

**Untersuchungen zur Regulation von  
Klasse I Phosphoinositid-3-Kinasen *in vivo***

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**

**Carsten Brock  
aus Berlin**

**Berlin 2002**

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Hucho  
Institut für Biochemie  
Freie Universität Berlin  
Thielallee 63  
14195 Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg  
Institut für Physiologische Chemie II  
Klinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Universitätsstraße 1  
Gebäude 22.03  
40225 Düsseldorf

Tag der Disputation: 13.02.2003

---

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	1
<b>1.1</b>	<b>Allgemeine Prinzipien der zellulären Signalverarbeitung</b>	1
<b>1.2</b>	<b>Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion</b>	1
1.2.1	Signaltransduktion durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen	2
1.2.2	Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und heterotrimere G-Proteine	4
1.2.2.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und heterotrimere G-Proteine	4
1.2.2.2	Signaltransduktion durch G $\alpha$ -Untereinheiten	9
1.2.2.3	Signaltransduktion durch G $\beta\gamma$ -Komplexe	11
<b>1.3</b>	<b>Phosphoinositid-3-Kinasen</b>	13
1.3.1	Phosphoinositide als intrazelluläre Botenstoffe	13
1.3.2	Einteilung der PI-3-Kinasen	13
1.3.3	Regulation der Klasse I <sub>A</sub> PI-3-Kinasen	17
1.3.4	Regulation der Klasse I <sub>B</sub> PI-3-Kinase $\gamma$	22
1.3.5	Zelluläre Funktionen der Klasse I PI-3-Kinasen	24
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	31
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	31
3.1.1	Zellen	31
3.1.2	Plasmide	31
3.1.3	Enzyme und Reaktionssysteme	32
3.1.4	Chemikalien	33
3.1.5	Antikörper	34
3.1.6	Sonstige Materialien	35
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	35
3.2.1	Konstruktion von Expressionsplasmiden	35

3.2.2	Zellkultur, Transfektion und Mikroinjektion	38
3.2.3	Immunoblot-Analyse von Ganzzell-Lysaten	38
3.2.4	Gelfiltration	39
3.2.5	Immunpräzipitation und <i>in vitro</i> PI-3-Kinase-Assay	39
3.2.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	40
3.2.7	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer	41
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression Fluoreszenz-markierter Klasse I PI-3-Kinase-Untereinheiten</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Subzelluläre Lokalisation und Translokation der RTK-regulierten Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinase <math>\beta</math></b>	<b>45</b>
4.2.1	Subzelluläre Lokalisation der PI-3-Kinase $\beta$ und ihrer Untereinheiten	45
4.2.2	RTK-vermittelte Membrantranslokation der Klasse I <sub>A</sub> PI-3-Kinase $\beta$	47
<b>4.3</b>	<b>Subzelluläre Lokalisation und Translokation der G<math>\beta\gamma</math>-regulierten Klasse I<sub>B</sub> PI-3-Kinase <math>\gamma</math></b>	<b>49</b>
4.3.1	Charakterisierung der Fluoreszenz-markierten PI-3-Kinase $\gamma$ -Untereinheiten	50
4.3.1.1	Überprüfung der Heterodimerisierung der Fluoreszenz-markierten PI-3-Kinase $\gamma$ -Untereinheiten	50
4.3.1.2	Überprüfung der enzymatischen Aktivität der Fluoreszenz-markierten PI-3-Kinase $\gamma$ und ihrer Stimulierbarkeit durch G $\beta\gamma$	53
4.3.2	Subzelluläre Lokalisation der PI-3-Kinase $\gamma$ und Untereinheiten	55
4.3.3	Stabilität der monomeren PI-3-Kinase $\gamma$ -Untereinheiten	58
4.3.4	Membranrekrutierung der PI-3-Kinase $\gamma$ durch G $\beta\gamma$	59
<b>4.4</b>	<b>G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase <math>\gamma</math></b>	<b>65</b>
4.4.1	PI-3-Kinase $\gamma$ -vermittelte Membrantranslokation einer PtdIns-3,4,5-P <sub>3</sub> -bindenden PH-Domäne	66
4.4.2	Notwendigkeit der p101-Untereinheit für die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase $\gamma$ <i>in vivo</i>	70
4.4.3	Aktivität einer Membran-assoziierten PI-3-Kinase $\gamma$	71
4.4.4	Bestätigung der Befunde zur Aktivierung der PI-3-Kinase $\gamma$ durch G $\beta\gamma$ <i>in vivo</i> durch alternative Methoden	79
4.4.4.1	Translokation der Fluoreszenz-markierten PH-Domäne der Btk in HEK293-Zellen	79
4.4.4.2	Phosphorylierung der Akt/PKB in HEK293-Zellen	82

