

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Phosphoinositide</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Phosphoinositid-3-Kinasen</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Aktivierung und Signalwege</b> .....	<b>4</b>
1.3.1 Klasse I.....	5
1.3.2 Klasse II.....	7
1.3.3 Klasse III.....	8
<b>1.4 Monomere GTPasen</b> .....	<b>9</b>
<b>1.5 Ziel</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>11</b>
2.1.1 Chemikalien.....	11
2.1.2 Puffer und Lösungen .....	11
2.1.3 Medien.....	12
2.1.3.1 Bakterielle Kulturen .....	12
2.1.3.2 Zellkultur Vollmedien .....	12
2.1.4 Primer .....	12
2.1.4.1 Primer für site-directed mutagenesis.....	12
2.1.4.2 Primer für die Proteinexpression in Säugerzellen .....	13
2.1.4.3 Primer für die Proteinexpression in Insektenzellen .....	14
2.1.5 Plasmide.....	15
2.1.5.1 pGEX6P1 .....	15
2.1.5.2 pcDNA3.1(+) .....	16
2.1.5.3 pBacPAK-His3-GST .....	16
2.1.6 Antikörper .....	17
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.2.1 Polymerasekettenreaktion.....	17
2.2.2 Agarosegelelektrophorese .....	19
2.2.3 DNA Extraktion aus dem Agarosegel.....	19
2.2.4 Restriktionsverdau von DNA .....	19
2.2.5 Dephosphorylierung von geschnittener Vektor-DNA.....	21
2.2.6 PCR Reinigung.....	21
2.2.7 Ligation von Insert und Vektor-DNA.....	22
2.2.8 Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Zellen .....	23
2.2.8.1. $\alpha$ - kompetente Bakterien.....	23
2.2.8.2 BL-21 DE3.....	23

2.2.9 Plasmidpräparation .....	23
2.2.9.1 Plasmidpräparation „Miniprep Kit“ .....	23
2.2.9.2 Plasmidpräparation „Maxiprep Kit“ .....	23
2.2.10 Sequenzierung .....	24
2.2.11 Proteinexpression und Affinitätsreinigung .....	24
2.2.11.1 RAS-Bindungsdomäne .....	24
2.2.11.2 GTPasen, Reinigung und Nukleotidladung .....	25
2.2.12 GST- Pulldown .....	25
2.2.12.1 GST-Pulldown Assay für exprimierte RBDs .....	25
2.2.12.2 GST-Pulldown Assay für exprimierte Proteine aus der Zellkultur .....	26
2.2.13 SDS-PAGE .....	26
2.2.14 Western Blot .....	27
2.2.15 PtdIns(3)P Mass ELISA .....	27
2.2.16 Zellkultur COS-7 und HEK-293 .....	28
2.2.16.1 Auftauen, Einfrieren und Kultivierung .....	28
2.2.16.2 Transfektion und Ernten COS-7 und HEK-293 .....	28
2.2.17 Insektenzellen .....	29
2.2.17.1 Auftauen, Einfrieren und Kultivierung .....	29
2.2.17.2 Suspensionkultur/ Subkultivierung .....	30
2.2.17.3 Baculovirus-Expressionssystem .....	30
2.2.17.4 Transfektion .....	31
2.2.17.5 Virusamplifikation .....	31
2.2.17.6 Virustiterbestimmung .....	31
2.2.17.7 Proteinexpression in High-5 .....	32
2.2.17.8 Proteinaufreinigung .....	32
2.2.17.9 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	33
2.2.17.10 Messung der Proteinaktivität .....	33
2.2.18 Statistische Methoden .....	34
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Protein-Protein-Interaktion isolierter RBDs .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Site directed mutagenesis der C2<math>\alpha</math>-RBD .....</b>	<b>36</b>
3.2.1 Generierung der C2 $\alpha$ -RBD Mutanten .....	36
3.2.2 Expression der RBD-Mutanten .....	37
3.2.3 Interaktion der RBD-C2 $\alpha$ -Mutanten mit CDC42 GDP/GTP $\gamma$ S .....	38
<b>3.3 Proteininteraktion isolierter RBDs mit aktiven GTPasen .....</b>	<b>40</b>
<b>3.4 Konstrukte für Säugerzellen .....</b>	<b>41</b>
3.4.1 PCR zur Amplifikation der Konstrukte .....	41
3.4.2 Klonierung .....	42

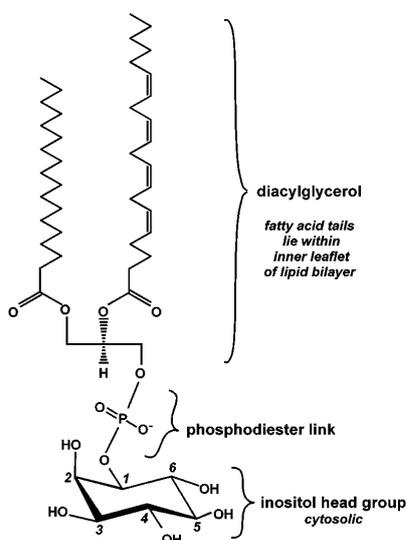
3.4.3 Expression in COS-7 .....	42
3.4.4 Protein-Protein-Interaktion .....	43
<b>3.5 PtdIns(3)P Mass ELISA .....</b>	<b>45</b>
<b>3.6 Herstellung Baculoviren für die Expression von Proteinen.....</b>	<b>46</b>
3.6.1 Subklonierung der Fragmente in pBacPak-His3-GST .....	46
3.6.2 Transfektion in SF-21-Zellen .....	46
3.6.3 Virusamplifikation .....	46
3.6.4 Bestimmung Virustiter .....	46
3.6.5 Proteinexpression in Hi-5-Zellen .....	47
3.6.6 Protein-Protein-Interaktionsstudien .....	47
3.6.7 Messung der Proteinaktivität .....	51
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Konstrukte .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2 Protein-Protein-Interaktionen.....</b>	<b>53</b>
4.2.1 Interaktion mit RAS-GTPasen .....	53
4.2.2 Interaktion mit CDC42 .....	54
4.2.3 Interaktion mit RHOA .....	55
4.2.4 Interaktion mit RAC1 .....	55
4.2.5 C2 $\alpha$ -RBD Mutanten mit CDC42 .....	56
4.2.6 Mögliche Einschränkungen der Pulldown-Methode .....	57
<b>4.3 Messung der Proteinaktivität .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4 PtdIns(3)P Mass ELISA .....</b>	<b>58</b>
<b>5. Ausblick .....</b>	<b>58</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
<b>7. Referenzen.....</b>	<b>62</b>

## 1. Einleitung

Zellen müssen extrazelluläre Signale wahrnehmen und verarbeiten können. Damit wird z.B. die Kommunikation zwischen den Zellen, sowie die strukturierte Regulation in intrazellulären Prozessen gewährleistet. Externe Signale (chemische oder physikalische) werden mit Hilfe von spezifischen Rezeptoren, die z.B. an der Zelloberfläche liegen, in das Zellinnere geleitet. Dort erfolgt eine geordnete Kaskade von Signalen, die zu zellulären Effekten führen, welche für das vielzellige Leben relevant sind. Rezeptoren aktivieren u.a. Phosphatidylinositol 3-Kinasen, die in fast allen Zellen exprimiert werden. Diese Lipidkinasen katalysieren die Phosphorylierungsreaktion an der 3'OH Position des Inositolrings von verschiedenen Lipidmolekülen in der Plasmamembran. Die dadurch entstandenen Lipidprodukte wirken als „second messenger“ Moleküle. Proteine mit einer Wechselwirkungsdomäne können an diese phosphorylierten Lipidmoleküle binden und interagieren mit ähnlich rekrutierten Signalproteinen. Veränderungen auf zellulärer Ebene durch PI3K-Signalwirkung kann in verschiedenen zellulären Prozessen beobachtet werden z.B. Zellwachstum, Migration und intrazellulären Transport. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Deregulation des PI3K-abhängigen zellulären Stoffwechselwegs mit verschiedenen Krankheiten z.B. Diabetes und Tumoren in Verbindung gebracht werden kann.

