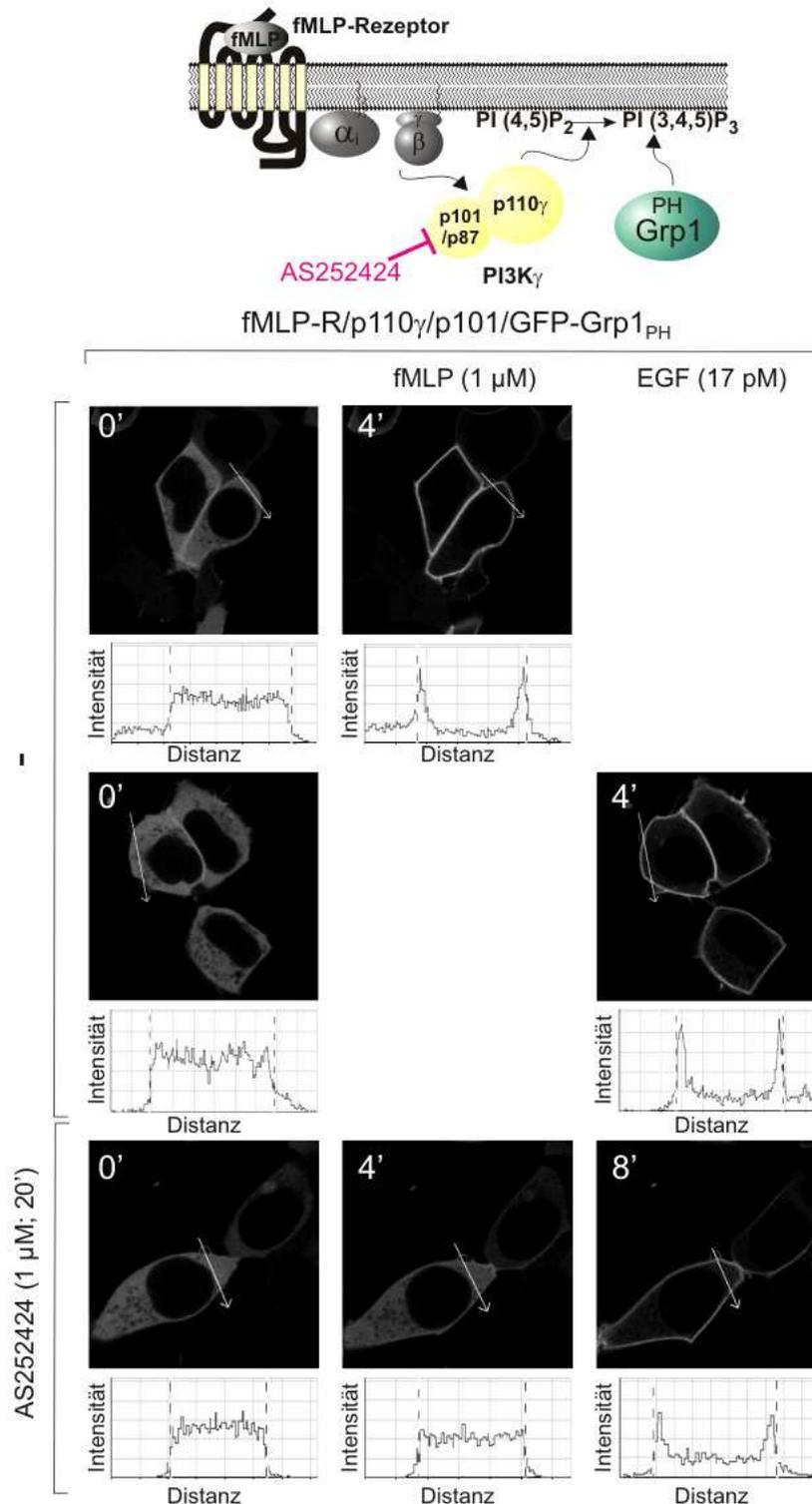


Abb. Anhang 8.13: Selektive Inhibition der PI3-Kinase γ durch AS252424. In HEK293-Zellen wurde der fMLP-Rezeptor, die PI3-Kinase γ_{p101} und der GFP-Grp1_{PH} PIP₃-Sensor überexprimiert. Die Behandlung der Zellen mit AS252424 (1 μ M, 20 min) führte zu einer vollständigen Inhibition der fMLP- (1 μ M, 4 min) induzierten Aktivierung der PI3-Kinase γ (vgl. untere Reihe mittlere Spalte mit der oberen Reihe mittlere Spalte). Die EGF-induzierte (17 pM, 4 min) Aktivierung endogener Klasse I_A PI3-Kinasen blieb hingegen in der Gegenwart von AS252424 unverändert (vgl. untere Reihe rechte Spalte mit mittlere Reihe rechte Spalte).