---

4.4.4.3	Translokation der Fluoreszenz-markierten PH-Domäne der GRP1 in glatten Gefäßmuskelzellen	84
<b>4.5</b>	<b>Membranrekrutierung der PI-3-Kinase <math>\gamma</math> durch Ras</b>	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>94</b>
<b>5.1</b>	<b>Subzelluläre Lokalisation und RTK-vermittelte Membrantranslokation der Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinase <math>\beta</math></b>	<b>96</b>
<b>5.2</b>	<b>Subzelluläre Lokalisation und G<math>\beta\gamma</math>-vermittelte Membrantranslokation der Klasse I<sub>B</sub> PI-3-Kinase <math>\gamma</math></b>	<b>98</b>
<b>5.3</b>	<b>Heterodimerisierung von p101 und p110<math>\gamma</math></b>	<b>100</b>
<b>5.4</b>	<b>Mechanismus der Aktivierung der PI-3-Kinase <math>\gamma</math> durch G<math>\beta\gamma</math></b>	<b>101</b>
<b>5.5</b>	<b>Stabilität der monomeren Klasse I PI-3-Kinase-Untereinheiten</b>	<b>106</b>
<b>5.6</b>	<b>Membranrekrutierung von heterodimerer PI-3-Kinase <math>\gamma</math> und monomerer p110<math>\gamma</math> durch Ras</b>	<b>107</b>
<b>5.7</b>	<b>Klasse I PI-3-Kinasen als mögliche Angriffspunkte für Pharmaka</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>111</b>
	SUMMARY	113
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>115</b>
	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN</b>	<b>137</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>139</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>140</b>

**ABKÜRZUNGEN**

Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
$\beta$ ARK	$\beta$ -Adrenorezeptor-Kinase
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
BSA	bovines Serumalbumin
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
ca.	circa
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i> , Variante des GFP
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
CLSM	<i>confocal laser-scanning microscope</i> , konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CSH2	näher am C-Terminus gelegene SH2-Domäne der p85
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	FRET-Effizienz
EC <sub>50</sub>	Konzentration eines Wirkstoffs, bei der die Hälfte des maximalen Effektes erreicht wird
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Bakterienzellen
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , Epidermis-Wachstumsfaktor
EGFR	EGF-Rezeptor
EGTA	Bis(aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
F	Fluoreszenz-Intensität
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
fMLP	formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
fMLP-R	fMLP-Rezeptor
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FYVE-Domäne	in Fab1p, YOTB, Vac1p und EEA1 gefundene Domäne
(x) g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
G $\alpha$	$\alpha$ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
G $\beta$	$\beta$ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
G $\beta\gamma$	Komplex aus G $\beta$ und G $\gamma$
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein der Qualle <i>Aequoria victoria</i>
G $\gamma$	$\gamma$ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
ggfs.	gegebenenfalls
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein

GRK	GPCR-Kinase
GRP1	<i>General receptor of phosphoinositides 1</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HR1, HR2, ...	Homologie-Regionen der PI-3-Kinasen
IB	Immunoblot
Ig	Immunglobulin
Ins	Inositol
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP	Immunpräzipitation
iSH2-Domäne	inter-SH2-Domäne (Domäne zwischen den beiden SH2-Domänen einer p85-Untereinheit)
kDa	Kilodalton
M	mol pro Liter
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEK	MAPK-/ERK-Kinase
NSH2-Domäne	näher zum N-Terminus gelegene SH2-Domäne der p85
P1, P2	Prolin-reiche Regionen der p85
p85	Prototyp der nicht-katalytischen Untereinheit der Klasse I <sub>A</sub> PI-3-Kinasen $\alpha$ , $\beta$ und $\delta$
p101	nicht-katalytische Untereinheit der Klasse I <sub>B</sub> PI-3-Kinase $\gamma$
p110	katalytische Untereinheit der Klasse I PI-3-Kinasen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> ; NaCl/Phosphatpuffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> , Plättchen-Wachstumsfaktor
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Konzentration in wässriger Lösung
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI	Phosphoinositid (PtdIns oder ein phosphoryliertes Derivat hiervon)
PI-3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns-3,4-P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PtdIns-3,4,5-P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PtdIns-4,5-P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
PTX	Pertussistoxin, Exotoxin von <i>Bordetella pertussis</i>
PX-Domäne	zuerst in zwei Proteinen gefunden, die in <u>Phagozyten</u> Komponenten des NADPH-Oxidase-Komplexes sind
r	Abstand
R <sub>0</sub>	Förster-Radius (Abstand, bei dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt)