### 1.1 Phosphoinositide

Phosphoinositide (PtdIns) sind Membranlipide, die als Substrat für Kinasen, Phosphatasen und Lipasen dienen. Daher nehmen sie nicht nur eine wichtige Rolle in der Membranstruktur ein, sondern auch in verschiedenen Signalwegen. Eine Phosphodiesterbindung verknüpft das Diacylglycerin, an dem 2 Fettsäureketten (C1 Stearinsäure, C2 Arachidonsäure) hängen, mit der polaren Inositolkopfgruppe (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1 Chemische Struktur von Phosphatidylinositol (PtdIns).** PI3-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung an der dritten Hydroxylgruppe des Inositolrings, durch den Transfer der terminalen Phosphatgruppe von ATP (Vanhaesebroeck et al., 2001).

Die Fettsäureketten liegen im inneren Bereich der Lipiddoppelschicht, während die Inositolkopfgruppe ins Cytosol ragt. PtdIns sind unter basalen Umständen das am häufigsten vorkommende Inosit in Zellen von Säugetieren. Es ist 10-20 mal höher als jene der PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, welche in etwa gleicher Menge vorkommen (Vanhaesebroeck et al., 2001).

PI3-Kinasen phosphorylieren den Inositolring an der 3' Position durch den Transfer der terminalen Phosphatgruppe von ATP. Die drei unterschiedlichen Lipide, die an der 3' Position im Inositolring phosphoryliert werden, sind PtdIns, PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Durch diese Phosphorylierung der freien Hydroxylgruppen des Inositolrings nehmen die Membranlipide vielfältige Funktionen ein. Als Folge können mit zeitlicher und örtlicher Auflösung Proteinbindungsstellen erzeugt werden, was zur Rekrutierung von Effektorproteinen mit spezifischen Phosphoinositidbindungsdomänen an die Plasmamembran führt (Falasca et al., 2012). Somit koordinieren die phosphorylierten PtdIns die Lokalisation und die Funktion von vielen Effektorproteinen. Diese Effektorproteine binden durch die spezifische Lipid-bindende Domäne, die sogenannten PH-Domäne (Pleckstrin homology), PX-Domäne (Phox homology), FYVE Domäne an die phosphorylierten Lipide (Jean & Kiger, 2014). Aufgrund dessen verändert sich die Lokalisation und Aktivität von Effektorproteinen und damit verbunden die zelluläre Funktion (Tab. 1.1).

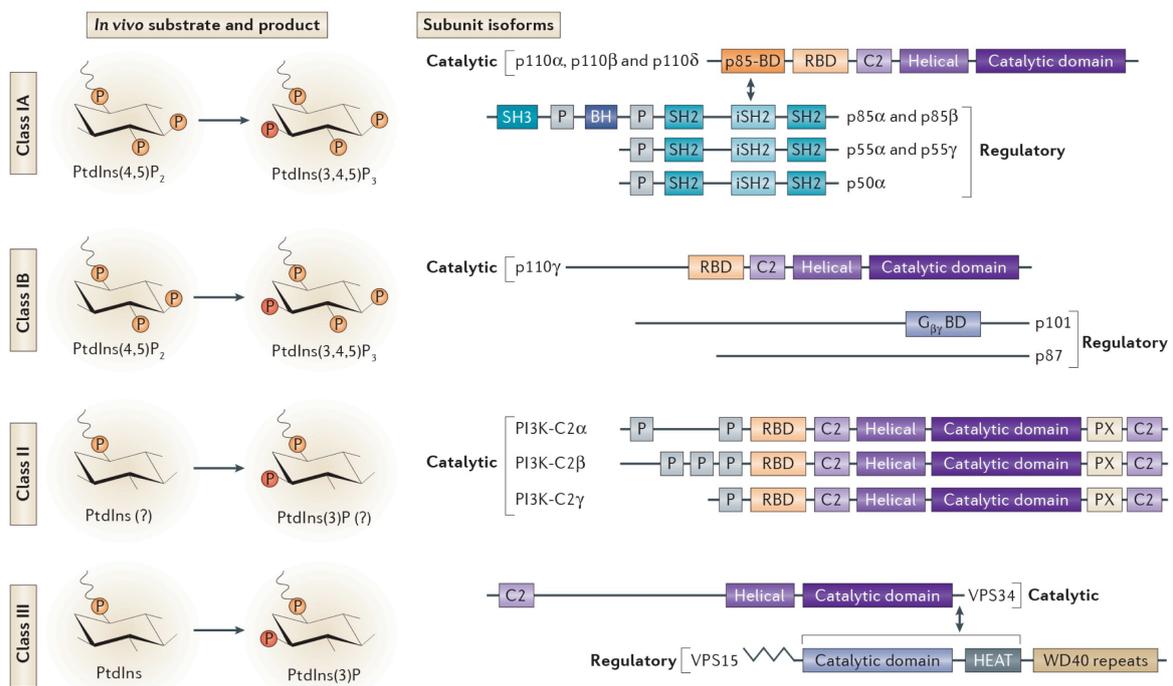
**Tab. 1.1** Überblick der PtdIns und die Auswirkung durch die Interaktion mit Effektoren

PI3K	Produkt	Bindedomäne	PtdIns-Funktion
Klasse I	PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>	PH, PX	Rezeptor-Signalwege, Zellwachstum
Klasse II	PtdIns(3)P	FYVE, PX, PH	Rezeptor-Signalwege, Proteintransport, Endocytose
	PtdIns(3,4)P <sub>2</sub>	PH, PX	
Klasse III	PtdIns(3)P	FYVE, PX, PH	Proteintransport, Autophagie

Der Haushalt der Phosphoinositide wird von verschiedenen PI-Kinasen und von PI-Phosphatasen geregelt. Dabei durchlaufen die Membranlipide einen reversiblen Zyklus aus Phosphorylierung und Dephosphorylierung, katalysiert durch organell-spezifische PIKs und PI-Phosphatasen. Lipidphosphatasen degradieren bzw. wandeln 3-PtdIns um. Dabei wird PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> von PTEN (Phosphatasen and Tensin homologue deleted Chromosom 10) degradiert. Verschiedene Myotubularine (MTM) katalysieren die Dephosphorylierungsreaktion von PtdIns(3)P (Vanhaesebroeck et al., 2010).

## 1.2 Phosphoinositid-3-Kinasen

Zu den Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks), zählen alle Enzyme, die PtdIns an der dritten Position des Inositolrings phosphorylieren. Sie kommen in vielen kernhaltigen Zellen vor. Diese Lipidkinasen wandeln Signale von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen Stimulantien in intrazelluläre Signale um. Dadurch regulieren sie eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden. Diese Signalwege kontrollieren viele physiologische Funktionen und zelluläre Prozesse wie z.B. Zellproliferation, Zellwachstum, Motilität und Zellmetabolismus (Thorpe et al., 2015). PI3Ks sind Lipidkinasen, die auf der Basis von Struktur, Substratspezifität, Regulation und zellulärer Funktion in drei Klassen eingeteilt werden (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2 Übersicht der PI3K Klassen. Links die katalysierte Reaktion, rechts die Isoformen und deren Domänenorganisation (Thorpe et al., 2015).**

Klasse I ist die bisher am intensivsten erforschte Klasse. Sie reguliert verschiedene Signalwege im Zusammenhang mit Zellwachstum, Zellüberleben, Motilität und Metabolismus (Fritsch et al., 2013). Klasse II Isoformen der PI3Ks regulieren Zellwachstum, Zellmigration, Glucosemetabolismus, Zellüberleben und Angiogenese. Die Klasse III PI3K spielt eine zentrale Rolle bei zellulären Transportvorgängen wie der Autophagie, Phagozytose und Endocytose (Thorpe et al., 2015).