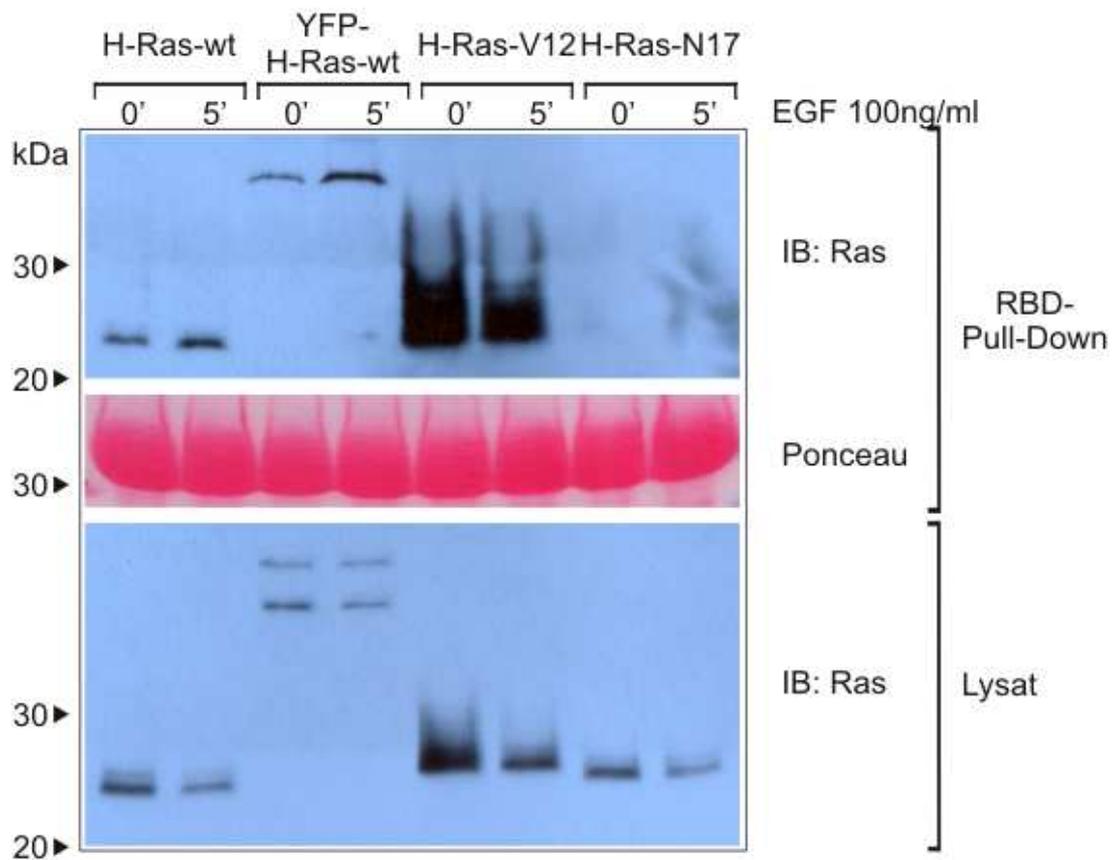


Abb. Anhang 8.14: Aktivität der H-Ras-Konstrukte. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für verschiedene H-Ras-Konstrukte (H-Ras-wt, YFP-H-Ras-wt, H-Ras-V12 und H-Ras-N17) transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Zellextrakte von unstimulierten oder EGF (1,7 pM, 5 min) behandelten Zellen präpariert und aktives Ras mittels gereinigter Raf-RBD präzipitiert. Die unten dargestellte Immunoblot-Analyse zeigt die eingesetzte Menge an Ras-Protein und der oben abgebildete Immunoblot das durch die Raf-RBD präzipitierte, aktive Ras. In der Darstellung der Ponceau-S-Färbung wird die gleichmäßige Beladung der Glutathion-Sepharose-Beads mit GST-RBD deutlich.

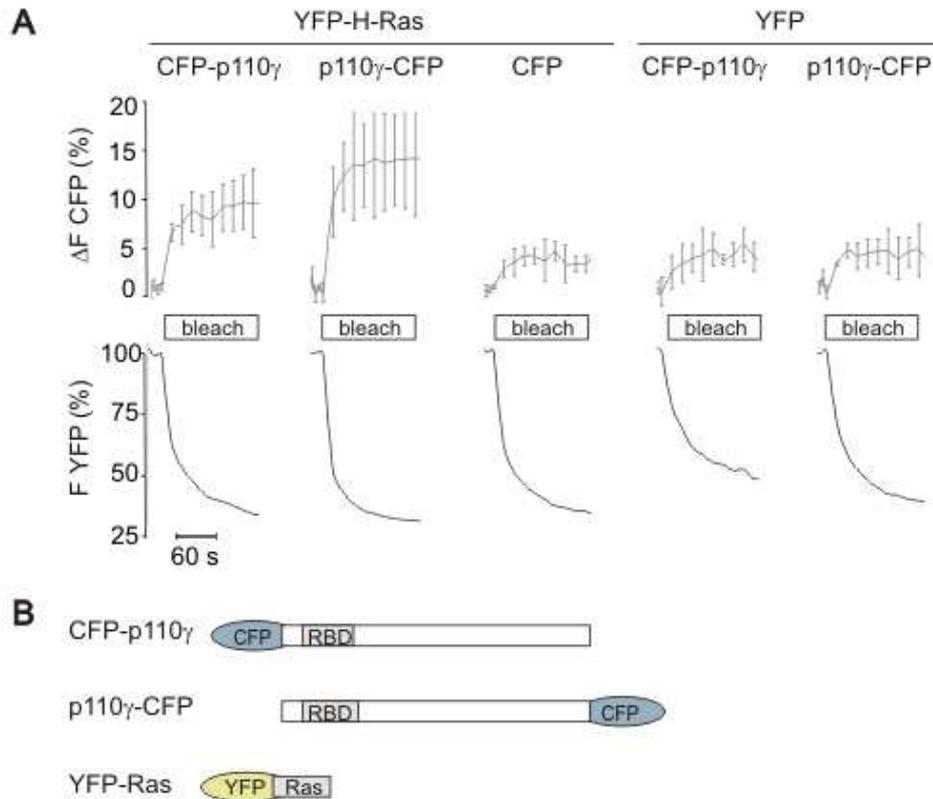


Abb. Anhang 8.15: FRET-Analyse zwischen p110 γ und Ras. HEK293-Zellen wurden mit YFP-H-Ras-wt oder YFP und N- oder C-terminal CFP-markiertem p110 γ oder CFP kotransfiziert. Der FRET zwischen den beiden Fluorophoren wurde einen Tag später mittels „Acceptor bleach“ an lebenden Zellen bestimmt: Das Akzeptor-Fluorophor (YFP) wurde durch Ausbleichen zerstört. Dadurch wird der FRET unterbunden, und die Fluoreszenz des Donor-Fluorophors (CFP) steigt an. Die Zunahme der Donor-Fluoreszenz durch vollständiges Ausbleichen des Akzeptors ist proportional zur FRET-Effizienz. Dargestellt sind die CFP-(oben) und die YFP-Fluoreszenz (unten) kurz vor und während des Ausbleichens von YFP („YFP bleach“). Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) von 8 analysierten Zellen aus unabhängigen Experimenten.

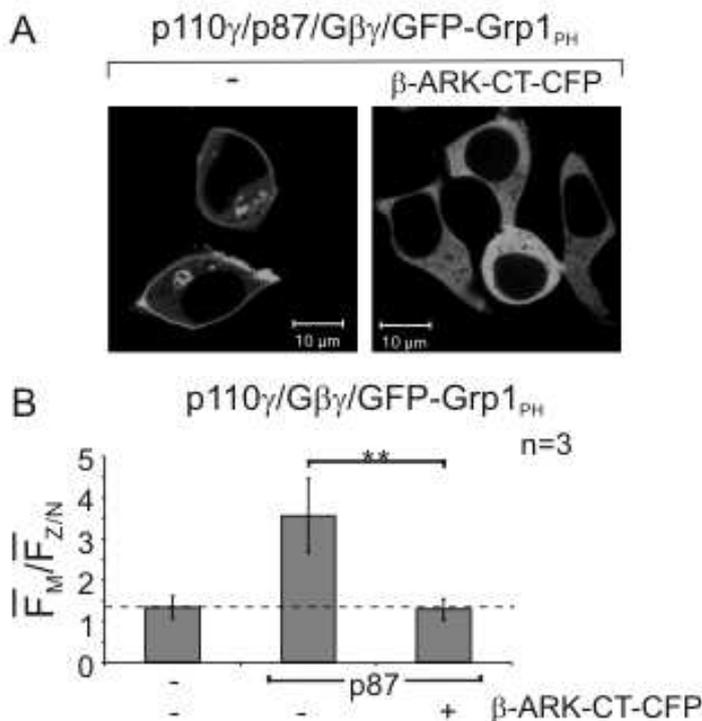


Abb. Anhang 8.16: β -ARK-CT-CFP inhibiert Signale von G β γ -Komplexen. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für p110 γ , p87, G β γ -Komplexe und GFP-Grp1_{PH} \pm β -ARK-CT-CFP transfiziert. (A) Die durch die G β γ -Komplex-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase γ bedingte Akkumulation der PH-Domäne an der Plasmamembran wurde durch die Gegenwart des C-Terminus von β -ARK vollständig inhibiert. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Semi-quantitative Auswertung der PH-Domänen-Verteilung zwischen Membran und intrazellulärem Kompartiment aus drei unabhängigen Experimenten in 18 Zellen analog zu (A).

