

4 *METHODEN*

4.1 *Proteinbiochemische Standardmethoden*

4.1.1 *Proteinbestimmung*

Die Konzentrationen der eingesetzten Proteinlösungen wurden durch verschiedene Methoden bestimmt, die alle auf der Bildung eines farbigen Komplexes in Abhängigkeit vom Proteingehalt beruhen.

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

Als weitere Bestimmungsmethode wurde die Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue herangezogen (siehe 4.1.3.1). Dazu wurden die Proteine SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.1.2) und durch Coomassie-Lösung angefärbt. Die mit 10%-iger Essigsäurelösung entfärbten Gele wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners digitalisiert und mit der Auswertungssoftware TINA 2.09f (Raytest, Straubenhardt) densitometrisch quantifiziert.

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

4.1.2 *SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer relativen Molekülmasse wurde ein von Lämmli (1970) entwickeltes, denaturierendes, diskontinuierliches Elektrophorese-System verwendet. Dazu werden die Proben in Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl, 10 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -ME, 2 % (w/v) SDS und 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Die Spaltung von Disulfidbrücken durch β -Mercaptoethanol verhindert eine Zusammenlagerung einzelner Untereinheiten zu multimeren Proteinen. SDS, ein anionisches, hydrophiles Detergenz, denaturiert die Proteine und verleiht ihnen durch Anlagerung an ihre Oberfläche eine negative Ladung. Dadurch können die Proteine nahezu unabhängig von ihrer

eigentlichen Ladung und Faltung entsprechend ihrer Molmasse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Elektrophorese wurde in einem Puffer aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS durchgeführt. Für die Konzentrierung der Proteine bei einer Spannung von 100 V diente zunächst ein relativ großporiges Sammelgel, während die Auftrennung bei 150 V in einem kleinerporigen Trenngel erfolgte. Ein Verschlussgel verhinderte das Auslaufen der Proben.

	SAMMELGEL	TRENNGEL	VERSCHLUSSGEL
Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	4,5 % (w/v)	10 % (w/v)*	30 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	
APS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	1,5 % (w/v)
TEMED	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	1,5 % (w/v)
Tris/HCl	125 mM, pH 6,8	375 mM, pH 8,8	

*Für eine bessere Auflösung im Bereich von 80 - 200 kDa wurde ein 8 %-iges, im Bereich 10 - 30 kDa entsprechend ein 12 %-iges Trenngel verwendet.

Für die gelelektrophoretische Trennung und Identifikation von G-Protein γ -Untereinheiten wurden kommerzielle Polyacrylamidgele der Fa. Bio-Rad verwendet. Dabei handelt es sich um ein Tris/Tricin/SDS-Gelsystem mit einem kontinuierlichen Polyacrylamidgradienten von 4 - 20 %. Durch die hohe Auflösung solcher Gelsysteme im Molekulargewichtsbereich von < 10 kDa ist es möglich, verschiedene G γ -Isoformen voneinander zu trennen und als separate Proteinbanden zu detektieren. Die Proben wurden in einem mitgelieferten Probenpuffer entsprechend der Anleitung des Herstellers aufgenommen.

4.1.3 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

4.1.3.1 Coomassie-Färbung

Die über SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennten Proteine (4.1.2) konnten durch Färbung mit 1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde mit der Coomassie-Lösung mindestens 20 min gefärbt und anschließend mit einem Gemisch aus 5 % Methanol und 10 % Essigsäure entfärbt, wobei Methanol den Farbstoff aus dem Gel herauslöst und Essigsäure den farbigen Proteinkomplex stabilisiert. Die Proteine waren nach Entfärbung des Gels als blaue Banden sichtbar. Für die kolorimetrische Quantifizierung von Proteinbanden (4.1.1) wurde nur 10 %-ige Essigsäure zum Entfärben eingesetzt.

4.1.3.2 Silber-Färbung

Bei der verwendeten Methode wurde nur das an der Geloberfläche befindliche Protein durch Präzipitation von metallischem Silber als braun- oder schwarz-gefärbte Bande sichtbar gemacht (Exner und Nürnberg, 1999). Hierzu wurde nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (4.1.2) das Gel 20 min in 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure und 0,185 ‰ (v/v) Formaldehyd fixiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min in 50 % (v/v) Ethanol erfolgte eine einminütige Inkubation in 0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$. Anschließend wurde das Gel dreimal für jeweils 30 s in demineralisiertem Wasser gewaschen und 12 min in 0,16 % (w/v) Silbernitrat und 0,274 ‰ (v/v) Formaldehyd inkubiert. Nach zweimaligem kurzen Spülen mit demineralisiertem Wasser wurden die Proteinbanden in 5 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,005 ‰ (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ und 0,148 ‰ (v/v) Formaldehyd unter Sicht entwickelt. Bei ausreichender Färbung der Proteinbanden konnte die Reaktion in 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure und 0,185 ‰ (v/v) Formaldehyd gestoppt werden.