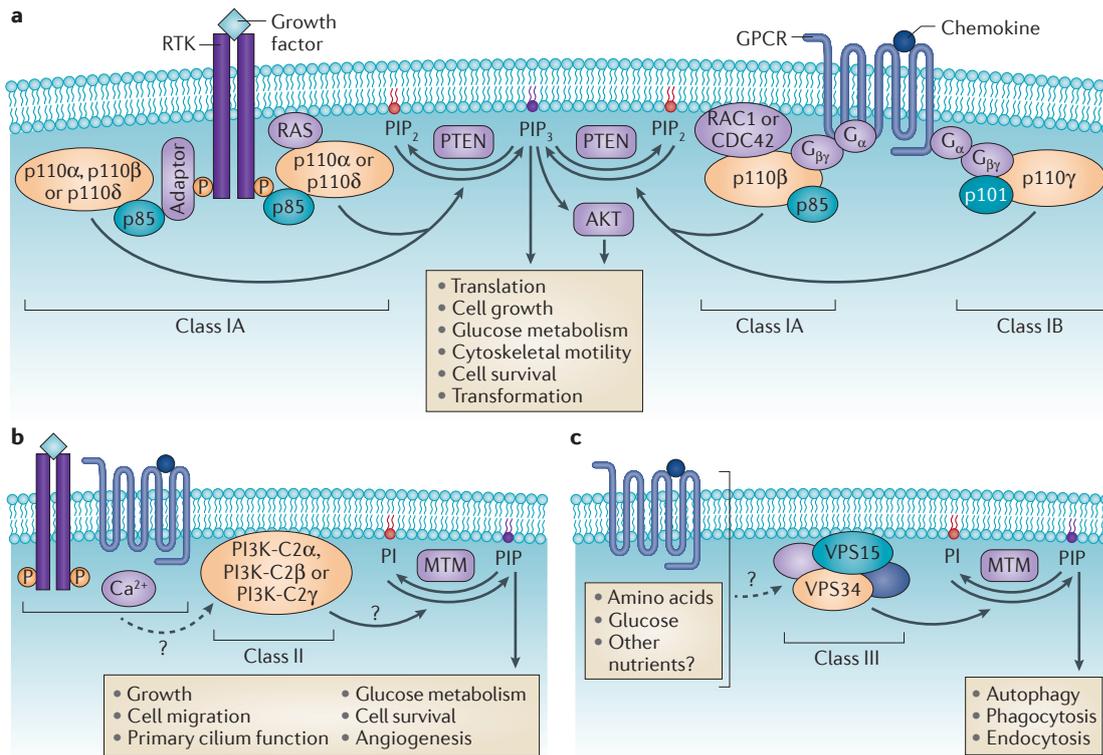
Die Einteilung der drei Klassen kann aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität erfolgen (Abb. 1.2). Dabei katalysiert Klasse I PI3K in lebenden Zellen ausschließlich die Phosphorylierung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu einem Triphosphoinositid, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Klasse II und III PI3-Kinasen katalysieren *in vivo* die Phosphorylierungsreaktion zum Monophosphoinositid, PtdIns(3)P. Klasse II katalysiert zusätzlich die Phosphorylierung von

PtdIns(4)P zu PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>. Die entstandenen Lipidprodukte PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> können als „second messenger“ fungieren, indem sie als Andockstelle für verschiedene Signalproteine an die Plasmamembran dienen und diese rekrutieren.

Die drei Klassen der PI3-Kinasen lassen sich ebenfalls basierend auf dem Vorhandensein von zusätzlichen Proteindomänen einteilen (Abb. 1.2). Alle Klassen besitzen eine katalytische Domäne, eine C2-Domäne und eine helikale Domäne. Die katalytischen Domänen unterscheiden sich in ihrer Primärsequenz, wodurch sich die unterschiedlichen Substratspezifitäten erklären lassen. Die Funktion der helikalen Domäne ist noch nicht geklärt. Die C2-Domäne zeigt Ca<sup>2+</sup> abhängige und unabhängige Phospholipid-bindende Eigenschaften und könnte somit in Signalwegen und Membranbindungen involviert sein.

### 1.3 Aktivierung und Signalwege

PI3-Kinasen werden räumlich reguliert und sind multifunktional. Das heißt sie agieren in fast allen Membranen der Zelle um Signalwege, Membrantransport und Stoffwechsel zu regulieren. PI3Ks integrieren Signale von Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder anderen Stimuli und übersetzen diese in intrazelluläre Signale. Somit regulieren sie verschiedene Signalwege. Der Aktivierungsmechanismus und die zellulären Prozesse, die kontrolliert werden, unterscheiden sich zwischen den drei unterschiedlichen PI3K-Klassen (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3 a: Signalweg der PI3K Klasse I:** Durch Aktivierung von Rezeptor Tyrosinkinassen (RTKs) oder G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) werden Klasse I Isoformen an die Plasmamembran rekrutiert und aktiviert. Vermehrt synthetisiertes PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (PIP<sub>3</sub>) fungiert als „second messenger“ und aktiviert Effektorsignalwege, darunter die AKT-Signalkaskade. Dadurch können unterschiedliche zelluläre Schlüsselfunktionen gesteuert werden. PTEN, eine Phosphatase inaktiviert den Signalweg. **1.3 b: PI3K Klasse II Signalweg:** Noch wenig charakterisierte Stimuli aktivieren die Klasse II Isoformen, woraufhin es zur Phosphorylierungsreaktion von PtdIns (PI) und PtdIns(4)P kommt. **1.3 c: Signalweg Klasse III PI3K:** Der Multiproteinkomplex aus VPS15 und VPS34 katalysiert die Phosphorylierung von PtdIns zu PtdIns(3)P und spielt eine Schlüsselrolle bei der Autophagie und in intrazellulären Transportprozessen. Die Lipidphosphatase MTM katalysiert die Dephosphorylierungsreaktion von Klasse II und III, so dass der Signalweg inaktiviert wird (Thorpe et al., 2015).

Jede PI3K-Klasse verfügt über mehrere zelluläre Rollen, indem sie die unterschiedlichen PtdIns Pools regulieren. Die zelluläre Rolle kann nach Signalwegen für Klasse I und Klasse II oder Membrantransport (Klasse II und III) kategorisiert werden. Gemeinsamkeiten zeigen die drei Klassen bei der Rekrutierung von Effektorproteinen. Die Effektormoleküle können durch spezifische Lipid-bindende Domänen mit den phosphorylierten Lipiden PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> wechselwirken. Als Folge verändern sich die Lokalisation und Aktivität von den Effektorproteinen, woraufhin unterschiedliche Signalwege aktiviert werden können, um unterschiedliche zelluläre Prozesse zu beeinflussen. Co-Regulation von PI3K und Phosphatasen lassen vermuten, das gemeinsame Kinase-Phosphatasen-Adapter-Interaktionen eine zeitlich-räumliche Kontrolle von ausgeprägten PtdIns-Pool bieten und damit deren spezifische zelluläre Funktion ermöglichen könnten (Jean & Kiger, 2014).

