

4 ERGEBNISSE

4.1 Expression Fluoreszenz-markierter Klasse I PI-3-Kinase-Untereinheiten

Für die Funktion einer Zelle ist die geordnete subzelluläre Kompartimentierung ihrer Bestandteile essentiell. Die gezielte Translokation von Proteinen spielt bei Signalübertragenden Mechanismen oft eine wichtige Rolle. Die Methodik zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen in lebenden Zellen wurde in den letzten Jahren durch die erstmals 1994 beschriebene 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; Tsien & Miyawaki, 1998; Chamberlain & Hahn, 2001).

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen die subzelluläre Lokalisation von Rezeptor-regulierten Klasse I PI-3-Kinasen in lebenden Zellen untersucht werden. Im Mittelpunkt des Interesses stand die G-Protein-regulierte Klasse I_B PI-3-Kinase γ . Zum Vergleich sollte auch die PI-3-Kinase β als Vertreter der RTK-regulierten Klasse I_A PI-3-Kinasen untersucht werden. Abbildung 7 gibt eine Übersicht über die verwendeten mit YFP (*yellow fluorescent protein*, gelbgrün fluoreszierende Variante des GFP) fusionierten PI-3-Kinase-Untereinheiten. Die an ihrem N-Terminus mit YFP fusionierten PI-3-Kinase-Untereinheiten werden im Folgenden als YFP-p85 α , YFP-p110 β , YFP-p101 und YFP-p110 γ bezeichnet, die C-terminal markierten PI-3-Kinase γ -Untereinheiten als p101-YFP und p110 γ -YFP.

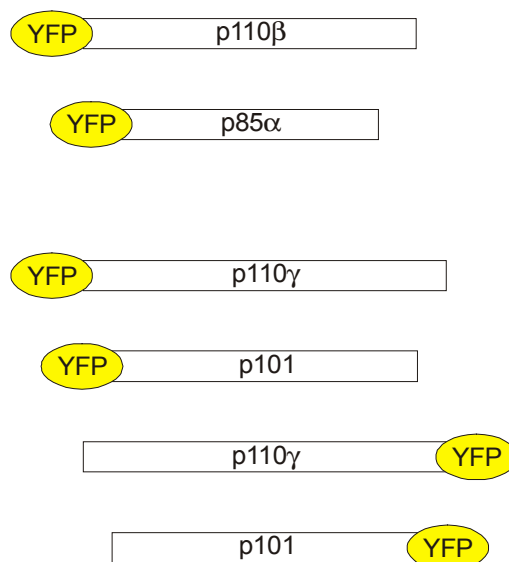


Abb. 7: Schematische Darstellung der verwendeten YFP-markierten PI-3-Kinase-Untereinheiten.

Die Fluoreszenz-markierten PI-3-Kinasen wurden in HEK293-Zellen (*human embryonic kidney*, humane embryonale Nierenzellen) exprimiert. Diese Fibroblasten-Zellen werden häufig für die Untersuchung von heterolog in Säugerzellen exprimierten Proteinen verwendet, da sie sich einfach kultivieren und gut transfizieren lassen. HEK293-Zellen waren auch in unserem Labor bereits für verschiedene Untersuchungen mit YFP-Fusionsproteinen verwendet worden (u. a. Schaefer et al., 2001). Außerdem exprimieren sie endogen keine PI-3-Kinase γ und sind daher für die Untersuchung des heterolog exprimierten Enzyms gut geeignet.

Zum Nachweis der Expression der Fusionsproteine wurden Lysate transfizierter HEK293-Zellen mittels Immunoblot mit einem gegen das GFP (oder andersfarbige Varianten hiervon) gerichteten Antikörper untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt.

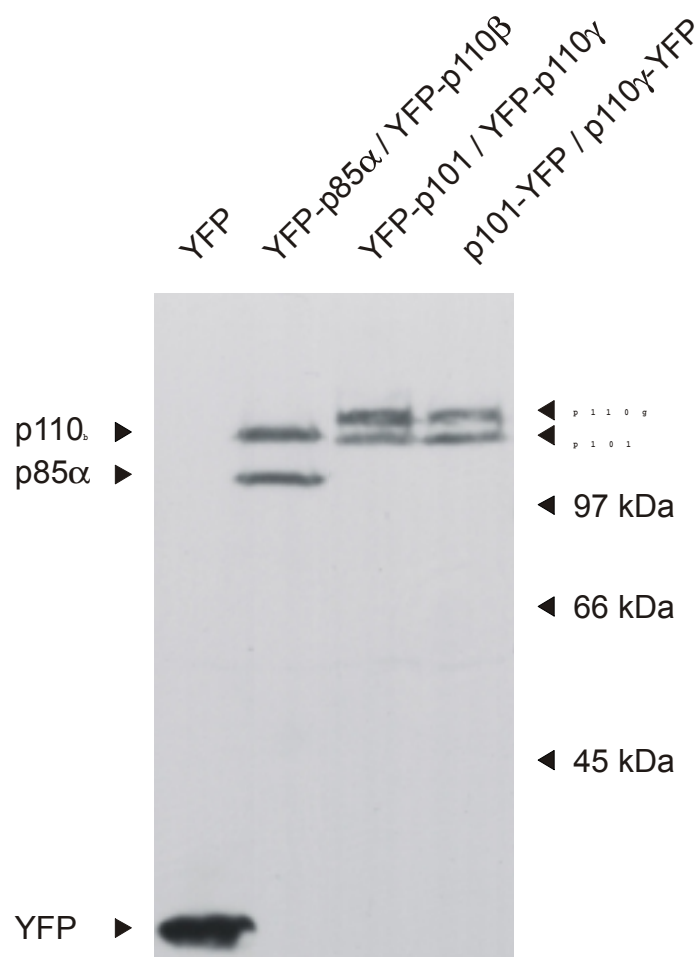


Abb. 8: Expression der YFP-markierten PI-3-Kinase-Untereinheiten. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für die YFP-markierten PI-3-Kinase-Untereinheiten bzw. freies YFP transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in Lämmli-Puffer lysiert. Aliquots der Ganzzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit einem anti-GFP-Antikörper analysiert. Die Laufhöhen von mitgeführten Standardproteinen mit bekannten Molekulargewichten sind rechts angezeigt.

In den Lysaten der mit jeweils zwei Plasmiden für markierte PI-3-Kinase-Untereinheiten cotransfizierten Zellen wurden jeweils auch zwei Proteinbanden vom anti-GFP-Antikörper erkannt (siehe Abb. 8, Bahnen 2 - 4), im Lysat der mit pEYFP-C1 (codiert freies YFP) transfizierten Zellen nur eine Bande (siehe Abb. 8, Bahn 1). Die apparenten Molekulargewichte dieser Proteine (abzuschätzen anhand der Laufhöhe mitgeführter Standardproteine) stimmten mit den erwarteten Größen des freien YFP bzw. der YFP-fusionierten PI-3-Kinase-Untereinheiten überein. Offenbar wurden die markierten PI-3-Kinase-Untereinheiten gut exprimiert. Außerdem war das YFP in diesen Zellen ausschließlich in den Fusionsproteinen gebunden; eine Expression von verkürzten Fusionsproteinen oder freiem YFP konnte ausgeschlossen werden. Bei den folgenden Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen konnte daher davon ausgegangen werden, daß die beobachtete YFP-Fluoreszenz ausschließlich die markierten PI-3-Kinase-Untereinheiten repräsentierte.

4.2 Subzelluläre Lokalisation und Translokation der RTK-regulierten Klasse I_A PI-3-Kinase β

4.2.1 Subzelluläre Lokalisation der PI-3-Kinase β und ihrer Untereinheiten

Zunächst wurde die subzelluläre Lokalisation der solitär in HEK293-Zellen exprimierten PI-3-Kinase β -Untereinheiten (YFP-p85 α oder YFP-p110 β) im Vergleich zu freiem YFP mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 zusammengefaßt.

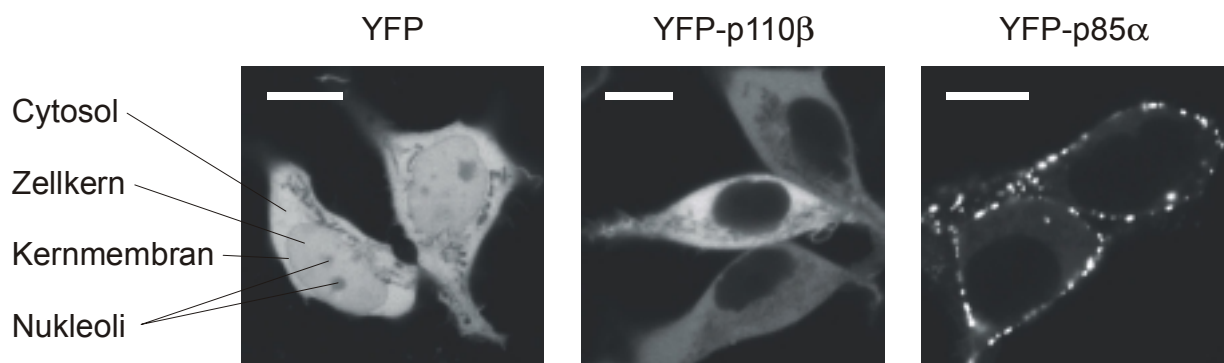


Abb. 9: Subzelluläre Lokalisation der YFP-markierten PI-3-Kinase β -Untereinheiten im Vergleich zu freiem YFP. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für YFP (links), YFP-p110 β (Mitte) oder YFP-p85 α (rechts) transfiziert. Die subzelluläre Verteilung des YFP bzw. der YFP-Fusionsproteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert (siehe auch Methoden, Kapitel 3.2.6). Die Länge der weißen Balken entspricht jeweils 10 μm .

Für freies GFP bzw. seine verschiedenfarbigen Varianten war bekannt, daß sie sich gleichmäßig in Cytosol und Nukleus der Zelle verteilen. Genau dies wurde auch für das YFP in den HEK293-Zellen beobachtet. Ausgespart blieben die Kernmembran, Nukleoli sowie Golgi- und andere intrazelluläre Vesikel (siehe Abb. 9, links).

Solitär exprimierte YFP-p110 β war hingegen nicht im Kern zu finden, sondern gleichmäßig im Cytosol verteilt (siehe Abb. 9, Mitte). Dies bestätigte wiederum, daß die beobachtete Fluoreszenz tatsächlich von einem YFP-p110 β -Fusionsprotein herrührte, dessen subzelluläre Lokalisation sich von der des freien YFP unterscheidet. An der Plasmamembran war ebenfalls keine YFP-p110 β zu finden (zumindest nicht angereichert gegenüber dem Cytosol). Wie erwähnt (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.3) sind die p110-Untereinheiten der Klasse I_A PI-3-Kinasen als Monomere eigentlich nicht stabil (Yu et al., 1998a; Maier et al., 1999). Es waren aber keine Anzeichen für eine Instabilität der solitär exprimierten YFP-p110 β zu beobachten. Vermutlich wird hier die monomere p110 β durch das angehängte YFP stabilisiert.

Solitär exprimierte YFP-p85 α war interessanterweise größtenteils in fleckenartigen Strukturen an der Plasmamembran lokalisiert (siehe Abb. 9, rechts). Zusätzlich war sie auch im Cytosol, aber nicht im Kern zu finden. Dieser Befund erinnert an die von Gillham und Mitarbeitern (1999) beschriebene subzelluläre Verteilung einer GFP-markierten p85 α -Untereinheit (siehe auch Diskussion, Kapitel 5.1).

Die jeweils monomer exprimierten YFP-p110 β und YFP-p85 α unterscheiden sich also in ihrer subzellulären Verteilung deutlich (siehe Abb. 9).

Als nächstes wurde die subzelluläre Verteilung der heterodimeren PI-3-Kinase β untersucht. Hierzu wurde jeweils eine YFP-markierte Untereinheit zusammen mit der komplementären Untereinheit ohne YFP-Markierung coexprimiert (also YFP-p85 α + p110 β bzw. p85 α + YFP-p110 β). Um zu erreichen, daß die markierte Untereinheit bei der Fluoreszenzmikroskopischen Analyse möglichst vollständig als Heterodimer vorliegt, wurde bei der Transfektion vom Plasmid für die nicht-markierte Untereinheit jeweils doppelt so viel eingesetzt wie von dem für das Fusionsprotein. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

Bei Coexpression mit p110 β (nicht-markiert) war die YFP-p85 α jetzt hauptsächlich im Cytosol zu finden (siehe Abb. 10, links); die Anreicherung in fleckenartigen Strukturen an der Membran war im Vergleich zum Befund mit solitär exprimierter YFP-p85 α deutlich geringer (vgl. mit Abb. 9, rechts). Dies spricht dafür, daß die YFP-p85 α tatsächlich mit der coexprimierten p110 β Heterodimere gebildet hatte, deren subzelluläre Verteilung sich von der der monomeren YFP-p85 α unterscheidet. Die dennoch an der Membran zu findende Fluoreszenz könnte entweder noch monomer vorliegende YFP-85 α oder aber eine geringere Menge Membran-assoziiertes YFP-85 α /p110 β -Dimere repräsentieren.

Mit p85 α (nicht-markiert) coexprimierte YFP-p110 β war zum allergrößten Teil im Cytosol lokalisiert, nicht im Kern, in der Tat aber vereinzelt auch in fleckenartigen Strukturen an der Membran (siehe Abb. 10, rechts). Da diese Flecken bei solitär exprimierter YFP-p110 β

nicht auftraten (vgl. Abb. 9) repräsentierten sie offenbar eine geringe Menge basal Membran-assoziiertes p85 α /YFP-p110 β -Heterodimere. Da die bei Coexpression von YFP-85 α mit p110 β auftretenden Flecken etwas stärker ausgeprägt waren (siehe Abb. 10, links), repräsentierten diese vermutlich zusätzlich noch monomer vorliegende p85 α .

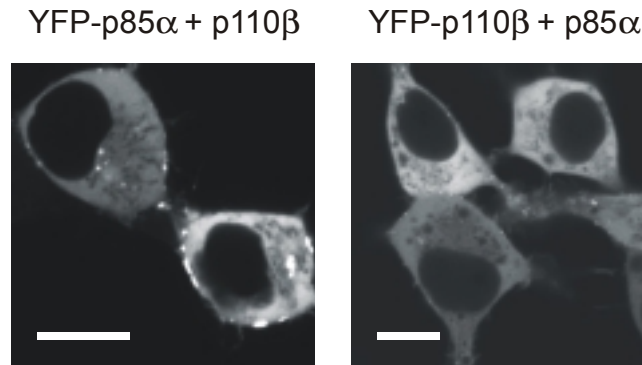


Abb. 10: Subzelluläre Lokalisation der heterodimeren PI-3-Kinase β . HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für jeweils eine YFP-markierte PI-3-Kinase β -Untereinheit (YFP-p85 α oder YFP-p110 β) zusammen mit dem Plasmid für die jeweils komplementäre nicht-markierte Untereinheit (p110 β bzw. p85 α) cotransfiziert. Um zu erreichen, daß möglichst alle YFP-Fusionsproteine als Heterodimere mit der entsprechenden komplementären nicht-markierten Untereinheit vorliegen (und möglichst wenig als freie Monomere), wurde von dem Plasmid für die nicht-markierte Untereinheit jeweils doppelt so viel eingesetzt wie vom dem für die fluoreszierende Untereinheit. Die subzelluläre Lokalisation der YFP-Fusionsproteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ m.

4.2.2 RTK-vermittelte Membrantranslokation der Klasse I_A PI-3-Kinase β

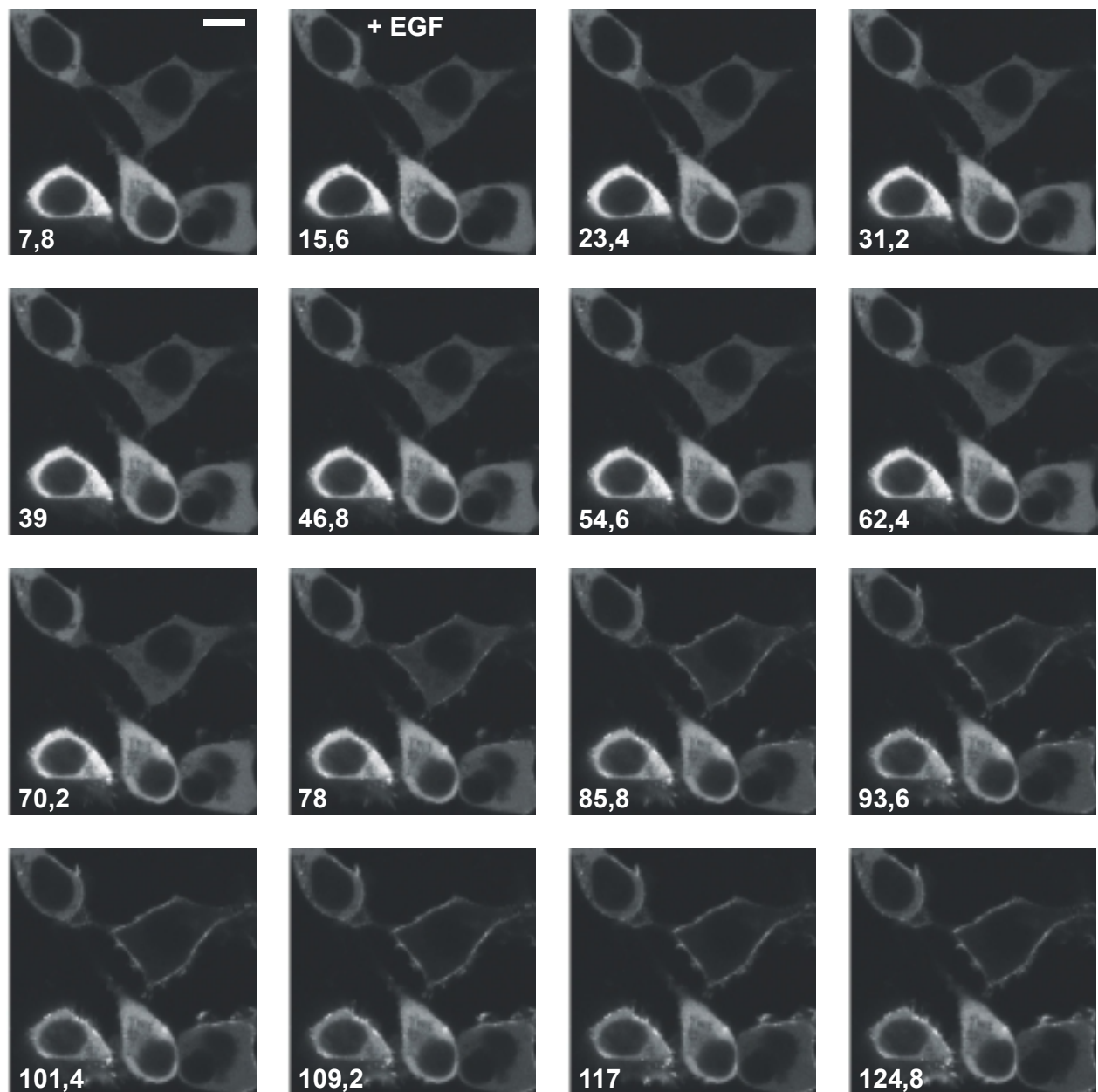
Monomere p85 α und heterodimere PI-3-Kinase β unterscheiden sich also deutlich in ihrer subzellulären Verteilung (vgl. Abb. 9 und 10). Daher lassen sich aus der von Gillham und Mitarbeitern (1999) beschriebenen EGF-induzierten Membrantranslokation von solitär überexprimierter GFP-p85 α keine Rückschlüsse auf das Verhalten einer heterodimeren Klasse I_A PI-3-Kinase ziehen.

Deshalb wurde nun YFP-markierte p110 β zusammen mit p85 α (nicht-markiert) sowie dem EGF-Rezeptor coexprimiert und die subzelluläre Lokalisation der fluoreszierenden PI-3-Kinase β vor und nach Stimulation mit EGF verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

In unstimulierten Zellen war die fluoreszierende PI-3-Kinase β hauptsächlich im Cytosol lokalisiert (siehe Abb. 11; vgl. Abb. 10). Nach Zugabe von EGF kam es jedoch zu einer deutlichen Translokation aus dem Cytosol an die Membran. Der Effekt trat unterschiedlich schnell nach der EGF-Zugabe ein (vgl. Abb. 11A und 11B), vermutlich aufgrund unterschiedlich rascher Durchmischung des Agonisten mit dem Puffer. Die Zeit vom Beginn

der Translokation bis zur maximalen Membranlokalisation der PI-3-Kinase β betrug zwischen einer halben und einer Minute. Wie zu erwarten war in Abwesenheit von coexprimierter p85 α keine Membrantranslokation der YFP-p110 β zu beobachten (nicht gezeigt).

Die Annahme, daß Klasse I_A PI-3-Kinasen infolge RTK-Stimulation aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert werden, konnte somit erstmals in lebenden Zellen Fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden. Gleichzeitig war somit die Methodik für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation und Translokation der G $\beta\gamma$ -regulierten Klasse I_B PI-3-Kinase γ etabliert.

A

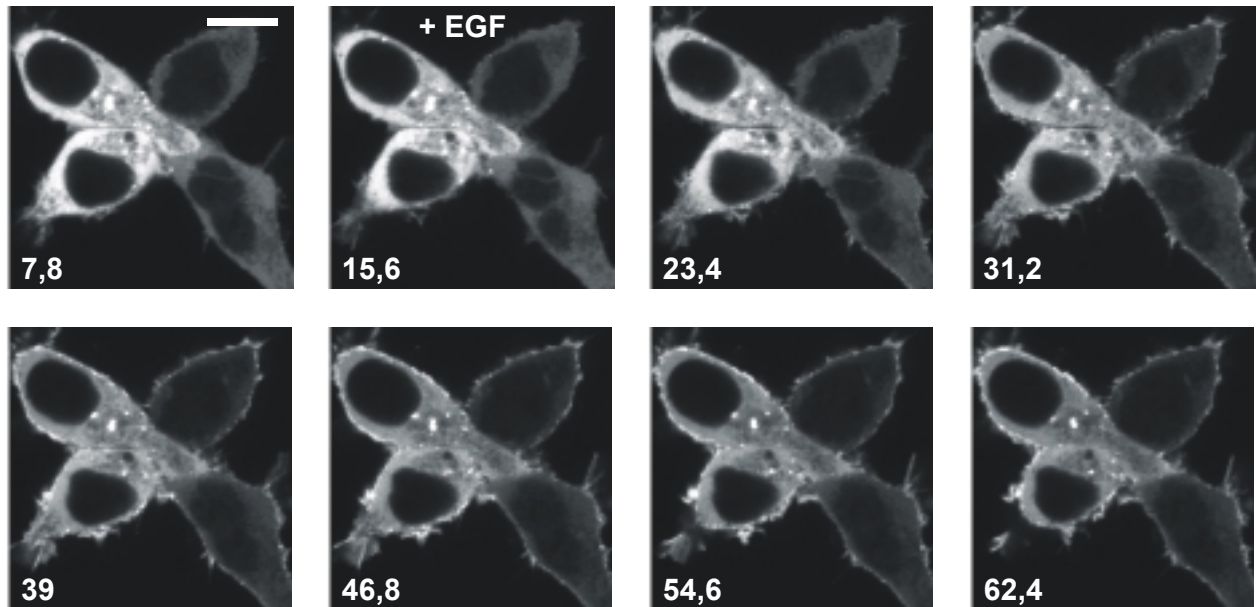
B

Abb. 11: EGF-induzierte Membrantranslokation der PI-3-Kinase β . A und B zeigen zwei identisch, aber unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für YFP-p110 β und nicht-markierte p85 α (in doppelter Menge, um möglichst vollständige Heterodimerisierung der YFP-p110 β zu erreichen) sowie den EGF-Rezeptor cotransfiziert. Die subzelluläre Verteilung der fluoreszierenden PI-3-Kinase β und ihre EGF-induzierte Umverteilung wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Vor der Untersuchung wurden die Zellen über Nacht in Serum-freiem Medium kultiviert. Die Bilder wurden kontinuierlich nacheinander aufgenommen, wobei die Aufnahme eines Bildes bei den hier gewählten Einstellungen jeweils 7,8 Sekunden dauerte. Angegeben ist jeweils der Zeitpunkt des Endes der Aufnahme eines Bildes in Sekunden nach Beginn der Aufnahme des ersten Bildes. Während der Aufnahme des zweiten Bildes wurde vorsichtig EGF ad 100 ng/ml dazugegeben (10 μ l 10 μ g/ml EGF auf 1 ml Puffer). Weiße Balken = 10 μ m.

