

## 2 FRAGESTELLUNG

Klasse I PI-3-Kinasen werden durch Zelloberflächen-Rezeptoren aktiviert und kontrollieren wichtige zelluläre Funktionen. Ein entscheidender Schritt bei der Regulation der Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist die Rekrutierung der PI-3-Kinase aus dem Cytosol an die Membran zu ihrem Substrat, wobei ihre nicht-katalytische p85-Untereinheit die Rolle eines Adapters spielt.

Für die Aktivierung der Klasse I<sub>B</sub> PI-3-Kinase  $\gamma$  durch G $\beta\gamma$ -Komplexe ist hingegen unklar, (1.) ob es hierbei ebenfalls zu einer Translokation des Enzyms aus dem Cytosol an die Membran kommt, (2.) ob G $\beta\gamma$  hier als Membrananker oder als allosterischer Aktivator fungiert, und (3.) welche Rolle die nicht-katalytische p101-Untereinheit bei der Stimulation der PI-3-Kinase  $\gamma$  durch G $\beta\gamma$  *in vivo* spielt.

Um diese Fragen zu beantworten sollten die subzelluläre Lokalisation und eine mögliche Translokation der PI-3-Kinase  $\gamma$  bzw. ihrer einzelnen Untereinheiten durch G $\beta\gamma$  in lebenden Zellen untersucht sowie mit ihrer enzymatischen Aktivität korreliert werden.

Eine Methode der Wahl für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation und Translokation von Proteinen in lebenden Zellen ist die Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung von GFP-Fusionsproteinen. Mit einem entsprechenden Ansatz war bereits die Membranrekrutierung einer GFP-markierten monomeren p85-Untereinheit gezeigt worden (Gillham et al., 1999). In einem ersten Schritt zur Etablierung der Methodik sollte nun zunächst die Membrantranslokation einer kompletten heterodimeren Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinase untersucht werden. Anschließend sollten Fluoreszenz-markierte PI-3-Kinase  $\gamma$ -Untereinheiten generiert und charakterisiert und ihre Lokalisation und Translokation in lebenden Zellen untersucht werden. Zur Aufklärung des Mechanismus, wie die PI-3-Kinase  $\gamma$  durch G $\beta\gamma$ -Komplexe *in vivo* aktiviert wird, sollte dann ihre subzelluläre Lokalisation mit ihrer enzymatischen Aktivität korreliert werden. Als Nachweis für die PI-3-Kinase-Aktivität in lebenden Zellen sollte hierbei wiederum die Membranrekrutierung einer GFP-markierten PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>-bindenden PH-Domäne dienen.