### 1.3.1 Klasse I

Klasse I Isoformen sind Heterodimere aus einer p110 (110 kDa) katalytischen Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit p85 (85 kDa). Durch die unterschiedliche

Zusammensetzung der regulatorischen Untereinheit werden sie in Klasse IA und IB unterteilt. Die katalytischen Untereinheiten von Klasse IA (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  und p110 $\delta$ ), die von den Genen PIK3CA, PIK3CB und PIK3CD kodiert werden, binden eine der fünf regulatorischen Untereinheiten vom p85-Typ. P110 $\alpha$  und p110 $\beta$  werden ubiquitär exprimiert, während p110 $\delta$  und p110 $\gamma$  insbesondere in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Die regulatorische Untereinheit der Klasse IA setzt sich aus den zwei SH2-Domänen (Src-homology2) zusammen. Diese werden durch eine p110-bindende Region (iSH2-Domäne) voneinander abgeschirmt (Abb. 1.2). Inaktiv liegt die PI3K als stabiler Komplex im Zytosol vor. Extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder Chemokine aktivieren Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) oder G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), woraufhin Klasse I PI3K Isoformen an die Plasmamembran rekrutiert werden (Abb. 1.3 a). Durch die Phosphotyrosinreste aktivierter RTKs können die SH2-Domänen der regulatorischen Untereinheit binden. Dabei erkennen die SH2-Domänen die Phosphotyrosin-Motive auf den zytoplasmatischen Domänen von RTKs. Als Folge wird die regulatorische Untereinheit an die Membran rekrutiert und die katalytische Untereinheit (p110) aktiviert (Anderson & Jackson, 2003). Eine indirekte Aktivierung kann dabei über aktivierte GTPasen der RAS- und RHO-Familie oder Adapterproteine erfolgen. Dabei wirken Signalproteine als „Adaptoren“, um andere Proteine miteinander zu verbinden und dadurch die Aktivierung der PI3K Klasse I zu katalysieren. Monomere GTPasen binden Isoform-spezifisch an die RAS-Bindungsdomänen (RBDs) der katalytischen Untereinheiten, was entscheidend zur Lipidkinasenaktivierung beiträgt (Fritsch et al., 2013). Aufgrund der Rezeptoren-Aktivierung kommt es zur Rekrutierung der Lipidkinase an die Plasmamembran und damit einhergehend zur Konformationsänderung. Durch die Rekrutierung an die Membran ist die Lipidkinase in räumliche Nähe zum Substrat PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und katalysiert die Phosphorylierungsreaktion zu PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> durch die Spaltung von ATP. Der wichtigste Negativregulator dieses Signalweges ist die Lipidphosphatase PTEN, welche PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> an der 3' Position dephosphoryliert und somit die Signalkaskade abschaltet (Thorpe et al., 2015).

Das einzige Mitglied der Klasse IB ist PI3K $\gamma$ , welches vor allem im hämatopoetischen System verteilt, vorkommt. Im Vergleich zur Klasse IA besitzt sie keine p85-bindende Domäne. Sie besteht aus einer katalytischen p110 $\gamma$ -Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit. Die regulatorischen Untereinheiten weisen im Gegensatz zu den Isoformen der Klasse IA keine SH2-Domänen auf. Ebenfalls zeigen sich Unterschiede bei der Aktivierung. Sie binden G $\beta\gamma$  Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen und leiten Signale von GPCRs weiter.

PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> fungiert als „second messenger“ und aktiviert Akt-abhängige und Akt-unabhängige Effektorsignalwege. Wenn PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> Akt rekrutiert, wird eine Aktivierungskaskade ausgelöst. Die nachgeschalteten Effektorsignalwege führen zu

verschiedenen zellulären Prozessen wie z.B. Zellwachstum, Zellproliferation und Zellüberleben. Dabei übernehmen die 4 Isoformen der Klasse I unterschiedliche physiologische Rollen. Aktivitätsveränderungen im Signalweg führen bei den Isoformen zu unterschiedlichen pathophysiologischen Veränderungen wie z.B. Tumoren. Es existieren zudem Isoform-spezifische Inhibitoren (Fritsch & Downward, 2013). Ein Beispiel ist Wortmannin. Dieser potente und selektive Inhibitor bindet an die ATP-Bindungsstelle und hemmt dadurch die katalytische Untereinheit von Klasse I PI3-Kinasen. Eine erhöhte Dosis inhibiert weitere Proteinkinasen und somit weitere Signalwege, das zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen kann (Yuan & Cantley, 2008).

### 1.3.2 Klasse II

PI3K der Klasse II sind monomere Lipidkinasen mit einem Molekulargewicht von ca. 170-210 kDa. In Säugern kommen drei Klasse II Isoformen vor, PI3KC2 $\alpha$ , PI3KC2 $\beta$ , und PI3KC2 $\gamma$ , die durch PIK3C2A, PIK3C2B und PIK3C2G kodiert werden. PI3KC2 $\alpha$  und PI3KC2 $\beta$  Isoformen werden ubiquitär exprimiert, während PI3KC2 $\gamma$  nur in Leber-, Prostata- und in Brustgewebe exprimiert ist. Diese Lipidkinasen katalysieren die Phosphorylierungsreaktion von PtdIns und PtdIns(4)P. Das bevorzugte Substrat *in vivo* wird kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien gezeigt haben, dass die Synthese von PtdIns(3)P *in vivo* bevorzugt katalysiert wird (Maffucci & Flasca, 2014). Klasse II PI3Ks sind weniger gut charakterisiert als Klasse I Kinasen. Sie scheinen vorwiegend in Verbindung mit intrazellulären Membranfraktionen und zu einem geringen Teil im Cytosol vorzukommen (Vanhaesebroeck et al., 2010). Sie besitzen im Gegensatz zu den beiden anderen Klassen keine regulatorische Untereinheit (Abb. 1.2). Charakteristisch für die drei Isoformen ist der verlängerte C-Terminus mit der C2-Domäne und der PX-Domäne. Die C2-Domäne könnte hauptsächlich als Modulator einer katalytischen Funktion fungieren (Arcaro et al., 1998). Am N-terminalen Ende kommen prolinreiche Regionen vor. Diese könnte evtl. für die Interaktion mit Proteinen, die eine SH3-Domäne besitzen, von Nutzen sein (Falasca & Maffucci, 2007). Die Kinaseaktivität könnte möglicherweise durch diese verlängerten Termini weitergeleitet werden (Vanhaesebroeck et al., 2012). Obwohl diese Klasse, ebenfalls wie Klasse III, PtdIns(3)P als Produkt bilden, werden andere Signalwege reguliert. Studien zeigten, dass die drei Isoformen in unterschiedlichen intrazellulären Prozessen involviert sind (Tab. 1.2).

**Tab. 1.2** Intrazelluläre Funktionen, die durch Klasse II PI3K reguliert werden (Falasca & Maffucci, 2012)

Lipidkinase	Zelluläre Funktion
PI3KC2 $\alpha$	Glucosetransport, Insulinsekretion, Endocytose, Zellwachstum, Zellüberleben
PI3KC2 $\beta$	Zellmigration, Zellwachstum, Zellüberleben, Zellzyklusprogression, K+Kanal-Aktivierung
PI3KC2 $\gamma$	„Homing Leukämiezellen“

Ein Thema, das in den Blickpunkt rückte, ist die Funktion von Klasse II PI3K am Zellkortex z.B. bei der Zellmigration, Glucosetransport, Insulinsignalweg, Endo- und Exocytose (Mazza & Maffucci, 2011; Falasca & Maffucci, 2012). Die Funktionen waren meistens (wenn auch umstritten) auf PtdIns(3)P zurückzuführen, welches bei Signalwegen oder intrazellulären Membrantransporten eine Rolle spielt. Bei Signalwegen scheinen die synthetisierten PtdIns(3)P die K+Kanalaktivität in Immunzellen (bei C2 $\beta$  beobachtet), Wachstumsfaktorrezeptor-Antwort und die Aktivierung von RHO-GTPasen bei Zellkontraktion und Migration (Aktin Umbau) (im Fall von C2 $\alpha$  und C2 $\beta$ ) zu vermitteln. Beim Membrantransport kann die von C2 $\alpha$  induzierte PtdIns(3)P-Aktivität z.B. zu endocytosolischem Recycling von frühen Endosomen führen (Jean & Kiger, 2014). Die Isoformen PI3KC2 $\alpha$  und PI3KC2 $\beta$  besitzen am N-Terminus Clathrin-bindende Regionen. Die Isoform PI3KC2 $\beta$  wird mit Clathrin assoziiert und bietet demnach einen Zusammenhang zwischen Rezeptor-vermittelten intrazellulären Signalwegen und Clathrin-beschichteten Vesikeltransport (Wheeler et al., 2006). PI3KC2 $\alpha$  wurde durch induzierte PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>-Aktivität mit Clathrin-vermittelten Transportvorgängen bei der Endocytose in Verbindung gebracht (Posor et al., 2013). Obwohl PI3KC2 Polymorphismen noch nicht mit menschlichen Krankheiten in Verbindung gebracht wurden, besteht laut Studien die Möglichkeit, dass es eventuell bei der Entstehung von Diabetes (PI3KC2 $\alpha$  and - $\gamma$ ) und Krebs (PI3KC2 $\alpha$  and - $\beta$ ) involviert sein könnten (Falasca & Maffucci, 2012). *In vitro* Studien zeigten, dass C2 $\beta$  bei der Regulation der Hepatitis-C-Virus Replikation involviert ist (Maffucci & Falasca, 2014). Klasse II beherbergt wie Klasse I die RBD. Bisher ist die Rolle von monomeren GTPasen, die bei Klasse I an die RBD binden, unzureichend verstanden. Die Bindungspartner, die mit Klasse II PI3-Kinasen interagieren, sind weniger gut charakterisiert. Daher ist es das Ziel, die Bedeutung von monomeren GTPasen bei der Aktivierung und Funktion dieser Enzyme zu identifizieren.

