
INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Allgemeine Prinzipien der zellulären Kommunikation	1
1.2	G-Protein-abhängige Signaltransduktion	3
1.2.1	Aufbau und Funktion von G-Proteinen	3
1.2.1.1	G α -Untereinheit	4
1.2.1.2	G β - und G γ -Untereinheit	7
1.2.2	G $\beta\gamma$ -regulierte Effektoren	11
1.2.2.1	Adenylylcyclasen	12
1.2.2.2	Phospholipasen C- β	12
1.3	PI-3-Kinasen	14
1.3.1	Aufbau und Funktion von PI-3-Kinasen	14
1.3.2	Regulation der Klasse I PI-3-Kinasen durch Zelloberflächen-Rezeptoren	17
1.3.2.1	Klasse I _A PI-3-Kinasen	17
1.3.2.2	Klasse I _B PI-3-Kinasen	19
1.3.3	Proteinkinase-Aktivität der Klasse I PI-3-Kinasen	20
1.3.4	Zelluläre Funktionen der Lipidprodukte von Klasse I PI-3-Kinasen	21
2	FRAGESTELLUNG	24
3	MATERIALIEN	26
3.1	Hersteller und Lieferanten	26
3.2	Chemikalien	26
3.3	Enzyme, Proteine, Peptide und andere biologisch aktive Substanzen	28
3.4	Nukleotide (nicht radioaktiv markiert)	28
3.5	Radioaktiv markierte Substanzen	28
3.6	Zellen, Zellkulturmedien und Zusätze	28
3.7	Proteinstandards	29
3.8	Reinigungs- und Trennmaterialien	29
3.9	Membranen/Filter	29
3.10	Filmmaterial	29

4	METHODEN	31
4.1	Proteinbiochemische Standardmethoden	31
4.1.1	Proteinbestimmung	31
4.1.2	SDS-Gelelektrophorese	31
4.1.3	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	32
4.1.3.1	Coomassie-Färbung	32
4.1.3.2	Silber-Färbung	33
4.1.4	Immunoblot	33
4.1.5	Desorption gebundener Antikörper	35
4.2	Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen	35
4.2.1	Kultivierung von <i>Sf9</i> -Zellen	35
4.2.2	Amplifikation rekombinanter Viren	36
4.2.3	Titerbestimmung von Viruslösungen	36
4.2.4	Infektion von <i>Sf9</i> -Zellen	37
4.3	Reinigung regulatorischer Proteine	37
4.3.1	Reinigung von G-Proteinen	37
4.3.1.1	Reinigung nativer G-Protein-Untereinheiten aus Rinderhirn	37
4.3.1.2	Reinigung rekombinanter G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aus <i>Sf9</i> -Zellen	38
4.3.1.2.1	Zellmembran-Präparation	38
4.3.1.2.2	Affinitäts- und Untereinheitenaustausch-Chromatographie	39
4.3.1.2.3	Anionenaustausch-Chromatographie	39
4.3.1.2.4	Reinigung rekombinanter Hexahistidin-markierter G $\beta_x\gamma_2$ -Komplexe	40
4.3.1.2.5	Integritätsprüfung des G $\beta_5\gamma_2$ -His-Dimers durch Rechromatographie	40
4.3.1.3	Reinigung endogener G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aus <i>Sf9</i> -Zellen	41
4.3.2	Reinigung rekombinanter, cytosolischer PI-3-Kinasen aus <i>Sf9</i> -Zellen	41
4.4	G-Protein-Funktionsbestimmung	42
4.4.1	Bestimmung von GTP γ S-Bindung	42
4.4.2	PTX-vermittelten ADP-Ribosylierung von G α_i -Untereinheiten	43
4.5	PI-3-Kinase-Funktionsbestimmung	43
4.5.1	Bestimmung der enzymatischen Aktivität	43
4.5.1.1	Herstellung der Phospholipid-Vesikel	44
4.5.1.2	Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität	44
4.5.1.3	Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität	45
4.5.2	Untersuchung der Interaktion zwischen G $\beta\gamma$ und PI-3-Kinasen	46
4.5.2.1	Koreinigung von G $\beta\gamma$ mit PI-3-Kinase-Untereinheiten	46
4.5.2.2	Bindungsaffinität von PI-3-Kinase β an Vesikel-assoziiertes G $\beta\gamma$	46