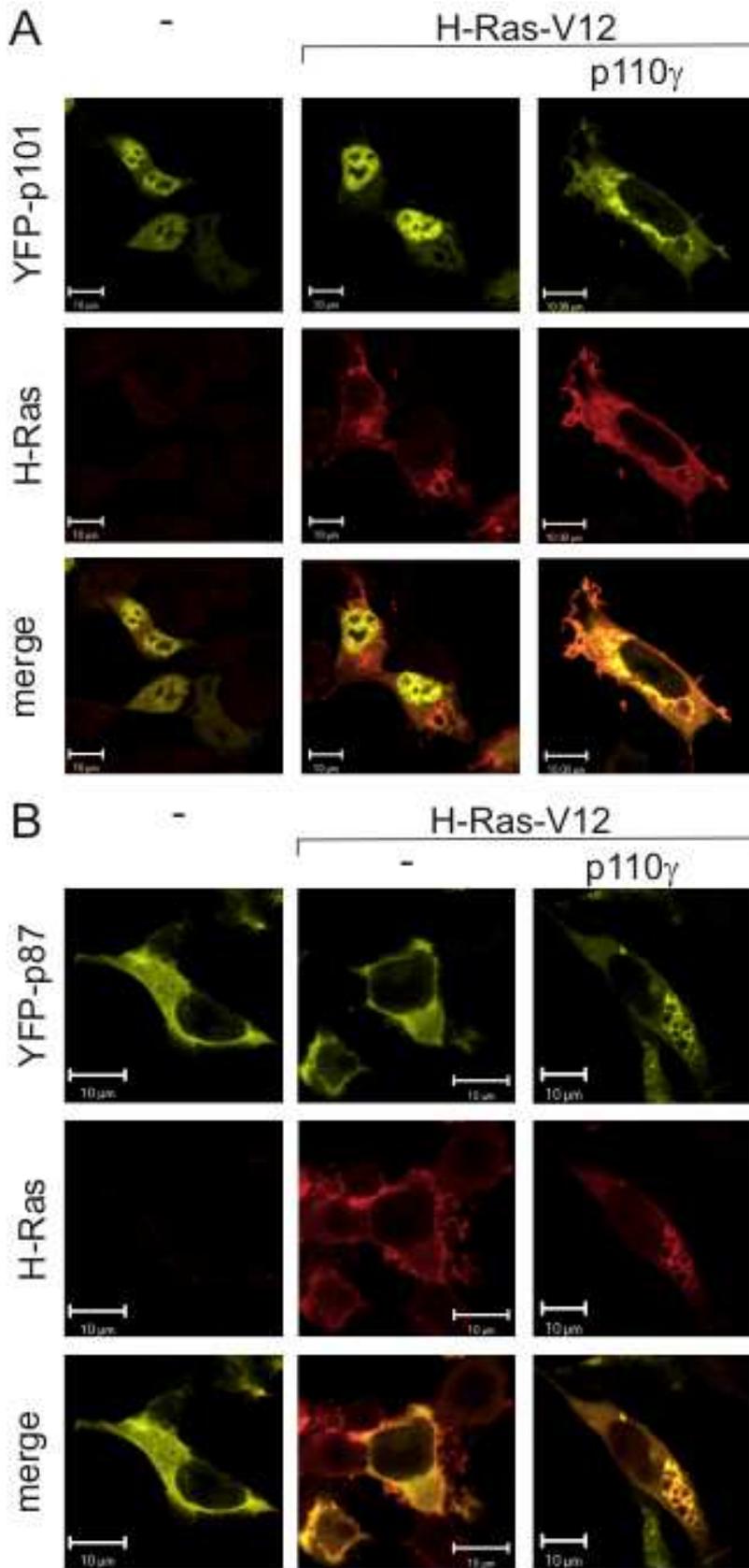


Abb. Anhang 8.17: Interaktion von PI3-Kinase γ -Untereinheiten mit konstitutiv aktivem H-Ras. HEK293-Zellen wurden mit YFP-markierten nicht-katalytischen Untereinheiten (A: p101 und B: p87), H-Ras-V12 und p110 γ in den angegebenen Kombinationen kotransfiziert. Sowohl die subzelluläre Verteilung der p101, als auch die der p87-Untereinheit wird nicht durch die Koexpression von konstitutiv aktivem Ras beeinflusst. Erst nach Kotransfektion der katalytischen Untereinheit findet eine Interaktion mit Ras statt, welche zu einer Redistribution der heterodimeren PI3-Kinase γ an Membranen führt.

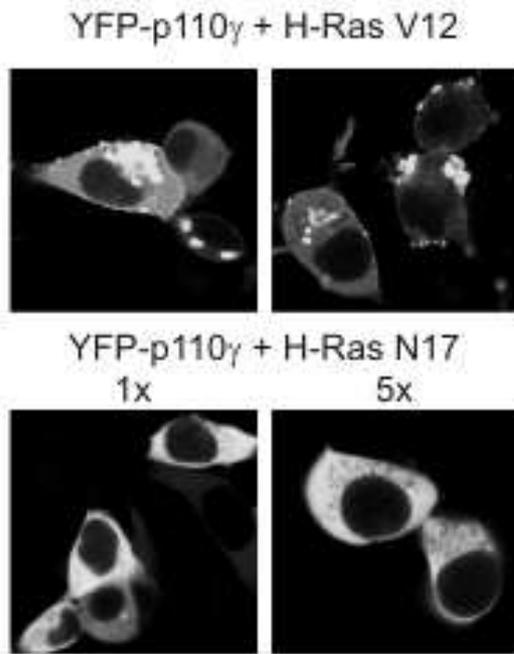


Abb. Anhang 8.18: Ras-induzierte Membranrekrutierung der p110 γ . HEK293-Zellen wurden mit YFP-p110 γ und H-Ras-V12 oder H-Ras-N17 kotransfiziert und die Lokalisation der YFP-markierten p110 γ -Untereinheit einen Tag nach Transfektion konfokalmikroskopisch untersucht. Die Koexpression von konstitutiv aktivem H-Ras-V12 führte zu einer Rekrutierung der katalytischen PI3-Kinase γ -Untereinheit an Endo- und Plasmamembranen (gezeigt sind Doppelwerte). Weder die Kotransfektion der gleichen Plasmidmenge an dominant negativem Ras (unten links), noch die Transfektion der fünfmaligen Plasmidmenge an H-Ras-N17 (unten rechts) hatte einen Einfluss auf die Distribution der p110 γ .