4.3 Subzelluläre Lokalisation und Translokation der G $\beta\gamma$ -regulierten Klasse I $_B$ PI-3-Kinase γ

Eine wichtige Frage betraf den Mechanismus, wie die Klasse I $_B$ PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ -Komplexe aus heterotrimeren G-Proteinen aktiviert wird. Hier sollte insbesondere untersucht werden, inwiefern eine mögliche Rekrutierung der PI-3-Kinase γ aus dem Cytosol an die Membran (durch G $\beta\gamma$ als Membrananker) eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang sollte außerdem die Rolle der einzelnen Untereinheiten der heterodimeren PI-3-Kinase γ bei der Aktivierung durch G $\beta\gamma$ *in vivo* geklärt werden.

Diese vorgesehenen Untersuchungen setzten aber geeignete molekulare Werkzeuge voraus.

4.3.1 Charakterisierung der Fluoreszenz-markierten PI-3-Kinase γ -Untereinheiten

Deshalb sollte zunächst überprüft werden, ob die Fluoreszenz-Markierungen die Bildung von Heterodimeren aus p101 und p110 γ sowie die Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch G β γ stören.

4.3.1.1 Überprüfung der Heterodimerisierung Fluoreszenz-markierter PI-3-Kinase γ -Untereinheiten

Die Heterodimerisierung der fluoreszierenden PI-3-Kinase γ -Untereinheiten in lebenden Zellen wurde mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) untersucht. Hierfür wurde YFP-markierte p110 γ mit CFP-markierter p101 in HEK293-Zellen co-exprimiert, und zwar in allen Kombinationsmöglichkeiten bezüglich der Positionen der Fluoreszenz-Markierungen am jeweiligen N- oder C-Terminus der beiden Untereinheiten. Der FRET zwischen den beiden Fluorophoren wurde mittels „*Acceptor bleach*“ bestimmt (siehe auch Methoden, Kapitel 3.2.7, Abb. 6): Durch Ausbleichen des Akzeptor-Fluorophors (YFP) wird der FRET unterbunden, so daß es zu einem Anstieg der Fluoreszenz des Donor-Fluorophors (CFP) kommt, dessen Ausmaß proportional zur FRET-Effizienz ist. Die Ergebnisse der FRET-Untersuchungen sind in Abbildung 12 dargestellt.

Bei allen Kombination wurde FRET zwischen CFP an der p101-Untereinheit und YFP an der p110 γ -Untereinheit YFP gefunden, somit also die Bildung von Heterodimeren aus den beiden markierten PI-3-Kinase γ -Untereinheiten *in vivo* nachgewiesen (siehe Abb. 12).

Interessanterweise gab es aber je nach Position der Fluoreszenz-Markierungen bei den unterschiedlichen Kombinationen quantitative Unterschiede (siehe Abb. 12): Eine relativ hohe FRET-Effizienz (Anstieg der CFP-Fluoreszenz um etwa 8 %) wurde immer dann gefunden, wenn die Fluoreszenz-Markierungen an beiden N- oder an beiden C-Termini angebracht waren (also CFP-p101 + YFP-p110 γ oder p101-CFP + p110 γ -YFP). Eine deutlich geringere FRET-Effizienz (Anstieg der CFP-Fluoreszenz um etwa 2 %) wurde immer dann gefunden, wenn die Fluoreszenz-Markierungen jeweils am N-Terminus der einen und am C-Terminus der anderen Untereinheit positioniert waren (siehe Abb. 12).

Die FRET-Effizienz ist eine Funktion des Abstands zwischen den beiden Fluorophoren (Stryer, 1978; van Roessel & Brand, 2002): Je größer der Abstand, desto geringer die FRET-Effizienz, wobei Veränderungen des Abstandes sich in sechster Potenz auf die FRET-Effizienz auswirken (siehe auch Methoden, Kapitel 3.2.7). Die beobachteten Unterschiede in der FRET-Effizienz zwischen CFP-markierter p101 und YFP-markierter p110 γ je nach Position der Fluoreszenz-Markierungen an den N- oder C-Termini der beiden Untereinheiten könnten also Ausdruck von je nach Kombination unterschiedlich weiten Abständen zwischen

den beiden Fluorophoren sein. Dies würde bedeuten, daß im PI-3-Kinase γ -Heterodimer einerseits die N-Termini und andererseits die C-Termini der beiden Untereinheiten jeweils relativ dicht beieinander liegen, während jeweils der N-Terminus der einen Untereinheit relativ weit vom C-Terminus der anderen Untereinheit entfernt liegt. Wie erwähnt (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.4) ist über die Interaktion zwischen der p101- und p110 γ -Untereinheit im Heterodimer bislang nur wenig bekannt. Daher sind die unterschiedlichen FRET-Effizienzen im PI-3-Kinase γ -Heterodimer je nach Position der Fluoreszenz-Markierungen ein wichtiger Hinweis auf die Orientierung der Untereinheiten zueinander.

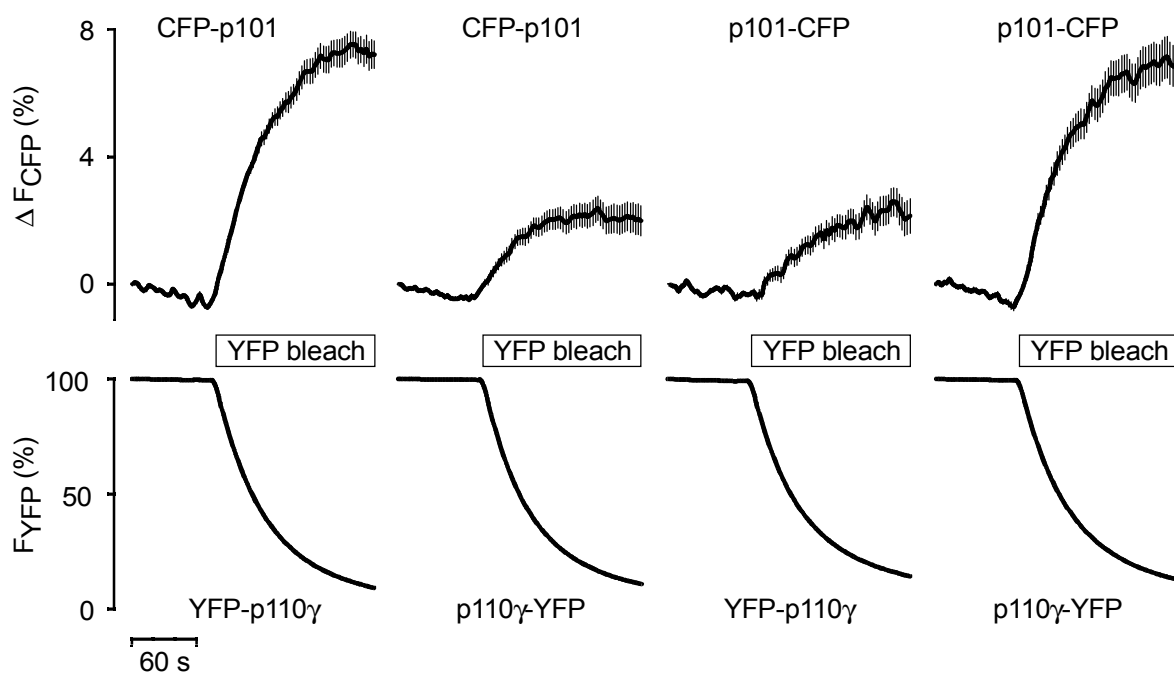


Abb. 12: FRET zwischen den Fluoreszenz-markierten PI-3-Kinase γ -Untereinheiten. HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden für N- oder C-terminal CFP-markierte p101 und N- oder C-terminal YFP-markierte p110 γ cotransfiziert. Der FRET zwischen den beiden Fluorophoren wurde zwei Tage später mittels „*Acceptor bleach*“ bestimmt (siehe auch Methoden, Kapitel 3.2.7, Abb. 6): Das Akzeptor-Fluorophor (YFP) wird durch Ausbleichen zerstört. Dadurch wird der FRET unterbunden, und die Fluoreszenz des Donor-Fluorophors (CFP) steigt an. 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 des YFP („*YFP bleach*“). Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) von jeweils mindestens 18 analysierten Zellen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Diese Interpretation der unterschiedlichen FRET-Effizienz je nach Position der Fluoreszenz-Markierungen an den N- oder C-Termini von p101 und p110 γ setzt allerdings voraus, daß das Ausmaß ihrer Heterodimerisierung bei allen Kombinationen gleich ist. Die Unterschiede könnten ebenso darauf beruhen, daß je nach Kombination ein unterschiedlich großer Anteil miteinander komplexieren. Bei den Kombinationen mit den höheren FRET-Effizienzen könnte ein hoher Anteil an p101 und p110 γ (im Idealfall alle) in gemeinsamen

Heterodimeren vorliegen, bei den Kombinationen mit geringerer FRET-Effizienz entsprechend weniger (und mehr als Monomere). Dies würde bedeuten, daß die Fluoreszenz-Markierungen in bestimmten Kombinationen die Affinität zwischen den beiden Untereinheiten herabsetzen, also die Bildung von p101/p110 γ -Heterodimeren stören. Dies spräche dann dafür, daß im PI-3-Kinase γ -Heterodimer jeweils der N-Terminus der einen Untereinheit in der Nähe des C-Terminus der anderen liegt, so daß sich die dort jeweils angebrachten Fluoreszenz-Markierungen gegenseitig sterisch behindern.

Beide Interpretationen sind möglich, führen aber bezüglich der Anordnung der beiden Untereinheiten im PI-3-Kinase γ -Heterodimer zu genau entgegengesetzten Aussagen. Um dies zu klären sollte mittels Gelfiltration überprüft werden, ob die unterschiedlichen FRET-Effizienzen mit einem unterschiedlich großen Anteil an heterodimerisierten PI-3-Kinase γ -Untereinheiten korrelieren. Hierfür wurden exemplarisch eine Kombination mit hoher FRET-Effizienz (CFP-p101 + YFP-p110 γ) und eine mit niedriger FRET-Effizienz (CFP-p101 + p110 γ -YFP) ausgewählt. Die Cytosole von entsprechend transfizierten HEK293-Zellen wurden einer Gelfiltration unterzogen und die Elutionsprofile der coexprimierten Fluoreszenz-markierten PI-3-Kinase γ -Untereinheiten miteinander sowie mit dem einer monomer exprimierten YFP-markierten p110 γ -Untereinheit verglichen. Die drei Elutionsprofile sind in Abb. 13 dargestellt.

Bei der gewählten Einstellung des Chromatographie-Systems lag das Elutionsmaximum des YFP-p110 γ -Monomers bei Fraktion 24 (siehe Abb. 13, oben). Im Vergleich hierzu war das Elutionsprofil der mit CFP-p101 coexprimierten YFP-p110 γ komplett zu früheren Fraktionen mit einem Elutionsmaximum bei Fraktion 21 verschoben, ohne weiteren Anstieg bei Fraktion 24 (siehe Abb. 13, Mitte). Der Vergleich der beiden Elutionsprofile zeigt also, daß die beiden coexprimierten PI-3-Kinase γ -Untereinheiten praktisch vollständig als CFP-p101/YFP-p110 γ -Heterodimere vorlagen. Dies paßt gut zur beobachteten hohen FRET-Effizienz bei dieser Kombination. Interessanterweise sah das Elutionsprofil bei der Kombination mit der geringeren FRET-Effizienz (CFP-p101 + p110 γ -YFP) aber praktisch genauso aus: Elutionsmaximum bei Fraktion 21 und kein weiterer Anstieg bei Fraktion 24, wo monomere YFP-markierte p110 γ eluieren würde (siehe Abb. 13, unten). Auch CFP-p101 und p110 γ -YFP lagen also praktisch vollständig als Heterodimere vor, obwohl die FRET-Effizienz bei dieser Kombination etwa vierfach geringer war.

Die Bildung von PI-3-Kinase γ -Heterodimeren wird von den Fluoreszenz-Markierungen an der p101- und p110 γ -Untereinheit also nicht gestört, und die unterschiedlichen FRET-Effizienzen korrelieren nicht mit einem unterschiedlichen Anteil an Heterodimeren. Daher ist anzunehmen, daß die Unterschiede in den FRET-Effizienzen je nach Kombination vielmehr unterschiedlich weite Abstände zwischen den CFP- und YFP-Markierungen im Heterodimer widerspiegeln: Offenbar liegen einerseits die N-Termini und andererseits die C-Termini von

p101 und p110 γ im Heterodimer jeweils dicht beieinander, während der N-Terminus der einen Untereinheit jeweils relativ weit vom C-Terminus der anderen entfernt ist.

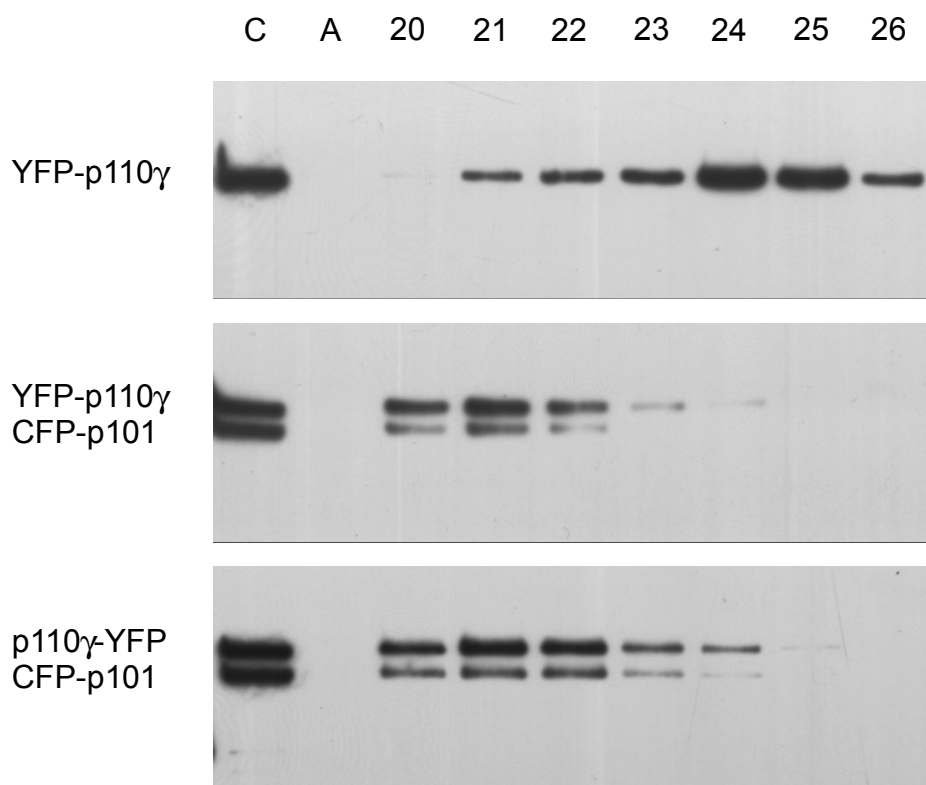


Abb. 13: Nachweis der Heterodimerisierung der fluoreszierenden PI-3-Kinase γ -Untereinheiten mittels Gelfiltration. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für eine YFP-markierte p110 γ -Untereinheit und eine CFP-markierte p101-Untereinheit cotransfiziert, und zwar in einer Kombination mit hoher FRET-Effizienz (YFP-p110 γ + CFP-p101) und in einer Kombination mit niedriger FRET-Effizienz (p110 γ -YFP + CFP-p101) (vgl. Abb. 12). Zum Vergleich wurden auch Zellen mit dem Plasmid für YFP-markierte p110 γ alleine (YFP-p110 γ) transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Cytosole der Zellen präpariert und auf eine Superdex 200 Gelfiltrations-Säule geladen. Zum Vergleich der Elutionsprofile wurden Aliquots der eluierten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert: Die Fusionsproteine wurden mit einem anti-GFP-Antikörper detektiert. C = Cytosole vor der Gelfiltration (1:5 verdünnt); A = Ausschlußvolumen; 20 - 26 = Fraktionsnummern.

4.3.1.2 Überprüfung der enzymatischen Aktivität der Fluoreszenz-markierten PI-3-Kinase γ und ihrer Stimulierbarkeit durch G $\beta\gamma$

Als nächstes wurde überprüft, ob die Fluoreszenz-Markierungen an p101 und p110 γ die enzymatische Aktivität der PI-3-Kinase γ und ihre Stimulierbarkeit durch G $\beta\gamma$ -Komplexe beeinflussen. Hierzu wurde die PI-3-Kinase γ entweder ohne Markierung oder mit jeweils einer N- oder C-terminal YFP-markierten Untereinheit in HEK293-Zellen exprimiert und

dann immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden dann einem *in vitro* PI-3-Kinase-Assay unterzogen (Maier et al., 1999). Hierbei wird das Enzym mit PtdIns-4,5-P₂-haltigen Lipidvesikeln und radioaktiv markiertem [γ -³²P]ATP sowie ggfs. seinem Stimulus (gereinigte G β γ -Komplexe für die PI-3-Kinase γ) inkubiert und anschließend das gebildete radioaktive PtdIns-3,4,5-P₃ mittels Dünnschicht-Chromatographie und Autoradiographie nachgewiesen (siehe auch Methoden, Kapitel 3.2.5). Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

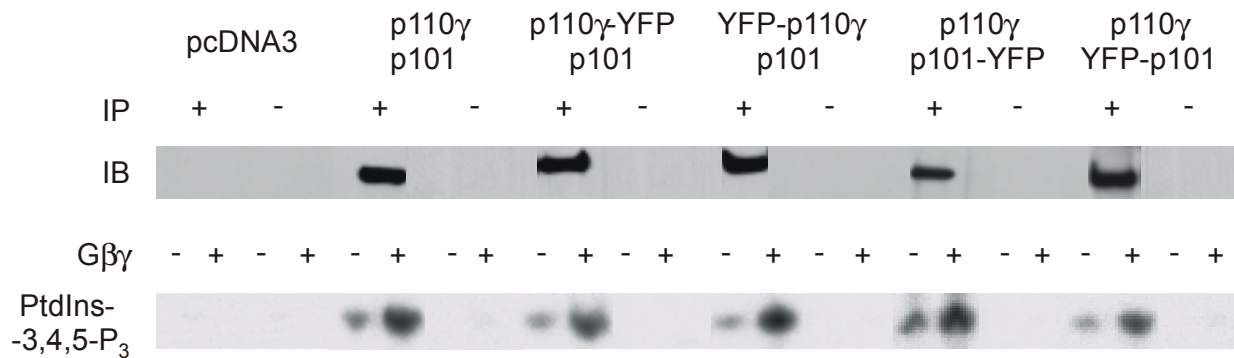


Abb. 14: Enzymatische Aktivität und G β γ -Stimulierbarkeit der YFP-markierten PI-3-Kinase γ . HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für jeweils eine (N- oder C-terminal) YFP-markierte PI-3-Kinase γ -Untereinheit zusammen mit der entsprechenden nicht-markierten Untereinheit cotransfiziert. Zum Vergleich wurden auch Zellen mit den Plasmiden für beide Untereinheiten ohne Markierung oder nur mit leerem Vektor (pcDNA3) (co-)transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden wie im Methodenteil beschrieben Zellextrakte präpariert und hieraus die PI-3-Kinase γ mit einem anti-p110 γ -Antikörper (+) immunpräzipitiert (Negativ-Kontrolle: ohne Antikörper (-)). Die Immunpräzipitation (IP) der PI-3-Kinase γ wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblot (IB) mit einem anderen anti-p110 γ -Antikörper überprüft. Zur Bestimmung der PI-3-Kinase-Aktivität wurden die Präzipitate wie im Methodenteil beschrieben mit PtdIns-4,5-P₂-haltigen Lipidvesikeln und [γ -³²P]ATP in Ab- (-) oder Anwesenheit (+) von 120 nM gereinigten G β γ -Komplexen inkubiert (15 Minuten bei 37 °C). Anschließend wurden die Lipide extrahiert und mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Das gebildete radioaktive PtdIns-3,4,5-P₃ wurde schließlich mit Hilfe eines Phosphoimagers detektiert.

Wie im anti-p110 γ -Immunoblot zu sehen (siehe Abb. 14, oben), war die Immunpräzipitation bei allen Kombinationen YFP-markierter und nicht-markierter PI-3-Kinase γ -Untereinheiten erfolgreich, und bei allen Kombinationen wurden etwa gleiche Mengen an PI-3-Kinase γ präzipitiert. Wie erwartet wurde keine p110 γ im Immunoblot gefunden, wenn nur leerer Vektor transfiziert wurde oder der Antikörper bei der Präzipitation weggelassen wurde. Wie im Autoradiogramm der Dünnschicht-Chromatographie zu sehen (siehe Abb. 14, unten), zeigten alle PI-3-Kinase γ -Immunpräzipitate eine basale Lipidkinase-Aktivität, die durch G β γ stimuliert wurde. Basalaktivität und Stimulierbarkeit waren bei allen PI-3-Kinase γ -Immunpräzipitaten etwa gleich, unabhängig von der An- oder Abwesenheit sowie der Position einer YFP-Markierung an N- oder C-Terminus der p110 γ - oder p101-Untereinheit.

Die enzymatische Aktivität der PI-3-Kinase γ und ihre Stimulierbarkeit durch $G\beta\gamma$ -Komplexe werden also durch die YFP-Markierungen nicht gestört. Die Fluoreszenz-markierten PI-3-Kinase γ -Untereinheiten sind daher für die Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus der PI-3-Kinase γ durch $G\beta\gamma$ *in vivo* geeignet.

4.3.2 Subzelluläre Lokalisation der PI-3-Kinase γ und ihrer Untereinheiten

Nachdem sichergestellt war, daß die Fluoreszenz-Markierungen an p101 und p110 γ die essentiellen Eigenschaften der PI-3-Kinase γ nicht beeinflussen, wurde nun die subzelluläre Lokalisation der PI-3-Kinase γ bzw. ihrer Untereinheiten untersucht. Wie für die Versuche zur PI-3-Kinase β beschrieben (siehe Kapitel 4.2.1) wurde hierfür YFP-markierte p101 oder p110 γ jeweils alleine oder zusammen mit der entsprechenden komplementären nicht-markierten Untereinheit in HEK293-Zellen coexprimiert und ihre subzelluläre Lokalisation Fluoreszenz-mikroskopisch analysiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt.

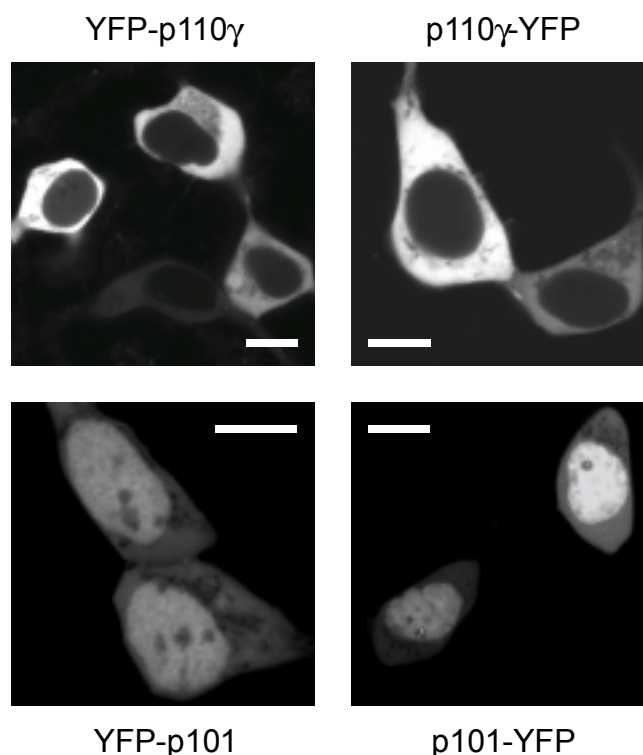


Abb. 15: Subzelluläre Lokalisation der monomeren PI-3-Kinase γ -Untereinheiten. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden N- oder C-terminal YFP-markierte p110 γ oder p101 transfiziert. Die subzelluläre Verteilung der YFP-Fusionsproteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ m.