4.1.4 Immunoblot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (4.1.2) wurden durch dieses Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen übertragen (Towbin et al., 1976) und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Leopoldt et al., 1997, Exner und Nürnberg, 1999). Der Proteintransfer (Minigel, 8x10 cm) erfolgte 1 h bei 250 mA mit 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,02 % (w/v) SDS in 20 % (v/v) Methanol. Die Nitrozellulose-Streifen wurden mit Ponceau S-Lösung angefärbt und der überschüssige Farbstoff dann durch Spülung mit demineralisiertem H_2O entfernt. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden dabei durch Bindung des roten Farbstoffs reversibel sichtbar gemacht. Um den Proteinen später eine Molmasse zuordnen zu können, wurde die Position der Standardproteine auf den Membranen markiert. Dann wurden die Membranen bei Raumtemperatur für mindestens 1 h oder über Nacht in einer 10 % igen Lösung von Roti-Block geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluß daran folgte eine 1-stündige Inkubation mit Antiseren (Verdünnungen 1:150 – 1:2000), die gegen bestimmte Peptidsequenzen der nachzuweisenden Proteine gerichtet waren. Die eingesetzten Antikörper-Lösungen und die zur Herstellung verwendeten Peptidsequenzen sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Nach mehrmaligem Waschen der Nitrozellulose-Streifen mit TBST-Puffer wurden diese 1 h mit einem 1:1000 verdünnten Peroxidase-konjugierten Anti-Immunglobulin-Antikörper inkubiert (Anti-Maus-, Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Ziege-IgG). Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden nach erneutem Waschen der Membranen mit TBST-Puffer über die

Peroxidase-Aktivität durch Chemolumineszenz nachgewiesen (ECL-Kit, Amersham Buchler, Braunschweig).

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

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

Tab. 1: Eingesetzte Antikörper zur immunologischen Identifizierung der verwendeten Proteine

Antikörper	Peptidsequenz	Literatur
anti- α_{common} (AS 8)	(C)GAGESGKSTIVKQMK	Schmidt et al., 1991
anti- $\alpha_{\text{q/11}}$ (AS 368)	(C)LQLNLKQLMLQ	Spicher et al., 1994
anti- α_{s} (AS 348)	(C)RMHLRQYELL	Spicher et al., 1994
anti- β_{common} (AS 398)	(C)TDDGMAVATGSWDDSFLLKIWN	Leopoldt et al., 1997
anti- β_1 (AS 28)	(C)CTTTFTGHTG	Hinsch et al., 1989
anti- β_2 (AS 36)	(C)TVGFAGHSG	Hinsch et al., 1989
anti- β_3 (AS 401)	(C)ADVTLAELVSGLEVV	Brunk et al., 1999
anti- β_5 (AS 422)	(C)ATDGLHENETLASLKSC	Brunk et al., 1999
anti- $\gamma_{2/3}$ (AS 292)	(C)SENPFREKKFFC	Dietrich et al., 1992
anti- γ_5 (AS 366)	(C)CGVSSSTNPFRPQKV	Spicher, K., Maier, U. unveröff. Befunde
anti- γ_7 (AS 361)	(C)ASSELMSYCEQHARN	
anti-p110 β	(C)FSFIMPPAMADILDIWAVD	Maier et al., 2000
anti-p101	(C)YERPRRPGGHERRG	Viard et al., 1999

(C) Cys-Rest, der zur Kopplung des Antigens an KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) zusätzlich eingeführt wurde.

4.1.5 Desorption gebundener Antikörper

Um Westernblot-gebundene Proteine nach erfolgter Immunoblot-Analyse (4.1.4) mit weiteren spezifischen Antikörpern detektieren zu können, mußten die gebundenen Antikörper zunächst vollständig entfernt werden (Exner und Nürnberg, 1999). Dieser Vorgang konnte mehrmals wiederholt werden.

Die Nitrozellulose-Membran wurde dazu in Desorptions-Puffer (62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7, 100 mM β -ME, 2 % (w/v) SDS) mindestens 3 h bei 80 °C inkubiert und gelegentlich geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen in TBS-Tween 20 für jeweils 10 min wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit einer Lösung von 10 % (v/v) Roti-Block in Wasser abgesättigt. Die Immunoblot-Analyse wurde anschließend wie unter 4.1.4 beschrieben durchgeführt.

4.2 Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen

Eine der am häufigsten verwendete Insektenzelllinie zur Expression rekombinanter Säuger-Proteine sind *Sf9*-Zellen. Dabei handelt es sich um Ovarienzellen von *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*). Für die Expression von rekombinanten Proteinen werden diese Zellen mit lytischen Baculoviren infiziert. Dies sind doppelsträngige zirkuläre DNA-Viren, die bevorzugt Insektenzellen befallen. Der Vorteil der Expression von Proteinen in *Sf9*-Zellen gegenüber Bakterienzellen ist die korrekte posttranslationale Prozessierung und Faltung der exprimierten Proteine, was für Funktionsuntersuchen von Säugerproteinen wichtig ist. Gegenüber Säuger-Transfektions-Systemen haben *Sf9*-Zellen den Vorzug, daß man in ihnen sehr leicht auch größere Mengen an rekombinanten Proteinen exprimieren kann, da sie Verdopplungszeiten von weniger als einem Tag aufweisen und darüber hinaus große Volumina in Suspension kultiviert werden können. Die Expression von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen wurde in Anlehnung an Methoden der Laborhandbücher von King und Possee (1992) bzw. O'Reilly und Mitarbeiter (1992) durchgeführt.

4.2.1 Kultivierung von *Sf9*-Zellen

Sf9-Zellen wurden sowohl adhärent (Monolayer) als auch in Suspension im Brutschrank bei 27 °C ohne CO₂-Begasung kultiviert. Für die Monolayer-Aufzucht in Zellkulturschalen (175 cm²) wurde TC100- oder TNM-FH-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Antibiotika-Zusätzen (Penicillin/Streptomycin) verwendet. Die Zellen in Suspensionskultur

wurden in dem gleichen Medium gehalten. Es wurde jedoch mit 1 % Lipid Medium Supplement ergänzt, um die Zellmembranen gegen die Scherkräfte in der Suspensionskultur widerstandsfähiger zu machen.