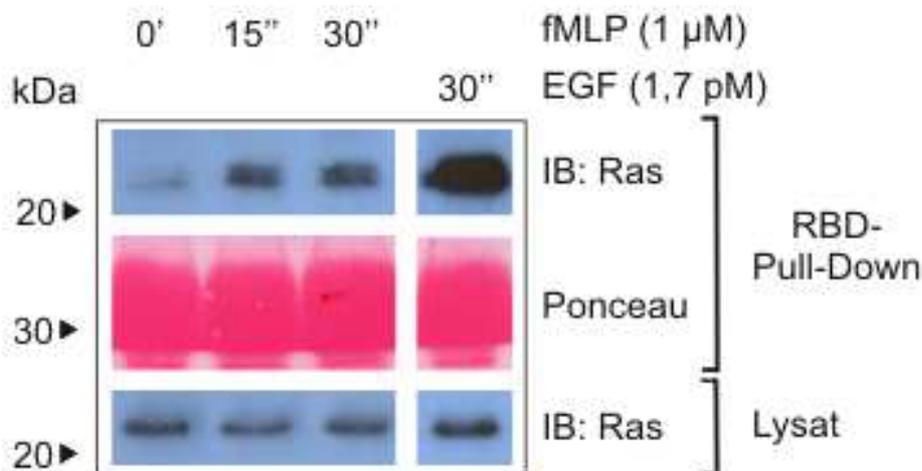


Abb. Anhang 8.19: fMLP-induzierte Aktivierung von Ras. HEK293-Zellen wurden mit dem fMLP-Rezeptor transfiziert, 18 Stunden gehungert, mit EGF oder fMLP stimuliert und mittels Raf-RBD-Pull-down sowie anschließender Immunoblot-Analyse auf aktives Ras hin untersucht. Die Stimulation der Zellen mit EGF führte zu einer starken Ras Aktivierung. Auch nach Stimulation der Zellen mit fMLP zeigte sich eine Erhöhung der Konzentration an aktivem Ras. (Weitere Erläuterungen s. Abb. Anhang 8.14)

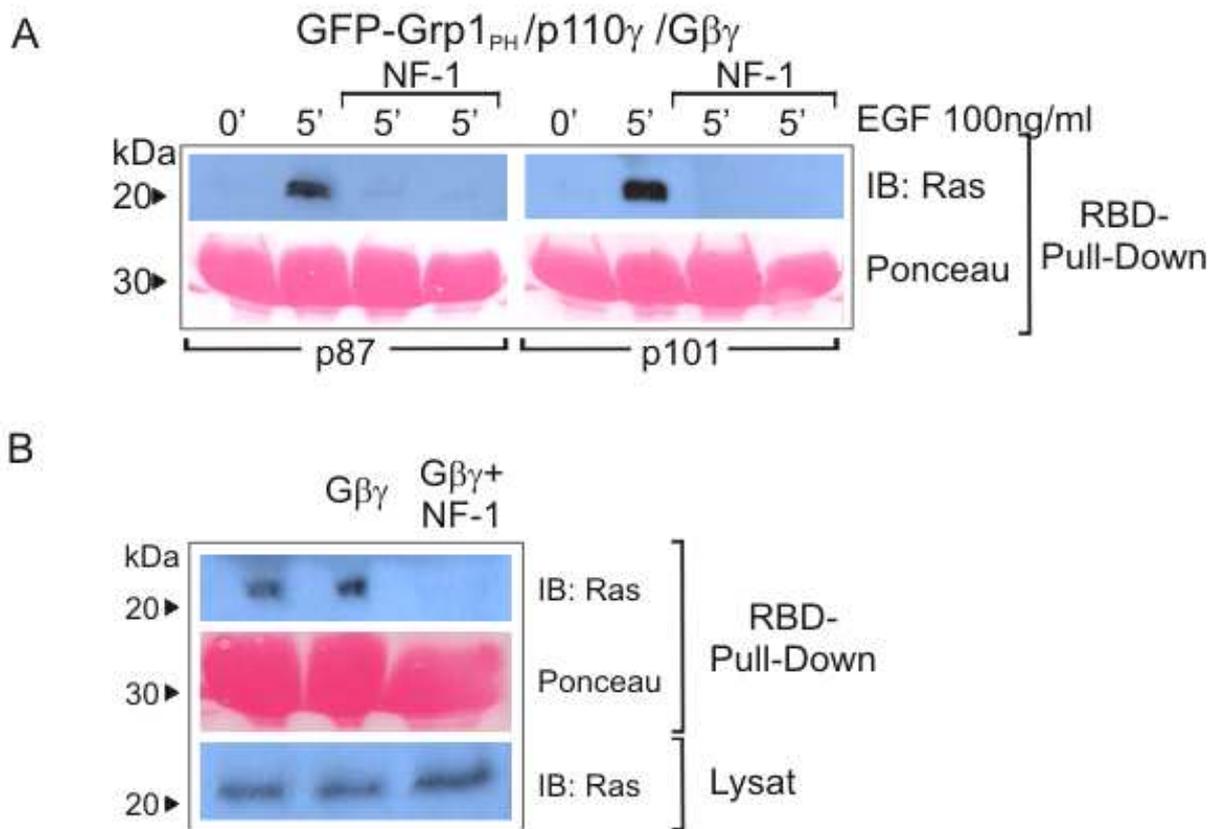


Abb. Anhang 8.20: Neurofibromin 1-induzierte Inaktivierung von Ras. (A) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für p110 γ , p87 oder p101, G $\beta\gamma$ -Komplexen und GFP-Grp1_{PH} \pm Neurofibromin 1 (NF1) kotransfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Zellextrakte aus unstimulierten oder EGF behandelten (1,7 μ M, 5 min) Zellen präpariert und aktives Ras mittels gereinigter Raf-RBD präzipitiert. Die Immunoblot-Analyse mit einem Pan-Ras-Antikörper zeigt das durch die Raf-RBD präzipitierte, und somit GTP-gebundene, Ras. In der Darstellung der Ponceau-S-Färbung wird die gleichmäßige Beladung der Glutathion-Sepharose-Beads mit GST-RBD deutlich. In der Gegenwart von NF1 konnte kein aktives Ras mittels Raf-RBD präzipitiert werden. (B) Quantifizierung von aktivem Ras in untransfizierten und G $\beta\gamma$ -Komplex, bzw. G $\beta\gamma$ -Komplex und NF1 exprimierenden Zellen. Die Überexpression von G $\beta\gamma$ -Komplexen führte zu keiner Hochregulation von aktivem Ras. Die Expression von NF1 inaktivierte dagegen ebenfalls das basal aktive Ras.

8.2 Die Rolle von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bei der Aktivierung der PI3-Kinase β

Da in der vorliegenden Arbeit die GTP-abhängige Regulation der Klasse I PI3-Kinasen detailliert analysiert werden sollte, wurden vergleichend auch Untersuchungen zur $G\beta\gamma$ -Komplex-vermittelten Aktivierung der PI3-Kinase β durchgeführt. Erste Hinweise auf eine mögliche Responsivität von Rezeptor-Tyrosin-Kinase-regulierten PI3-Kinasen gegenüber $G\beta\gamma$ -Komplexen (Kurosu et al., 1995) konnten von unserer Arbeitsgruppe bereits anhand von *in vitro*-Befunden bestätigt und näher charakterisiert werden (Maier et al., 1999). Bislang fehlten jedoch Untersuchungen zur Relevanz dieser $G\beta\gamma$ -Komplex-vermittelten Aktivierung in einem zellulären System. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten belegen in „knock-out“-Mausmodellen die physiologische Relevanz dieses Regulationsmechanismus (Guillermet-Guibert et al., 2008).