Solitär exprimierte YFP-markierte p110 γ (siehe Abb. 15, oben) war gleichmäßig im Cytosol verteilt. Im Kern und an der Plasmamembran wurde keine YFP-Fluoreszenz gefunden (zumindest keine Anreicherung gegenüber dem Cytosol). Das Ergebnis war unabhängig von der Position der YFP-Markierung am N- oder C-Terminus der p110 γ (siehe Abb. 15, oben links / oben rechts). Die monomer exprimierte p110 γ -Untereinheit der Klasse I β PI-3-Kinase γ zeigt also die gleiche Verteilung wie die monomer exprimierte p110 β -Untereinheit der Klasse I α PI-3-Kinase β (vgl. Abb. 15 oben und Abb. 9 Mitte, Seite 46).

Bei solitär exprimierter YFP-markierter p101 fiel auf, daß die Fluoreszenz-Intensität insgesamt deutlich geringer war als bei der YFP-markierten p110 γ (siehe Abb. 15, unten; vgl. Abb. 15, oben). Überraschenderweise befand sich der größte Anteil der fluoreszierenden p101 im Zellkern. Sie war auch im Cytosol nachweisbar, nicht aber an der Plasmamembran (zumindest nicht gegenüber dem Cytosol angereichert). Das Ergebnis war unabhängig von der Position des YFP am N- oder C-Terminus der p101 (siehe Abb. 15, unten links / unten rechts). Die beobachtete Verteilung der fluoreszierenden p101 könnte von einer aktiven Anreicherung im Zellkern herrühren. Die geringere Fluoreszenz-Intensität läßt aber auf eine geringere Menge fluoreszierender p101 schließen. Dies legt die Vermutung nahe, daß die p101-Untereinheit als Monomer ohne die p110 γ -Untereinheit instabil ist. Die scheinbare Anreicherung der p101 im Kern könnte auch darauf beruhen, daß sie sich initial in Cytosol und Kern verteilt, aber nur im Kern vor proteolytischer Degradation geschützt ist. Auf jeden Fall unterscheidet sich die subzelluläre Verteilung der monomer exprimierten p101-Untereinheit der PI-3-Kinase γ fundamental von der Verteilung der monomer exprimierten p85 α -Untereinheit einer Klasse I α PI-3-Kinase (vgl. Abb. 15 unten und Abb. 9 rechts).

Die YFP-markierte p110 γ war bei Coexpression mit p101 (nicht-markiert) hauptsächlich im Cytosol zu finden, nicht an der Plasmamembran (zumindest nicht gegenüber dem Cytosol angereichert), aber im Gegensatz zur monomer exprimierten p110 γ auch zu einem geringen Anteil im Kern (siehe Abb. 16, oben; vgl. Abb. 15, oben). Das Ergebnis war unabhängig von der Position der YFP-Markierung am N- oder C-Terminus der p110 γ (siehe Abb. 16, oben links / oben rechts). Offenbar ist die p101-Untereinheit, die ja als Monomer im Gegensatz zum p110 γ -Monomer auch im Zellkern zu finden ist, für die Lokalisation eines kleinen Teils der p101/p110 γ -Heterodimere im Zellkern verantwortlich, wenngleich klar der überwiegende Teil im Cytosol zu finden ist.

Die gleiche Verteilung zeigte die fluoreszierende p101 bei Coexpression mit p110 γ (nicht-markiert) (siehe Abb. 16, unten; vgl. Abb. 16, oben), wiederum unabhängig von der Position des YFP an ihrem N- oder C-Terminus (siehe Abb. 16, unten links / unten rechts). Auch die Fluoreszenz-Intensität war diesmal ähnlich wie bei der Kombination mit fluoreszierender p110 γ . Dies stützt die Hypothese, daß die p101 durch die Heterodimerisierung mit der p110 γ im Cytosol stabilisiert wird.

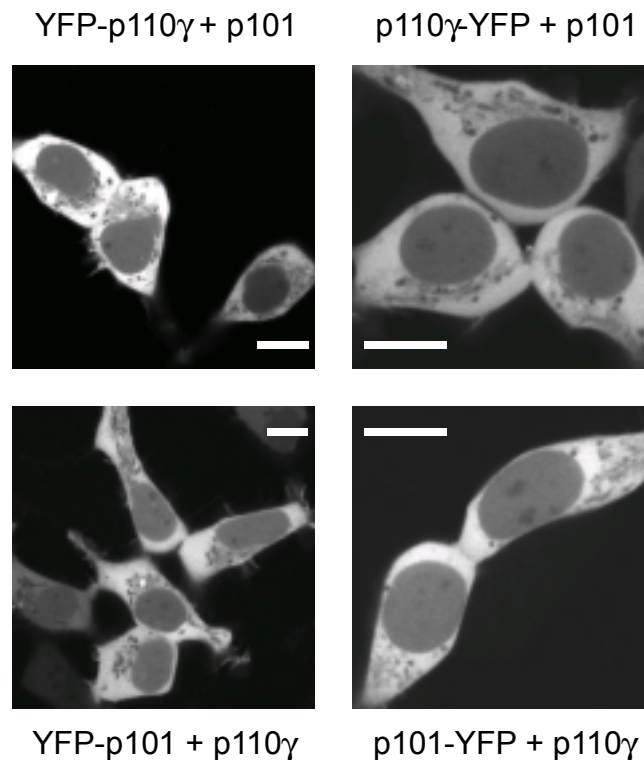


Abb. 16: Subzelluläre Lokalisation der heterodimeren PI-3-Kinase γ . HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für N- oder C-terminal YFP-markierte p110 γ oder p101 sowie die jeweils komplementäre nicht-markierte PI-3-Kinase γ -Untereinheit (in doppelter Menge, um möglichst vollständige Heterodimerisierung der fluoreszierenden Untereinheit zu erreichen) cotransfiziert. Die subzelluläre Verteilung der YFP-Fusionsproteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ m.

Zur besseren Darstellung der schwachen Kernlokalisation der p110 γ in Anwesenheit der p101 wurden nochmals YFP-p110 γ alleine, YFP-p101 alleine oder YFP-p110 γ zusammen mit p101 (nicht-markiert) exprimiert. Bei der Fluoreszenz-mikroskopischen Analyse wurden diesmal aber zusätzlich die Zellkerne mit dem Fluoreszenz-Farbstoff bis-Benzimid angefärbt (Abb. 17). Werden nun jeweils die beiden Bilder in verschiedenen Farben dargestellt (z. B. YFP-Fluoreszenz in gelb und bis-Benzimid-Fluoreszenz in blau) und überlagert, so kommt es an den Stellen, wo sich die beiden Farben überlagern, zu einer Veränderung der Farbqualität. Besonders deutlich zu sehen ist dies bei den mit dem YFP-p101-Plasmid transfizierten Zellen (siehe Abb. 17, rechts): Bei den Zellen, die die YFP-p101 exprimieren (welche wie bereits zuvor beobachtet vor allem im Kern lokalisiert ist), erscheint das zur Darstellung der Fluoreszenz des bis-Benzimid verwendete Blau bei Überlagerung mit dem für die Darstellung der YFP-Fluoreszenz verwendeten Gelb anders als in den Zellen, die keine YFP-p101 exprimieren. Bei den überlagerten Bildern der mit den Plasmiden für YFP-p110 γ und p101 cotransfizierten Zellen ist ebenfalls eine Veränderung des Blautons zu beobachten (siehe Abb. 17, Mitte), wenngleich natürlich schwächer als bei den die YFP-p101 exprimierenden Zellen.

Die YFP-p110 γ ist bei Coexpression mit der p101 also zu einem geringen Anteil auch im Kern lokalisiert. Bei den nur die YFP-p110 γ exprimierenden Zellen hingegen kommt es bei Überlagerung der Bilder zu keiner Veränderung des Blautons (siehe Abb. 17, links). Die monomere YFP-p110 γ ist also nicht im Kern präsent.

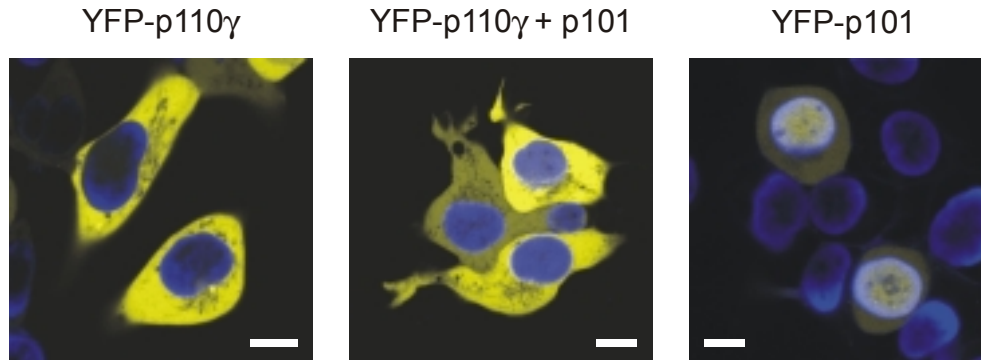


Abb. 17: Überprüfung der Kernlokalisierung der PI-3-Kinase γ -Untereinheiten. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für YFP-p110 γ alleine oder YFP-p101 alleine oder mit den Plasmiden für YFP-p110 γ und nicht-markierte p101 zusammen transfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der YFP-Fusionsproteine (gelb) wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff bis-Benzimid angefärbt (blau). Dargestellt sind jeweils die überlagerten Bilder. Man beachte die Veränderung des Blautons bei Überlagerung mit Gelb. Weiße Balken = 10 μ M.

Zusammenfassend läßt sich bezüglich der subzellulären Lokalisation der PI-3-Kinase γ also festhalten, daß in unstimulierten Zellen weder die heterodimere PI-3-Kinase γ noch ihre monomeren Untereinheiten an der Plasmamembran nachzuweisen sind (zumindest nicht gegenüber dem Cytosol angereichert). Da hingegen sowohl der Stimulus als auch das Substrat der PI-3-Kinase γ , also G β γ -Komplexe und PtdIns-4,5-P₂, membranär lokalisiert sind, war zu vermuten, daß die G β γ -regulierte Klasse I_B PI-3-Kinase γ analog zu den RTK-sensitiven Klasse I_A PI-3-Kinasen bei ihrer Aktivierung aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert wird. Im Folgenden sollte dies überprüft werden.

4.3.3 Stabilität der monomeren PI-3-Kinase γ -Untereinheiten

Zunächst sollte die Hypothese überprüft werden, daß die p101-Untereinheit nur im Komplex mit der p110 γ -Untereinheit stabil ist.

HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für Fluoreszenz-markierte p101 und p110 γ (als Beispiele willkürlich ausgewählt: CFP-p101 und YFP-p110 γ) in verschiedenen Mengenverhältnissen cotransfiziert und dann die Mengen an p101 und p110 γ in Ganzzell-Lysaten

mittels Immunoblot-Analyse mit dem anti-GFP-Antikörper bestimmt. Der Immunoblot ist in Abbildung 18 dargestellt.

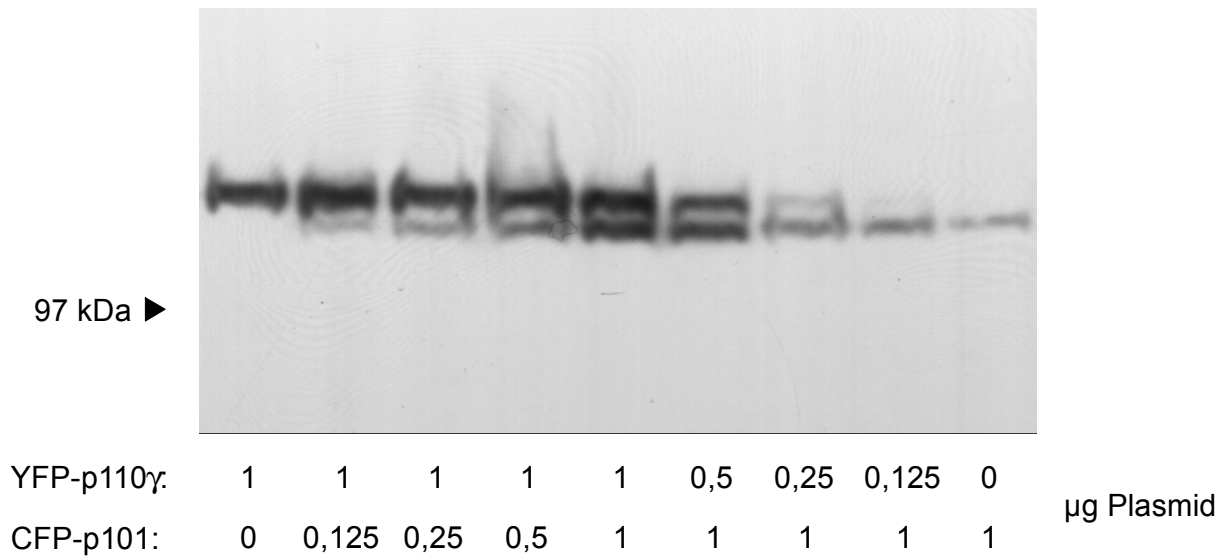


Abb. 18: Stabilität der monomeren PI-3-Kinase γ -Untereinheiten. Anti-GFP-Immunoblot von Ganzzell-Lysaten von mit den Plasmiden für die beiden PI-3-Kinase γ -Untereinheiten in verschiedenen Verhältnissen cotransfizierten HEK293-Zellen. Die Plasmid-Menge wurde jeweils mit leerem Vektor (pcDNA3) auf 2 μ g aufgefüllt.

Die Intensität des Immunoblot-Signals der p110 γ (siehe Abb. 18, obere Bande) war nur abhängig von der Menge des eingesetzten p110 γ -Plasmids (siehe Abb. 18, rechte Hälfte), bei konstanter Menge p110 γ -Plasmid aber unabhängig von der Menge des cotransfizierten p101-Plasmids (siehe Abb. 18, linke Hälfte). Das Immunoblot-Signal für die p101 (siehe Abb. 18, untere Bande) hingegen wurde deutlich schwächer nicht nur mit abnehmender Menge an p101-Plasmid (siehe Abb. 18, linke Hälfte), sondern auch bei konstanter Menge p101-Plasmid mit abnehmender Menge an coexprimierter p110 γ (siehe Abb. 18, rechte Hälfte).

Die p110 γ ist also auch als Monomer stabil, unabhängig von der p101-Untereinheit. Die p101 hingegen ist nicht als Monomer, sondern nur zusammen mit der p110 γ -Untereinheit im PI-3-Kinase γ -Heterodimer stabil.

4.3.4 Membranrekrutierung der PI-3-Kinase γ durch G β γ

Um nun die Frage zu klären, ob die PI-3-Kinase γ tatsächlich durch G β γ -Komplexe aus dem Cytosol an die Plasmamembran rekrutiert wird, wurde die Fluoreszenz-markierte PI-3-Kinase γ mit G β γ in HEK293-Zellen coexprimiert und ihre subzelluläre Lokalisation wie üblich Fluoreszenz-mikroskopisch analysiert.

In einem ersten Versuch wurde der Effekt der Coexpression von $G\beta\gamma$ auf die subzelluläre Lokalisation der monomeren YFP-markierten PI-3-Kinase γ -Untereinheiten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

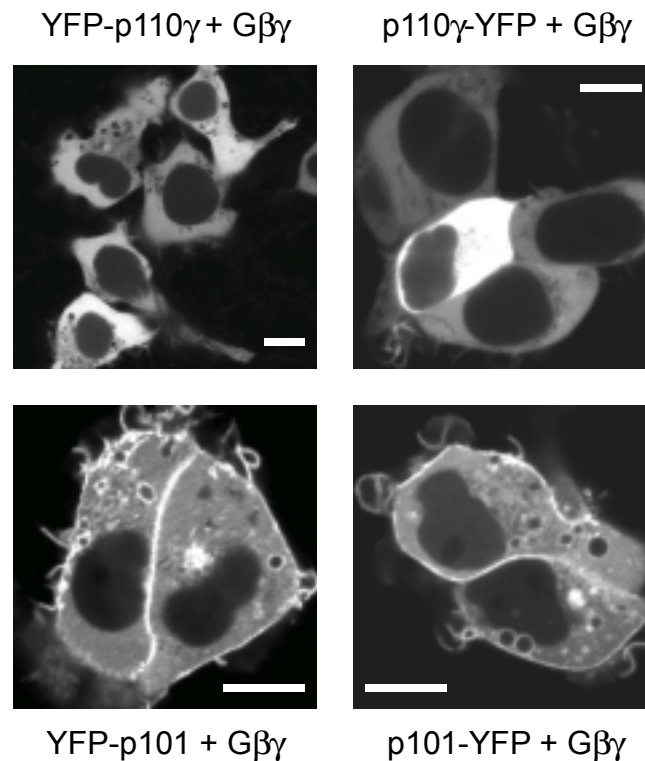


Abb. 19: Einfluß von $G\beta\gamma$ auf die subzelluläre Lokalisation der monomeren PI-3-Kinase γ -Untereinheiten. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für jeweils eine fluoreszierende PI-3-Kinase γ -Untereinheit und $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ cotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der YFP-Fusionsproteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M.

Die Cotransfektion der Plasmide für $G\beta$ und $G\gamma$ hatte keinen Einfluß auf die subzelluläre Lokalisation von monomer exprimierter fluoreszierender p110 γ (siehe Abb. 19, oben; vgl. Abb. 15, oben, Seite 56): Sie war ausschließlich im Cytosol lokalisiert, eine Anreicherung an der Membran war nicht zu erkennen. Das Ergebnis war unabhängig von der Position der YFP-Markierung am N- oder C-Terminus der p110 γ (siehe Abb. 19, oben links / oben rechts).

Hingegen wurde die subzelluläre Verteilung der monomer exprimierten fluoreszierenden p101 durch die Cotransfektion der Plasmide für $G\beta$ und $G\gamma$ signifikant beeinflusst (siehe Abb. 19, unten; vgl. Abb. 15, unten): Sie war an der Plasmamembran sowie auch auf Endomembranen angereichert. Außerdem war die p101 auch im Cytosol, aber kaum noch im Zellkern zu finden. Das Ergebnis war unabhängig von der Position der YFP-Markierung an ihrem N- oder C-Terminus (siehe Abb. 19, unten links / unten rechts). Dieses Ergebnis legt nahe, daß (1.) die heterolog exprimierten $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten $G\beta\gamma$ -Komplexe gebildet haben, daß (2.) diese $G\beta\gamma$ -Komplexe aufgrund der heterologen

Überexpression frei und nicht im Komplex mit $G\alpha$ -Untereinheiten vorlagen, daß (3.) die heterolog exprimierten $G\gamma_2$ -Untereinheiten auch isoprenyliert wurden, so daß die $G\beta\gamma$ -Komplexe an der Membran lokalisiert waren, und daß schließlich (4.) die fluoreszierende p101-Untereinheit durch diese $G\beta\gamma$ -Komplexe an die Membran rekrutiert wurde.

Zur Bestätigung dieser Schlußfolgerungen wurde wie zuvor YFP-p101 mit $G\beta\gamma$ coexprimiert und ihre subzelluläre Lokalisation untersucht, dabei aber in Kontrollansätzen (a) das $G\gamma_2$ -Plasmid weggelassen, (b) das $G\beta_1$ -Plasmid weggelassen oder (c) zusätzlich eine $G\alpha$ -Untereinheit ($G\alpha_{i2}$) coexprimiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

Die Membranrekrutierung der YFP-p101 war nicht zu beobachten, wenn nur $G\beta_1$ oder nur $G\gamma_2$ coexprimiert wurde (siehe Abb. 20, oben); sie beruhte also auf einer Bildung von $G\beta\gamma$ -Komplexen (siehe Abb. 20, unten links). Ebenso wurde sie durch zusätzliche Coexpression einer $G\alpha$ -Untereinheit ($G\alpha_{i2}$) unterdrückt (siehe Abb. 20, unten rechts). Im heterotrimeren G-Protein sind die Effektor-Bindungsstellen von $G\beta\gamma$ durch die $G\alpha$ -Untereinheit maskiert.

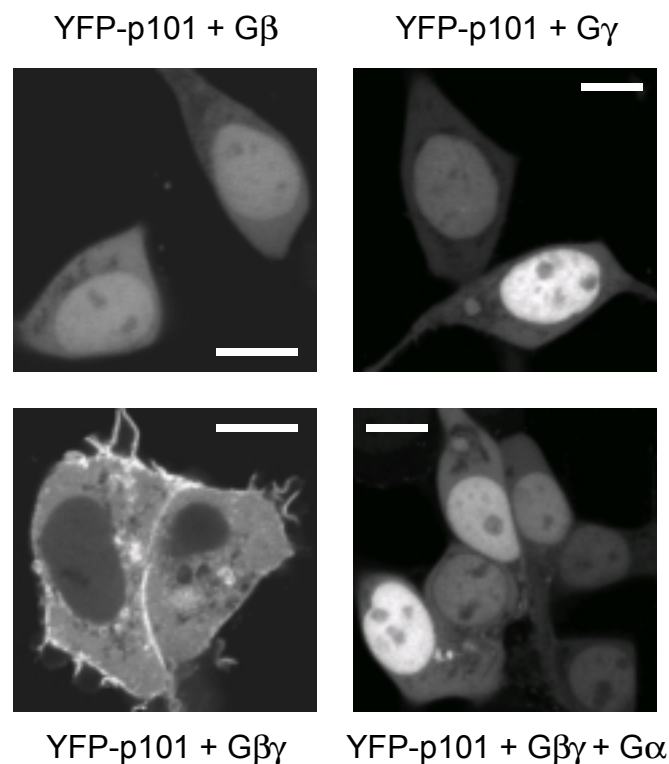


Abb. 20: Freie $G\beta\gamma$ -Komplexe vermitteln die Membranrekrutierung der p101. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für YFP-p101 sowie für (a) $G\beta_1$ oder (b) $G\gamma_2$ oder (c) $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ oder (d) $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ und $G\alpha_{i2}$ cotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der YFP-p101 wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ m.

Beim Vergleich der subzellulären Lokalisation der entweder solitär oder mit $G\beta\gamma$ coexprimierten fluoreszierenden p101 (siehe Abb. 19, unten; vgl. Abb. 15, unten) fällt auf,

daß in Anwesenheit von $G\beta\gamma$ kaum p101 mehr im Kern, jedoch vermehrt im Cytosol nachzuweisen ist. Dies legt die Vermutung nahe, daß sie nicht nur an der Membran sondern auch im Cytosol mit $G\beta\gamma$ interagiert und hierdurch einerseits am Eintritt in den Zellkern gehindert sowie andererseits vor dem Abbau im Cytosol geschützt wird. Die Komplexierung der p101 mit der p110 γ -Untereinheit hatte ja diese beiden Effekte (vgl. Abb. 15 - 18). Gegen diese Hypothese könnte sprechen, daß $G\beta\gamma$ -Komplexe durch die Isoprenylierung der $G\gamma$ -Untereinheit an der Membran lokalisiert sind und nicht im Cytosol. Aufgrund der heterologen Überexpression werden jedoch möglicherweise nicht alle überexprimierten $G\gamma_2$ -Untereinheiten tatsächlich geranylgeranyliert, so daß ein Teil der $G\beta\gamma$ -Komplexe im Cytosol verbleibt (Jin et al., 2000). Um diese Literatur-bekanntete Beobachtung auch in unserem Versuchsansatz nachzuweisen, wurde die subzelluläre Lokalisation einer alleine oder zusammen mit $G\gamma_2$ überexprimierten Fluoreszenz-markierten $G\beta_1$ -Untereinheit (CFP- $G\beta_1$) untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 21 dargestellt.