Zellen in Monolayer-Kultur wurden abhängig von der Zelldichte alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:4 umgesetzt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und durch neues ersetzt. Durch Klopfen wurden die Zellen abgelöst, resuspendiert und anschließend auf zwei bis vier neue Zellkulturschalen verteilt. Schüttelkulturen wurden in einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml gestartet und durch regelmäßiges Verdünnen mit frischem Medium bis zu einer Zelldichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml gehalten. Unter diesen Umständen sollte sich die Zahl der *Sf9*-Zellen innerhalb von 18-24 Stunden verdoppeln.

4.2.2 Amplifikation rekombinanter Viren

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

4.2.3 Titerbestimmung von Viruslösungen

Es wurden $0,8-1,0 \times 10^6$ Zellen in Petrischalen (10 cm^2) ausgesetzt und mindestens 30 min bis zur Adhärenz der Zellen gewartet. Eine in der Zwischenzeit hergestellte Verdünnungsreihe der virushaltigen Überstände (4.2.2) setzte sich wie folgt zusammen: $1:10^5$, $1:10^6$ und $1:10^7$. Nachdem nicht adhärente Zellen abgesaugt waren, wurden die adhären Zellen mit $800 \mu\text{l}$ der jeweiligen Virus-Verdünnung überschichtet und eine Stunde bei 27°C inkubiert. Eine sterile Agarose-Lösung mit niedrigem Schmelzpunkt (2,5 % (w/v) "low-melting agarose" in Wasser) wurde durch Erwärmen verflüssigt und nach Temperieren auf 37°C mit Medium im Verhältnis 1:2 gemischt. Der virushaltige Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 2,5 ml der Agarose/Medium-Mischung überschichtet. Um ein Austrocknen während der nun folgenden 7-tägigen Inkubationszeit bei 27°C zu verhindern, wurden die Ansätze mit 2 ml Medium überschichtet. Während dieser Zeit vermehrten sich die Viren und bildeten - im Falle einer ausreichend großen Verdünnung des Virusüberstandes - gegeneinander abgrenzbare sog. Plaques, die unter dem Mikroskop in diffusem Seitenlicht sichtbar waren. Ein Plaque bezeichnet dabei eine Gruppe von Viren, die aus einem einzelnen Virus hervorgegangen ist.

Diese Plaques wurden nun für die Bestimmung des Virustiters herangezogen. Dieser wird als “plaque forming units” (pfu)/ml angegeben und entspricht der Konzentration der Viren in der entsprechenden Lösung. Er berechnet sich wie folgt:

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

Durch Kenntnis des Titers ist es möglich, die Infektion der *Sf9*-Zellen in einem bestimmten Virus-Zell-Verhältnis durchzuführen. Dieses Verhältnis wird als “multiplicity of infection” (MOI) bezeichnet und gibt die pfu pro Zelle an. Für die Gewinnung rekombinanter Säuger-Proteine im Rahmen dieser Arbeit kam üblicherweise eine MOI von 1 zum Einsatz.

4.2.4 Infektion von *Sf9*-Zellen

Zur Gewinnung präparativer Mengen rekombinanter Proteine wurden *Sf9*-Zellen in Schüttelkultur bei einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit den berechneten Mengen der entsprechenden Viruslösungen infiziert. Bei Koinfektionen von mehreren G-Protein- bzw. PI-3-Kinase-Untereinheiten wurde jeder einzelne Virus mit einer MOI von 1,0 zugegeben. Nach einer definierten Infektionszeit (36 bis 60 h), die von der Zielsetzung der folgenden Untersuchungen abhing, wurden die Zellen abzentrifugiert und mit eiskaltem PBS (12 mM Na_2HPO_4 , 4 mM KH_2PO_4 , 120 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen. Die so erhaltenen Zellsedimente wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

4.3 Reinigung regulatorischer Proteine

4.3.1 Reinigung von G-Proteinen

4.3.1.1 Reinigung nativer G-Protein-Untereinheiten aus Rinderhirn

Native $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexe wurden aus Rinderhirnmembranen durch ein sequentielles, mehrstufiges, säulenchromatographisches Verfahren isoliert (Sternweis und Pang, 1990; Codina et al., 1991). Die Abtrennung der $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten von den $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexen erfolgte mit einer Heptylamin-Sepharose-Säule in Anwesenheit von AlF_4^- . Die $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexe wurden

dann durch eine Mono Q-FPLC-Säule (Pharmacia) gereinigt (Nürnberg et al., 1994, Exner et al. 1999). Die nach der Reinigung finale Pufferzusammensetzung der für die PI3K- und PLC-Versuche (siehe 4.5) eingesetzten G $\beta\gamma$ -Präparation (10 mg/ml) war wie folgt: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 190 mM NaCl, 1 mM EDTA, 11 mM CHAPS, 0,1 % Lubrol PX und 20 mM β -ME. Die G $\beta\gamma$ -Untereinheiten wurden durch ihre Immunoreaktivität (4.1.4) identifiziert und durch die Methode nach Lowry et al. (1951) bzw. Färbung der G β -Untereinheit nach elektrophoretischer Auftrennung mit anschließender Coomassie-Färbung (4.1.1) quantifiziert. Die gereinigten Proteine wurden bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert.