### 1.3.3 Klasse III

Klasse III sind Heterodimere aus einer katalytischen Untereinheit (VPS34) und einer regulatorischen Untereinheit (VPS15). In Säugern wird die Lipidkinase ubiquitär exprimiert.

VPS34 (vacuolar protein-sorting 34) ist von niederen Eukaryonten bis zu Pflanzen und Säugern konserviert. Als endosomalen Kinasen erlangen sie, durch die Assoziation mit ausgeprägten Multiproteinkomplexen vielfältige Funktionen (Vanhaesebroeck et al., 2010). Im Gegensatz zu den anderen beiden Klassen besitzt diese Klasse keine RBD (Abb. 1.2). Die Kinase katalysiert *in vivo* und *in vitro* die Phosphorylierung von PtdIns zu PtdIns(3)P. Dadurch nimmt sie wichtige zelluläre Funktionen wahr, z.B. in Vesikel-vermittelten Sortierprozessen, einschließlich Phagozytose, endocytosischer Transport, Autophagie und Cytosol-Vakuolen Transport. In Säugerzellen tritt es zusätzlich bei Cytokinese, Signalwegen und Recycling auf. VPS34 bildet einen Komplex mit anderen Proteinen und gewährleistet dadurch die unterschiedlichen zellulären Prozesse (Rostislavleva et al., 2015). In Mammalia bildet die katalytische Untereinheit VPS34 ein Heterodimer mit dem myristylierten und membrangebundenen regulatorischen Untereinheit VPS15. VPS15 reguliert die intrazelluläre Membranlokalisation von VPS34 und somit dessen Aktivität. Ebenfalls interagiert VPS15 mit andern Membranproteinen wie z.B. RAB-GTPase und kann dadurch die VPS34-Aktivität an den Endosomen koordinieren (Jean & Kiger, 2014). Die Aktivierung von VPS34 ist noch nicht geklärt. Die Aktivierung könnte möglicherweise durch verschiedene Stimuli z.B. Aminosäuren, Glucose und andere Nährstoffe erfolgen (Abb. 1.3 c). Effektoren können durch die PX- oder FYVE-Domäne an das phosphorylierte PtdIns(3)P binden. Manche Effektoren interagieren nicht mit dem phosphorylierten Lipid, so dass VPS34 als Gerüstprotein fungieren könnte, um eine Funktion hervorzurufen (Vanhaesebroeck et al., 2010).

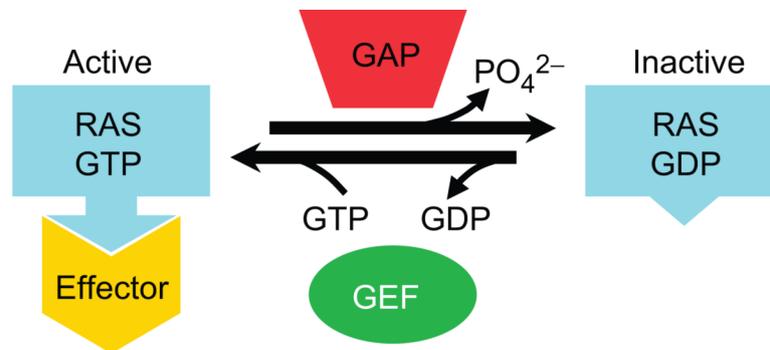
#### 1.4 Monomere GTPasen

Kleine monomere GTPasen übertragen intrazelluläre Informationen und regulieren dadurch verschiedene zelluläre Vorgänge (Tab. 1.3). Sie bestehen aus einer Untereinheit (Polypeptidkette mit ca. 20-40 kDa). Durch ihre intrinsische GTPase Aktivität liegt die GTPase inaktiv vor, wenn diese GDP und aktiv, wenn sie GTP gebunden hat. Die Superfamilie der kleinen GTPasen beinhaltet über 100 Mitglieder. Diese sind aufgrund struktureller Homologien der Effektorregion in fünf Subfamilien eingeteilt: die RAS-, RHO/RAC/CDC42-, der RAN-, der RAB- und der SAR/ARF- Familie (Alberts et al., 2011).

**Tab. 1.3** Funktion monomerer GTPasen

Familie	Funktion
RAS	Kontrolle Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Genexpression
RHO	Signalweiterleitung an Cytoskelett und anderen Stellen
RAN	Regulation Kerntransport von RNA und Proteinen
RAB	Regulation intrazellulären Vesikeltransport
ARF	Regulation beim Aufbau von Proteinhüllen an intrazellulären Vesikeln

Der Aktivitätszustand der GTPasen wird von Regulatorproteinen kontrolliert. Diese strenge Regulation ist notwendig, da eine erhöhte Aktivität der GTPasen weitreichende Folgen hat, wie z.B. die unkontrollierte Zellteilung. Bei den monomeren GTPasen spricht man auch von „molekularen Schaltern“, da sie je nach Regulatorprotein an- oder abgeschaltet werden (Abb. 1.4)



**Abb. 1.4 Regulationsmechanismus der monomeren GTPase RAS.** Im aktiven Zustand kann die GTPase mit Effektorproteinen interagieren. GAPs stimulieren die Hydrolyse von GTP zu GDP. Als Folge wird RAS inaktiviert. Durch die Interaktion von GEFs wird der aktive Zustand der GTPasen wieder hervorgerufen. Dabei wird von GEFs die Freisetzung von GDP angeregt und RAS kann GTP binden (Colicelli, 2004).

GTPase aktivierendes Protein (zusammengefasst als GAPs) bindet an die GTPase und regt die Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP an. Im GTP gebundenen Zustand können die aktivierten GTPasen eine Bindeoberfläche für *downstream* liegende Effektorproteine darstellen. Durch die Hydrolyse von GTP, katalysiert durch GAPs, wird  $\gamma$ -Phosphat freigesetzt. Dies führt zur Neuausrichtung der Effektorenbindestelle und es kommt zur Abschwächung der *downstream* Signalwege. Der Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor (zusammengefasst als GEFs) katalysiert die Freisetzung von GDP, wodurch die GTP Ladung an der Domäne von den GTPasen wieder begünstigt wird. Die GTPase liegt im aktiven Zustand vor (Colicelli, 2004).