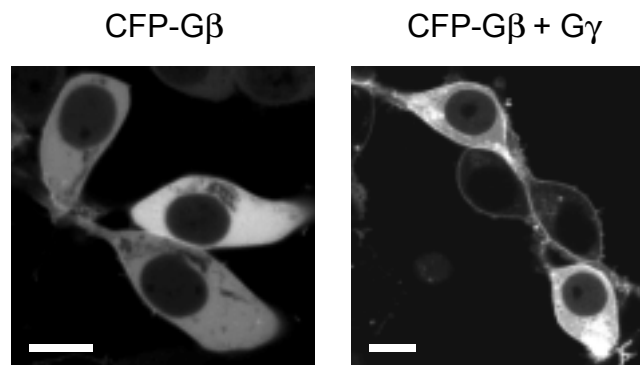


Abb. 21: Subzelluläre Lokalisation von $G\beta\gamma$. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für CFP-markierte $G\beta_1$ und für $G\gamma_2$ transfiziert. Die subzelluläre Lokalisation des CFP- $G\beta_1$ wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M.

Das solitär überexprimierte fluoreszierende $G\beta_1$ war wie erwartet bevorzugt im Cytosol lokalisiert (siehe Abb. 21, links). Ein nur sehr schwach sichtbares Fluoreszenz-Signal an der Membran deutete darauf hin, daß ein sehr kleiner Anteil des heterolog überexprimierten $G\beta_1$ auch mit endogenen $G\gamma$ -Untereinheiten Komplexe einging.

Das zusammen mit $G\gamma_2$ überexprimierte CFP- $G\beta_1$ zeigte hingegen eine deutliche Membranassoziation (siehe Abb. 21, rechts). Dies bestätigt noch einmal die Bildung von funktionell aktiven $G\beta\gamma$ -Komplexen aus heterolog coexprimierten $G\beta_1$ - und $G\gamma_2$ -Untereinheiten. Jedoch war das fluoreszierende $G\beta_1$ nicht nur an der Membran, sondern auch im Cytosol nachzuweisen. Dabei war je nach Zelle um so mehr CFP- $G\beta_1$ im Cytosol zu finden, je stärker die Fluoreszenz insgesamt war. Diese Beobachtungen stimmen mit der Annahme überein, daß ab einer bestimmten Menge an überexprimiertem $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ nicht mehr alle $G\gamma_2$ -Untereinheiten geranylgeranyliert werden können, so daß ein Teil der $G\beta\gamma$ -Komplexe im Cytosol verbleibt und hier mit p101 interagieren könnte.

Die Membranrekrutierung der p101 durch coexprimiertes $G\beta\gamma$ (siehe Abb. 19, unten; auch Abb. 20) bestätigt gleichzeitig, daß die fehlende Membrantranslokation der mit $G\beta\gamma$ coexprimierten p110 γ (siehe Abb. 19, oben) nicht auf funktionell inaktiven $G\beta\gamma$ -Komplexen beruht. Die monomere p110 γ wird offenbar tatsächlich nicht durch $G\beta\gamma$ an die Membran rekrutiert.

Als nächstes wurde der Einfluß von $G\beta\gamma$ auf die subzelluläre Lokalisation der heterodimeren PI-3-Kinase γ untersucht. Hierzu wurde die PI-3-Kinase γ mit einer YFP-Markierung am N- oder C-Terminus jeweils einer Untereinheit mit $G\beta\gamma$ in HEK293-Zellen coexprimiert und die Zellen wie üblich Fluoreszenz-mikroskopisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

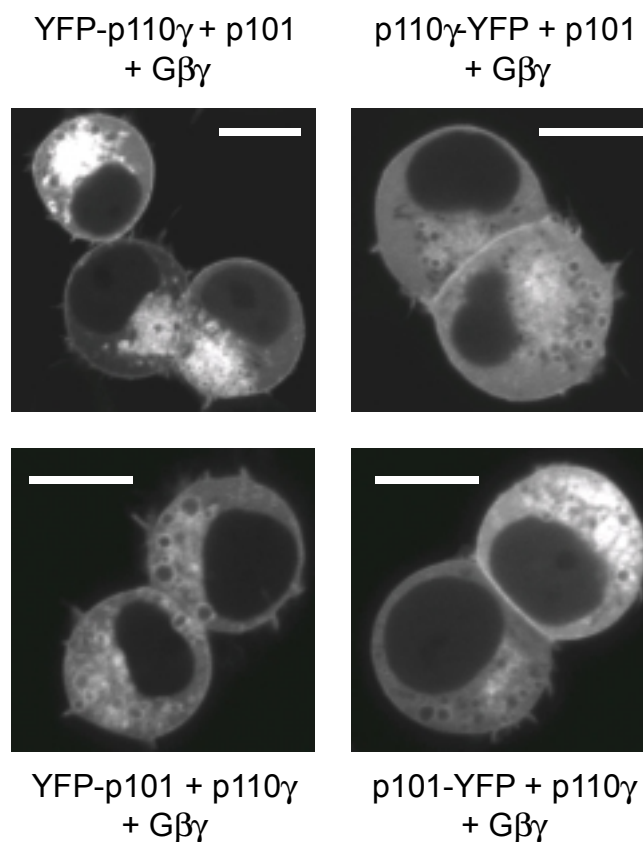


Abb. 22: Membranrekrutierung der heterodimeren PI-3-Kinase γ durch $G\beta\gamma$. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für jeweils eine N- oder C-terminal YFP-markierte PI-3-Kinase γ -Untereinheit zusammen mit dem Plasmid für die jeweils komplementäre nicht-markierte Untereinheit (in doppelter Menge, um möglichst vollständige Heterodimerisierung der fluoreszierenden Untereinheit zu erreichen) sowie für $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ cotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der fluoreszierenden PI-3-Kinase γ wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M.

Wurde die fluoreszierende p110 γ mit p101 (nicht-markiert) und $G\beta\gamma$ coexprimiert, so war auch membranständige p110 γ nachweisbar, unabhängig von der Position des YFP an ihrem N- oder C-Terminus (siehe Abb. 22, oben, links / rechts). Offenbar wurde die p110 γ im

Komplex mit p101 durch G β γ an die Membran rekrutiert. Die nicht-katalytische p101-Untereinheit spielt offenbar in der heterodimeren PI-3-Kinase γ (zumindest in diesem zellulären System) die Rolle eines Adapters, der die Rekrutierung der im Heterodimer gebundenen katalytischen p110 γ -Untereinheit durch G β γ an die Membran vermittelt (siehe auch Diskussion, Kapitel 5.2, Abb. 42).

Die G β γ -vermittelte Membranrekrutierung der fluoreszierenden p101 durch die zusätzliche Coexpression von p110 γ (nicht-markiert) nicht gehemmt, unabhängig von der Position des YFP am N- oder C-Terminus der p101 (siehe Abb. 22, unten, links / rechts). Allerdings erscheint die G β γ -vermittelte Membranassoziation der fluoreszierenden p101 in Anwesenheit der p110 γ etwas schwächer als in ihrer Abwesenheit (vgl. Abb. 18, unten). Dies könnte darauf hindeuten, daß die Affinität der p101 zu G β γ durch die Heterodimerisierung mit der p110 γ -Untereinheit leicht verringert wird.

Außerdem fiel auf, daß die G β γ -vermittelte Membranassoziation der heterodimeren PI-3-Kinase γ (unabhängig von der Position des YFP an N- oder C-Terminus der p101- oder der p110 γ -Untereinheit) mit einem Abrunden und Ablösen der Zellen einherging (siehe Abb. 22). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, daß es bei der gemeinsamen Überexpression von freien G β γ -Komplexen und heterodimerer PI-3-Kinase γ zu einer konstitutiven Aktivierung des Enzyms kam, und daß diese Daueraktivierung der PI-3-Kinase γ -regulierten Signalwege eine cytotoxische Wirkung hatte, die zum beobachteten Abrunden und Ablösen der Zellen führte.

Deshalb wurde ein Plasmid für eine Kinase-defiziente p110 γ -Mutante hergestellt. Es war bekannt, daß die Mutation des Lysins an Position 833 der p110 γ zu Arginin (K833R) zu einem kompletten Verlust ihrer enzymatischen Aktivität führt (Stoyanova et al., 1997). Entsprechend wurde durch ortsgerichtete Mutagenese ein Plasmid für eine Kinase-defiziente p110 γ -K833R-Mutante mit einer N-terminalen YFP-Markierung (YFP-p110 γ -K833R) generiert und zusammen mit der p101-Untereinheit und G β γ coexprimiert. Zusätzlich wurde überprüft, ob die bei Coexpression von G β γ und PI-3-Kinase γ beobachtete Abrundung der Zellen sensitiv gegenüber dem PI-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin ist. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 23 dargestellt.

In der Tat kam es bei Coexpression der YFP-p110 γ -K833R mit p101 und G β γ zwar zur Membranassoziation der fluoreszierenden Kinase-defizienten p110 γ , nicht jedoch zum Abrunden und Ablösen der Zellen (siehe Abb. 23, links; vgl. Abb. 22).

Ebenso wurde durch die Behandlung mit Wortmannin zumindest bei einigen der Zellen das Abrunden und Ablösen umgekehrt (siehe Abb. 23, Mitte; vgl. Abb. 22): Ohne Wortmannin waren praktisch alle Zellen mit Membran-assoziiertem PI-3-Kinase γ rund und lösten sich ab, nach Wortmannin-Behandlung hingegen nur etwa die Hälfte, während die anderen eine Fibroblasten-typische Form aufwiesen und gut auf dem Glasplättchen

adhärierten. Dieser Effekt war nicht nach Inkubation mit DMSO, dem Lösungsmittel des Wortmannins, zu beobachten (siehe Abb. 23, rechts).

Das Abrunden und Ablösen der Zellen mit der $G\beta\gamma$ -vermittelten Membranassoziation der heterodimeren PI-3-Kinase γ beruhte also auf der enzymatischen Aktivität der PI-3-Kinase γ , die offenbar durch die überexprimierten freien $G\beta\gamma$ -Komplexe dauerstimuliert wurde.

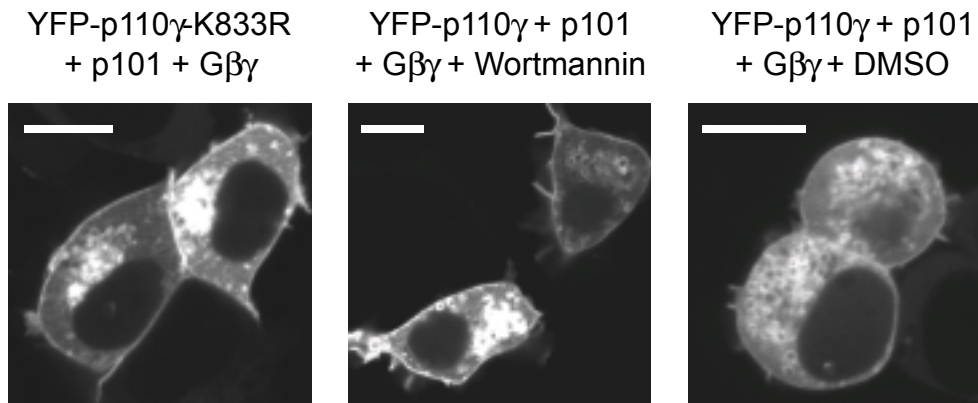


Abb. 23: Abhängigkeit des Abrundens und AblöSENS der $G\beta\gamma$ -/PI-3-Kinase γ -coexprimierenden Zellen von der enzymatischen Aktivität der PI-3-Kinase γ . HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden YFP-markierte p110 γ und nicht-markierte p101 (in doppelter Menge, um möglichst vollständige Heterodimerisierung der fluoreszierenden p110 γ zu erreichen) sowie für $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ cotransfiziert und zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M. Links: Anstelle der normalen YFP-p110 γ wurde die Kinase-defiziente Mutante YFP-p110 γ -K833R exprimiert. Mitte / rechts: Die Zellen wurden vor der Analyse 30 Minuten lang mit dem PI-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin (100 nM) oder nur mit dessen Lösungsmittel DMSO inkubiert.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die PI-3-Kinase γ *in vivo* in der Tat durch $G\beta\gamma$ -Komplexe aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert wird, wobei die nicht-katalytische p101-Untereinheit als notwendiger Adapter fungiert. Außerdem führt die Coexpression der heterodimeren PI-3-Kinase γ mit $G\beta\gamma$ nicht nur zu ihrer Rekrutierung an die Membran, sondern auch zur ihrer Aktivierung. Diese Ergebnisse klären jedoch nicht, ob die Rekrutierung an die Membran bereits den Mechanismus darstellt, mit dem $G\beta\gamma$ -Komplexe die PI-3-Kinase γ *in vivo* aktivieren. So ist vorstellbar, daß die Membranrekrutierung an sich die PI-3-Kinase γ noch nicht aktiviert, sondern zusätzlich noch eine allosterische Aktivierung durch $G\beta\gamma$ stattfindet.

4.4 *G*-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ

Bei der Coexpression der heterodimeren PI-3-Kinase γ mit $G\beta\gamma$ kam es durch die enzymatische Aktivität der PI-3-Kinase γ zum Abrunden und Ablösen der Zellen (siehe Abb.

22 - 23). Als Nachweis oder Maß für die enzymatische Aktivität der PI-3-Kinase γ eignet sich dies allerdings nur schlecht, da der Effekt vermutlich eine unspezifische cytotoxische Wirkung einer unphysiologischen Dauerstimulation darstellt.

Um den Mechanismus der G-Protein-vermittelten Aktivierung der PI-3-Kinase γ *in vivo* genauer untersuchen zu können, mußte also ein geeigneter Nachweis für ihre enzymatische Aktivität gefunden werden. Ein früher Schritt in PI-3-Kinase-regulierten Signalwegen ist die Membranrekrutierung von cytosolischen Effektormolekülen mit PtdIns-3,4,5- P_3 -bindenden PH-Domänen (siehe Abb. 5). Die Membrantranslokation eines solchen Effektors oder seiner isolierten PH-Domäne, z. B. als GFP-Fusionsprotein, könnte also als Nachweis für PI-3-Kinase-Aktivität dienen. Die PI-3-Kinase-vermittelte Membrantranslokation von Fluoreszenz-markierten PtdIns-3,4,5- P_3 -bindenden PH-Domänen war bereits von anderen Gruppen beschrieben worden (Balla et al., 2000), zum Beispiel einer GFP-markierten PH-Domäne des GRP1 (*General receptor for phosphoinositides 1*, siehe Einleitung, Kapitel 1.3.5) (GFP-GRP1_{PH}) in HEK293-Zellen (Gray et al., 1999). Anstelle der Abrundens und Ablösens der Zellen sollte nun also die Membranrekrutierung dieser fluoreszierenden PtdIns-3,4,5- P_3 -bindenden PH-Domäne als Nachweis für die enzymatische Aktivität der PI-3-Kinase γ genutzt werden.

Außerdem sollte die unphysiologische und zum bei der Analyse eher störenden Abrundens und Ablösen der Zellen führende Dauerstimulation der PI-3-Kinase γ durch überexprimierte freie G $\beta\gamma$ -Komplexe vermieden werden. Die Aktivierung der PI-3-Kinase γ sollte daher durch transiente Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors erfolgen. Wie erwähnt ist die Aktivierung der PI-3-Kinase γ über den G_i-koppelnden Rezeptor für das chemotaktische Peptid fMLP gut charakterisiert (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.1).

4.4.1 PI-3-Kinase γ -vermittelte Membrantranslokation einer PtdIns-3,4,5- P_3 -bindenden PH-Domäne

Für die genauere Untersuchung des Aktivierungsmechanismus der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ *in vivo* sollte also ein Versuchsaufbau etabliert werden, bei dem die PI-3-Kinase γ über den fMLP-Rezeptor stimuliert und ihre enzymatische Aktivität durch eine Membrantranslokation der GFP-markierten PtdIns-3,4,5- P_3 -bindenden PH-Domäne des GRP1 nachgewiesen wird.

Die GFP-GRP1_{PH} wurde also zusammen mit dem fMLP-Rezeptor (fMLP-R) und der PI-3-Kinase γ (p101 + p110 γ , beide nicht-markiert) in HEK293-Zellen exprimiert und die subzelluläre Verteilung der fluoreszierenden PtdIns-3,4,5- P_3 -bindenden PH-Domäne als Indikator für PI-3-Kinase-Aktivität vor und nach Zugabe von fMLP Fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Um zu überprüfen, ob eine fMLP-induzierte Translokation der

fluoreszierenden PH-Domäne tatsächlich durch die heterolog coexprimierte PI-3-Kinase γ vermittelt wird, wurde diese bei einem Kontrollansatz weggelassen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

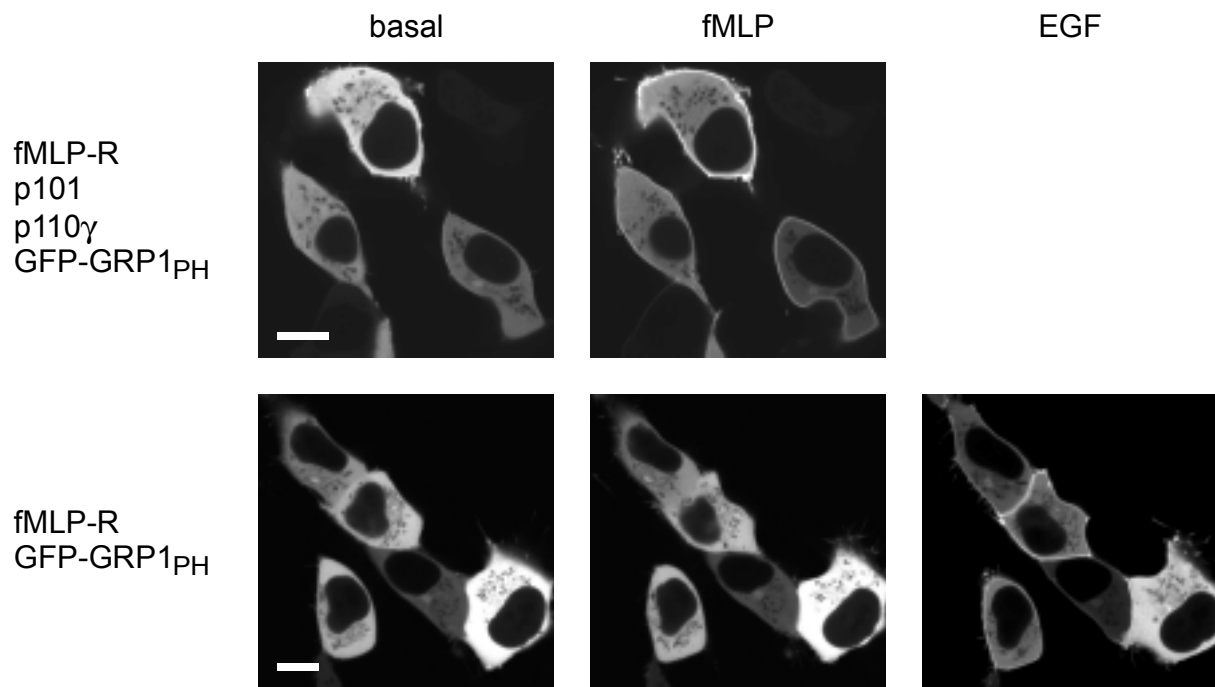


Abb. 24: Agonist-induzierte und PI-3-Kinase γ -vermittelte Membrantranslokation der GFP-markierten PtdIns-3,4,5- P_3 -bindenden PH-Domäne von GRP1 (GFP-GRP1_{PH}). HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für den G_i-Protein-koppelnden fMLP-Rezeptor und die GFP-markierte PtdIns-3,4,5- P_3 -bindende PH-Domäne des GRP1 (GFP-GRP1_{PH}) cotransfiziert (unten), bzw. zusätzlich noch mit den Plasmiden für die beiden PI-3-Kinase γ -Untereinheiten (p101 und p110 γ , beide nicht markiert) (oben). Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} wurde wie von Gray und Mitarbeitern (1999) beschrieben bereits einen Tag nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ m. Basal: Vor Agonist-Zugabe. fMLP: 4 Minuten nach Zugabe von fMLP ad 1 μ M (10 μ l 100 μ M auf 1 ml Puffer). War nach 8 Minuten immer noch kein Effekt des fMLP auf die subzelluläre Verteilung der GFP-GRP1_{PH} zu erkennen, so wurde EGF hinzugegeben. EGF: 4 Minuten nach Zugabe von EGF ad 100 ng/ml (10 μ l 10 μ g/ml auf 1 ml Puffer).

In den mit allen vier Plasmiden (fMLP-Rezeptor + p101 + p110 γ + GFP-GRP1_{PH}) cotransfizierten Zellen war die GFP-GRP1_{PH} vor der Zugabe von fMLP fast ausschließlich im Cytosol lokalisiert (siehe Abb. 24, oben, „basal“). In einigen Zellen war auch eine sehr schwache basale Membranassoziation der fluoreszierenden PH-Domäne zu erkennen; im Kern war keine Fluoreszenz nachweisbar. Die Zugabe von fMLP führte zu einer deutlichen Rekrutierung der GFP-GRP1_{PH} aus dem Cytosol an die Membran (siehe Abb. 24, oben, „fMLP“). Die maximale Membranlokalisation war nach vier Minuten erreicht.

In Abwesenheit der PI-3-Kinase γ war die fluoreszierende PH-Domäne unter basalen Bedingungen vollständig im Cytosol lokalisiert; die beim Ansatz mit allen vier Plasmiden

beobachtete schwache basale Membranassoziation der GFP-GRP1_{PH} war hier nicht zu beobachten (siehe Abb. 24, unten, „basal“; vgl. Abb. 24, oben, „basal“). Noch viel deutlicher machte sich die Abwesenheit der PI-3-Kinase γ beim Effekt des fMLP bemerkbar: fMLP hatte keinen sichtbaren Einfluß auf die Lokalisation der fluoreszierenden PH-Domäne; sie blieb vollständig im Cytosol (siehe Abb. 24, unten, „fMLP“). Die bei coexprimierter PI-3-Kinase γ beobachtete schwache basale Membranassoziation und die deutliche fMLP-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} waren also abhängig von der Stimulation spezifisch durch die heterolog exprimierte PI-3-Kinase γ vermittelte Effekte.