4.3.1.2 Reinigung rekombinanter G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aus Sf9-Zellen

Die Reinigung rekombinanter Säuger-G $\beta\gamma$ -Komplexen basierte auf einer kombinierten Affinitäts- und Untereinheiten austausch-Chromatographie, die von Kozasa und Gilman (1995) entwickelt wurde. Die Methode beruht auf der Koinfektion der gewünschten G $\beta\gamma$ -Kombination mit einer G α -Untereinheit, die ein Hexahistidin-Peptidmotiv trägt. Das sich in den Sf9-Zellen bildende heterotrimere G-Protein wird über die Hexahistidin-Markierung an einer Ni²⁺-NTA-Agarose-Matrix immobilisiert, so daß kontaminierende Proteine leicht durch Waschen entfernt werden können. Schließlich können die gewünschten G $\beta\gamma$ -Dimere durch Aktivierung des fixierten G-Proteins mit AMF-haltigem Puffer eluiert werden, wohingegen die G α -Untereinheit an der Matrix gebunden bleibt. Für die Reinigung von G $\beta\gamma$ -Dimeren aus einer Schüttelkulturmenge von 500 ml wurde wie folgt verfahren (Leopoldt et al., 1998, Maier et al., 1999, 2000).

4.3.1.2.1 Zellmembran-Präparation

Das aus infizierten Sf9-Zellen bestehende Zellsediment (4.2.4) wurde in eiskaltem Bombenpuffer (50 mM HEPES, pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 10 mM β -ME, 110 mM NaCl, 10 μ M GDP, 0,2 mM Pefabloc SC, 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Trypsin-Inhibitor und 10 μ g/ml TPCK) resuspendiert und anschließend durch N₂-Überdruck in einer Parr-Bombe (25 bar, 4 °C, 30 min) aufgeschlossen. Das so erhaltene Zellysate wurde bei 800 x g für 2 min zentrifugiert, um die Zellkerne abzutrennen. Die Membranen wurden durch einen anschließenden Ultrazentrifugationsschritt erhalten (80.000 x g, 4 °C, 30 min). Das Membransediment von je 750 x 10⁶ Zellen wurde zunächst in 1 ml Waschpuffer (50 mM HEPES, pH 8,0, 3 mM MgCl₂, 10 mM β -ME, 50 mM NaCl, 10 μ M GDP, 0,2 mM Pefabloc SC, 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Trypsin-Inhibitor und 10 μ g/ml TPCK) durch mehrmaliges

Passieren durch Injektionsnadeln der Größe 22 G gefolgt von 26 G homogenisiert und anschließend auf das siebenfache Volumen aufgefüllt. In diesem Stadium war es möglich, die Membran-Suspension mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockzufrieren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C zu lagern.

4.3.1.2.2 Affinitäts- und Untereinheitenaustausch-Chromatographie

Die membranständigen Proteine wurden nun durch 1 % Natriumcholat unter Rühren (4 °C , 1 h) solubilisiert. Der so erhaltene „Cholat-Extrakt“ wurde durch Ultrazentrifugation ($100.000 \times g$, 4 °C , 1 h) geklärt und nach Verdünnen auf 35 ml mit Puffer A (20 mM HEPES, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 20 mM Imidazol, 0,5 % (w/v) Lubrol PX, 10 mM β -ME, 10 μM GDP) auf eine 1 ml Ni^{2+} -NTA-Agarose-Säule, die zuvor mit Puffer A äquilibriert worden war, geladen. Nach intensivem Waschen mit Puffer A (10 Säulenvolumina) konnten die $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexe mit Puffer B (20 mM HEPES, pH 8,0, 50 mM NaCl, 50 μM AlCl_3 , 50 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 0,9 % (w/v) Natriumcholat, pH 8,0, 10 mM β -ME, 10 μM GDP) eluiert werden.

4.3.1.2.3 Anionenaustausch-Chromatographie

Üblicherweise wurde die Anionenaustausch-Chromatographie ab einer Proteinmenge durchgeführt, die einem Zellkulturvolumen von mindestens 2000 ml entsprach. Alle Eluat-Fractionen der Affinitäts- und Untereinheitenaustausch-Chromatographie, die mindestens 10 % der $\text{G}\beta\gamma$ -Menge der Peakfraktion besaßen, wurden vereinigt, zur Reduzierung der Cl^- -Konzentration auf das 3-fache Volumen mit Puffer C (20 mM HEPES, pH 8,0, 50 μM AlCl_3 , 5 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 11 mM CHAPS und 20 mM β -ME) verdünnt und auf eine mit 1,5 ml Resource 30-Material gepackte Säule geladen, die zuvor mit Puffer C äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit 5 Säulenvolumina Puffer C wurden dann die Proteine entsprechend ihrer steigenden negativen Nettoladung mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten (20-200 mM in Puffer C, $\Delta c_{(\text{NaCl})}/\Delta V = 4\text{ mM/ml}$) eluiert und fraktioniert.

Die Analyse des Säulenprofils erfolgte durch Proteinfärbung. Hierzu wurden 50 μl jeder zweiten Fraktion auf einer Mikrotiterplatte mit 250 μl Bradford-Reagenz (0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 4,7 % (v/v) Ethanol und 8,5 % (v/v) Phosphorsäure) versetzt und ca. 5-10 min inkubiert. Die relative Abschätzung der Proteinkonzentration erfolgte durch Messung der Extinktion mit einem Photometer bei 620 nm. Da diese Färbemethode sehr empfindlich auf die Anwesenheit von Detergenzien reagiert, wurde sie nicht zur Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration herangezogen. Die Peakfraktionen wurden mit Hilfe von Centricon-Röhrchen (Trenngrenze: 10 kDa) in Puffer D (20 mM HEPES, pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM β -ME und 0,9 % (w/v) Natriumcholat) umgepuffert und auf

5-10 % des Ausgangsvolumens konzentriert. Die Reinheit und Konzentration der so erhaltenen $G\beta_x\gamma_2$ -Lösungen wurde durch SDS-gelelektrophoretische Auftrennung mit nachfolgender Coomassie-Färbung bestimmt (4.1.1). Sofern die Proteine nicht unmittelbar zum Einsatz kamen, wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