RBD	Ras-Bindungs-Domäne
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SEM	<i>standard error of the mean</i>
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
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
TPCK	N-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-monolaurat
vgl.	vergleiche
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i> , glatte Gefäßmuskelzelle
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , Variante des GFP
z. B.	z. B.

Einbuchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:

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



## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Rezeptor-regulierten Klasse I PI-3-Kinasen generieren das Membranlipid PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> als *second messenger*, was zur Membranrekrutierung und Aktivierung verschiedener Effektoren mit PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>-bindenden PH-Domänen führt. Auf diese Weise kontrollieren Klasse I PI-3-Kinasen wichtige zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung oder cytoskelettale Veränderungen. Die Regulation und Funktion der erst vor relativ Kurzem entdeckten PI-3-Kinasen ist aber erst unvollständig verstanden. Da die Klasse I PI-3-Kinasen vorwiegend im Cytosol gefunden werden, ging man davon aus, daß sie durch ihre Stimuli zunächst selbst aus dem Cytosol an die Membran zu ihrem Substrat rekrutiert werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal mittels Fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen in lebenden Zellen gezeigt werden.

Klasse I PI-3-Kinasen sind heterodimere Enzyme und werden nach ihren nicht-katalytischen Untereinheiten weiter in Klasse I<sub>A</sub> und I<sub>B</sub> eingeteilt: Die Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  werden typischerweise durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert, wobei ihre nicht-katalytische p85-Untereinheit als Adapter fungiert, der über seine SH2-Domänen die Interaktion mit dem autophosphorylierten Rezeptor vermittelt. Entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der PI-3-Kinase  $\beta$  gezeigt, daß das heterodimere Enzym infolge RTK-Stimulation aus dem Cytosol an die Membran transloziert wird, nicht aber seine monomere katalytische p110 $\beta$ -Untereinheit in Abwesenheit der p85-Adapter-Untereinheit.

Die bisher einzige bekannte Klasse I<sub>B</sub> PI-3-Kinase  $\gamma$  hat anstelle der p85- eine p101-Untereinheit und wird typischerweise über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durch G $\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert. Hierbei war allerdings umstritten, welche Rolle die nicht-katalytische p101-Untereinheit spielt, und ob G $\beta\gamma$  die PI-3-Kinase  $\gamma$  ebenfalls an die Membran rekrutiert und hierdurch aktiviert. In der vorliegenden Arbeit wurde nun gezeigt, daß G $\beta\gamma$  die PI-3-Kinase  $\gamma$  tatsächlich aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert, und zwar durch Interaktion mit ihrer p101-Untereinheit, die insofern also ähnlich der p85-Untereinheiten der Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen als Adapter fungiert.

Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität und Rezeptor-vermittelten Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen in lebenden Zellen wurde ein Verfahren angewandt, bei dem die Bildung ihres Lipidprodukts PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> durch die Membrantranslokation von hieran bindenden Fluoreszenz-markierten PH-Domänen sichtbar gemacht wird. Wie aus der Notwendigkeit der p101-Untereinheit für die Membranrekrutierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  durch G $\beta\gamma$  bereits zu vermuten war, konnte so gezeigt werden, daß die p101-Untereinheit auch für die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  *in vivo* notwendig ist.

Um nun zu aufzuklären, ob die Rekrutierung aus dem Cytosol an die Membran zu ihrem Substrat gleichzeitig den Mechanismus darstellt, wie G $\beta\gamma$  die PI-3-Kinase  $\gamma$  aktiviert, wurde eine künstlich Membran-assoziierte PI-3-Kinase  $\gamma$  untersucht. In der Tat war die Membran-assoziierte PI-3-Kinase  $\gamma$  bereits ohne weitere Stimulation enzymatisch aktiv.