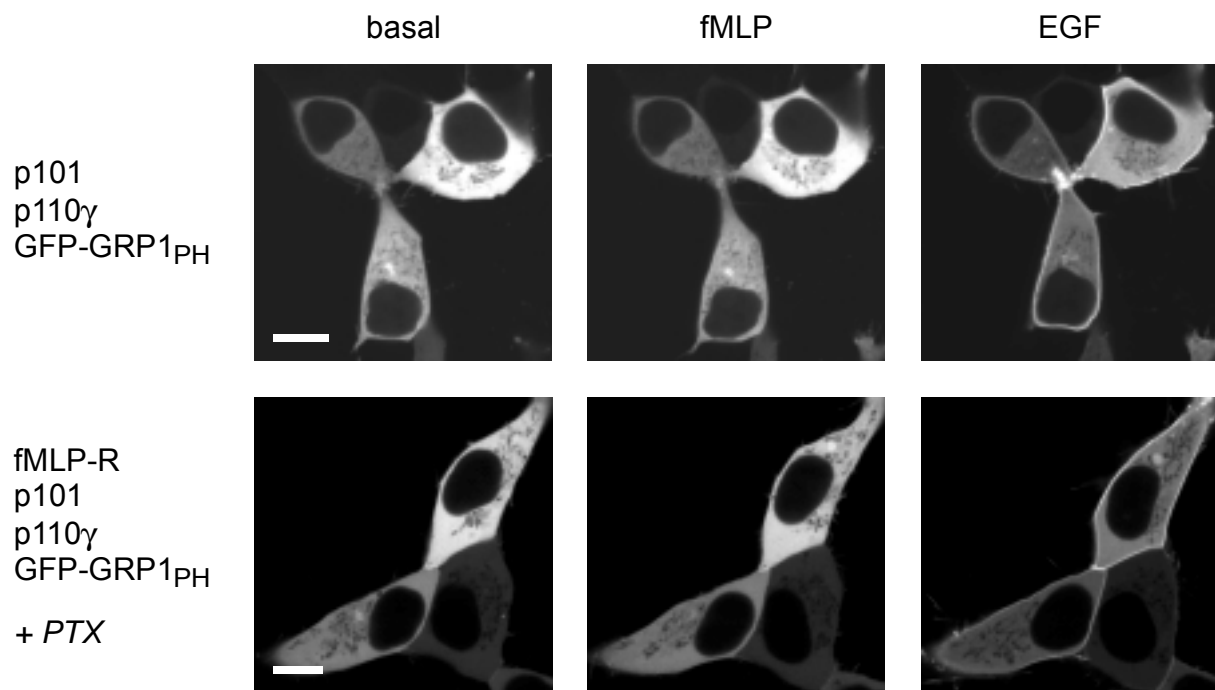
Um auszuschließen, daß das Ausbleiben einer fMLP-induzierten Membrantranslokation der GFP-GRP1_{PH} tatsächlich auf der Abwesenheit der PI-3-Kinase γ und nicht auf einem unspezifischen Defekt der gerade betrachteten Zellen beruhte, wurde versucht, ob in diesen Zellen eine Translokation der PH-Domäne durch Aktivierung einer anderen PI-3-Kinase erreicht werden könnte. HEK293-Zellen exprimieren zwar endogen nicht die G-Protein-regulierte Klasse I_B PI-3-Kinase γ ; die RTK-regulierten Klasse I_A PI-3-Kinasen α und β sind aber ubiquitär exprimiert. Ebenso gibt es in vielen Zellen endogen vorkommende Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Es wäre also vorstellbar, daß es auch durch Aktivierung endogen in den HEK293-Zellen exprimierter Klasse I_A PI-3-Kinasen über endogen exprimierte Wachstumsfaktor-Rezeptoren zu einer PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung kommt, die eine sichtbare Membranrekrutierung der heterolog überexprimierten GFP-GRP1_{PH} induziert. In der Tat kam es nach Zugabe von EGF wiederum innerhalb weniger Minuten zu einer deutlichen Membranrekrutierung der fluoreszierenden PH-Domäne (siehe Abb. 24, unten, „EGF“), obwohl vorher fMLP keinen Effekt auf ihre Verteilung hatte.

Mit diesem Versuchsansatz ist es also möglich, spezifisch die enzymatische Aktivität bzw. Aktivierung der heterolog exprimierten PI-3-Kinase γ durch die Membranrekrutierung einer Fluoreszenz-markierten PtdIns-3,4,5-P₃-bindenden PH-Domäne sichtbar zu machen.

In weiteren Kontrollversuchen sollte überprüft werden, ob der Effekt von fMLP bei den mit allen vier Plasmiden (fMLP-Rezeptor + p101 + p110 γ + GFP-GRP1_{PH}) cotransfizierten Zellen auch tatsächlich über den fMLP-Rezeptor sowie ein heterotrimeres G-Protein vermittelt wird. Hierfür wurden bei der Transfektion das fMLP-Rezeptor-Plasmid weggelassen bzw. die Zellen vor der Analyse mit Pertussistoxin (PTX) behandelt. Der fMLP-Rezeptor koppelt wie erwähnt an heterotrimeres G_i-Proteine, und PTX modifiziert G_i-Proteine so, daß sie nicht mehr an Rezeptoren koppeln und aktiviert werden können. Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} wurde wie beim vorigen Versuch untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.

Die zuvor bei Coexpression des fMLP-Rezeptors und der PI-3-Kinase γ gefundene schwache basale Membranassoziation der GFP-GRP1_{PH} (siehe Abb. 24, oben, „basal“) war in Abwesenheit des fMLP-Rezeptors nicht zu beobachten (siehe Abb. 25, oben, „basal“). Sie

beruhte also nicht auf einer Basalaktivität der überexprimierten PI-3-Kinase γ an sich, sondern auf der geringen konstitutiven Aktivität des überexprimierten fMLP-Rezeptors. Wie zu erwarten hatte fMLP in Abwesenheit des fMLP-Rezeptors keinen Effekt auf die Lokalisation der GFP-GRP1_{PH} (siehe Abb. 25, oben, „fMLP“). Anschließende Zugabe von EGF löste hingegen wieder eine deutliche Membrantranslokation der fluoreszierenden PH-Domäne aus (siehe Abb. 25, oben, „EGF“). Die zuvor bei Coexpression des fMLP-Rezeptors und der PI-3-Kinase γ beobachtete fMLP-induzierte Membranrekretion der GFP-GRP1_{PH} (siehe Abb. 24, oben, „fMLP“) war also tatsächlich über den heterolog exprimierten fMLP-Rezeptor



vermittelt.

Abb. 25: fMLP-Rezeptor- und G-Protein-Abhängigkeit der fMLP-induzierten PI-3-Kinase γ -vermittelten GFP-GRP1_{PH}-Translokation. Oben: HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für die beiden PI-3-Kinase γ -Untereinheiten und den fluoreszierenden PtdIns-3,4,5-P₃-Sensor GFP-GRP1_{PH} (aber nicht den fMLP-Rezeptor) cotransfiziert. Unten: Die Zellen wurden mit den Plasmiden für beide PI-3-Kinase γ -Untereinheiten und GFP-GRP1_{PH} sowie den G_i-Protein-kopplenden fMLP-Rezeptor cotransfiziert, aber vor der Analyse mit Pertussistoxin (PTX) inkubiert (200 ng/ml, 24 Stunden), welches durch ADP-Ribosylierung von G_i-Proteinen deren Rezeptor-vermittelte Aktivierung verhindert. Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} wurde einen Tag nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M. Basal: Vor Agonist-Zugabe. fMLP: 4 Minuten nach Zugabe von fMLP ad 1 μ M (10 μ l 100 μ M auf 1 ml Puffer). War nach 8 Minuten immer noch kein Effekt des fMLP auf die subzelluläre Verteilung der GFP-GRP1_{PH} zu erkennen, so wurde EGF hinzugegeben. EGF: 4 Minuten nach Zugabe von EGF ad 100 ng/ml (10 μ l 10 μ g/ml auf 1 ml Puffer).

Die gleichen Effekte wie das Weglassen des fMLP-Rezeptor-Plasmids (siehe Abb. 25, oben) hatte auch die PTX-Behandlung der mit allen vier Plasmiden (fMLP-Rezeptor + p101 + p110 γ + GFP-GRP1_{PH}) cotransfizierten Zellen (siehe Abb. 25, unten): In den PTX-behandelten Zellen war die fluoreszierende PH-Domäne weder unter basalen Bedingungen an der Membran zu finden (siehe Abb. 25, unten, „basal“), noch wurde sie nach Zugabe von fMLP an die Membran transloziert (siehe Abb. 25, unten, „fMLP“), sehr wohl aber nach anschließender Zugabe von EGF (siehe Abb. 25, unten, „EGF“). Die zuvor bei den nicht PTX-behandelten Zellen beobachtete fMLP-induzierte Membranrekrutierung der GFP-GRP1_{PH} (siehe Abb. 24, oben, „fMLP“) war also über ein heterotrimeres G_i-Protein vermittelt, wie für einen bzw. fMLP-Rezeptor-vermittelten Effekt zu erwarten.

4.4.2 Notwendigkeit der p101-Untereinheit für die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ in vivo

Die bisherigen Untersuchungen hatten gezeigt, daß die cytosolische PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ -Komplexe an die Membran rekrutiert wird (siehe Abb. 19 - 22), wobei die nicht-katalytische p101-Untereinheit als Adapter fungiert (siehe auch Diskussion, Kapitel 5.2, Abb. 42). Da das Substrat der Klasse I PI-3-Kinasen, PtdIns-4,5-P₂, ein Membranlipid ist, war davon auszugehen, daß die Translokation der PI-3-Kinase γ aus dem Cytosol an die Membran bei ihrer Aktivierung eine wesentliche Rolle spielt - möglicherweise sogar den Aktivierungsmechanismus selbst darstellt. Es war daher zu vermuten, daß die für die G $\beta\gamma$ -induzierte Membranrekrutierung der PI-3-Kinase γ notwendige nicht-katalytische p101-Untereinheit somit auch für die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ *in vivo* unverzichtbar sein könnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde wie zuvor die Agonist-induzierte Translokation der PtdIns-3,4,5-P₃-bindenden GFP-GRP1_{PH} als Indikator für PI-3-Kinase-Aktivität in HEK293-Zellen untersucht, die außerdem noch mit den Plasmiden für den fMLP-Rezeptor und die p110 γ , aber diesmal nicht die p101 transfiziert worden waren. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 dargestellt.

In Abwesenheit der p101-Untereinheit waren weder eine basale Membranassoziation noch eine fMLP-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} zu beobachten (siehe Abb. 26, „basal“ bzw. „fMLP“; vgl. auch Abb. 24), wohingegen EGF wieder eine deutliche Membranrekrutierung auslöste (siehe Abb. 26, „EGF“).

Die p101-Untereinheit ist also für die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ *in vivo* notwendig (siehe Abb. 24 - 26).

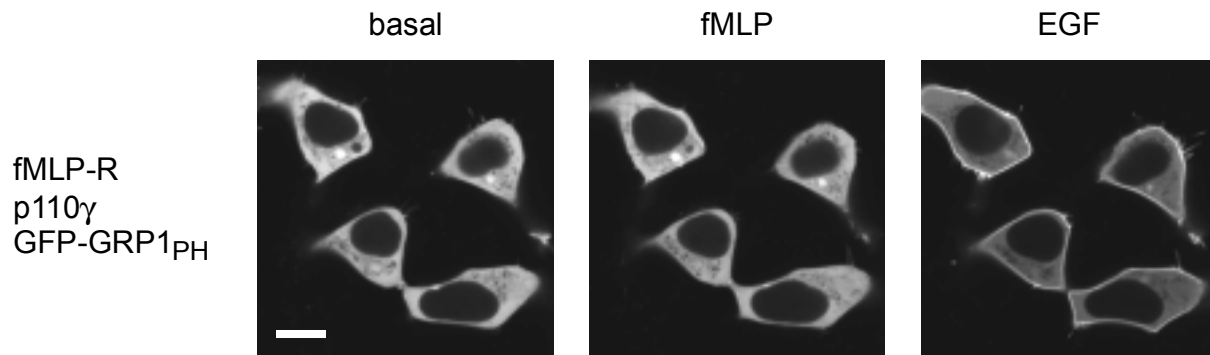


Abb. 26: Notwendigkeit der p101-Untereinheit für die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ *in vivo*. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für den fMLP-Rezeptor, den fluoreszierenden PtdIns-3,4,5- P_3 -Sensor GFP-GRP1_{PH} sowie die p110 γ (nicht markiert), nicht aber die p101-Untereinheit cotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} wurde einen Tag nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M. Basal: Vor Agonist-Zugabe. fMLP: 4 Minuten nach Zugabe von fMLP ad 1 μ M (10 μ l 100 μ M auf 1 ml Puffer). War nach 8 Minuten immer noch kein Effekt des fMLP auf die subzelluläre Verteilung der GFP-GRP1_{PH} zu erkennen, so wurde EGF hinzugegeben. EGF: 4 Minuten nach Zugabe von EGF ad 100 ng/ml (10 μ l 10 μ g/ml auf 1 ml Puffer).

4.4.3 Aktivität einer Membran-assoziierten PI-3-Kinase γ

Bezüglich der Frage nach dem Mechanismus, wie G $\beta\gamma$ die PI-3-Kinase γ aktiviert, fügen sich die bisher präsentierten Ergebnisse gut in die Vorstellung ein, daß G $\beta\gamma$ hierbei als Membrananker fungiert, der die PI-3-Kinase γ dadurch aktiviert, daß er sie aus dem Cytosol an die Membran zu ihrem Substrat rekrutiert. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte nun eine künstlich an der Membran verankerte PI-3-Kinase γ untersucht werden: Wenn G $\beta\gamma$ die PI-3-Kinase γ tatsächlich durch die Rekrutierung aus dem Cytosol an die Membran zu ihrem Substrat aktiviert, müßte eine künstlich Membran-assoziierte PI-3-Kinase γ bereits ohne Stimulation durch G $\beta\gamma$ enzymatisch aktiv sein.

Die Membranassoziation eines eigentlich cytosolischen Proteins läßt sich durch Anhängen von Signalsequenzen für Lipidmodifikationen erreichen. Häufig wird z. B. die auch für die Isoprenylierung der G γ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine verantwortliche C-terminale Sequenz CAAX (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.2.2.1) an den C-Terminus eines Proteins angehängt. Auch das monomere GTP-bindende Protein Ras trägt an seinem C-Terminus das CAAX-Motiv und wird farnesyliert. Die Membranverankerung des H-Ras wird unterstützt durch bis zu zwei Palmytylierungen ebenfalls in der Nähe des C-Terminus (Casey, 1994). Für die Versuche mit einer künstlich Membran-assoziierten PI-3-Kinase γ wurde ein Plasmid für eine p110 γ -Untereinheit konstruiert, die an ihrem C-Terminus mit den 18 C-terminalen Aminosäuren des H-Ras (inklusive CAAX-Box und beider Palmytylierungsstellen) fusioniert ist. Nach dem charakteristischen Isoprenylierungs-Motiv wird das

Fusionsprotein aus der p110 γ und den 18 C-terminalen Aminosäuren des H-Ras im Folgenden vereinfacht als p110 γ -CAAX bezeichnet.

Zunächst sollte überprüft werden, ob die p110 γ -CAAX tatsächlich an der Membran lokalisiert ist. Hierfür wurde zusätzlich ein Plasmid für eine N-terminal YFP-markierte p110 γ -CAAX (YFP-p110 γ -CAAX) konstruiert, in HEK293-Zellen exprimiert und ihre subzelluläre Lokalisation mit dem Fluoreszenz-mikroskopisch analysiert. Außerdem wurde untersucht, ob eine YFP-markierte p101-Untereinheit durch coexprimierte nicht-markierte p110 γ -CAAX an die Membran gebunden wird. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

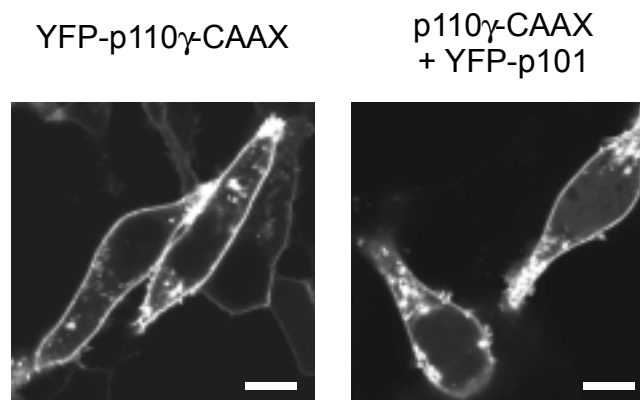


Abb. 27: Überprüfung der subzellulären Lokalisation der künstlich Membran-assoziierten p110 γ -CAAX. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für YFP-p110 γ -CAAX (links) bzw. p110 γ -CAAX (nicht markiert) und YFP-p101 (rechts) (co-)transfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der YFP-Fusionsproteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M.

Im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym (siehe Abb. 15) war die YFP-p110 γ -CAAX zum größten Teil an der Plasmamembran sowie auch auf Endomembranen lokalisiert; das Fusionsprotein war offenbar erfolgreich posttranslational modifiziert worden (siehe Abb. 27, links).

Dies kann indirekt auch für die nicht-markierte p110 γ -CAAX geschlossen werden, denn die coexprimierte YFP-p101 zeigte die gleiche Verteilung wie die YFP-p110 γ -CAAX, lag also offenbar in Heterodimeren mit Membran-assoziiierter p110 γ -CAAX vor (siehe Abb. 27, rechts).

Interessanterweise hatten Zellen, die eine Membran-assoziierte YFP-p110 γ -CAAX oder ein Membran-assoziiertes YFP-p101/p110 γ -CAAX-Heterodimer exprimierten, eine normale Fibroblasten-typische Form (siehe Abb. 27): Ein Abrunden und Ablösen wie bei der Coexpression der heterodimeren PI-3-Kinase γ mit G $\beta\gamma$ (vgl. Abb. 22) war nicht zu erkennen. Das Abrunden und Ablösen dieser Zellen (siehe Abb. 23) war also nicht unmittelbar auf die Membranlokalisierung des Enzyms zurückzuführen. Die Aktivierung der PI-3-Kinase γ beruhte also nicht unmittelbar auf ihrer Rekrutierung aus dem Cytosol an die Membran zu ihrem

Substrat. Dies ließ vermuten, daß $G\beta\gamma$ zusätzlich zu seiner Funktion als Membrananker noch einen weiteren Effekt hatte, der wie beschrieben über eine Aktivierung der PI-3-Kinase γ zum Abrunden und Ablösen der Zellen führte.

Um diesem interessanten Hinweis weiter nachzugehen, wurde nun der Effekt von zusätzlich zur YFP-p110 γ -CAAX bzw. p110 γ -CAAX und YFP-p101 noch coexprimiertem $G\beta\gamma$ auf die Morphologie der Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

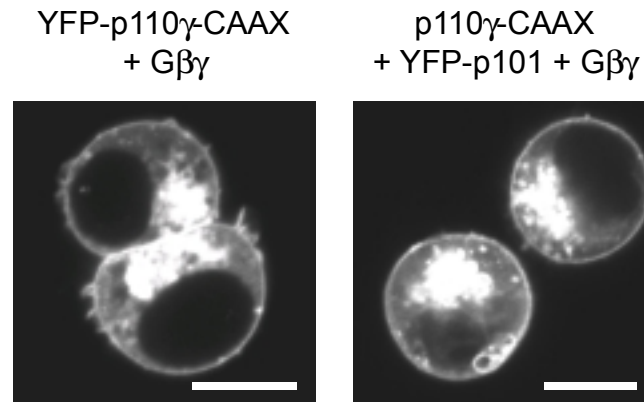


Abb. 28: Abrunden und Ablösen der Zellen bei Coexpression der Membran-assoziierten p110 γ -CAAX mit $G\beta\gamma$. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für YFP-p110 γ -CAAX (links) bzw. p110 γ -CAAX (nicht markiert) und YFP-p101 (rechts) sowie für $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ cotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der YFP-Fusionsproteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M.

Tatsächlich war bei Coexpression von p110 γ -CAAX, YFP-p101 und $G\beta\gamma$ wieder das für die dauerstimulierte PI-3-Kinase γ -Aktivität typische Abrunden und Ablösen der Zellen zu beobachten (siehe Abb. 28, rechts). $G\beta\gamma$ hatte also einen aktivierenden Effekt auf die PI-3-Kinase γ , obwohl diese schon an der Membran lokalisiert war.

Interessanterweise war das typische Abrunden und Ablösen auch bei Coexpression von YFP-p110 γ -CAAX und $G\beta\gamma$ in Abwesenheit der p101 zu beobachten (siehe Abb. 28, links). Der stimulierende Effekt des $G\beta\gamma$ auf die Membran-assoziierte PI-3-Kinase γ bzw. p110 γ war also unabhängig von der nicht-katalytischen p101-Untereinheit - ganz im Gegensatz zur vorher beschriebenen $G\beta\gamma$ -induzierten Membranrekrutierung (vgl. Abb. 19 - 22) und fMLP-Rezeptor-vermittelten Aktivierung der PI-3-Kinase γ (vgl. Abb. 24 - 27) ohne künstliche Membranverankerung.

Diese Befunde legen die Interpretation nahe, daß $G\beta\gamma$ -Komplexe die PI-3-Kinase γ durch zwei Mechanismen aktivieren, die jeweils spezifisch an einer der beiden Untereinheiten des heterodimeren Enzyms ansetzen: Zunächst rekrutiert $G\beta\gamma$ die PI-3-Kinase γ über ihre nicht-katalytische p101-Untereinheit aus dem Cytosol an die Membran, und hier wird dann in

einem zweiten Schritt die katalytische p110 γ -Untereinheit durch G β γ direkt allosterisch aktiviert (siehe auch Diskussion, Kapitel 5.3, Abb. 43).

Mit der GFP-GRP1_{PH}-Translokation als geeigneterer Methode sollte nachfolgend die enzymatische Aktivität und Aktivierung der Membran-assoziierten PI-3-Kinase γ weiter abgeklärt werden.

Zuerst wurde mit Hilfe der GFP-GRP1_{PH} als PtdIns-3,4,5-P₃-Sensor überprüft, ob die Membran-assoziierte p110 γ -CAAX tatsächlich keine basale Aktivität aufweist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

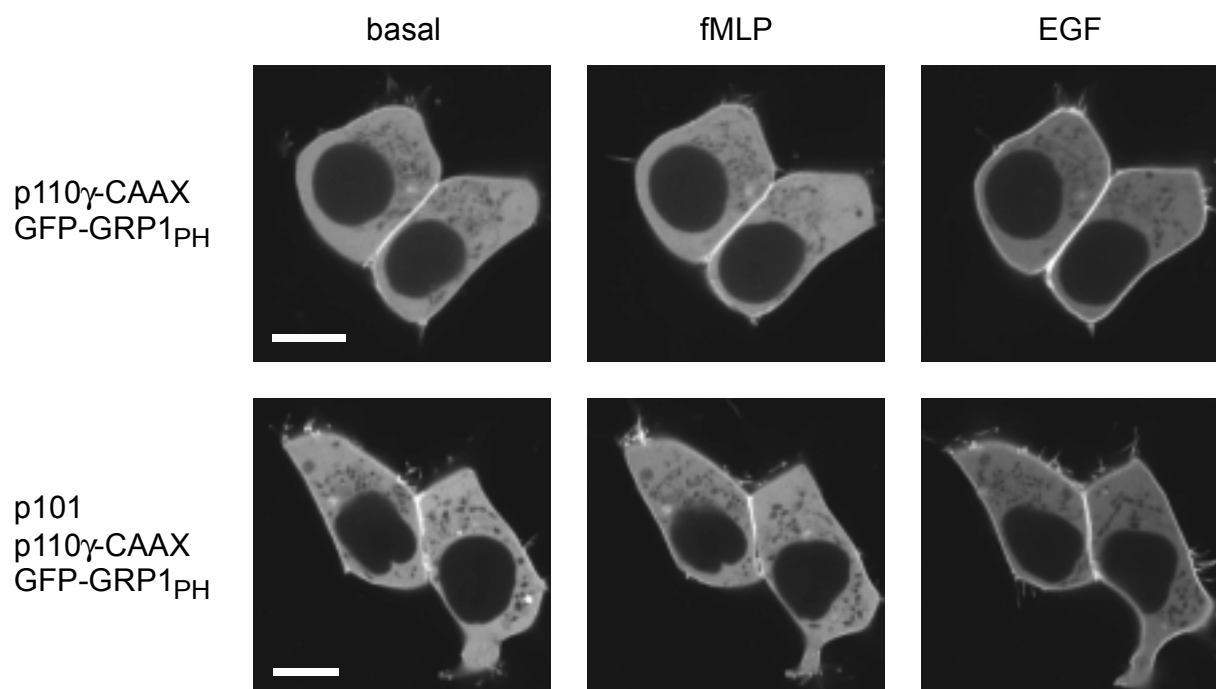


Abb. 29: Enzymatische Aktivität der Membran-assoziierten PI-3-Kinase γ . HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für den fluoreszierenden PtdIns-3,4,5-P₃-Sensor GFP-GRP1_{PH} und die Membran-assoziierte p110 γ -CAAX (oben) oder zusätzlich noch mit dem Plasmid für die p101-Untereinheit cotransfiziert (unten). Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} wurde einen Tag nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M. Basal: Vor Agonist-Zugabe. fMLP: 4 Minuten nach Zugabe von fMLP ad 1 μ M (10 μ l 100 μ M auf 1 ml Puffer). War nach 8 Minuten immer noch kein Effekt des fMLP auf die subzelluläre Verteilung der GFP-GRP1_{PH} zu erkennen, so wurde EGF hinzugegeben. EGF: 4 Minuten nach Zugabe von EGF ad 100 ng/ml (10 μ l 10 μ g/ml auf 1 ml Puffer).