Um die von unserer Arbeitsgruppe erhobenen *in vitro*-Daten auch in einem zellulären System testen zu können, wurde die G_i PCR-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase β mittels PH-Domänen-Translokation in HEK293-Zellen untersucht. Wie zuvor erwähnt, konnte weder eine Stimulation des überexprimierten fMLP-Rezeptors, noch die Überexpression freier $G\beta\gamma$ -Komplexe die endogenen PI3-Kinasen in HEK293-Zellen aktivieren (s. Abb. Anhang 8.21). In der Annahme, dass die endogene PI3-Kinase β -Konzentration nicht ausreichend ist, um eine durch die PH-Domänen-Translokation detektierbare PtdIns-3,4,5- P_3 -Konzentration zu generieren, wurde das p110 β /p85 α -Heterodimer im Folgenden zusätzlich überexprimiert. Bei HEK293-Zellen, die GFP-Grp1_{PH}, p110 β , p85 α und entweder den fMLP-Rezeptor oder den CXCR4-Rezeptor überexprimierten, führte eine Stimulation mit dem entsprechenden Agonisten (fMLP oder CXCL12) zu einer Translokation des PIP₃-Sensors an die Plasmamembran (s. Abb. Anhang 8.21). Dies konnte jedoch nur in einigen Fällen beobachtet werden (in 3 aus 17 unabhängigen Experimenten). In Abb. Anhang 8.21 A sind beispielhaft Zellen gezeigt, in denen eine PI3-Kinase β -abhängige G_i -vermittelte Rekrutierung deutlich wird. Im Gegensatz zu PI3-Kinase γ und G_i PCR exprimierenden Zellen, war hier keine basale Aktivierung der PI3-Kinase erkennbar. Diese Befunde lassen vermuten, dass die PI3-Kinase β im zellulären System durch $G\beta\gamma$ -Komplexe aktiviert werden kann, hierbei jedoch weniger sensitiv reagiert, als die PI3-Kinase γ . Diese Interpretation wird durch *in vitro*-Daten gestützt, die zeigen, dass bei Verwendung von gereinigten Proteinen die PI3-Kinase β eine zwölfmal niedrigere Sensitivität gegenüber $G\beta\gamma$ -Komplexen aufweist, als die PI3-Kinase γ (nicht gezeigt).

Daher wurde weiterhin überprüft, ob eine erhöhte Verfügbarkeit von G-Proteinen zu einer gesteigerten Rezeptor-induzierten PI3-Kinase β -Stimulation führt. Um eine höhere Konzentration an G-Proteinen zu erhalten, wurden die Zellen mit Plasmiden für $G\alpha_{i2}$, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ kotransfiziert. In Abb. Anhang 8.21 B, links ist ein solches Beispiel gezeigt. Die Stimulation des G_i -Protein-gekoppelten Rezeptors führte hier ebenfalls zu einer Umverteilung des PIP₃-Sensors vom Zytosol an die Plasmamembran. Jedoch war die Anzahl der Zellen, in denen diese Translokation auftrat, gegenüber Zellen, die nicht zusätzliche G-Proteine überexprimierten, unverändert (5 von 25 unabhängigen Experimenten).