4.3.1.2.4 *Reinigung rekombinanter Hexahistidin-markierter $G\beta_x\gamma_2$ -Komplexe*

Da $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexe durch das oben beschriebene Verfahren aufgrund einer verminderten Affinität von $G\beta_5$ zur $G\gamma$ -Untereinheit nicht zugänglich waren, mußte hier ein einfaches, affinitätschromatographisches Verfahren angewandt werden (Maier et al., 2000)

Sf9-Zellen wurden, wie in 4.2.4 beschrieben, mit Baculoviren infiziert, die für $G\beta_5$ und ein Hexahistidin-markiertes $G\gamma_2$ ($G\gamma_2$ -His) kodierte. Aus den präparierten Membransuspensionen (4.3.1.2.1) wurden die enthaltenen Proteine im Falle des $G\beta_5\gamma_2$ -His mit 0,5 % Lubrol PX und im Falle des $G\beta_1\gamma_2$ -His mit 0,9 % Natriumcholat solubilisiert (4 °C , 1 h). Die durch Ultrazentrifugation ($100.000 \times g$, 1 h) geklärten Extrakte wurden auf das 5-fache Volumen mit Puffer A (4.3.1.2.2) verdünnt, auf eine Ni^{2+} -NTA-Agarose-Säule (1 ml Säulenmaterial/ 750×10^6 Zellen) geladen und mit Puffer A gewaschen (10 Säulenvolumina). Um die gebundenen endogenen *Sf9*- $G\alpha$ -Untereinheiten zu entfernen, wurde mit 10 Säulenvolumina AMF-haltigem Puffer (20 mM HEPES, pH 8,0, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$, 0,9 % Natriumcholat (für $G\beta_1\gamma_2$ -His) bzw. 0,05 % Lubrol PX (für $G\beta_5\gamma_2$ -His), 10 mM β -ME, 10 μ M GDP, 30 μ M $AlCl_3$ und 10 mM NaF) gewaschen. Anschließend wurden die rekombinanten $G\beta\gamma$ -Komplexe mit einem Imidazol-Stufengradienten (20-150 mM, 1 Stufe \cong 10 mM) in Puffer F (20 mM HEPES, pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,5 % Natriumcholat (für $G\beta_1\gamma_2$ -His) bzw. 0,37 % Oktylthioglukosid (für $G\beta_5\gamma_2$ -His) und 10 mM β -ME) eluiert.

Die erhaltenen Proteine wurden durch ihre Immunoreaktivität (4.1.4) identifiziert und durch Coomassie-Färbung nach gelelektrophoretischer Auftrennung (4.1.1) quantifiziert.

4.3.1.2.5 *Integritätsprüfung des $G\beta_5\gamma_2$ -His-Dimers durch Rechromatographie*

Um die Stabilität der $G\beta_5\gamma_2$ -His-Dimere im Elutionspuffer F (4.3.1.2.4) zu überprüfen, wurden die gereinigten Komplexe an Ni^{2+} -NTA-Agarose rechromatographiert. Dazu wurde eine repräsentative Fraktion der Imidazol-Elution mit Puffer A (4.3.1.2.2, ohne Imidazol) auf das 10-fache Volumen verdünnt, um die Imidazol-Konzentration zu senken, so daß ein erneutes Beladen einer Ni^{2+} -NTA-Agarose-Säule (1 ml Säulenmaterial) möglich war. Nach dem Laden der Säule wurde mit 5 Säulenvolumina Puffer A gewaschen, um im Anschluß die gebundenen Protein zu eluieren (Puffer F mit 0,37 % Oktylthioglukosid und 150 mM Imidazol). Die reeluierten Proteinmengen wurden durch Coomassie-Färbung (4.1.1) quantifiziert.

4.3.1.3 Reinigung endogener G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aus Sf9-Zellen

Die Gewinnung der endogenen Sf9-G-Proteine erfolgte prinzipiell nach dem gleichen Verfahren wie die Reinigung der rekombinanten Säuger-G-Proteine. Um endogene Insekten-G $\beta\gamma$ -Komplexe zu erhalten, wurden die Sf9-Zellen mit einer Hexahistidin-markierten G α_{i1} -Untereinheit (G α_{i1} -His) infiziert. Da der Expressionsgrad der endogenen G-Proteine mit steigender Infektionszeit stark abnimmt (Leopoldt et al., 1997), wurde die Infektion nach 48 h gestoppt. Die sich bildenden heterotrimeren G-Proteine aus rekombinantem G α_{i1} -His und endogenem G $\beta\gamma$ -Anteil wurden wie in 4.3.1.2 beschrieben aufgereinigt. Die G-Protein-Untereinheiten wurden durch ihre Immunreaktivität (4.1.4) identifiziert und durch Coomassie-Färbung (4.1.1) quantifiziert.

4.3.2 Reinigung rekombinanter, cytosolischer PI-3-Kinasen aus Sf9-Zellen

Zur Reinigung rekombinanter PI-3-Kinasen wurden Sf9-Zellen mit Viren, die für die entsprechenden Untereinheiten kodieren, wie in 4.2.4 beschrieben infiziert. Die Reinigung erfolgte affinitätschromatographisch entweder über Ni²⁺-NTA-Agarose (im Falle von Hexahistidin-markierten Untereinheiten) oder über eine Glutathion-Sepharose-Matrix, wobei bei letzterem Verfahren die Bindung der gewünschten Proteine über die Fusion einer Untereinheit mit einer Glutathion-S-Transferase (GST) erreicht wurde (Leopoldt et al., 1998, Viard et al., 1999, Maier et al., 1999, 2000).