Wenngleich die Expression der Membran-assoziierten PI-3-Kinase γ bzw. p110 γ ohne gleichzeitige G β γ -Überexpression noch nicht zum Abrunden und Ablösen der Zellen geführt hatte (siehe Abb. 27), so war doch bei der Coexpression der GFP-GRP1_{PH} mit der Membran-assoziierten p110 γ oder heterodimeren PI-3-Kinase γ bereits eine leichte basale Membran-

assoziation der PtdIns-3,4,5-P₃-bindenden PH-Domäne erkennbar (siehe Abb. 29). Die An- oder Abwesenheit der p101 war ohne Einfluß (vgl. Abb. 29 oben / unten). Die Membran-assoziierte p110 γ bzw. heterodimere PI-3-Kinase γ war also doch bereits enzymatisch aktiv, auch ohne coexprimiertes G $\beta\gamma$ oder Stimulation eines G-Protein-koppelnden Rezeptors. Offenbar war diese Basalaktivität aber so gering, daß sie zwar durch die PtdIns-3,4,5-P₃-bindende fluoreszierende PH-Domäne nachweisbar war (siehe Abb. 29, „basal“), aber noch nicht zum Abrunden und Ablösen der Zellen führte (siehe Abb. 27).

Wenn tatsächlich die Membran-assoziierte PI-3-Kinase γ bzw. p110 γ noch weiter durch G $\beta\gamma$ stimulierbar ist, so müßte es infolge Stimulation eines zusätzlich coexprimierten fMLP-Rezeptors zu einer weiteren Membranrekrutierung der GFP-GRP1_{PH} über das Basal-Niveau hinaus kommen. In Abwesenheit des fMLP-Rezeptors hatte fMLP natürlich keinen solchen Effekt (siehe Abb. 29, „fMLP“). EGF löste aber eine weitere Membrantranslokation der GFP-GRP1_{PH} aus (siehe Abb. 29, „EGF“). Die durch Expression der Membran-assoziierten PI-3-Kinase γ bzw. p110 γ erhöhte PtdIns-3,4,5-P₃-Menge konnte also noch weiter gesteigert werden.

Um zu überprüfen, ob die Membran-assoziierte p110 γ -CAAX bzw. die heterodimere p101/p110 γ -CAAX über ihre (als leichte basale Membranlokalisation der GFP-GRP1_{PH} zu beobachtende) Basalaktivität hinaus noch über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor stimuliert werden können, wurde zusätzlich der fMLP-Rezeptor coexprimiert. Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der fluoreszierenden PH-Domäne wurde wie üblich Fluoreszenz-mikroskopisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

Bei beiden Kombinationen (GFP-GRP1_{PH} + fMPL-Rezeptor + p110 γ -CAAX +/- p101) war eine leichte basale Membranassoziation der GFP-GRP1_{PH} zu erkennen (siehe Abb. 30, „basal“; vgl. Abb. 29, „basal“). fMLP löste diesmal aber eine deutliche zusätzliche Membranrekrutierung der GFP-GRP1_{PH} aus (siehe Abb. 30, „fMLP“). Die Membran-assoziierte PI-3-Kinase γ war also in der Tat über ihre Basalaktivität hinaus noch stimulierbar. Hierbei machte es keinen Unterschied, ob mit der Membran-assoziierten p110 γ -CAAX noch die p101 coexprimiert wurde oder nicht (vgl. Abb. 30, oben / unten, „fMLP“). Die fMLP-Rezeptor-vermittelte Stimulation der Membran-assoziierten PI-3-Kinase kann also direkt an der katalytischen p110 γ -Untereinheit angreifen. Dieses Ergebnis paßt gut zum beobachteten Abrunden und Ablösen der G $\beta\gamma$ und p110 γ -CAAX coexprimierenden Zellen unabhängig von der Coexpression der p101-Untereinheit (siehe Abb. 28).

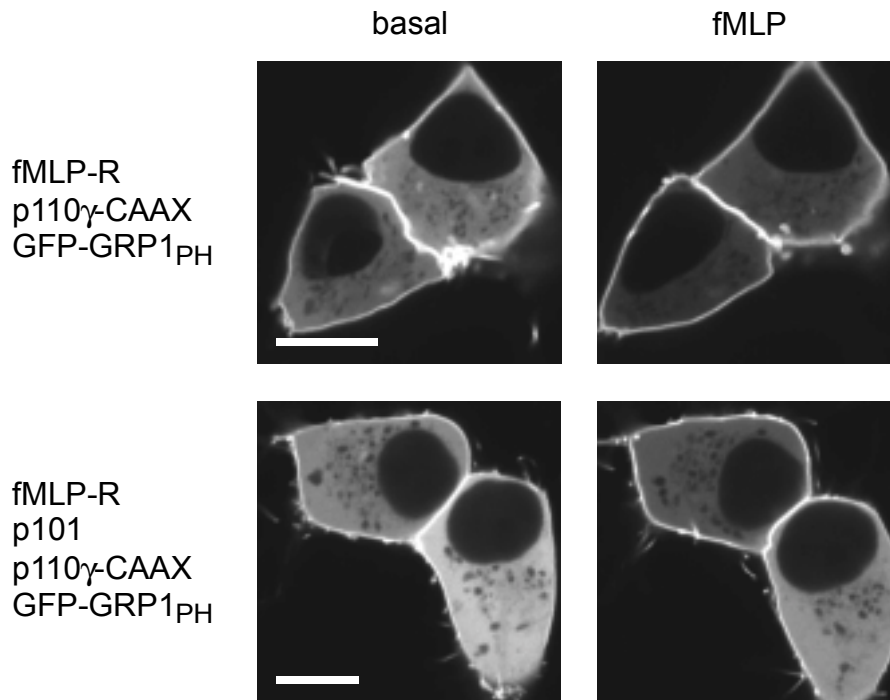


Abb. 30: Stimulation der Membran-assoziierten PI-3-Kinase γ . HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für den fMLP-Rezeptor, den PtdIns-3,4,5- P_3 -Sensor GFP-GRP1_{PH} sowie die membran-assoziierte p110 γ -CAAX (oben) oder zusätzlich noch mit dem Plasmid für die p101-Untereinheit (unten) cotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} wurde einen Tag nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ m. Basal: Vor Agonist-Zugabe. fMLP: 4 Minuten nach Zugabe von fMLP ad 1 μ M (10 μ l 100 μ M auf 1 ml Puffer). War nach 8 Minuten immer noch kein Effekt des fMLP auf die subzelluläre Verteilung der GFP-GRP1_{PH} zu erkennen, so wurde EGF hinzugegeben. EGF: 4 Minuten nach Zugabe von EGF ad 100 ng/ml (10 μ l 10 μ g/ml auf 1 ml Puffer).

Die vorgestellten Befunde sprechen klar für die Möglichkeit einer direkten, p101-unabhängigen Stimulation der Membran-assoziierten p110 γ -CAAX durch G β γ . Wie erwähnt wird die p101-Untereinheit in der Literatur aber mitunter als notwendiger Adapter für die Stimulation der PI-3-Kinase γ durch G β γ dargestellt (Stephens et al., 1997). Daher sollte der angenommene Signalweg durch weitere Kontrollen abgesichert werden. Erstens sollte mit Hilfe von PTX bestätigt werden, daß auch die p101-unabhängige fMLP-Rezeptor-vermittelte und p110 γ -CAAX-abhängige GFP-GRP1_{PH}-Translokation tatsächlich über ein heterotrimeres G β -Protein vermittelt wird. Zweitens sollte ausgeschlossen werden, daß der Effekt indirekt über Ras vermittelt wird. Denn die katalytischen p110-Untereinheiten aller Klasse I PI-3-Kinasen besitzen eine Ras-Bindungs-Domäne und können auch durch GTP-gebundenes Ras aktiviert werden (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.3 und 1.3.4). Zwar ist Ras typischerweise an der Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen beteiligt (siehe Einleitung, Kapitel 1.2.1, Abb. 1B), soll aber auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren über G β γ aktiviert werden können (Koch et al., 1994; Gutkind, 1998). Es wäre daher vorstellbar, daß die beobachtete p101-unabhängige Stimulation der Membran-assoziierten p110 γ -CAAX darauf beruht, daß durch

den stimulierten fMLP-Rezeptor bzw. das überexprimierte G $\beta\gamma$ endogenes Ras aktiviert wird und erst dieses dann die p110 γ -CAAX stimuliert. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde der Effekt einer zusätzlich exprimierten dominant negativen Ras-Mutante, H-Ras N17 (Reusch et al., 2001a), auf die fMLP-Rezeptor-vermittelte, p101-unabhängige Aktivierung der p110 γ -CAAX untersucht. Die inhibitorische Wirkung des H-Ras N17 auf Ras-vermittelte Signalwege wurde in einem Parallelversuch kontrolliert (EGF-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

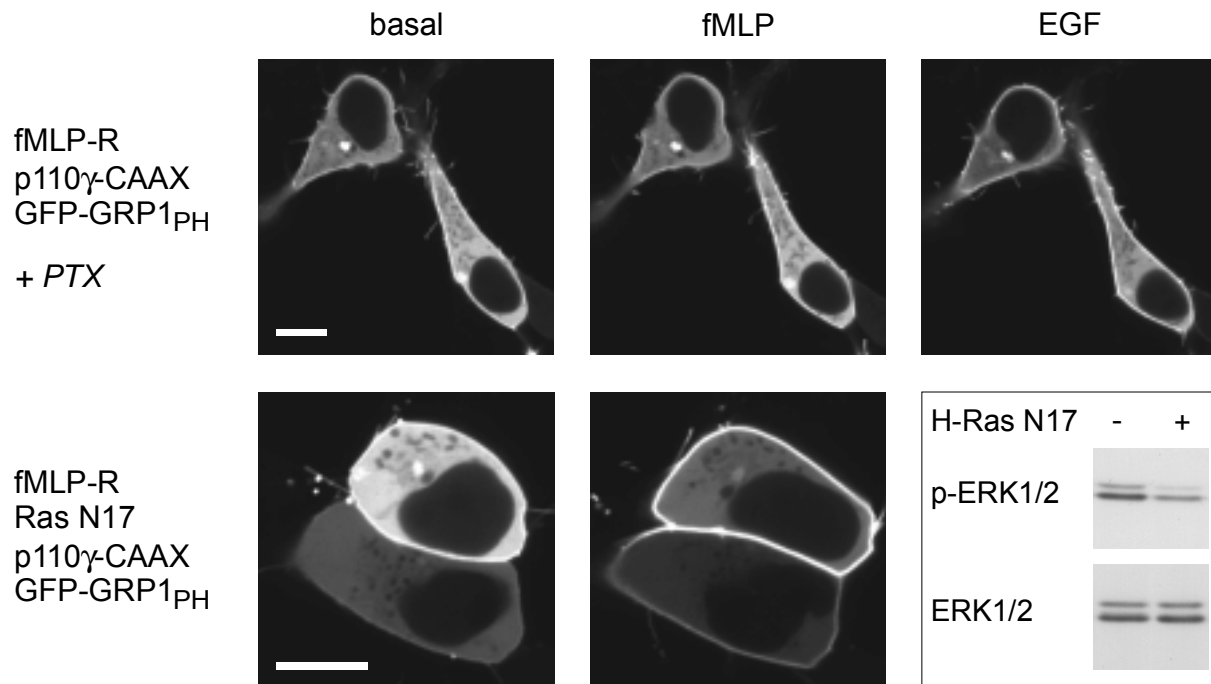


Abb. 31: G-Protein-Abhängigkeit und Ras-Unabhängigkeit der p101-unabhängigen Aktivierung der Membran-assoziierten p110 γ -CAAX. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für den fMLP-Rezeptor, den PtdIns-3,4,5-P₃-Sensor GFP-GRP1_{PH} sowie die Membran-assoziierte p110 γ -CAAX (nicht aber die p101-Untereinheit) (oben) oder zusätzlich noch mit dem Plasmid für dominant negatives H-Ras N17 (unten) cotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} wurde einen Tag nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M. Basal: Vor Agonist-Zugabe. fMLP: 4 Minuten nach Zugabe von fMLP ad 1 μ M (10 μ l 100 μ M auf 1 ml Puffer). War nach 8 Minuten immer noch kein Effekt des fMLP auf die subzelluläre Verteilung der GFP-GRP1_{PH} zu erkennen, so wurde EGF hinzugegeben. EGF: 4 Minuten nach Zugabe von EGF ad 100 ng/ml (10 μ l 10 μ g/ml auf 1 ml Puffer). Unten rechts: Zur Überprüfung der inhibitorischen Wirkung der Cotransfektion des H-Ras-N17-Plasmids auf Ras-vermittelte Signalwege wurden HEK293-Zellen mit dem H-Ras-N17-Plasmid (+) (gleiche Menge wie beim nebenstehenden Fluoreszenzmikroskopischen Experiment) oder nur mit Vektor (-) transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit EGF stimuliert (5 Minuten, 10 ng/ml) und dann direkt in Lämmli-Puffer lysiert. Aliquots der Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert: Die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (unten) bzw. die phosphorylierten (aktivierten) p-ERK1 und p-ERK2 (oben) wurden mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

Die PTX-Behandlung der den fMLP-Rezeptor, p110 γ -CAAX und GFP-GRP1_{PH} coexpressierenden Zellen hatte keinen Einfluß auf die basale Membranassoziation der fluoreszierenden PH-Domäne (siehe Abb. 31, oben, „basal“). Dies bestätigt noch einmal die intrinsische Basalaktivität der Membran-assoziierten p110 γ -CAAX (vgl. Abb. 29, oben, „basal“). Die PTX-Behandlung verhinderte aber die zuvor bei den unbehandelten Zellen beobachtete fMLP-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} (siehe Abb. 31, oben, „fMLP“; vgl., Abb. 30, oben, „fMLP“), wohingegen die anschließende Zugabe von EGF wieder eine Membranrekrutierung des PtdIns-3,4,5-P₃-Sensors auslöste (siehe Abb. 31, oben, „EGF“). Die zuvor bei den nicht PTX-behandelten Zellen beobachtete fMLP-induzierte p101-unabhängige Stimulation der p110 γ -CAAX (siehe Abb. 30) wurde also durch ein heterotrimeres G β -Protein vermittelt.

Die Coexpression des dominant negativen H-Ras N17 hatte hingegen keinen sichtbaren Einfluß auf die fMLP-induzierte Membrantranslokation der fluoreszierenden PH-Domäne (siehe Abb. 31, unten, „fMLP“; vgl. Abb. 30, oben, „fMLP“). Die EGF-induzierte MAP-Kinase-Aktivierung wurde jedoch durch das H-Ras N17 gehemmt (siehe Abb. 31, unten rechts): Während in beiden Zell-Lysaten etwa gleich viel ERKs (ERK1/2) vorlagen, war die Menge an phosphorylierten ERKs (p-ERK1/2) bei Coexpression des H-Ras N17 (+) deutlich geringer als bei den Vektor-transfizierten Zellen (-). Bei diesem Vergleich ist zusätzlich zu berücksichtigen, daß bei einer Transfektion stets nur ein Teil der Zellen auch tatsächlich die Plasmide aufnehmen und exprimieren (bei der hier verwendeten Methode bei den HEK293-Zellen etwa 20 bis 50 %), so daß das H-Ras N17 nur in einem Teil der Zellen eine Wirkung haben konnte, also keinesfalls ein vollständiges Verschwinden der Phospho-ERK-Banden zu erwarten gewesen wäre.

Die fMLP-induzierte p101-unabhängige Stimulation der p110 γ -CAAX wird also nicht über Ras vermittelt.

Die Ergebnisse mit der Membran-assoziierten p110 γ -CAAX und der Membrantranslokation der GFP-GRP1_{PH} als Indikator für PI-3-Kinase-Aktivität zeigen also: An der Membran verankerte PI-3-Kinase γ bzw. p110 γ -CAAX ist bereits ohne Stimulation enzymatisch aktiv, unabhängig von der An- oder Abwesenheit der nicht-katalytischen p101-Untereinheit (siehe Abb. 29, unten / oben, „basal“). Jedoch kann die membranäre PI-3-Kinase γ bzw. p110 γ -CAAX weiter durch G β γ stimuliert werden, und zwar ebenfalls unabhängig von p101 (siehe Abb. 30, unten / oben, „fMLP“; Abb. 31

4.4.4 Bestätigung der Befunde zur Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch G β γ in vivo durch alternative Methoden

Um die Befunde zum *in vivo* Aktivierungsmechanismus der PI-3-Kinase γ durch G β γ (siehe auch Diskussion, Kapitel 5.3, Abb. 43) zu untermauern, sollten sie mit alternativen Methoden bestätigt werden. Erstens sollte anstelle der GFP-GRP1_{PH} eine andere PH-Domäne als PtdIns-3,4,5-P₃-Sensor verwendet werden, nämlich die der Btk. Zweitens sollte die Aktivität der PI-3-Kinase γ mit einer nicht Fluoreszenz-mikroskopischen Methode untersucht werden, nämlich durch Immunoblot-Analyse der Phosphorylierung des PI-3-Kinase-Effektors Akt/PKB. Drittens sollte ein anderes Zellsystem als die HEK293-Zellen verwendet werden, nämlich glatte Gefäßmuskelzellen.

4.4.4.1 Translokation der Fluoreszenz-markierten PH-Domäne der Btk in HEK293-Zellen

Wie beschrieben ist neben dem *General receptor for phosphoinositides 1* (GRP1) auch die *Bruton's tyrosine kinase* (Btk) ein PI-3-Kinase-Effektor mit einer spezifisch PtdIns-3,4,5-P₃-bindenden PH-Domäne (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.5, Abb. 5). Auch die PH-Domäne der Btk (Btk_{PH}) ist bereits als GFP-Fusionsprotein zum Nachweis von PI-3-Kinase-Aktivität beschrieben worden (Várnai et al., 1999). Interessanterweise wurde berichtet, daß die Btk_{PH}-GFP unter basalen Bedingungen gleichmäßig im Cytosol und im Kern der transfizierten Zellen verteilt ist. Hingegen ist die GFP-GRP1_{PH} unter basalen Bedingungen nur im Cytosol, aber nicht im Kern zu finden (siehe z. B. Abb. 24, unten, „basal“). Dies zeigt, daß die beiden PH-Domänen von GRP1 und Btk trotz ihrer Ähnlichkeit bezüglich der spezifischen und affinen Bindung an PtdIns-3,4,5-P₃ auch unterschiedliche Eigenschaften haben.

In einer ersten Versuchsserie wurde die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der Btk_{PH}-CFP (C-terminal mit CFP fusionierte Btk_{PH}) bei Coexpression mit dem fMLP-Rezeptor und entweder nur der katalytischen p110 γ - oder beiden PI-3-Kinase γ -Untereinheiten cotransfizierten HEK293-Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

Die mit dem fMLP-Rezeptor und der p110 γ coexprimierte Btk_{PH}-CFP war wie von Várnai und Mitarbeitern (1999) beschrieben unter basalen Bedingungen gleichmäßig in Cytosol und Zellkern verteilt (siehe Abb. 32, oben, „basal“). Damit entsprach das Verteilungsmuster dem von freiem GFP (bzw. seinen andersfarbigen Varianten, vgl. Abb. 9) und unterschied sich von dem der GFP-GRP1_{PH} (vgl. z. B. Abb. 24, unten, „basal“).

Bei zusätzlicher Coexpression der p101 war bereits unter basalen Bedingungen zusätzlich eine leichte Membranassoziation der Btk_{PH}-CFP zu erkennen (siehe Abb. 32, unten, „basal“). Dies stimmt gut mit den Befunden mit der GFP-GRP1_{PH} überein: die

Coexpression der heterodimeren PI-3-Kinase γ mit dem fMLP-Rezeptor resultierte aufgrund dessen konstitutiver Basalaktivität in einer tonischen PI-3-Kinase γ -Aktivität (vgl. Abb. 24, oben, „basal“). Hierfür erschien die nicht-katalytische p101-Untereinheit erforderlich (vgl. Abb. 26, „basal“).

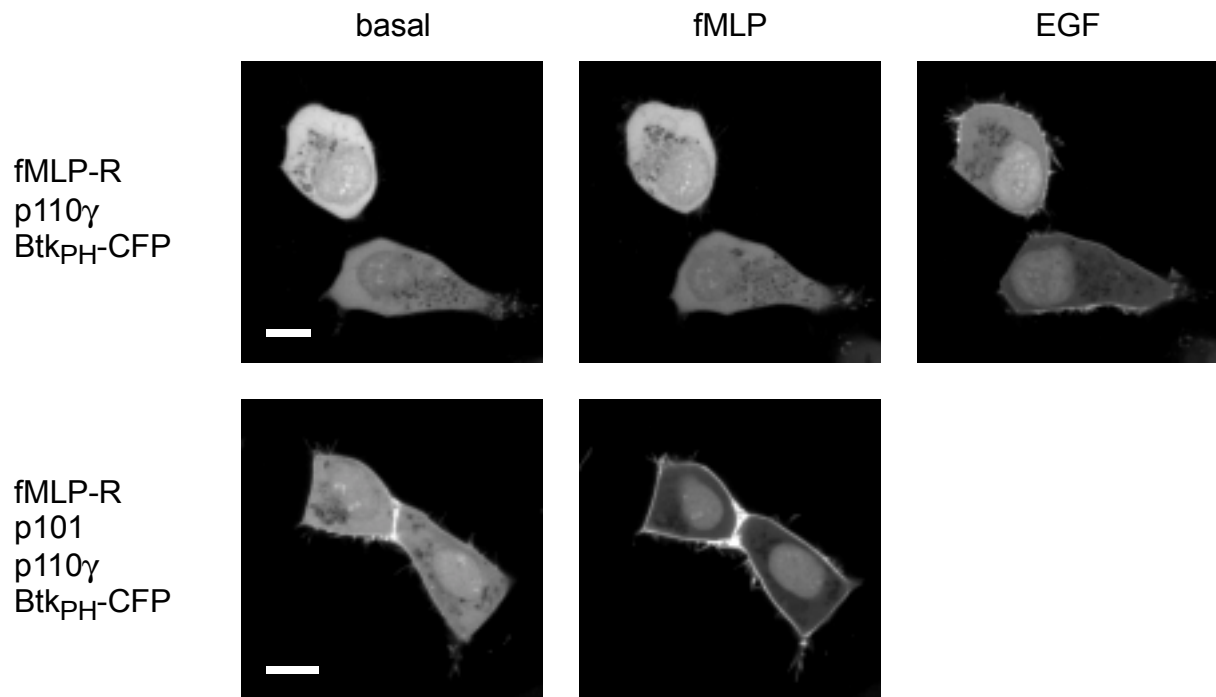


Abb. 32: PI-3-Kinase γ -vermittelte Membranrekrutierung der Fluoreszenz-markierten PH-Domäne der Btk, Btk_{PH}-CFP. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für den fMLP-Rezeptor, die Btk_{PH}-CFP (als fluoreszierender PtdIns-3,4,5-P₃-Sensor) und die p110 γ (oben) oder zusätzlich noch mit dem Plasmid für die p101-Untereinheit (unten) cotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der Btk_{PH}-CFP wurde einen Tag nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M. Basal: Vor Agonist-Zugabe. fMLP: 4 Minuten nach Zugabe von fMLP ad 1 μ M (10 μ l 100 μ M auf 1 ml Puffer). War nach 8 Minuten immer noch kein Effekt des fMLP auf die subzelluläre Verteilung der GFP-GRP1_{PH} zu erkennen, so wurde EGF hinzugegeben. EGF: 4 Minuten nach Zugabe von EGF ad 100 ng/ml (10 μ l 10 μ g/ml auf 1 ml Puffer).