Hierfür war die nicht-katalytische p101-Untereinheit nicht notwendig, was ihre Rolle als Vermittler der Membranrekrutierung durch G $\beta\gamma$  unterstreicht. Interessanterweise konnte die Membran-assoziierte PI-3-Kinase  $\gamma$  aber durch G $\beta\gamma$ -Komplexe noch weiter stimuliert werden, offenbar also durch einen allosterischen Mechanismus. Auch hierbei machte die An- oder Abwesenheit der p101-Untereinheit keinen Unterschied. G $\beta\gamma$  interagiert also auch direkt mit der katalytischen p110 $\gamma$ -Untereinheit, nur offenbar nicht stark genug, um sie auch unabhängig von der p101-Untereinheit an die Membran zu rekrutieren.

Auf der Basis dieser Befunde läßt sich ein Zwei-Schritt-Mechanismus für die Aktivierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  durch G $\beta\gamma$  mit jeweils spezifischen Rollen für ihre p101- und die p110 $\gamma$ -Untereinheit postulieren: Im ersten Schritt rekrutiert G $\beta\gamma$  die PI-3-Kinase  $\gamma$  aus dem Cytosol an die Membran, und zwar durch Interaktion mit ihrer nicht-katalytischen p101-Untereinheit, die hierfür als notwendiger Adapter fungiert. Bereits die Colokalisation der Lipidkinase mit ihrem Substrat führt aufgrund der Basalaktivität des Enzyms zu einer signifikanten PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bildung. An der Membran wird die PI-3-Kinase  $\gamma$  aber von G $\beta\gamma$  noch weiter aktiviert, und zwar durch direkte Interaktion mit ihrer katalytischen p110 $\gamma$ -Untereinheit.

Neben der Aufklärung des Aktivierungsmechanismus der Klasse I<sub>B</sub> PI-3-Kinase  $\gamma$  durch G $\beta\gamma$  *in vivo* wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Erkenntnisse über die Funktion dieses Enzyms gewonnen. Mittels Gelfiltration wurde gezeigt, daß die p101- und die p110 $\gamma$ -Untereinheit ein festes Heterodimer bilden, und FRET-Untersuchungen ergaben interessante Hinweise auf die Orientierung der beiden Untereinheiten im Heterodimer zueinander. Weiterhin wurde gezeigt, daß die p110 $\gamma$ - auch ohne p101-Untereinheit als Monomer stabil ist, nicht aber umgekehrt. In Abwesenheit der p101-Untereinheit kann die monomere p110 $\gamma$  zwar nicht durch G $\beta\gamma$  an die Membran rekrutiert werden, aber durch Ras.

Die PI-3-Kinase  $\gamma$  ist vorwiegend in Leukozyten exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von entzündlichen und allergischen Prozessen. Die in der vorliegenden Arbeit aufgeklärte Notwendigkeit der p101-Untereinheit für die G-Protein-vermittelte Aktivierung des Enzyms *in vivo* macht die Entwicklung eines an der p101-Untereinheit angreifenden anti-inflammatorischen Pharmakons vorstellbar, zumal die p101 keinerlei Ähnlichkeit mit anderen bekannten Proteinen aufweist.

## Summary

Receptor-regulated class I PI-3-kinases produce the membrane lipid PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> as a second messenger. This in turn induces membrane recruitment and activation of diverse cellular effectors harboring PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>-binding PH domains. Thereby, class I PI-3-kinases control important cellular functions such as growth, differentiation or cytoskeletal rearrangements. However, since PI-3-kinases have only recently been discovered, their regulation and function are not fully understood. Since class I PI-3-kinases are predominantly found in the cytosol, it has been assumed that they are recruited from the cytosol to the membrane, i. e. to their substrate, upon stimulation. This was shown here for the first time in living cells using fluorescence microscopy.