Zur Reinigung dieser GST-markierten Proteine wurde das nach der Infektion erhaltene Zellsediment (üblicherweise von 150×10^6 Zellen) in 2 ml eiskaltem Puffer G (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, jeweils 10 μ g/ml von TPCK, Benzamidin bzw. Leupeptin und 0.2 mM Pefabloc[®] SC) resuspendiert und durch Homogenisieren mit einer Injektionskanüle (26 G) aufgeschlossen. Die cytosolische wurde von der partikulären Fraktion durch Ultrazentrifugation ($100.000 \times g$, 4 °C, 50 min) getrennt und anschließend für 2-3 h mit der Glutathion-Sepharose-Suspension (500 μ l/ 150×10^6 Zellen), die zuvor mit Puffer G äquilibriert worden war, unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Sepharose ($1000 \times g$, 2 min) wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen mit Puffer H (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM DTT) entfernt. Die gebundenen GST-Fusionsproteine konnten so bis zur weiteren Verwendung in Lagerpuffer (40 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % Glycerin und 1,57 mg/ml Benzamidin) ca. 2 Wochen bei -20 °C aufbewahrt werden. Zur Elution der Proteine wurde mit Puffer H gewaschen und dann mit 10 mM Glutathion in Puffer H inkubiert (4 °C, 1-2 h). Dabei wurden die GST-Fusionsproteine durch das freie Glutathion

von ihren Bindungsstellen an der Glutathion-Sepharose verdrängt und somit freigegeben. Nach Abzentrifugieren der Sepharose konnte der Überstand als PI-3-Kinase-enthaltende Fraktion in den entsprechenden Versuchen eingesetzt werden.

Zur Reinigung von Hexahistidin-markierten PI-3-Kinasen wurden die infizierten Zellen in Puffer I (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM β -ME, 20 mM Imidazol, jeweils 10 μ g/ml von TPCK, Benzamidin bzw. Leupeptin und 0,2 mM Pefabloc[®] SC) wie oben beschrieben lysiert und zentrifugiert. Die cytosolische Fraktion wurde dann auf eine Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule (0,5 ml Säulenmaterial/150 x 10⁶ Zellen) geladen und mit Puffer I gewaschen (5 Säulenvolumina) Die Elution erfolgte mit 150 mM Imidazol in Puffer I. Die erhaltenen Proteine wurden durch ihre Immunoreaktivität (4.1.4) identifiziert und durch Coomassie-Färbung nach gelelektrophoretischer Auftrennung (4.1.1) quantifiziert.

4.4 *G-Protein-Funktionsbestimmung*

4.4.1 *Bestimmung der GTP γ S-Bindung*

Zum Nachweis und zur Quantifizierung von G α -Untereinheiten wurde deren Fähigkeit zur Bindung von ³⁵S-GTP γ S ausgenutzt (Nürnberg et al., 1994). Dazu wurden 20 μ l einer G α -haltigen Lösung mit 10 μ l Verdünnungspuffer (1 mM EDTA, 20 mM Hepes, pH 8,0, 1 mM DTT, 0,1 % Lubrol PX) und 30 μ l Reaktions-Mix (50 mM Hepes, pH 8,0, 200 mM NaCl, 60 mM MgSO₄, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 μ M GTP γ S sowie 0,1 μ Ci ³⁵S-GTP γ S) versetzt. Bei der Untersuchung von Membranproteinen wurden 3 μ l Membransuspension mit 27 μ l Verdünnungspuffer und 30 μ l Reaktions-Mix versetzt. Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde dem Reaktions-Mix unmarkiertes GTP γ S (2 mM) oder GTP (5 mM) zugesetzt. Die Proben wurden 60 Minuten bei 32 °C inkubiert und anschließend einer Vakuum-Schnellfiltration durch Nitrozellulose-Filter unterworfen. Die mit Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 20 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) zweimal gespülten Filter wurden in Zählgefäße überführt, mit 5 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt, und die Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{fmol GTP}\gamma\text{S} \times \text{mg}^{-1} = \frac{\text{cpm}_{\text{Ansatz}} \times \text{fmol GTP}\gamma\text{S}_{\text{eingesetzt}}}{\text{cpm}_{\text{Vorlage}} \times \text{mg Membranprotein}_{\text{Ansatz}}}$$

Die spezifische GTP γ S-Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen von der totalen GTP γ S-Bindung erhalten.

4.4.2 PTX-vermittelte ADP-Ribosylierung von G α_1 -Untereinheiten

Zur ADP-Ribosylierung von bovinen G α_1 -Untereinheiten wurden 5 μ g des Toxins aus *Bordetella pertussis* in 50 μ l Inkubationspuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM ATP, 20 mM DTT) für 30 min bei 37 °C präaktiviert. Nach Zugabe von 450 μ l Verdünnungspuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) BSA, 20 mM DTT) wurden 10 μ l dieser Lösung mit den zu untersuchenden Proben (150 nM G α_1 und variable Mengen G $\beta\gamma$) versetzt. Mit dem Hinzufügen von 30 μ l Reaktionspuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 5 mM ATP, 1 mM GTP, 0,3 % (v/v) Lubrol PX, 10 mM Thymidin, 0,6 μ g DNAase, 1 μ M [α - 32 P]NAD (1 μ Ci/Ansatz)) begann die Inkubation bei 30 °C, die eine Markierung der G α -Untereinheit mit 32 P-ADP-Ribose durch Pertussistoxin (PTX) bewirkte (Nürnberg, 1997, 2000). Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l zweifach konzentriertem Probenpuffer nach Lämmli gestoppt. 30 μ l dieser Lösung wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt (4.1.2) und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (4.1.4). Die quantitative Auswertung der getrockneten Blot-Streifen erfolgte mit einem Phosphor-Imager (BAS 1500 Fuji-Imager der Firma Raytest, Straubenhardt).