Protein-Protein-Interaktionen bewirken eine zelluläre Umverteilung und regeln dadurch unterschiedliche zelluläre Prozesse. Es hat sich gezeigt, dass die vier Isoformen der Klasse I PI3K durch direkte Bindung aktiver RAS oder RHO GTPasen an die RAS-Bindungsdomänen (RBDs) co-aktiviert werden (Fritsch & Downward, 2013). Die RBDs finden sich auch auf den drei Isoformen der Klasse II PI3Ks. Die Bindungspartnern und deren Rolle bei der Aktivierung und Funktion der PI3K Klasse II sind bisher unzureichend verstanden. Daher ist es das Ziel, GTPasen zu identifizieren, die mit der RBD von PI3KC2 Isoformen interagieren. Es könnte möglich sein, dass durch die aktivierte GTPase (gebunden mit GTP) die an die RBD bindet, eine Konformationsänderung des Proteins verursacht und dadurch aktiviert wird. Durch die Aktivierung der PI3KC2 Isoformen werden PtdIns und PtdIns(4)P phosphoryliert. Das phosphorylierte Lipid wirkt als „second messenger“ und beeinflusst verschiedene molekulare Prozesse. Die Aktivierung der drei Isoformen der Klasse II PI3-

Kinasen ist bisher unzureichend verstanden. Aus diesem Grund sind in der vorliegenden Arbeit, verschiedene GTPasen untersucht worden, um mögliche Interaktionspartner mit der RBD von PI3K Klasse II Isoformen zu identifizieren.

## 1.5 Ziel

Aufgrund der unzureichenden Informationen über die Aktivierung der Klasse II PI3-Kinasen war das Ziel dieser Arbeit mögliche Bindungspartner der RBD zu identifizieren. Da die weit besser charakterisierten RBDs der Klasse I PI3Ks entweder RHO-GTPasen (RAC1 bzw. CDC42 mit p110 $\beta$ ) oder klassische RAS-Proteine (p110 $\alpha$ -, - $\gamma$ -, - $\delta$ ) Isoform-spezifisch binden, wurden zunächst Vertreter dieser monomeren GTPasen untersucht. Dazu sollten Protein-Protein-Interaktionen zwischen PI3KC2 $\alpha$  und - $\beta$  und diesen GTPasen durchgeführt werden, um zu identifizieren, welche spezifisch an die RBD binden. Zuerst wurden die isolierten RBDs untersucht. Für die weitere Charakterisierung der Aktivierung sollten RBD-Mutanten identifiziert werden, die nicht mehr mit GTPasen interagieren. Zusätzlich sollten Mutanten der PI3KC2 $\alpha$  untersucht werden, um das onkogene Potential von dieser Isoform zu charakterisieren. Weiter sollten Baculoviren zur Expression von verschiedenen Klasse II PI3K Proteinen verwendet werden, um größere Mengen an rekombinantem Protein zu generieren. Nach erfolgreicher Proteinreinigung sollte *in vitro* die katalytische Aktivität gemessen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die häufigsten verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Steingem, Deutschland) oder Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Diese werden im weiteren Verlauf der schriftlichen Arbeit nicht immer gesondert angegeben.

#### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden für diese Arbeit verwendet:

**Tab. 2.1** Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung
Bakterieller Lysis Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 100 mg/ml Lysozym, 100 mM PMSF, 5 mM MgCl <sub>2</sub>
10x Tris-Glycin Lauf Puffer	250 mM Tris, 1.92 M Glycin, 1% SDS
TBST	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20
Waschpuffer 1 pH 7,4	20 mM Tris-HCl pH7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2% Triton X-100
Waschpuffer 2 pH 7,4	20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl , 2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
GST- Lysis Puffer pH 7,4	20 mM Tris-HCl pH7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1% Triton X-100
GTP loading buffer pH 7,4	20 mM Tris-HCl pH7, 5 mM EDTA, 25 mM NaCl
1x Binde-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1%

	Triton X-100, 5 mg/ml BSA
Coomassie Blue stock solution	0,25% Coomassie Blue, 7,5% Essigsäure (80%), 50% Ethanol
Transfer Puffer	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% Methanol
4x SDS Probenpuffer pH 6,8	0,2 M Tris-HCl, 10% $\beta$ -Mercaptoethanol, 8% SDS, 40% Glycerin, Bromphenolblau
IPTG	0,1M Isopropyl- $\beta$ -thiogalactoside
Ampicillin	1000x Stock mit 100 mg/ml
PBS pH 7,4	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,4 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$

## 2.1.3 Medien

### 2.1.3.1 Bakterielle Kulturen

Folgende Medien wurden für die Kultivierung von Bakterien genutzt:

LB-Medium: 25g LB-Medium auf 1L dest.H<sub>2</sub>O (autoklaviert), 1000X Ampicillin (1/1000)

LB-Agar: 40g auf 1L dest.H<sub>2</sub>O (autoklaviert)

SOC: 26,41g SOB auf 1L dH<sub>2</sub>O, 20 nM Glucose (autoklaviert)

### 2.1.3.2 Zellkultur Vollmedien

Für die Kultivierung von Säugerzellen wurden folgende Medien verwendet:

#### Vollmedium für COS-7 und HEK-293

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA)

10% fötales Kalbserum („Fetal calf serum“, FCS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Antibiotika (Penicillin und Streptomycin, je 100  $\mu\text{g/ml}$ ) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA)

#### Vollmedium für SF-21 und HI-5

SF900 II Sfn (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA)

Fungin (1/1000) (InvivoGen, San Diego, CA)

Antibiotika (Penicillin und Streptomycin, je 100  $\mu\text{g/ml}$ ) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA)

## 2.1.4 Primer

Die hier aufgezeigten Listen zeigen die verwendeten Primer, die für die Klonierung genutzt wurden. Andere Konstrukte, die für diese Arbeit verwendet wurden, lagen schon vor. Die Orientierung der hier gezeigten Primer geht von 5' zu 3'. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Invitrogen (Thermo Fisher, Waltham, MA) oder Apar Biosciences (Denzlingen, Deutschland).

### 2.1.4.1 Primer für site-directed mutagenesis

Mit Hilfe der *site-directed mutagenesis* können strukturelle und funktionelle Aminosäuren verändert werden. Dabei wurden durch eine Punktmutation in der RBD von C2 $\alpha$ , Mutanten generiert, die aufgrund des Alignments (Abb. 3.2) als wichtige Andockstelle für die Protein-Protein-Interaktion angenommen werden konnten.

**Tab. 2.2** Synthetisch hergestellte Oligonucleotide für die Klonierung von RBD Mutanten der C2 $\alpha$

M1	C2 $\alpha$ -V425S-FP	gtgtggggagaatgccagttcgaaggctccattgaaatt
	C2 $\alpha$ -V425S-RP	aatttcaatggagaccttgaactggcatttccccacac
M2	C2 $\alpha$ -K426A-FP	ttcaattcaatggagaccgccacactggcatttccccca
	C2 $\alpha$ -K426A-RP	tggggagaatgccagtggtggcggtctccattgaaattgaa
M3	C2 $\alpha$ -V427S-FP	ggagaatgccagtggaagagctccattgaaattgaagg
	C2 $\alpha$ -V427S-RP	ccctcaattcaatggagctcttcaactggcatttccc
M4	C2 $\alpha$ -S428D-FP	agaatgccagtggaaggtcgacattgaaattgaagggttc
	C2 $\alpha$ -S428D-RP	gaagccctcaatttcaatgtcgaccttcaactggcatttct
M5	C2 $\alpha$ -V438S-FP	gaactcacatcacatgtaaaagtacttgtagttgaagccctcaatttc
	C2 $\alpha$ -V438S-RP	gaaattgaagggtcaactaccaagtacttttcatgtgatgtgagttc
M6	C2 $\alpha$ -T439D-FP	gtagaactcacatcacatgtaaaatcaactgtagttgaagcccttcaat
	C2 $\alpha$ -T439D-RP	attgaagggttcaactaccagttgattttacatgtgatgtgagttctac
M7	C2 $\alpha$ -T441S-FP	cagtagaactcacatcacatgaaaaagtaactgtagttgaagc
	C2 $\alpha$ -T441S-RP	gcttcaactaccagttacttttcatgtgatgtgagttctactg
M8	C2 $\alpha$ -C442A-FP	gtagaactcacatcagctgtaaaagtaactgtagttgaagccctt
	C2 $\alpha$ -C442A-RP	aagggttcaactaccagttacttttcaactgtagttgagttctac
M9	C2 $\alpha$ -V448S-FP	taccagttacttttcatgtgatgtgagttctacttcagaaataattataatgaagc
	C2 $\alpha$ -V448S-RP	gcttgattataattatttctgaagtagaactcacatcacatgtaaaagtaactggta
M10	C2 $\alpha$ -I451K-FP	acatgtgatgtgagttctactgtagaataaagataatgaagcccttgc
	C2 $\alpha$ -I451K-RP	gcaaagggttgcattatcttttctacagtagaactcacatcacatgt
M11	C2 $\alpha$ -I452K-FP	gcaaagggttgcatttataattatttctacagtagaactcacatca
	C2 $\alpha$ -I452K-RP	tgatgtgagttctactgtagaataatataatgaagcccttgc
M12	C2 $\alpha$ -L456K-FP	ttgattcaagtcacatgtaccagcacttggtgattataattatttctacagt
	C2 $\alpha$ -L456K-RP	actgtagaataattataatgaagccaagtgtgggtacatgatgactgaaatca
M13	C2 $\alpha$ -K474A-FP	tgtggcagctacattctggcagtttgggtcaagaggag
	C2 $\alpha$ -K474A-RP	ctcctcttgaccacaaactgccagaatgtagctgccaaca
M14	C2 $\alpha$ -H460A-FP	actgattcaagtcacagctaccagcaaaagggttgcatt
	C2 $\alpha$ -H460A-RP	atgcaagcccttgcgtgggtagctgatgactgaaatcaagt