Nach Zugabe von fMLP kam es bei den mit allen vier Plasmiden (fMLP-Rezeptor + p101 + p110 γ + Btk_{PH}-CFP) cotransfizierten Zellen innerhalb von wenigen Minuten zu einer deutlichen Translokation der Btk_{PH}-CFP aus dem Cytosol an die Membran (siehe Abb. 32, unten, „fMLP“). Interessanterweise blieb die im Nukleus vorliegende Btk_{PH}-CFP weiter im Zellkern lokalisiert. Der Austausch der Btk_{PH}-CFP zwischen Kern und Cytosol erfolgt offenbar nur relativ langsam.

Wie zuvor mit der GFP-GRP1_{PH} beobachtet (vgl. Abb. 26) hatte fMLP aber in Abwesenheit der p101 keinen Effekt auf die Verteilung der Btk_{PH}-CFP (siehe Abb. 32, oben,

„fMLP“), wohingegen die anschließende EGF-Zugabe eine Membranrekrutierung der fluoreszierenden PH-Domäne auslöste (siehe Abb. 32, oben, „EGF“).

Diese Befunde mit der Btk_{PH}-CFP stimmen also mit denen mit der GFP-GRP1_{PH} überein: Für die G-Protein-vermittelte Stimulation der PI-3-Kinase γ *in vivo* ist ihre nicht-katalytische p101-Untereinheit erforderlich.

Nachfolgend wurde die Aktivität und Aktivierung der Membran-assoziierten PI-3-Kinase γ mit der Btk_{PH}-CFP untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

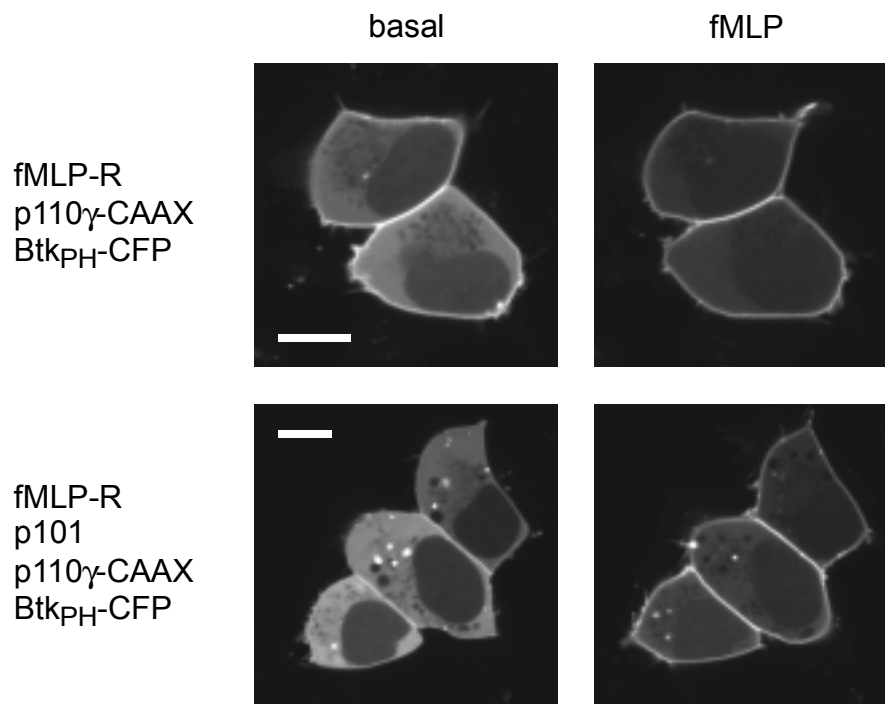


Abb. 33: p110 γ -CAAX-vermittelte Membranrekrutierung der Btk_{PH}-CFP. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für den fMLP-Rezeptor, die Btk_{PH}-CFP und die Membran-assoziierte p110 γ -CAAX (oben) oder zusätzlich noch mit dem Plasmid für die p101-Untereinheit (unten) cotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der Btk_{PH}-CFP wurde einen Tag nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M. Basal: Vor Agonist-Zugabe. fMLP: 4 Minuten nach Zugabe von fMLP ad 1 μ M (10 μ l 100 μ M auf 1 ml Puffer). War nach 8 Minuten immer noch kein Effekt des fMLP auf die subzelluläre Verteilung der GFP-GRP1_{PH} zu erkennen, so wurde EGF hinzugegeben. EGF: 4 Minuten nach Zugabe von EGF ad 100 ng/ml (10 μ l 10 μ g/ml auf 1 ml Puffer).

Wie bei den entsprechenden Ansätzen mit der GFP-GRP1_{PH} (vgl. Abb. 30, „basal“) war bei Coexpression von fMLP-Rezeptor, Btk_{PH}-CFP und p110 γ -CAAX eine deutliche basale Membranassoziation der fluoreszierenden PH-Domäne zu erkennen, und zwar unabhängig davon, ob zusätzlich die nicht-katalytische p101-Untereinheit coexprimiert war oder nicht (siehe Abb. 33, unten / oben, „basal“). Wie bei den Untersuchungen mit der GFP-GRP1_{PH} (vgl. Abb. 24, oben, „basal“; Abb. 30, „basal“) zu beobachten war die basale

Membranassoziation der Btk_{PH}-CFP bei Coexpression mit der p110 γ -CAAX (siehe Abb. 33, „basal“) stärker als bei Coexpression mit dem fMLP-Rezeptor und der heterodimeren PI-3-Kinase γ (vgl. Abb. 32, unten, „basal“). Diese stärkere basale Membranassoziation der Btk_{PH}-CFP ging einher mit einer sichtbaren Verschiebung ihrer Verteilung zwischen Cytosol und Kern in Richtung Cytosol (siehe Abb. 33, „basal“; vgl. Abb. 32, „basal“). Die mit der GFP-GRP1_{PH} gefundene Basalaktivität der Membran-assoziierten p110 γ -CAAX (mit oder ohne coexprimierter p101) wird also im Versuch mit der Btk_{PH}-CFP bestätigt.

fMLP löste eine deutliche weitere Rekrutierung der Btk_{PH}-CFP aus dem Cytosol an die Membran aus, unabhängig von einer coexprimierten p101-Untereinheit (siehe Abb. 33, unten / oben, „fMLP“). Diese Befunde stimmen mit den mit der GFP-GRP1_{PH} gemachten Beobachtungen überein (vgl. Abb. 30, „fMLP“) und erhärten die Schlußfolgerung: Die katalytische p110 γ -Untereinheit der PI-3-Kinase γ kann an der Membran unabhängig von ihrer nicht-katalytischen p101-Untereinheit direkt durch G $\beta\gamma$ aktiviert werden.

4.4.4.2 Phosphorylierung der Akt/PKB in HEK293-Zellen

Die meisten der bis hierher erzielten Ergebnisse beruhen auf Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen. Dies war die Methode der Wahl vor allem für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation (siehe Abb. 15 - 17) und Translokation (siehe Abb. 19 - 22) der PI-3-Kinase γ . Aber auch ihre enzymatische Aktivität bzw. Aktivierung wurde in den vorgestellten Experimenten mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten PH-Domänen als PtdIns-3,4,5-P₃-Sensoren im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht (siehe Abb. 24 - 26 und Abb. 29 - 33). Diese Methode hatte für die Untersuchung der heterolog exprimierten PI-3-Kinase γ außerdem den Vorteil, daß stets nur die Zellen analysiert wurden, die tatsächlich erfolgreich transfiziert waren. Die mit der Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung der PH-Domänen-Translokation erzielten Ergebnisse zum Aktivierungsmechanismus der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ *in vivo* sollten aber auch mit einer alternativen Methode überprüft werden.

Ein weiterer über die Lipidprodukte der Klasse I PI-3-Kinasen aktivierter Effektor neben GRP1 und Btk ist die Akt/PKB (siehe Einleitung, Kapitel 5, Abb. 5). Wie erwähnt wird diese bei ihrer Aktivierung phosphoryliert. Ähnlich wie beim Nachweis der ERK-Phosphorylierung mit Hilfe eines Phospho-ERK-spezifischen Antikörpers (vgl. Abb. 31) ist es mit Hilfe eines Phospho-Akt/PKB-spezifischen Antikörpers möglich, mittels Immunoblot die aktivierte Akt/PKB in Zell-Lysaten und somit indirekt die PI-3-Kinase-Aktivität nachzuweisen (Reusch et al., 2001b). Ein Nachteil dieser Methode ist, wie bei der Untersuchung der ERK-Phosphorylierung bereits diskutiert, daß hierbei stets alle Zellen mit in das Ergebnis eingehen, nicht nur die erfolgreich transfizierten Zellen.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den Untersuchungen mit der Akt/PKB und den fluoreszierenden PH-Domänen als Indikatoren für PI-3-Kinase-Aktivität ist, daß es sich bei der Akt/PKB um ein vollständiges Protein handelt und nicht nur eine Proteindomäne. Es wäre vorstellbar, daß eine isolierte PH-Domäne leichter an die Membran rekrutiert wird als ein ganzes Protein. Die PH-Domänen-Translokation wäre dann zwar ein sensitiverer Indikator für PI-3-Kinase-Aktivität, würde aber nicht unbedingt 1:1 die PI-3-Kinase-vermittelte Aktivierung des Effektors widerspiegeln, aus dem die PH-Domäne stammt.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Indikatorsystemen ist, daß die PH-Domänen des GRP1 und der Btk spezifisch nur an PtdIns-3,4,5-P₃ binden, die PH-Domäne der Akt/PKB hingegen bevorzugt auch an den PtdIns-3,4,5-P₃-Metaboliten PtdIns-3,4-P₂ (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.5, Abb. 5).

HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für den fMLP-Rezeptor und entweder nur die p110 γ -Untereinheit oder zusätzlich auch die p101-Untereinheit, bzw. nur die Membran-assoziierte p110 γ -CAAX alleine oder zusätzlich die p101 transfiziert. Vorversuche hatten ein relativ hohes basales Niveau der Akt/PKB-Phosphorylierung in den HEK293-Zellen ergeben, welches aber durch vorheriges Kultivieren der Zellen in Serum-freiem Medium deutlich reduziert wurde. Die transfizierten und über Nacht in Serum-freiem Medium kultivierten Zellen wurden unstimuliert oder nach Stimulation mit fMLP lysiert und Aliquots der Zell-Lysate mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit dem Phospho-Akt/PKB-Antikörper analysiert. Zum Vergleich der Proteinmengen wurde parallel ein anti-ERK1/2-Immunoblot durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt.

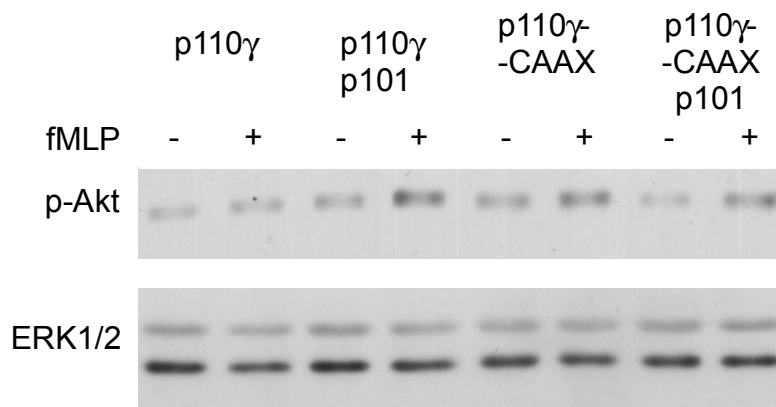


Abb. 34: PI-3-Kinase γ -vermittelte Akt/PKB-Phosphorylierung. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für den fMLP-Rezeptor und die p110 γ oder die p110 γ und die p101 oder die Membran-assoziierte p110 γ -CAAX oder die Membran-assoziierte p110 γ -CAAX und die p101 cotransfiziert. Die Zellen wurden dann über Nacht in Serum-freiem Medium kultiviert und einen Tag nach der Transfektion mit fMLP stimuliert (+) (1 μ M, 5 Minuten) oder nicht (-) und anschließend direkt in Lämmli-Puffer lysiert. Aliquots der Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert: Die phosphorylierte (aktivierte) Akt/PKB wurde mit einem Phospho-Akt/PKB-spezifischen Antikörper nachgewiesen (p-Akt). Zum Vergleich der

Proteinmengen wurden ERK1 und ERK2 (ERK1/2) mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Der Vergleich der Intensitäten der ERK1/2-Immunoblot-Signale ließ vermuten, daß die Proteinmengen in allen Zell-Lysaten etwa gleich waren (siehe Abb. 34, „ERK1/2“). Das Phospho-Akt/PKB-Signal im Immunoblot (siehe Abb. 34, „p-Akt“) war nach Coexpression von fMLP-Rezeptor, p110 γ und p101 und Stimulation mit fMLP (Spur 4) deutlich stärker als ohne Stimulation (Spur 3). fMLP induzierte also die Akt/PKB-Phosphorylierung. In Abwesenheit der p101 war das Phospho-Akt/PKB-Immunoblot-Signal bei unstimulierten Zellen (Spur 1) etwa gleich stark wie in Anwesenheit der p101 (Spur 3). Hingegen hatte fMLP in Abwesenheit der p101 keinen sichtbaren Effekt auf das Phospho-Akt/PKB-Signal (Bahn 2). Die fMLP-induzierte Akt/PKB-Phosphorylierung nach Coexpression von fMLP-Rezeptor, p110 γ und p101 wurde also durch die heterodimere PI-3-Kinase γ vermittelt. Die fMLP-induzierte Akt/PKB-Phosphorylierung eignete sich also zum Nachweis der Aktivierung der PI-3-Kinase γ *in vivo*, und das Ergebnis entsprach den mit der Translokation der fluoreszierenden PtdIns-3,4,5-P₃-bindenden PH-Domänen erhaltenen Befunden: Die p101-Untereinheit ist für die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ *in vivo* notwendig (siehe Abb. 34, linke Hälfte; vgl. Abb. 24, unten, „fMLP“ / Abb. 26, „fMLP“ / Abb. 32, „fMLP“).

Bei Expression der Membran-assoziierten p110 γ -CAAX war eine fMLP-induzierte Zunahme der Akt/PKB-Phosphorylierung nicht nur in Anwesenheit (Spuren 7 und 8), sondern diesmal auch in Abwesenheit der p101 (Spuren 5 und 6) zu erkennen. Auch dieses Ergebnis entspricht den mit der PH-Domänen-Translokation erhaltenen Befunden. Eine sichtbare Erhöhung der basalen Akt/PKB-Phosphorylierung bei Expression der p110 γ -CAAX entsprechend der basalen Membranassoziation der PtdIns-3,4,5-P₃-bindenden PH-Domänen war allerdings nicht zu beobachten (siehe Abb. 35, rechte Hälfte, „-“; vgl. Abb. 30 - 31, „basal“ / Abb. 33, „basal“). Dies könnte bedeuten, daß die durch die basale Aktivität der Membran-assoziierten p110 γ -CAAX gebildete Menge PtdIns-3,4,5-P₃ zwar ausreicht, die isolierten PH-Domänen von GRP1 und Btk an die Membran zu rekrutieren, nicht aber das komplette Protein Akt/PKB. Andererseits sind die gefundenen maximalen Unterschiede der Phospho-Akt/PKB-Immunoblot-Signale von fMLP-stimulierten im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen nur relativ gering (etwa 2x), so daß es ebenso sein kann, daß eine schwache basale Akt/PKB-Phosphorylierung bei Expression der p110 γ -CAAX eine nur wenig, praktisch nicht sichtbar stärkere Bande ergibt. Die Immunoblot-Analyse der Akt/PKB-Phosphorylierung erscheint als Methode zur Untersuchung der Aktivität der PI-3-Kinase γ weniger sensitiv als die PH-Domänen-Translokation.

4.4.4.3 Translokation der Fluoreszenz-markierten PH-Domäne der GRP1 in glatten Gefäßmuskelzellen

Zur weiteren Absicherung der Befunde wurde nun ein weiteres Zellsystem getestet. Anstelle von relativ undifferenzierten Fibroblastenzellen wie den HEK293-Zellen sollten hierfür differenzierte Primärzellen verwendet werden. Außerdem sollten die Plasmide diesmal nicht transfiziert, sondern intranukleär injiziert werden, da bei diesem Verfahren das Verhältnis der Expression der einzelnen Plasmide zueinander stets genau gleich ist.

Für diese Versuche wurden glatte Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) aus Ratten-Aorta ausgewählt. Diese sind im Vergleich zu den HEK293-Zellen sehr groß und haben einen entsprechend großen Kern, was die intranukleäre Mikroinjektion erleichtert. Außerdem war aus Voruntersuchungen bekannt, daß sie ebenfalls endogen keine PI-3-Kinase γ exprimieren (P. Reusch und M. Schaefer, persönliche Mitteilung). Hingegen konnte mit diesen Zellen eine wahrscheinlich über endogen exprimierte Klasse I_A PI-3-Kinasen vermittelte Akt/PKB-Phosphorylierung nach Stimulation mit PDGF (*platelet-derived growth factor*) nachgewiesen worden (Reusch et al., 2001b). Die VSMCs erschienen daher für die Untersuchung der Aktivität der heterolog exprimierten PI-3-Kinase γ gut geeignet.

Nach intranukleärer Mikroinjektion der Plasmide für die GFP-GRP1_{PH} und den fMLP-Rezeptor sowie zusätzlicher Expression von p110 γ bzw. beider PI-3-Kinase γ -Untereinheiten wurde die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation des fluoreszierenden PtdIns-3,4,5-P₃-Sensors in den VSMCs wie üblich Fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt.

Nach Coexpression von GFP-GRP1_{PH} und fMLP-Rezeptor war die fluoreszierende PH-Domäne gleichmäßig im Cytosol verteilt; im Kern und an der Membran war keine Fluoreszenz zu erkennen (siehe Abb. 35, oben, „basal“). fMLP hatte keinen Effekt auf die Lokalisation der GFP-GRP1_{PH} (siehe Abb. 35, oben, „fMLP“). Anschließend zugegebenes PDGF löste jedoch eine deutliche Translokation der fluoreszierenden PH-Domäne aus dem Cytosol an die Membran aus (siehe Abb. 35, oben, „PDGF“). In Abwesenheit der PI-3-Kinase γ wurde durch Stimulation des G-Protein-koppelnden Rezeptors also keine PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung ausgelöst, sehr wohl aber nach Stimulation einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase über endogen exprimierte Klasse I_A PI-3-Kinasen.

Wurden nun zusätzlich auch die p110 γ und p101 exprimiert, so war die fluoreszierende PH-Domäne unter nicht-stimulierten Bedingungen ebenfalls nur im Cytosol nachweisbar (siehe Abb. 35, Mitte, „basal“). Die Zugabe von fMLP führte zu einer deutlichen Membranrekrutierung der fluoreszierenden PH-Domäne in den VSMCs (siehe Abb. 35, Mitte, „fMLP“), offenbar also vermittelt durch die heterolog exprimierte PI-3-Kinase γ .

In Abwesenheit der p101-Untereinheit hatte fMLP aber wiederum keinen Effekt auf die Lokalisation der GFP-GRP1_{PH} (siehe Abb. 35, unten, „fMLP“), wohingegen PDGF eine deutliche Membrantranslokation auslöste (siehe Abb. 35, unten, „PDGF“). Diese Befunde an den mikroinjizierten glatten Gefäßmuskelzellen bestätigen, daß die nicht-katalytische p101-

Untereinheit für die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ *in vivo* notwendig ist.

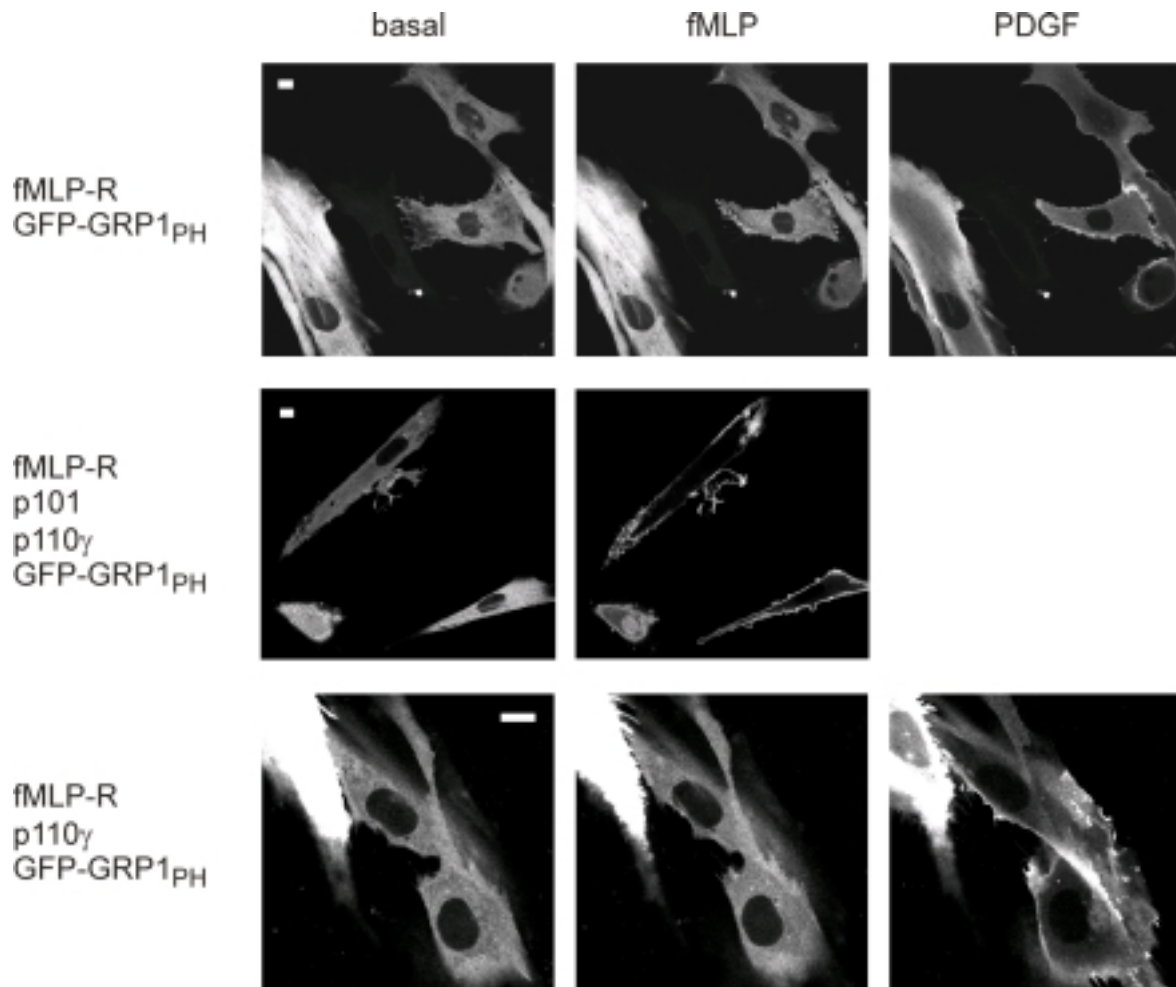


Abb. 35: PI-3-Kinase γ -vermittelte Membranrekrutierung der GFP-GRP1_{PH} in glatten Gefäßmuskelzellen. VSMCs wurden mit den Plasmiden für den fMLP-Rezeptor und den fluoreszierenden PtdIns-3,4,5-P₃-Sensor GFP-GRP1_{PH} (oben) oder zusätzlich noch mit dem Plasmid für die beide PI-3-Kinase γ -Untereinheiten (p110 γ und p101, Mitte) oder nur die katalytische p110 γ -Untereinheit (unten) mikroinjiziert. Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} wurde einen Tag nach der Injektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M. Basal: Vor Agonist-Zugabe. fMLP: 4 Minuten nach Zugabe von fMLP ad 1 μ M (10 μ l 100 μ M auf 1 ml Puffer). War nach 12 Minuten immer noch kein Effekt des fMLP auf die subzelluläre Verteilung der GFP-GRP1_{PH} zu erkennen, so wurde PDGF hinzugegeben. PDGF: 4 Minuten nach Zugabe von PDGF ad 10 ng/ml (10 μ l 1 μ g/ml auf 1 ml Puffer).