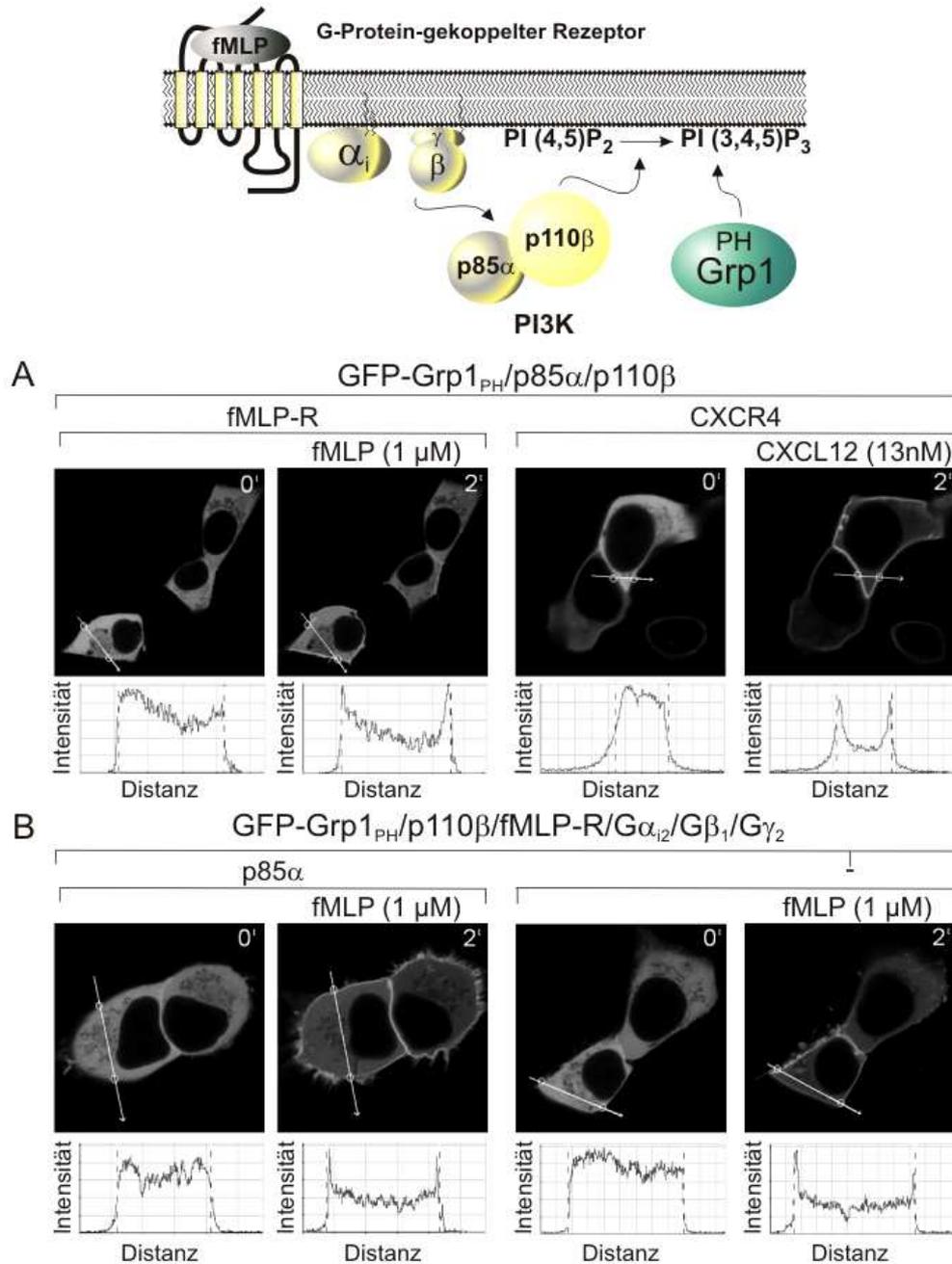


Abb. Anhang 8.21: Aktivierung der PI3-Kinase β durch G_i -gekoppelte Rezeptoren. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für GFP-Grp1_{PH}, p110 β , p85 α , G α_{i2} , G β_1 , G γ_2 und fMLP-R oder CXCR4 in den angegebenen Kombinationen kotransfiziert. (A) Die Stimulation mit den jeweiligen Agonisten (fMLP 1 μ M oder CXCL12 13 nM für 2 min) führt in beiden Fällen zu einer Membranrekrutierung des GFP-Grp1_{PH} PIP₃-Sensors, welche allerdings nur in drei von 17 unabhängigen Experimenten auftrat. Dies weist auf eine G_i -vermittelte $G\beta\gamma$ -Komplex-abhängige Aktivierung der PI3-Kinase β in diesem System hin. (B) Links: Die Rekrutierung des PIP₃-Sensors an die Plasmamembran in fünf von 25 unabhängigen Experimenten trat in Gegenwart von koexprimierter G $\alpha_{i2}\beta\gamma$ nicht signifikant häufiger auf, als unter Bedingungen ohne zusätzlich exprimierte G-Proteine. Rechts: Die Stimulation mit 1 μ M fMLP für 2 min führte zu einer vergleichbaren Aktivierung der p110 β (drei von 17 unabhängigen Experimenten) im Vergleich zum PI3-Kinase β -Heterodimer. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert.

Möglicherweise war, aufgrund der sehr geringen Sensitivität der PI3-Kinase β gegenüber $G\beta\gamma$ -Komplexen die Konzentration an freigesetzten $G\beta\gamma$ -Komplexen in den meisten Experimenten für eine nachweisbare PI3-Kinase β -Aktivität nicht ausreichend.

Anhand von *in vitro*-Experimenten mit gereinigten Proteinen war bereits zuvor gezeigt worden, dass die PI3-Kinase β -Aktivierung durch $G\beta\gamma$ -Komplexe unabhängig von der Präsenz der p85-Untereinheit ist (Maier et al., 1999). Deshalb wurde hier zusätzlich ein möglicher stimulierender Einfluss von $G\beta\gamma$ -Komplexen auf die monomere p110 β untersucht (s. Abb. Anhang 8.21 B, rechts). Die Transfektion der Zellen mit p110 β in Abwesenheit der p85 α -Untereinheit, führte zu einer vergleichbaren Häufigkeit an positiven Resultaten (in 3 von 17 unabhängigen Experimenten). Hier wird deutlich, dass die $G\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase β unabhängig von der regulatorischen Untereinheit stattfindet.

Da die rein $G\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase β nicht effizient genug für eine physiologische Relevanz zu sein scheint, sollte weiterhin die synergistische Aktivierung der Kinase durch RTKs und GPCRs analysiert werden. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit Plasmiden für den fMLP-R, die PI3-Kinase β (p110 β /p85 α) und den PIP₃-Sensor kotransfiziert und anschließend mit EGF und/oder fMLP stimuliert. Der Vergleich der GFP-fusionierten PH-Domänen-Translokation nach Stimulation der Zellen erbrachte in der Tat einen synergistischen Effekt der simultanen Stimulation mit EGF und fMLP (s. Abb. Anhang 8.21). Die Stimulation des endogenen EGF-Rezeptors resultierte in einer schwachen Aktivität der PI3-Kinase β , während die Aktivierung des überexprimierten fMLP-Rezeptors in dem hier abgebildeten Experiment zu keiner nachweisbaren PIP₃-Sensor Translokation führte (s. Abb. Anhang 8.22 A, oben und Mitte). Die simultane Stimulation der Zellen mit beiden Agonisten resultierte in einer beinahe vollständigen Rekrutierung der PH-Domäne an die Plasmamembran (s. Abb. Anhang 8.22 A, unten). Die kinetische Auswertung der Stimulationen macht darüber hinaus deutlich, dass die PI3-Kinase β durch RTKs erst nach etwa zwei Minuten aktiviert wird, während die synergistische Stimulation mit EGF und fMLP nicht nur zu einer verstärkten, sondern ebenfalls zu einer wesentlich schnelleren Aktivierung der PI3-Kinase β bereits nach 30 Sekunden führt (s. Abb. Anhang 8.22 B).

Die langsamere Stimulation durch EGF reflektiert möglicherweise die Existenz eines bestimmten Schwellenwertes für die PtdIns-3,4,5-P₃-abhängige Translokation des PIP₃-Sensors an die Plasmamembran. Unter diesem Schwellenwert kann der PIP₃-Sensor scheinbar keine Bildung von PtdIns-3,4,5-P₃ detektieren. Die statistische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ergab eine signifikant erhöhte Aktivität nach synergistischer Stimulation der PI3-Kinase β mit EGF und fMLP im Vergleich zur reinen EGF-Stimulation. Die Zeitdiskrepanz zwischen einer rein EGF-induzierten und der synergistischen EGF und fMLP-induzierten Aktivität konnte ebenfalls in allen durchgeführten Experimenten nachgewiesen werden. Diese Befunde zeigen, dass die PI3-Kinase β in lebenden Zellen Signale von beiden, RTKs und GPCRs, empfangen und in ein intrazelluläres Signal transduzieren kann. Darüberhinaus wird deutlich, dass die PI3-Kinase β bei synergistischer Aktivierung als ein koinzidenter Detektor fungieren kann.