#### 2.1.4.2 Primer für die Proteinexpression in Säugerzellen

Für die Klonierung der PI3K Klasse II Isoformen wurden sowohl die Gesamtlänge als auch Fragmente des Proteins verwendet. Durch die verkürzten Fragmente, bei denen die Domänen auf der C- und/ oder N-terminalen Verlängerung entfernt wurden, konnte die Funktion im Vergleich zur Gesamtlänge Protein untersucht werden. Für die Proteine, die in den COS-7 und HEK-293 exprimiert wurden, wurden die nachfolgenden Primer verwendet (Tab. 2.3).

**Tab. 2.3** Primer für Gesamtlänge Proteine und Proteinfragmenten

C2 $\beta$ -F3	C2 $\beta$ -pcDNA-KpnI-315-FP
	GGTACAGGTACCGAACTGTTGCCAATGGCCACGAATTGTTTGAGG
	C2 $\beta$ -EcoR-PI3KC2B-RP
	GGTACAGAATTCTAGGTTCCATGACCTCGAGAACCCAG
C2 $\beta$ -F5	C2 $\beta$ -pcDNA- KpnI-315-FP
	GGTACAGGTACCGAACTGTTGCCAATGGCCACGAATTGTTTGAGG
	C2 $\beta$ -pcDNA-EcoRI-1346-RP
	GGTACAGAATTCTTAATCTGAGCCCTGTGAACTTCATCTGAGC
C2 $\beta$ -F3- RBD	C2 $\beta$ -pcDNA-KpnI-592-FP
	GGTACAGGTACCGCCAACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAGGATCTTGGACT GGGTGGAGCTGTACTGC
	C2 $\beta$ -EcoR-PI3KC2B-RP
	GGTACAGAATTCTAGGTTCCATGACCTCGAGAACCCAG
C2 $\beta$ -F5- RBD	C2 $\beta$ -pcDNA-KpnI-592-FP
	GGTACAGGTACCGCCAACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAGGATCTTGGACT GGGTGGAGCTGTACTGC
	C2 $\beta$ -pcDNA-EcoRI-1346-RP
	GGTACAGAATTCTTAATCTGAGCCCTGTGAACTTCATCTGAGC
C2 $\alpha$ -F3- RBD	C2 $\alpha$ -pCDNA-650-FP
	GGTACAGGTACCGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGACAGCGATTTA TGATCTTCTCAGGCTC
	NotI-C2 $\alpha$ -RP
	GGTACAGCGGCCGCTTATAGATACGTTGCCGCGATCAGC
C2 $\alpha$ -F5- RBD	C2 $\alpha$ -pCDNA-650-FP
	GGTACAGGTACCGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGACAGCGATTTA TGATCTTCTCAGGCTC
	C2 $\alpha$ pcDNA/pBP1408
	GGTACAGCGGCCGCTTAGATGGGCTCATCATTAGAAGGAAGG
C2 $\gamma$ -VL	pcDNA-NotI-h2G-FP
	GGTACAGCGGCCGCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGCATATTCTTGG CAACGGATCC
	pcDNA-XhoI-H2G-FL-RP
	GGTACACTCGAGTCAAATTATACTGTTTCCTAATGGATACC
C2 $\alpha$ -VL- RBD	BamH1-C2A-RBD-FP
	GGTACAGGATCCGGAAGTTCTTCTTCTACAAGAATTTGAAG
	EcoRI-C2A-RBD-RP
	GGTACAGAATTCAGTTTGAAGAGCCAGTTCTACTTGG
C2 $\beta$ -VL- RBD	BamH1-C2B-RBD-FP
	GGTACAGGATCCCACGAATTGTTTGAGGTCTCAGAGG
	EcoRI-C2B-RBD-RP
	GGTACAGAATTCAGCCAGCAGGAAGGCGTCCACC

#### 2.1.4.3 Primer für die Proteinexpression in Insektenzellen

Da zu große Fragmente mit geringerer Effizienz von dem Wirt aufgenommen werden und dadurch die Expression beeinflusst werden kann, wurden zusätzlich für dieses Problem kürzere Fragmente (F3 und F5) der Isoformen PI3KC2 $\alpha$  und PI3KC2 $\beta$  gebildet. Damit eine größere Menge an rekombinanten PI3-Kinase Klasse II Proteinen hergestellt werden konnte, wurde die Expression in Insektenzellen gewählt. Für die Klonierung der murinen PI3K Klasse II Proteine, die schlussendlich in Insektenzellen exprimiert wurden, wurden die nachfolgenden Primer verwendet (Tab. 2.5).

**Tab. 2.5** Primer für Gesamtlänge Proteine und Proteinfragmente, die mit dem jeweilig verdauten Vektor pBACPAK-His3-GST ligiert wurden

C2 $\alpha$ -F3-RBD	C2 $\alpha$ -pBP-XhoI-650-FP
	GGTACACTCGAGTTACAGCGATTTATGATCTTCTCAGGCTCC
	pBP-NotI-C2 $\alpha$ -RP
	GGTACAGCGGCCGCTTATAGATACGTTGCCGCAGTCAGC
C2 $\alpha$ -F5-RBD	C2 $\alpha$ -pBP-XhoI-650-FP
	GGTACACTCGAGTTACAGCGATTTATGATCTTCTCAGGCTCC
	C2 $\alpha$ pcDNA/pBP1408
	GGTACAGCGGCCGCTTAGATGGGCTCATCATTAGAAGGAAGG
C2 $\gamma$ -VL	pBP-XhoI-hC2G-FL-FP
	GGTACACTCGAGTTGCATATTGGCCAAACGGATCC
	pBP-NotI-hC2G-FL-PR
	GGTACAGCGGCCGCTCAAATTATACTGTTTCCTAATGGATACC
C2 $\beta$ -VL	C2 $\beta$ -pBP-FL-FP
	GGTACAGGATCCGTCTTCCACTCAGGGCAATGGGGAGC
	C2 $\beta$ -pBP-NotI-FL-RP
	GGTACAGCGGCCGCTTAGGTTCCATGACCTCGAGAACCCAG
C2 $\beta$ -F3	C2 $\beta$ -pBP-KpnI-315-FP
	GGTACAGGTACCGAACTGTTGCCAATGGCCACGAATTGTTTGAGG
	C2 $\beta$ -pBP-NotI-FL-RP
	GGTACAGCGGCCGCTTAGGTTCCATGACCTCGAGAACCCAG
C2 $\beta$ -F5	C2 $\beta$ -pBP-KpnI-315-FP
	GGTACAGGTACCGAACTGTTGCCAATGGCCACGAATTGTTTGAGG
	C2 $\beta$ -pBP-NotI-1346-RP
	GGTACAGCGGCCGCTTAATCTGAGCCTGTGAACTTCATCTGAGC
F3-C2 $\alpha$	C2 $\alpha$ -pBP-351-FP
	GGTACACTCGAGTTCAGGGCCAAGTATCTCAGAAAGACC
	NotI-C2 $\alpha$ -RP
	GGTACAGCGGCCGCTTATAGATACGTTGCCGCAGTCAGC
C2 $\alpha$ -F5	C2 $\alpha$ -pBP-351-FP
	GGTACACTCGAGTTCAGGGCCAAGTATCTCAGAAAGACC
	C2 $\alpha$ -pcDNA/pBP-1408-RP
	GGTACAGCGGCCGCTTAGATGGGCTCATCATTAGAAGGAAGG