Class I PI-3-kinases are heterodimeric enzymes, and are further classified according to their type of non-catalytic subunit: The p85 non-catalytic subunit of the class I<sub>A</sub> PI-3-kinases  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  mediates their characteristic activation by receptor tyrosine kinases through interaction of its SH2 domains with the autophosphorylated receptor. Accordingly, using PI-3-kinase  $\beta$  as an example, it was shown here that upon RTK stimulation the heterodimeric enzyme, but not its monomeric catalytic p110 $\beta$  subunit in the absence of the p85 adapter subunit, indeed translocates from the cytosol to the plasma membrane.

The only known class I<sub>B</sub> PI-3-kinase to date is PI-3-kinase  $\gamma$ . Instead of p85 it has a p101 subunit, and is typically activated *via* G protein-coupled receptors by G $\beta\gamma$  complexes. In this context, it is controversially discussed which role the non-catalytic p101 subunit plays, and whether PI-3-kinase  $\gamma$  is also membrane-recruited by G $\beta\gamma$  and activated in this way. Here it was shown that G $\beta\gamma$  recruits PI-3-kinase  $\gamma$  from the cytosol to the membrane, namely through interaction with its non-catalytic p101 subunit. In this respect p101 functions as an adapter, comparable to the role of the p85 subunit of class I<sub>A</sub> PI-3-kinases.

To study the enzymatic activity and receptor-mediated activation of class I PI-3-kinases, a method was applied that visualizes the generation of the PI-3-kinase lipid product PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> as a translocation of fluorescence-tagged PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>-binding PH domains from the cytosol to the membrane. Using this method it was shown that the p101 subunit is required for the G protein-mediated activation of PI-3-kinase  $\gamma$  *in vivo*. This finding is in line with the requirement of p101 for the G $\beta\gamma$ -induced membrane recruitment of the enzyme.

In order to elucidate whether the recruitment from the cytosol to the membrane, i. e. to the substrate, represents the mechanism by which G $\beta\gamma$  activates PI-3-kinase  $\gamma$ , a membrane-targeted PI-3-kinase  $\gamma$  mutant was studied. Indeed, the membrane-associated PI-3-kinase  $\gamma$  displays enzymatic activity without further stimulation. The non-catalytic p101 subunit was not required for this, underlining its role as an adapter for the membrane recruitment of PI-3-kinase  $\gamma$  by G $\beta\gamma$ . However, interestingly, the membrane-associated PI-3-kinase  $\gamma$  was further stimulated by G $\beta\gamma$ , indicating an allosteric activation. Again the effect was independent of the

absence or presence of p101. Hence, G $\beta\gamma$  directly interacts with the catalytic p110 $\gamma$  subunit - although with a weaker affinity than p101, which therefore acts as a high affinity adapter mediating the membrane recruitment of the heterodimeric enzyme.

In conclusion, a two-step mechanism for the activation of PI-3-kinase  $\gamma$  by G $\beta\gamma$  is postulated, with specific roles for its p101 and its p110 $\gamma$  subunit: As a first step, G $\beta\gamma$  recruits the enzyme from the cytosol to the membrane through interaction with its non-catalytic p101 subunit as a mandatory adapter. As a consequence of its intrinsic basal enzymatic activity, the colocalization of the lipid kinase with its substrate readily induces some PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> production. However, at the membrane, PI-3-kinase  $\gamma$  is further allosterically activated by G $\beta\gamma$  by direct interaction with its catalytic p110 $\gamma$  subunit.

In addition, further insights about the function of the enzyme were obtained. Gel filtration confirmed that the p101 and the p110 $\gamma$  subunit form a tight dimer. The results of FRET analysis indicated the relative orientation of the two subunits within the heterodimer. Furthermore it was shown that p110 $\gamma$  is also stable as a monomer in the absence of p101, but not *vice versa*. In the absence of p101, monomeric p110 $\gamma$  can not be membrane-recruited by G $\beta\gamma$ , but by Ras.

PI-3-kinase  $\gamma$  is predominantly expressed in leukocytes and plays an important role in the regulation of inflammatory and allergic processes. The requirement of p101 for the G protein-mediated activation of the enzyme *in vivo*, demonstrated here, qualifies p101 as a potential target for anti-inflammatory drugs, particularly since p101 has no similarity to any other known proteins.

## ***EIGENE PUBLIKATIONEN***

### ***Originalarbeiten***

Kern, F., Sural, I. P., Brock, C., Freistedt, B., Radtke, H., Scheffold, A., Blasczyk, R., Reinke, P., Schneider-Mergener, J., Radbruch, A., Walden, P., Volk, H.-D. (1998) T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat. Med.*, **4**, 975-978.