Schließlich wurde auch die p101-unabhängige G-Protein-vermittelte Aktivierung der Membran-assoziierten monomeren p110 γ -CAAX (vgl. Abb. 30) in mikroinjizierten VSMCs überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 36 dargestellt.

Bei dieser Kombination war bereits unter basalen Bedingungen eine schwache Membranassoziation der fluoreszierenden PH-Domäne zu erkennen, wenngleich der überwiegende Teil im Cytosol lokalisiert war (siehe Abb. 36, „basal“). Wie bereits in den

HEK293-Zellen zu beobachten (vgl. Abb. 29 / 30, oben, „basal“) hat die Membran-assoziierte p110 γ -CAAX also bereits eine leichte Basalaktivität. fMLP induzierte wiederum eine deutliche Membranrekrutierung der GFP-GRP1_{PH} (siehe Abb. 36, „fMLP“). Dieser Befund in den glatten Gefäßmuskelzellen unterstützt die Annahme, daß die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ nur teilweise auf ihrer (p101-vermittelten) Rekrutierung aus dem Cytosol an die Membran zu ihrem Substrat beruht; und an der Membran eine weitere (p101-unabhängige) Aktivierung erfolgt (siehe auch Diskussion, Kapitel 5.3, Abb. 43).

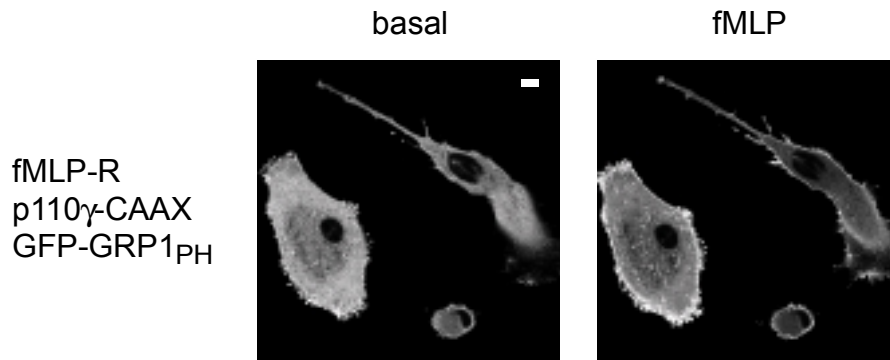


Abb. 36: p110 γ -CAAX-vermittelte Membranrekrutierung der GFP-GRP1_{PH} in glatten Gefäßmuskelzellen. VSMCs wurden mit den Plasmiden für den fMLP-Rezeptor, den PtdIns-3,4,5-P₃-Sensor GFP-GRP1_{PH} und die Membran-assoziierte p110 γ -CAAX mikroinjiziert. Die subzelluläre Lokalisation und Agonist-induzierte Translokation der GFP-GRP1_{PH} wurde einen Tag nach der Injektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M. Basal: Vor Agonist-Zugabe. fMLP: 4 Minuten nach Zugabe von fMLP ad 1 μ M (10 μ l 100 μ M auf 1 ml Puffer).

4.5 Membranrekrutierung der PI-3-Kinase γ durch Ras

Es gibt Hinweise, daß die katalytische p110 γ -Untereinheit der PI-3-Kinase γ auch als Monomer ohne die nicht-katalytische p101-Untereinheit nativ vorkommt (Baier et al., 1999).

In den vorgestellten Experimenten wurde gezeigt, daß die nicht-katalytische p101-Untereinheit für die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ essentiell ist, da sie die Rekrutierung der heterodimeren PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ aus dem Cytosol an die Membran vermittelt. Daher stellt sich die Frage nach der Regulation einer monomeren p110 γ . Wenn sie wie die heterodimere PI-3-Kinase γ auch als Lipidkinase wirkt, muß es für die monomere p110 γ einen anderen, p101-unabhängigen, Mechanismus zur Rekrutierung aus dem Cytosol an die Membran und zum Substrat PtdIns-4,5-P₂ geben. Ein möglicher Regulator könnte Ras sein. So hat die p110 γ - wie alle p110-Isoformen - in der N-terminalen Hälfte eine Ras-Bindungs-Domäne (RBD), und die PI-3-Kinase γ wird auch von aktiviertem (GTP-gebundenen) Ras stimuliert. Ras ist ein Membran-gebundenes Protein. Es wäre also vorstellbar, daß die monomere p110 γ p101-unabhängig durch direkte Interaktion mit aktiviertem Ras aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert und hierdurch aktiviert wird. Eine Ras-induzierte

Membranrekrutierung der p110 γ oder heterodimeren PI-3-Kinase γ oder einer anderen Klasse I PI-3-Kinase ist aber bislang nicht nachgewiesen worden. Daher sollte überprüft werden, ob die PI-3-Kinase γ bzw. ihre Untereinheiten (vor allem ihre katalytische p110 γ -Untereinheit als Monomer) durch aktiviertes Ras an die Membran rekrutiert werden. Hierzu wurden die fluoreszierenden PI-3-Kinase γ -Untereinheiten mit dauerhaftem H-Ras V12 oder inaktivem H-Ras N17 coexprimiert. H-Ras V12 ist GTPase-defizient und bleibt daher stets im GTP-gebundenen (aktiven) Zustand (John et al., 1988). Ras N17 hingegen hat eine stark verringerte Affinität für GTP und kann daher praktisch nicht durch GTP-Bindung aktiviert werden, sondern bleibt stets im GDP-gebundenen (inaktiven) Zustand (Feig & Cooper, 1988).

Zunächst wurde mit Hilfe eines CFP-markierten H-Ras V12 (CFP-H-Ras V12) die subzelluläre Verteilung eines heterolog in HEK293-Zellen überexprimierten Ras überprüft. Außerdem wurde untersucht, ob die subzelluläre Verteilung von freiem YFP durch Coexpression des daueraktiven Ras beeinflusst wird. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt.

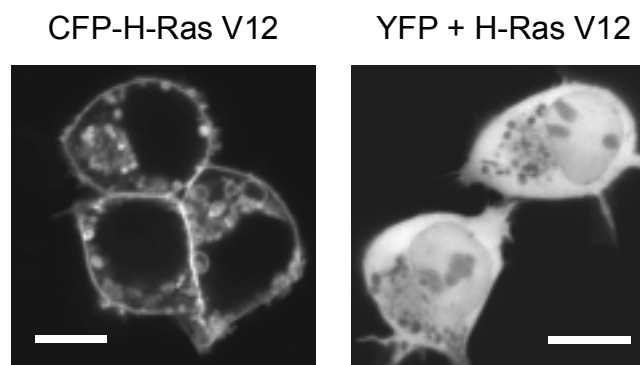


Abb. 37: Subzelluläre Lokalisation des CFP-H-Ras V12 und Einfluß des daueraktiven Ras auf die Verteilung von freiem YFP. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für CFP-markiertes H-Ras V12 (links) oder für nicht-markiertes H-Ras V12 und freies YFP (rechts) (co-)transfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der fluoreszierenden Proteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ M.

Wie erwartet war das CFP-markierte Ras größtenteils an der Plasmamembran sowie auch auf Endomembranen zu finden, zu einem kleinen Teil auch im Cytosol, aber nicht im Kern (siehe Abb. 37, links). Das Ras wurde also ausreichend exprimiert und posttranslational modifiziert. Die subzelluläre Lokalisation des freien YFP wurde durch die Coexpression des H-Ras V12 nicht beeinflusst (siehe Abb. 37, rechts; vgl. Abb. 6, links). Bei beiden Ansätzen fiel eine - offenbar auf der Expression des daueraktiven Ras beruhende - leicht veränderte Morphologie der Zellen auf: Die Zellen waren im Vergleich zur normalen Form der HEK293-Zellen leicht abgerundet. Die Abrundung war aber nicht so stark wie bei der Coexpression von G $\beta\gamma$ mit p101 und p110 γ beobachtet (vgl. Abb. 22), und es kam auch nicht zum Ablösen der Zellen.

Anschließend wurde untersucht, ob die YFP-markierte monomere p110 γ oder p101 durch Coexpression des daueraktiven H-Ras V12 in HEK293-Zellen an die Membran rekrutiert werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt.

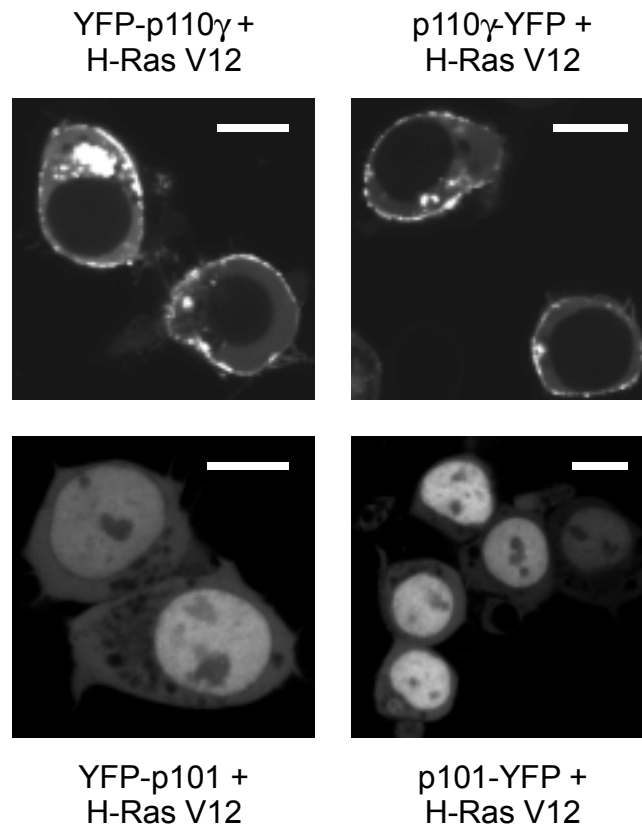


Abb. 38: Einfluß von konstitutiv aktivem H-Ras V12 auf die subzelluläre Lokalisation monomerer PI-3-Kinase γ -Untereinheiten. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für N- oder C-terminal YFP-markierte p110 γ oder p101 sowie das daueraktive H-Ras V12 co-transfiziert. Die subzelluläre Verteilung der YFP-Fusionsproteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ m.

Die subzelluläre Verteilung der p101 wurde durch die Coexpression des daueraktiven Ras nicht beeinflusst, unabhängig von der Position der YFP-Markierung am ihrem N- oder C-Terminus (siehe Abb. 38, unten; vgl. auch Abb. 15, unten): Die p101 war bei insgesamt schwächerer Fluoreszenz größtenteils im Kern, zu einem kleineren Teil auch im Cytosol, nicht aber an der Membran angereichert. Zwischen dem H-Ras V12 und der monomeren p101 fand offenbar keine Interaktion statt.

Die monomere YFP-markierte p110 γ hingegen wurde durch das coexprimierte H-Ras V12 an die Membran rekrutiert - unabhängig von der Position des YFP an ihrem N- oder C-Terminus (siehe Abb. 38, oben; vgl. auch Abb. 15, oben). Hierbei fiel auf, daß die fluoreszierende p110 γ nicht gleichmäßig entlang der Plasmamembran angereichert war,

sondern in Flecken. Diese Verteilung entsprach nicht der des alleine exprimierten daueraktiven Ras (vgl. Abb. 37). Sie entsprach auch nicht dem für die monomere fluoreszierende p85 α gefundenen Fleckenmuster (vgl. Abb. 9): Während die beobachteten p85 α -Flecken klar voneinander separiert waren, lagen die Flecken der mit H-Ras V12 coexprimierten p110 γ dichter beieinander, so daß sie häufig ineinander übergingen. Außerdem erschienen sie eher zusätzlich zu einer schwächeren durchgehenden Verteilung entlang der Membran.

Diese Beobachtungen warfen sogleich weitere Fragen auf. Zuerst sollte überprüft werden, ob Ras tatsächlich nur in seiner GTP-gebundenen Form die p110 γ an die Membran rekrutiert. Deshalb wurde anstelle des daueraktiven (GTP-gebundenen) H-Ras V12 das inaktive (GDP-gebundene) H-Ras N17 mit fluoreszierender p110 γ coexprimiert und ihre subzelluläre Lokalisation untersucht. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob das beobachtete Fleckenmuster auf der (ggfs. durch Ras stimulierten) enzymatischen Aktivität der p110 γ beruht. Hierfür wurde die Kinase-defiziente YFP-p110 γ -K833R-Mutante mit dem H-Ras V12 coexprimiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt.

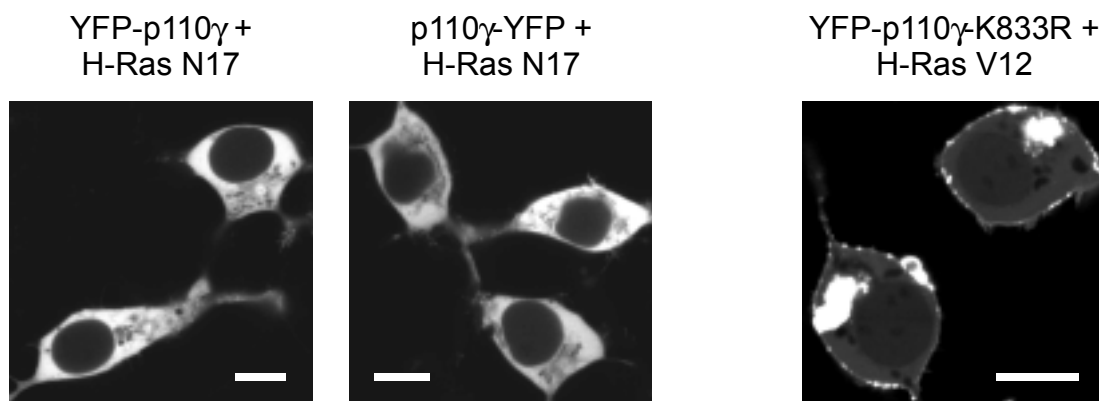


Abb. 39: Einfluß von aktivem und inaktivem Ras auf die subzelluläre Lokalisation der p110 γ . HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für N- oder C-terminal YFP-markierte p110 γ und das inaktive H-Ras N17 (links) oder mit den Plasmiden für die Kinase-defiziente YFP-p110 γ -K833R und das daueraktive H-Ras V12 (rechts) cotransfiziert. Die subzelluläre Verteilung der YFP-Fusionsproteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ m.

Bei Coexpression des inaktiven H-Ras N17 anstelle des daueraktiven H-Ras V12 war die fluoreszierende p110 γ ausschließlich im Cytosol zu finden, und zwar unabhängig von der Position des YFP an ihrem N- oder C-Terminus (siehe Abb. 39, linke Seite). Dies entspricht der Verteilung der solitär exprimierten p110 γ (vgl. Abb. 15, oben). Auch die Cotransfektion mit einer fünffach höheren Menge an H-Ras-N17-Plasmid (im Vergleich zur eingesetzten Menge an H-Ras-V12-Plasmid) blieb ohne Einfluß auf die Verteilung der fluoreszierenden p110 γ (nicht gezeigt). Die beobachtete Membranrekrutierung der p110 γ (siehe Abb. 38, oben) beruhte also auf einem Effekt des aktivierten Ras. Die mit dem H-Ras-N17-Plasmid transfizierten Zellen wiesen außerdem keine morphologischen Veränderungen auf (siehe Abb.

39, linke Seite); die bei der Expression des H-Ras V12 beobachtete leichte Abrundung (vgl. Abb. 37) beruhte also ebenfalls auf einem spezifischen Effekt des aktiven Ras.

Die zusammen mit dem daueraktiven H-Ras V12 coexprimierte Kinase-defiziente YFP-p110 γ -K833R zeigte die gleiche subzelluläre Verteilung wie das mit H-Ras V12 coexprimierte Wildtyp-Enzym (siehe Abb. 39, rechts; vgl. Abb. 38, oben), insbesondere das gleiche Fleckenmuster an der Membran. Die fleckige Verteilung der mit H-Ras V12 coexprimierten p110 γ war also unabhängig von ihrer PI-3-Kinase-Aktivität.

Da die p110 γ tatsächlich durch aktiviertes Ras an die Membran rekrutiert wird, und zwar als Monomer unabhängig von der p101, wurde als nächstes untersucht, ob auch die heterodimere PI-3-Kinase γ aus p110 γ - und p101-Untereinheit durch Ras an die Membran transloziert wird. Die Ergebnisse sind in Abbildung 40 dargestellt.

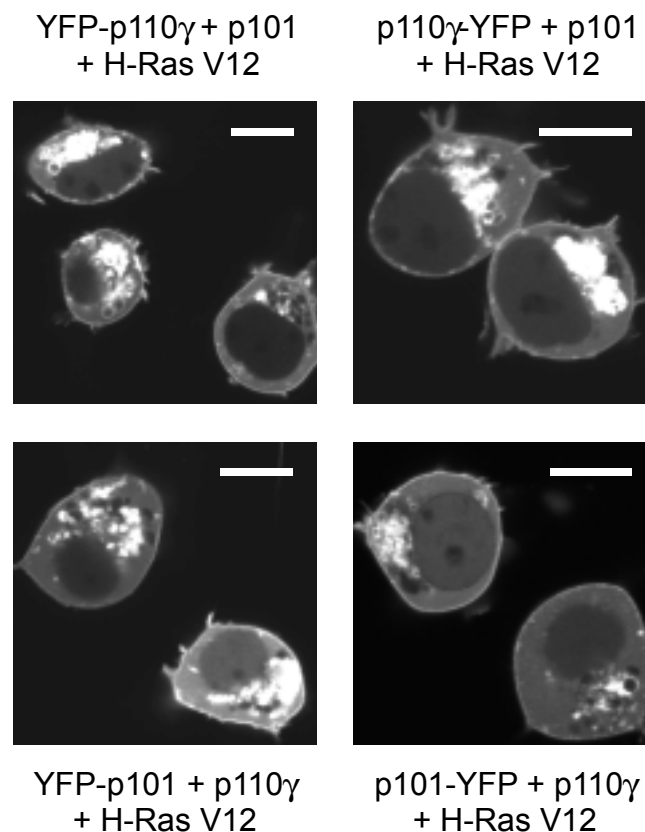


Abb. 40: Membranrekrutierung der heterodimeren PI-3-Kinase γ durch daueraktives H-Ras V12. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für N- oder C-terminal YFP-markierte p110 γ oder p101 sowie die jeweils komplementäre nicht-markierte Untereinheit (in doppelter Menge, um möglichst vollständige Heterodimerisierung der fluoreszierenden Untereinheit zu erreichen) sowie dem Plasmid für das daueraktive H-Ras V12 cotransfiziert. Die subzelluläre Verteilung der YFP-Fusionsproteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Weiße Balken = 10 μ m.

Auch die heterodimere PI-3-Kinase γ wurde durch daueraktives Ras an die Membran rekrutiert (siehe Abb. 40). Das Ergebnis war unabhängig von der Position des YFP am N- oder C-Terminus der p110 γ - oder p101-Untereinheit. Die Heterodimerisierung der p110 γ mit der p101-Untereinheit stört also ihre Interaktion mit dem Ras nicht. Interessanterweise war aber die mit H-Ras V12 coexprimierte heterodimere PI-3-Kinase γ nicht wie die mit H-Ras V12 coexprimierte monomere p110 γ in Flecken (vgl. Abb. 38), sondern gleichmäßig an der Membran verteilt (siehe Abb. 40). Worauf dieser Unterschied beruht ist derzeit unklar.

Da die monomere p110 γ auch p101-unabhängig an die Membran rekrutiert werden kann, aber eben nur durch Ras und nicht wie die heterodimere PI-3-Kinase γ auch durch G $\beta\gamma$, ist es also vorstellbar, daß die p110 γ auch in der monomeren Form physiologische Aufgaben als Rezeptor-regulierte PI-3-Kinase hat. Während die heterodimeren Klasse I PI-3-Kinasen typischerweise direkt durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bzw. G $\beta\gamma$ aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert und aktiviert werden, würde die monomere p110 γ über Ras reguliert.

Als nächstes sollte daher untersucht werden, welchen Effekt die Coexpression von daueraktivem H-Ras V12 auf die enzymatische Aktivität der monomeren p110 γ hat. Da wie gezeigt eine künstlich Membran-assoziierte p110 γ bereits ohne weitere Stimulation PtdIns-3,4,5-P₃ in deutlich nachweisbarer Menge produziert (siehe Abb.29, oben, „basal“), wäre zu erwarten, daß die durch Ras an die Membran rekrutierte p110 γ zumindest eine ähnliche enzymatische Aktivität aufweist. Vorstellbar wäre auch, daß die p110 γ durch das Ras zusätzlich zur Membranrekrutierung noch allosterisch aktiviert wird. Hierfür spricht, daß sich die Kristallstruktur der p110 γ im Co-Kristall mit Ras leicht von der Kristallstruktur der p110 γ alleine unterscheidet, und zwar am stärksten in der C-terminalen Subdomäne der katalytischen Domäne, wo sich die Bindungsstelle für das Phosphoinositid-Substrat befindet (Pacold et al., 2000).

Um also den Effekt von daueraktivem H-Ras V12 auf die enzymatische Aktivität von p110 γ *in vivo* zu untersuchen, wurden beide zusammen mit GFP-GRP1_{PH} als PtdIns-3,4,5-P₃-Sensor in HEK293-Zellen coexprimiert. Bei diesem Experiment war allerdings zu erwarten, daß auch die endogen exprimierten Klasse I_A PI-3-Kinasen durch das Ras aktiviert werden. Um also ggfs. beurteilen zu können, ob eine beobachtete erhöhte Membranlokalisation der GFP-GRP1_{PH} tatsächlich über die p110 γ vermittelt ist, wurde bei Kontrollansätzen das p110 γ -Plasmid weggelassen. Außerdem wurde die Menge des H-Ras-V12-Plasmids variiert, um die Chance zu vergrößern, bei einem der Ansatz-Paare mit gegenüber ohne p110 γ einen signifikanten Unterschied zu sehen. Die subzelluläre Lokalisation der fluoreszierenden PH-Domäne wurde Fluoreszenz-mikroskopisch analysiert. Das Ausmaß der gefundenen Membranassoziation der fluoreszierenden PH-Domäne korrelierte deutlich mit der Menge an transfiziertem H-Ras-V12-Plasmid: Je mehr hiervon eingesetzt wurde, desto mehr GFP-GRP1_{PH} war an der Membran lokalisiert. Bei keiner der getesteten Mengen an H-Ras-V12-Plasmid war aber ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen mit p110 γ und den Zellen

ohne p110 γ zu finden (nicht gezeigt). Es konnte also keine H-Ras-V12-induzierte und spezifisch durch die heterolog exprimierte p110 γ vermittelte PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung nachgewiesen werden. Die p110 γ scheint durch das daueraktive Ras also nicht oder nur schwach stimuliert zu werden.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der monomeren p110 γ *in vivo* könnte darin bestehen, daß sie durch Ras aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert und dann dort durch G β γ -Komplexe aktiviert wird. Bei einer Aktivierung der monomeren p110 γ durch Ras und G β γ gemeinsam würde also die fehlende p101-vermittelte Membranrekrutierung durch G β γ dadurch ersetzt, daß die p110 γ direkt durch Ras an die Membran rekrutiert wird.

Um diese Möglichkeit zu testen, wurden HEK293-Zellen wie beim vorangegangenen Versuch mit den Plasmiden für die GFP-GRP1_{PH}, die p110 γ und das daueraktive H-Ras V12 (in verschiedenen Mengen) sowie diesmal zusätzlich den fMLP-Rezeptor cotransfiziert und wie üblich einen Tag nach der Transfektion Fluoreszenz-mikroskopisch analysiert. Wie bereits beim vorangegangenen Versuch beobachtet korrelierte das Ausmaß der Membranassoziation der GFP-GRP1_{PH} unter basalen Bedingungen mit der Menge des transfizierten H-Ras-V12-Plasmids. fMLP induzierte aber bei keinem der Ansätze eine sichtbare zusätzliche Membranrekrutierung der fluoreszierenden PH-Domäne (nicht gezeigt). Die Hypothese der gemeinschaftlichen Aktivierung einer monomeren p110 γ durch Ras und G β γ konnte also nicht bestätigt werden.