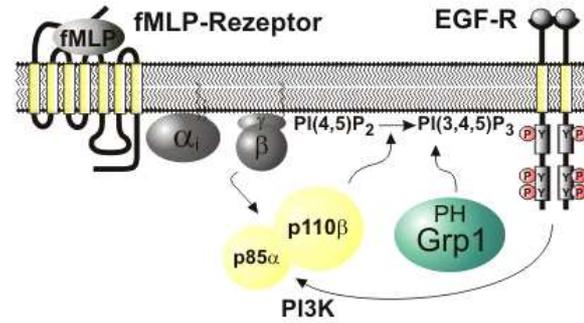
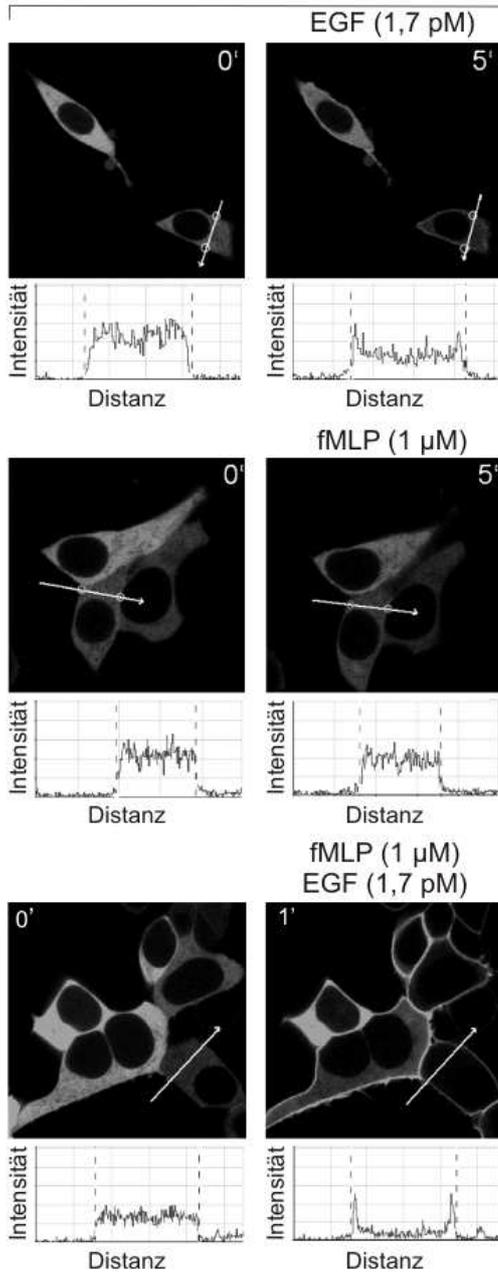
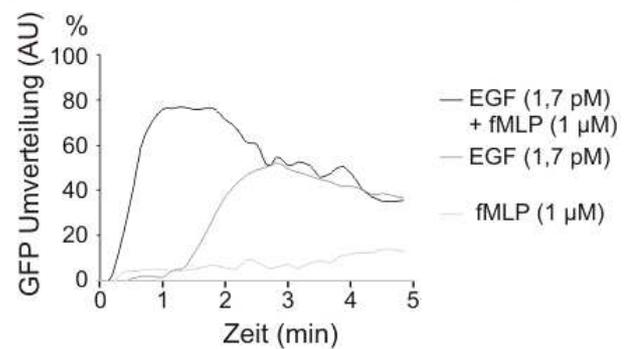
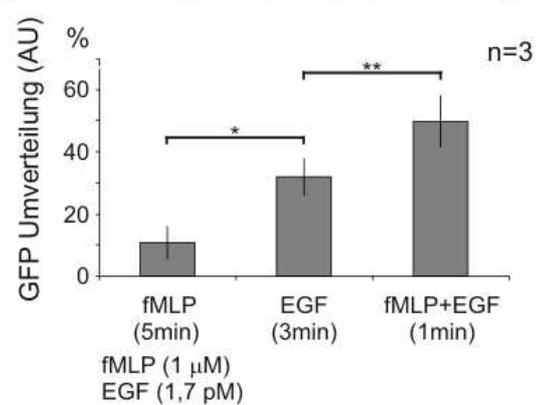
A fMLP-R/p85 α /p110 β /GFP-Grp1_{PH}B fMLP-R/p85 α /p110 β /GFP-Grp1_{PH}C fMLP-R/p85 α /p110 β /GFP-Grp1_{PH}

Abb. Anhang 8.22: Synergismus der RTK- und GPCR-induzierten Stimulation der PI3-Kinase β . HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für GFP-Grp1_{PH}, fMLP-R, p110 β und p85 α kotransfiziert. (A) Die Stimulation mit EGF (1.7 pM, 5 min) führte zu einer leichten Akkumulation der GFP-Grp1_{PH}-Domäne an der Plasmamembran (oben), wohingegen die Behandlung mit fMLP (1 μ M, 5 min) in keiner messbaren Translokation des PIP₃-Sensors resultierte (Mitte). Die simultane Stimulation mit 1.7 pM EGF und 1 μ M fMLP führte zu einer wesentlich intensiveren und schnelleren Aktivierung der PI3-Kinase β schon nach 1 min. Die Zellen wurden 18 Stunden in Serum-freiem DMEM gehungert. (B) Zeitkinetik der Stimulationen aus (A) über fünf Minuten. Es zeigt sich eine wesentlich schnellere und effektivere Aktivierung der PI3-Kinase β nach Stimulation der Zellen mit EGF und fMLP, verglichen mit einer reinen EGF-Stimulation. (C) Zeigt die statistische Auswertung von sechs unabhängigen Versuchen.

Eigene Publikationen

Originalarbeiten

Inga Preuß*, Barbara Kurig*, Bernd Nürnberg, Joachim H.C. Orth & Klaus Aktories. (2009). *Pasteurella multocida* toxin activates G $\beta\gamma$ dimers of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal.*, 21(4), 551-558.

Barbara Kurig, et al. Assigning isoform-specificity within class IB Phosphoinositide 3-kinase signaling. (*In Revision*)

Barbara Kurig, et al. Coupling specificity of phosphoinositide 3-kinase γ to G_s-, G_i-, and G_q-coupled receptors. (*In Vorbereitung*)

Aliaksei Shymanets, Barbara Kurig, et al. The p101 subunit of PI3-Kinase γ augments enzymatic activity of p110 γ . (*In Vorbereitung*)

Kurzfassungen von Kongressbeiträgen

Barbara Kurig, Wiebke Wetzels, Stephanie Schmitmeier, Friedrich Boege, Martina Schmidt, Bernd Nürnberg. (2005). Coupling specificity of class I phosphoinositide 3-kinases to G_s-, G_i-, and G_q-coupled receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 371 (Suppl.1), R44

Roland P. Piekorz, Stefan vom Dahl, Katja Pexa, Barbara Kurig, Wiebke Wetzels, Karsten Spicher, Dieter Häussinger, Lutz Birnbaumer, Bernd Nürnberg. (2005). G α_{i3} selectively regulates autophagic proteolysis in mouse liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 371 (Suppl.1), R43

Katja Pexa, Stefan vom Dahl, Barbara Kurig, Wiebke Wetzels, Dieter Häussinger, Emilio Hirsch, Bernd Nürnberg, Roland P. Piekorz. (2005). The insulin-induced, phosphoinositide 3-kinases γ -dependent inhibition of autophagic proteolysis in mouse liver does not require p110 γ catalytic activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 371 (Suppl.1), R43

Barbara Kurig, Wiebke Wetzels, Martina Schmidt, Antje Gohla, Bernd Nürnberg. Coupling specificity of class I phosphoinositide 3-kinases to G_s-, G_i- and G_q-coupled receptors. Gordon Research Conference on "Phosphorylation & G-protein mediated signalling networks, Second Messengers & Protein Phosphorylation", University of New England, Biddeford, Maine, USA, 12.-17. Juni 2005 (Poster)