Bianco, A., Brock, C., Zabel, C., Walk, T., Walden, P., Jung, G. (1998) New synthetic non-peptide ligands for classical major histocompatibility complex class I molecules. *J. Biol. Chem.*, **273**, 28759-28765.

Linnemann, T., Brock, C., Sparbier, K., Muche, M., Mielke, A., Lukowsky, A., Sterry, W., Kaltoft, K., Wiesmüller, K.-H., Walden, P. (1998) Identification of epitopes for CTCL-specific cytotoxic T lymphocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **451**, 231-235.

Brock, C., Schaefer, M., Reusch, H.-P., Czupalla, C., Michalke, M., Spicher, K., Schultz, G., Nürnberg, B. (2003) Roles of G $\beta\gamma$  in membrane recruitment and activation of heterodimeric p110 $\gamma$ /p101 phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ . *J. Cell Biol.* (in Druck)

Czupalla, C., Culo, M., Müller, E.-C., Brock, C., Spicher, K., Krause, E., Nürnberg, B. (2003) Identification and characterization of the autophosphorylation sites of phosphoinositide 3-kinase isoforms  $\beta$  and  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* (in Revision)

Leemhuis, J., Boutillier, S., Barth, H., Feuerstein, T. J., Brock, C., Nürnberg, B., Aktories, K., Meyer, D. K. (2003) Rho GTPases and phosphoinositide 3-kinase organize the formation of branched neurites. *Mol. Biol. Cell* (eingereicht)

### ***Kongressbeiträge, Abstracts***

Bianco, A., Brock, C., Walden, P., Jung, G.: Synthesis of novel oligomers as potential ligands for major histocompatibility complex class I molecules. 3. *Deutsches Peptidkolloquium*, Konstanz, März 1997 (Poster).

Linnemann, T., Brock, C., Sparbier, K., Sterry, W., Walden, P. (1997) Identification of natural and synthetic peptide epitopes for CTCL-specific cytotoxic T-lymphocytes. *3<sup>rd</sup> European Conference on Gene Therapy of Cancer*, Berlin, September 1997 (Poster).

Linnemann, T., Brock, C., Sparbier, K., Kaltoft, K., Sterry, W., Walden, P. (1997) Identification of naturally presented tumour antigens of cutaneous lymphomas. *European Society for Dermatological Research, Clinically orientated symposium „Cutaneous Malignant Lymphomas“*, Berlin, September 1997 (Poster).

Brock, C. (1999) Regulation of vesicular monoamine transporter 1 by  $G\alpha_o$ : a recombinant approach. *B. I. F. FUTURA*, **14**, 243-247.

Brock, C., Gasnier, B., Henry, J.-P., Nürnberg, B. (2000)  $G\alpha_{o2}$  regulates vesicular monoamine transport in VMAT-transfected CHO cells. *41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz, März 2000 (Vortrag). Abstract publiziert in: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **361**(4), R54.

Czupalla, C., Brock, C., Müller, E.-C., Schaefer, M., Krause, E., Nürnberg, B. (2001) Regulation of phosphoinositide 3-kinases by G proteins. *Signal transduction: Receptors, mediators and genes*. Weimar, November 2001 (Poster). Abstract publiziert in: *Sig. Trans.*, **1**, 154.

Brock, C., Reusch, H.-P., Czupalla, C., Schulz, A., Michalke, M., Schultz, G., Nürnberg, B., Schaefer, M. (2001) Dual role for  $G\beta\gamma$  in activation of PI-3-kinase  $\gamma$ . *Jahrbuch 2001 des Universitätsklinikums Benjamin Franklin, Fachbereich Humanmedizin, Freie Universität Berlin*, S327.

Brock, C., Schaefer, M., Czupalla, C., Reusch, H.-P., Schulz, A., Nürnberg, B. (2002)  $G\beta\gamma$  recruits heterodimeric phosphatidylinositide 3-kinase  $\gamma$  to the cell membrane through interaction with its non-catalytic p101 subunit. *43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz, März 2002 (Vortrag). Abstract publiziert in: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **365**, R46.