4.5 PI-3-Kinase-Funktionsbestimmung

4.5.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Klasse I PI-3-Kinasen zeigen sowohl eine Lipid- als auch eine Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität (Hunter, 1995). Zur Bestimmung dieser beiden Enzymaktivitäten wurden unterschiedliche Verfahren angewandt.

Zur Analyse der Lipidkinase-Aktivität wurde die Fähigkeit der vier Vertreter der Klasse I PI-3-Kinasen untersucht, Phosphoinositide in der 3'-Position des Inositolrings unter Übertragung der γ -ständigen Phosphatgruppe von [γ - 32 P]ATP zu phosphorylieren (Stoyanov et al., 1995). Für vergleichende Untersuchungen aller 4 Isoformen wurde PI-4,5-P $_2$ als Substrat verwendet und somit 32 P-markiertes PI-3,4,5-P $_3$ als Produkt isoliert und quantifiziert (siehe 4.5.1.2). Das Verhalten gegenüber verschiedenen Phospholipid-Substraten (PI und PI-4,5-P $_2$) wurde für die G $\beta\gamma$ -sensitiven PI-3-Kinasen β und γ zusätzlich näher untersucht. Die dabei entstandenen 3'-phosphorylierten Produkte konnten durch ihr unterschiedliches

Laufverhalten nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung identifiziert und quantifiziert werden (siehe 4.5.1.2).

Zur Messung der Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ wurde ein eigenes Verfahren entwickelt, bei dem Phospholipid-Vesikel verwendet wurden, die keine Lipid-Substrate enthielten (Maier et al., 1999). Die Auftrennung der gebildeten ^{32}P -markierten Produkte erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese (siehe 4.5.1.3 bzw. 4.1.2).

4.5.1.1 Herstellung der Phospholipid-Vesikel

PI-4,5- P_2 -enthaltende Phospholipid-Vesikel wurden unmittelbar vor dem Experiment hergestellt, da eine Lagerung infolge von Instabilitäten zu mehreren Produktflecken nach chromatographischer Trennung führte. Lipid-Substrat-freie (siehe 4.5.1.3) oder PI-enthaltende Vesikel konnten mehrere Tage bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden (Leopoldt et al., 1998).

Zur Herstellung wurden 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Chloroform ausgespült und die folgenden Lipid-Lösungen in den angegebenen Mengen gemischt: 22,5 μl Phosphatidylethanolamin (10 mg/ml), 21 μl Phosphatidylserin (10 mg/ml), 9,6 μl Phosphatidylcholin (10 mg/ml), 10,5 μl Sphingomyelin (2 mg/ml) und für Lipidkinase-Aktivitäts-Untersuchungen zusätzlich 30 μl PI-4,5- P_2 (1 mg/ml) oder 20 μl PI (10 mg/ml). Das Gemisch wurde dann mit Hilfe eines N_2 -Stroms bis zur Trockene eingeengt und der entstandene Lipidfilm anschließend in 900 μl Vesikelpuffer (40 mM Hepes, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM β -Glycerophosphat und 0-10 mM MgCl_2 bzw. MnCl_2) aufgenommen. Die Eppendorfgefäße wurden solange im Ultraschallbad bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich der Lipidfilm vollständig von der Gefäßwandung unter Bildung einer leicht trüben Suspension gelöst hatte.

Zur Untersuchung der Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} -Abhängigkeit der Lipid- und Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ wurden für jede der angegebenen Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} -Konzentrationen gesonderte Lipid-Substrat-Vesikel hergestellt.

4.5.1.2 Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität

Die PI-3-Lipidkinase-Aktivität wurde in einem Reaktions-Volumen von 50 μl bestimmt (Viard et al., 1999, Maier et al., 1999). Dazu wurden die Phospholipid-Vesikel (30 μl ; 320 μM Phosphatidylethanolamin, 300 μM Phosphatidylserin, 140 μM Phosphatidylcholin, 30 μM Sphingomyelin und entweder 300 μM PI oder 40 μM PI-4,5- P_2) mit 3 μl BSA (1 %)

und maximal 5 μ l der jeweiligen Stimuli (G β γ -Komplexe und/oder p85-Bindungspeptid) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Für die Messung der G β γ -modulierten Aktivitäten wurde sichergestellt, daß die jeweiligen G β γ -Trägerpuffer die basale Enzymaktivität nicht hemmten. Darüber hinaus wurden die einzelnen Versuchsansätze einer G β γ -Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Hilfe von G β γ -Trägerpuffer auf die gleiche Detergenz-Konzentration eingestellt. Anschließend wurden 2 μ l der jeweiligen Enzyme (2-10 ng für PI-3-Kinase γ bzw. 20–100 ng für die PI-3-Kinase α , β und δ) zugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Für Inhibitionsmessungen mit Wortmannin wurde diese Lipid-Vesikel/Enzym-Mischung anstatt auf Eis für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die eigentliche Phosphorylierungsreaktion wurde dann durch Zugabe von 10 μ l Reaktionspuffer (40 mM Hepes, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM β -Glycerophosphat, 0,1 % BSA, 40 μ M ATP, 1 μ Ci [γ -³²P]ATP und 0-10 mM MgCl₂ bzw. MnCl₂) gestartet und nach 15 min Inkubationszeit bei 37 °C oder 20 min bei 30 °C durch Zugabe von 150 μ l 1 N HCl gestoppt.