Barbara Kurig, Wiebke Wetzels, Martina Schmidt, Antje Gohla, Bernd Nürnberg. Kopplungsspezifität von Phosphoinositid-3-Kinasen gegenüber G_s-, G_i-, und G_q-gekoppelten Rezeptoren. Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses, Universität Düsseldorf, 24.-25. Juni 2005 (Poster)

Barbara Kurig, Wiebke Wetzel, Martina Schmidt, Elisabeth M. Jeanclos, Antje Gohla, Bernd Nürnberg. Coupling specificity of class I phosphoinositide 3-kinases to G_s-, G_i- and G_q-coupled receptors. The Cell Biology of Inositol Lipids and Phosphatases in honour of Professor Bob Michell, University of Birmingham Medical School, UK, 29.-31. März 2006 (Poster)

Barbara Kurig, Antje Gohla, Bernd Nürnberg. Molecular mechanisms of guanine nucleotide dependent activation of phosphoinositide 3-kinases. Spring Meeting GRK 1089, Bensberg, 9.-10. Juni 2006, (Vortrag)

Barbara Kurig, Elisabeth M. Jeanclos, Antje Gohla, Bernd Nürnberg. Regulation of phosphoinositide 3-kinase γ activity by G_i-, G_s-, and G_q-protein coupled receptors. Kolloquium des SFB 612, Bensberg, 11.-12. Dezember 2006 (Vortrag)

Barbara Kurig, Elisabeth M. Jeanclos, Antje Gohla, Bernd Nürnberg. Regulation der PI3-Kinase γ , eine kardial exprimierte Lipidkinase. Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses, Universität Düsseldorf, 22./23. Juni 2007 (Vortrag)

Barbara Kurig, Elisabeth M. Jeanclos, Antje Gohla, Bernd Nürnberg. Molecular mechanisms of guanine nucleotide dependent phosphoinositide 3-kinase Regulation. Spring Meeting GRK 1089, Münster, 29.-30. Juni 2007 (Vortrag)

Barbara Kurig, Elisabeth Jeanclos, Aliaksei Shymanets, Antje Gohla, Bernd Nürnberg. Active Ras acts as an indispensable adapter and regulator for receptor induced activation of the novel phosphoinositide 3-kinase γ isoform, p110 γ /p87. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on PTEN/PI3 Kinase Pathways in Health & Disease - PTEN Pathways & Targets, Cold Spring Harbor, USA, 5.-9. März 2008 (Poster)

Barbara Kurig, Elisabeth Jeanclos, Aliaksei Shymanets, Antje Gohla, Bernd Nürnberg. (2008). Active Ras acts as an indispensable adapter and regulator for receptor induced activation of the novel phosphoinositide 3-kinase γ isoform, p110 γ /p87. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 377 (Suppl.1), R25

Inga Preuß*, Barbara Kurig*, Joachim Orth, Bernd Nürnberg, Klaus Aktories. (2008). Influence of G $\beta\gamma$ on *Pasteurella multocida* toxin-induced activation of heterotrimeric G-Proteins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 377 (Suppl.1), R26

Meine akademischen Lehrer:

Prof. Dr. Rudolf Bauer
Prof. Dr. Axel Goedecke
Prof. Dr. Helmut Haas
Prof. Dr. Hans-Peter Heinz
Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje
Prof. Dr. Thomas Hohlfeld
Prof. Dr. Regine Kahl
Prof. Dr. Wolfgang Kläui
Prof. Dr. Georg Kojda
Prof. Dr. Uwe Kuckländer
Prof. Dr. Claudia Leopold
Prof. Dr. Bernhard Lippold
Prof. Dr. Hans-Dieter Martin
Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg
Prof. Dr. Claus Passreiter
Prof. Dr. Peter Proksch
Prof. Dr. Peter Ruth
Prof. Dr. Thomas Schmidt
Prof. Dr. Jürgen Schrader
Prof. Dr. Karsten Schrör
Prof. Dr. Dieter Schumacher
Junior Prof. PD. Dr. Nora Urbanetz
Prof. Dr. Artur-Aron Weber
Prof. Dr. Horst Weber
Prof. Dr. Günter Willuhn

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Barbara Kurig
Geburtsdatum/-ort: 02.06.1976 in Rheine (Westfalen)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG

1982 - 1986 Grundschole in Xanten/Birten und Stuttgart/Feuerbach
1986 – 1992 Marienschule Private Realschule für Mädchen Xanten/Rhein
Abschluss: Mittlere Reife
1992 – 1995 Cusanus-Gymnasium Erkelenz
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1995 – 1996 Höhere Handelsschule für Abiturienten

HOCHSCHULSTUDIUM UND WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

04/1996 - 05/2001 **Studium** der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
07/2002 **Approbation** als Apothekerin
11/2002 - 11/2008 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**, Institut für Biochemie und
Molekularbiologie II, Universitätsklinikum Düsseldorf
Ab 16.11.2008 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**, Institut für Pharmakologie und
Toxikologie, Universitätsklinikum Tübingen

PRAKTIKA UND BERUFLICHE TÄTIGKEIT

09/1997 **Famulantin**, Institut für Pharmazeutische Biologie,
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
05/1998 – 06/1998 **Werkstudentin**, Bayer AG, Monheim
08/1999 – 09/1999 **Werkstudentin**, Bayer AG, Leverkusen
02/2000 - 03/2000 **Werkstudentin**, Bayer AG, Leverkusen
06/2001 - 11/2001 **Pharmaziepraktikantin**, Lindopharm GmbH, Hilden

12/2001 - 05/2002 **Pharmaziepraktikantin**, Fürstenwallapotheke, Düsseldorf

08/2002 - 10/2002 **appr. Apothekerin**, Fürstenwallapotheke, Düsseldorf

STIPENDIEN

04/2006 – 06/2007 Stipendiatin des DFG-Graduiertenkollegs 1089
„Proteininteraktionen und -modifikationen im Herzen“

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. Peter Ruth danke ich für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit am Fachbereich Chemie und Pharmazie der Eberhard Karls Universität Tübingen zu vertreten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Elisabeth Jeanclos für die exzellente Ko-Betreuung.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Antje Gohla für die äußerst produktive Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Wiebke Wetzel danke ich für die Einführung in molekularbiologische und zellbiologische Arbeitstechniken.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories, Herrn Dr. Joachim Orth, Institut für Experimentelle & Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Albert Ludwigs Universität Freiburg, und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die interessante und erfolgreiche Kollaboration bedanken.

Herrn Dr. Aliaksei Shymanets, Frau Dr. Mamatha Sauermann und Herrn Prajwal Prajwal bin ich für die sehr gute, kollegiale Zusammenarbeit verbunden und Frau Wibke Ballhorn sowie Frau Ilse Maier möchte ich für die hervorragende technische Unterstützung danken.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und ausgezeichnete Zusammenarbeit bedanken.

Besonders dankbar bin ich meinen Eltern und meiner Großmutter für ihre immerwährende Unterstützung, meiner Schwester Stefanie und vor allem Axel für anregende Diskussionen und moralische Unterstützung, ebenso meiner ganzen Familie und meinen Freunden für ihren Rückhalt.