Schimmelpfennig, K., Schulz, A., Brock, C., Spicher, K., Nürnberg, B., Schunack, W. (2002) Direct inhibition of  $G_i$ -protein signaling by branched lipotriamines - a new lead for anti-inflammatory drugs. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Berlin, Oktober 2002 (Poster).

Brock, C., Schaefer, M., Michalke, M., Wetzel, W., Giehl, K., Gierschik, P., Schultz, G., Nürnberg, B. (2003) Roles of subunits in the membrane recruitment of class I phosphoinositide 3-kinases. *44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz, März 2003 (Vortrag) (eingereicht)

# **LEBENS LAUF**

## ***Persönliche Angaben***

Name: Carsten Brock  
Geburtsdatum und -ort: 24.10.1971, Berlin  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## ***Schule***

1977 - 1984 Käthe-Kollwitz-Grundschule, Berlin-Lichtenrade  
1984 - 1991 Ulrich-von-Hutten-Gymnasium, Berlin-Lichtenrade  
1990 Teilnahme an „Jugend forscht“ (Land Berlin, Biologie, 3. Preis)  
04.06.1991 Allgemeine Hochschulreife

## ***Studium und wissenschaftliche Tätigkeit***

10/1991 - 03/1997 Studium der Biochemie  
am Fachbereich Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin  
06.08.1993 Vordiplom  
09/1993 - 10/1995 Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie der Charité, Berlin  
08/1994 Praktikum am Institut für Zell- und Molekularbiologie,  
Schering AG, Berlin  
01/1995 - 03/1995 Studienjahresarbeit am Department of Animal and Plant Sciences,  
University of Sheffield, UK  
04/1996 - 03/1997 Diplomarbeit bei Prof. Dr. P. Walden an der Dermatologischen Klinik  
der Charité, Berlin (Prof. Dr. W. Sterry): Isolierung und Charakteri-  
sierung von MHC-Klasse-I-restringierten T-Zell-Epitopen aus Trans-  
plantationsantigenen als Modell für Tumorantigene  
29.05.1997 Diplom (Note: ausgezeichnet)  
04/1997 - 04/1998 Zivildienst als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. P. Walden in  
der Dermatologischen Klinik der Charité, Berlin (Prof. Dr. W. Sterry)  
seit 05/1998 Doktorand bei Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg am Institut für Pharmakologie  
des Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin (Prof. Dr.  
G. Schultz), in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des  
Universitätsklinikums Ulm (Prof. Dr. P. Gierschik) und am Institut für  
Physiologische Chemie II des Klinikums der Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf (Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg)  
11/1998 - 03/1999 Forschungsaufenthalt am Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris,  
Frankreich (Dr. J.-P. Henry).

## **DANKSAGUNG**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Hierzu zählt nicht nur die wissenschaftliche Betreuung in zahlreichen Diskussionen, sondern auch „das Organisatorische dahinter“, wie die Sorge um die Finanzierung, das Knüpfen von fruchtbaren Kollaborationen und insbesondere die Bereitschaft zur „Fernbetreuung“ seit seinem Weggang aus Berlin.

Herrn Prof. Dr. Günter Schultz danke ich sehr für seine Unterstützung und wissenschaftliche Förderung, insbesondere die Möglichkeit, meine Dissertationsarbeit bis zum Schluß in „seinem“ Institut in einem Klima des regen wissenschaftlichen Austauschs durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hucho bin ich sehr dankbar für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin zu vertreten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Schaefer für die exzellente Co-Betreuung, ohne die diese Arbeit so nie zustande gekommen wäre.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Nürnberg und Herrn Dr. Schaefer möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und ausgezeichnete Zusammenarbeit bedanken.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie für ihre Unterstützung.

Bei Herrn Dr. Peter Reusch, Institut für Klinische Pharmakologie, und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die vorbildliche Kollaboration bedanken.

Für die Überlassung von Plasmiden oder anderen Materialien möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Michael Schaefer, bei Frau Dr. Cornelia Czupalla, Herrn Jürgen Malkewitz, Herrn Andreas Schulz, Herrn Dr. Karsten Spicher, Herrn Dr. Peter Reusch, Frau Dr. Manuela Michalke, sowie bei Frau Dr. Klaudia Giehl, Ulm, bedanken.

*Last but not least:* Ein großes Dankeschön an Freunde und Familie, die das alles mit mir durchlebt haben.