5	ERGEBNISSE	48
5.1	Sensitivität der Klasse I PI-3-Kinasen gegenüber verschiedenen Rezeptorklassen	48
5.2	Strukturelle Determinanten der G$\beta\gamma$-Sensitivität der PI-3-Kinase β und $-\gamma$	51
5.3	Funktion der p101-Untereinheit bei der G$\beta\gamma$-vermittelten Stimulation der PI-3-Kinase γ	53
5.3.1	Bindung der p101- an die p110 γ -Untereinheit der PI-3-Kinase γ	53
5.3.2	Affinität von PI-3-Kinase γ -Untereinheiten für G $\beta\gamma$	54
5.3.3	Mg ²⁺ -Abhängigkeit der G $\beta\gamma$ -vermittelten Stimulation der PI-3-Kinase γ	56
5.3.4	G $\beta\gamma$ -Konzentrations-Abhängigkeit der PI-3-Kinase γ -Stimulation	58
5.4	Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ	62
5.4.1	G $\beta\gamma$ -Sensitivität der Autophosphorylierung	62
5.4.2	Metall-Abhängigkeit der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase γ	64
5.4.3	Einfluß der p101-Untereinheit auf die G $\beta\gamma$ -vermittelte Stimulation der p110 γ -Autophosphorylierung	66
5.5	Wortmannin-Sensitivität der PI-3-Kinase γ	67
5.6	Untersuchung der Gβ-Isoformspezifität der PI-3-Kinase β und $-\gamma$	70
5.6.1	Charakterisierung der endogenen G $\beta\gamma$ -Komplexe aus <i>Sf9</i> -Zellen	70
5.6.1.1	Reinigung von G $\beta\gamma_{Sf9}$	72
5.6.1.2	Massenspektrometrische Charakterisierung von G $\beta\gamma_{Sf9}$	74
5.6.2	Reinigung funktionell aktiver G $\beta_x\gamma_2$ -Isoformen	77
5.6.3	Sensitivität der PI-3-Kinase γ gegenüber G $\beta_{1-3}\gamma_2$ und T _D $\beta\gamma$	79
5.6.3.1	Rolle der Isoprenylierung der G γ -Untereinheit bei der G $\beta\gamma$ -Stimulation der PI-3-Kinase γ	80
5.6.4	Sensitivität der PI-3-Kinase γ gegenüber G $\beta_5\gamma_2$	81
5.6.5	Sensitivität der PI-3-Kinase β gegenüber G $\beta_5\gamma_2$	83
5.6.6	Überprüfung der funktionellen Aktivität der G $\beta_5\gamma_2$ -Komplexe	86
5.6.6.1	Unterstützung der PTX-vermittelten ADP-Ribosylierung von G α_{i1} durch G $\beta_5\gamma_2$	87
5.6.6.2	Aktivierung von Phospholipase C- β -Isoformen durch G $\beta_5\gamma_2$	88
6	DISKUSSION	92
6.1	G$\beta\gamma$-Sensitivität von Klasse I PI-3-Kinasen	92
6.2	Strukturelle Determinanten der G$\beta\gamma$-Sensitivität der PI-3-Kinase β und $-\gamma$	94

6.3	Funktion der p101-Untereinheit bei der G$\beta\gamma$-vermittelten Stimulation der PI-3-Kinase γ	95
6.4	G$\beta\gamma$-Sensitivität der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ	97
6.5	Gβ-Isoformspezifität der PI-3-Kinase β und $-\gamma$	99
6.6	G$\beta_5\gamma_2$ als hochselektiver Modulator von Effektoren	102
7	ZUSAMMENFASSUNG	107
8	LITERATURVERZEICHNIS	109
9	EIGENE PUBLIKATIONEN	127
10	LEBENS LAUF	129
11	DANK	130