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden nun zur Vermeidung von hydrolytischen Dephosphorylierungen auf Eis durchgeführt. Die Extraktion der Lipide erfolgte mit 500 μ l Chloroform/Methanol (1:1) durch Vortexen (30 s), wobei die Phasen durch Zentrifugation (1000 x g, 1 min, 4 °C) wieder getrennt wurden. Von der unteren organischen Phase wurden 150 μ l abpipettiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in welchem 150 μ l 1 N HCl vorgelegt waren. Der Waschschrift wurde noch einmal wiederholt und schließlich wurde die organische Phase der dünnschichtchromatographischen Trennung unterworfen.

Hierzu wurde eine 20x20 cm Dünnschichtplatte (Kieselgel 60) mit Kaliumoxalat (1 % in 40 % Methanol) vorentwickelt und anschließend zunächst an der Luft und unmittelbar vor der Verwendung für mindestens 1 h bei 80 °C getrocknet. Von der gewaschenen organischen Phase wurden 40-100 μ l auf die Platte aufgetragen und mit einem Gemisch aus 35 ml 2 N Essigsäure und 65 ml n-Propanol entwickelt (2,5 h, ca. 15 cm). Die Platten wurden mit einem Fön getrocknet und autoradiographisch mit Hilfe eines Phosphor-Imagers ausgewertet.

4.5.1.3 Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität

Die Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ erfolgte prinzipiell wie die Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität (4.5.1.2). Die Phospholipid-Vesikel wurden ohne Zusatz von Substraten, wie PI oder PI-4,5-P₂ eingesetzt und das Proben-Volumen betrug 25 μ l (Maier et al., 1999, 2000).

Dazu wurden 15 μ l Phospholipid-Vesikel mit 1,5 μ l BSA (1%) und maximal 2,5 μ l Stimuli (G β γ -Komplexe und/oder p85-Bindungspeptid) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 20-50 ng PI-3-Kinase γ (1 μ l) zugegeben und für weitere

10 min auf Eis inkubiert. Die Angleichung der G β γ -Puffermengen erfolgte analog zur Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität. Nach Zugabe von 5 μ l Reaktionspuffer (wie in 4.5.1.2, jedoch 2 μ Ci [γ -³²P]ATP) wurde der Ansatz für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 25 μ l eiskaltem, zweifach konzentriertem Probenpuffer nach Lämmli (4.1.2) durch intensives Mischen gestoppt. 30 μ l dieser Lösung wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt (10 %iges Trenngel, 4.1.2) und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (4.1.4). Die quantitative Auswertung der getrockneten Blot-Streifen erfolgte mit einem Phosphor-Imager.

4.5.2 Untersuchung der Interaktion zwischen G β γ und PI-3-Kinasen

4.5.2.1 Koreinigung von G β γ mit PI-3-Kinase-Untereinheiten

Die Koreinigung von G β γ mit GST-fusionierten PI-3-Kinase γ -Untereinheiten erfolgte ähnlich wie die Aufreinigung der PI-3-Kinasen zur enzymatischen Analyse (Leopoldt et al., 1998). Je 150 x 10⁶ Sf9-Zellen wurden mit Viren, die für G β γ , G γ 2 und die GST-fusionierte katalytische (p110 γ -GST) bzw. nicht-katalytische (p101-GST) Untereinheit der PI-3-Kinase γ kodierten, koinfiziert (4.2.4) und nach 60 h aufgearbeitet. Im Unterschied zu 4.3.2 wurde das erhaltene Lysat vor der Ultrazentrifugation mit 0,5 % Lubrol PX und 10 μ M GTP γ S für 30 min gerührt. Nach Beladen und Waschen der Glutathion-Sepharose (300 μ l) wurde etwa die Hälfte der Matrix mit dem gleichen Volumen von 10 mM Glutathion in Puffer H (siehe 4.3.2) eluiert. Eluat und Lysat wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt (10 %iges Trenngel; 4.1.2) und durch Silberfärbung (4.1.3.2) bzw. Immunoblot-Analyse (4.1.4) mit spezifischen Antikörpern gegen G β , p110 γ , und GST analysiert.

4.5.2.2 Bindungsaffinität von PI-3-Kinase β an Vesikel-assoziiertes G β γ

Die Untersuchung der Assoziation von PI-3-Kinase β und G β γ an Phospholipid-Vesikeln wurde analog zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität durchgeführt (4.5.1.2, Maier et al., 2000). 30 μ l PI-4,5-P₂-enthaltende Phospholipid-Vesikel wurden mit 3 μ l BSA (1 %) und 5 μ l G β γ _{2-His} bzw. G β γ _{2-His} gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2 μ l PI-3-Kinase β (100 ng) zugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10 μ l Reaktionspuffer (siehe 4.5.1.2, ohne [γ -³²P]ATP) wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt (2 min) und anschließend zentrifugiert (1000 x g, 4 °C, 2 min). Der Überstand wurde vom Lipidsediment abpipettiert und mit 50 μ l

zweifach konzentriertem Probenpuffer nach Lämmli (4.1.2) versetzt, während zur Auflösung des Lipidsediments 100 μ l einfach konzentrierter Probenpuffer verwendet wurde. Gleiche Mengen (30 μ l) vom Überstand und Lipidsediment in Probenpuffer wurden nun SDS-gelelektrophoretisch (4.1.2, 10 %-iges Trenngel) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran überführt (4.1.4). Die Proteine wurden durch spezifische Antikörper detektiert und die Stärke des Signals mit Hilfe eines LAS-1000 Chemilumineszenz-Detekors (Raytest, Straubenhardt) quantifiziert.