## 2.1.5 Plasmide

### 2.1.5.1 pGEX6P1

Für die Generierung der Mutanten von C2 $\alpha$ -RBD wurde der Vektor pGEX6P1 (Adgene, Cambridge, USA) (Abb. 2.1) verwendet. Das zu untersuchende Gen wurde über die MCS in den Vektor kloniert. Der Vektor wurde anschließend über  $\alpha$ -kompetente Bakterien (siehe 2.2.8.1) transformiert und das kodierte Protein in *E.coli* exprimiert. Dabei wurde die Proteinexpression durch IPTG induziert.

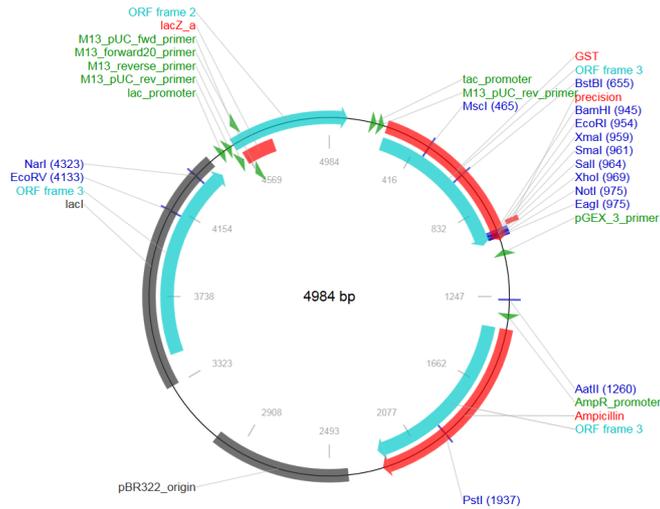


Abb. 2.1 Vektorkarte für die Proteinexpression in *E.coli*, induziert durch IPTG (Adgene, Cambridge, MA)

### 2.1.5.2 pcDNA3.1(+)

Dieser Vektor diente der Klonierung von DNA-Fragmenten, die daraufhin in den Säugerzellen COS-7 und HEK-293 transfektiert wurden, um die kodierten Proteine (Abb. 3.6) zu exprimieren.

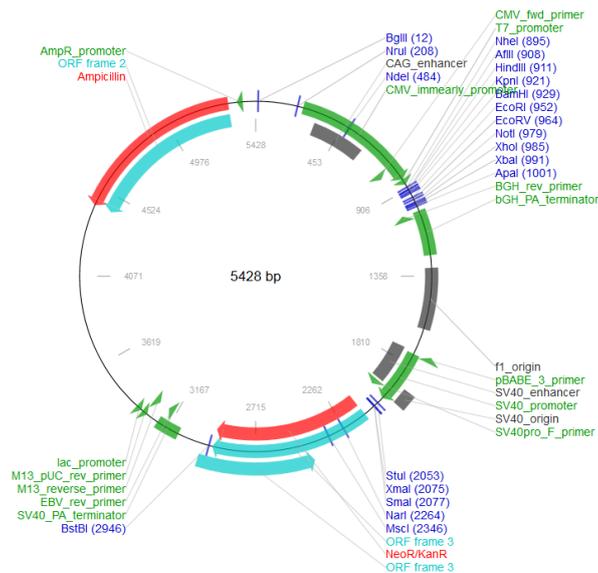


Abb. 2.2 Vektorkarte von pcDNA3.1(+) für die Proteinexpression in Säugerzellen (Adgene, Cambridge, MA).

### 2.1.5.3 pBacPAK-His3-GST

Für die rekombinante Proteinexpression in Insektenzellen wurde der Vektor pBacPAK-His3-GST verwendet (Abb. 2.3). Das zu untersuchende DNA-Fragment, mit der kodierenden Sequenz des Gens, wurde in den „Shuttle“-Vektor kloniert.

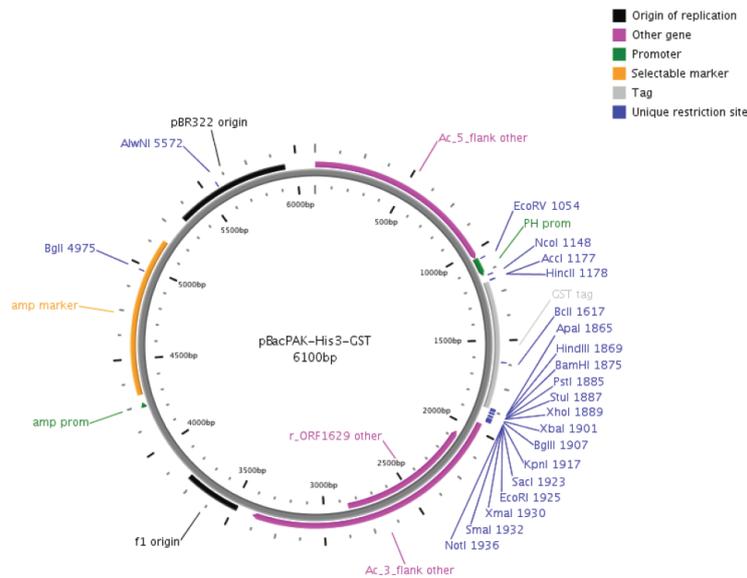


Abb. 2.3 Vektorkarte von pBacPAK-His3-GST für die Herstellung von Baculoviren in Insektenzellen (Protein Purification Facility pBacPak-His3-GST).

## 2.1.6 Antikörper

Die Tabelle zeigt eine Auflistung der verwendeten Antikörper, die für die Detektion im Odyssey Imaging System genutzt wurden.

Tab. 2.6 Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Kaninchen CDC42	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland	1:500
Maus Anti-Pan-RAS	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	1:500
polyklonaler Kaninchen Anti-RAC1(C-14) und Anti-RAC1/2/3/4	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	1:500
monoklonaler Maus Anti-RHOA	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	1:500
monoklonaler Maus Anti- $\alpha$ -Flag M2	Sigma-Aldrich, Steingheim, Deutschland	1:5000
IRDye 700/800 Phosphoramidite	LI-COR Biosciences, Nebraska, USA	1:5000
Kaninchen Anti-GST	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland	1:3000
Maus PI3-Kinase p170	BD Bioscience Pharmingen, San Jose, USA	1:1000
monoklonaler Kaninchen Anti-PI3 Kinase p110 $\beta$	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland	1:1000
polyklonaler Kaninchen Anti-c-Myc	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	1:500
polyklonaler Kaninchen Anti- $\beta$ -Galactosidase IgG,	Thermo Scientific, Waltham, MA	1:500

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient dazu, eine Gensequenz z.B. aus genomischer DNA, cDNA (komplementäre DNA) oder Plasmid-DNA enzymatisch zu vervielfältigen. Für

die Amplifizierung der DNA-Fragmente diverser Proteine, die in Säugerzellen exprimiert wurden, wurde in dieser Arbeit die Touch Down-PCR verwendet (Tab. 2.7)

**Tab. 2.7** Touch Down-PCR Reaktionsansatz

Komponente	Eingesetztes Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Primestar HS DNA Polymerase (Clontech Laboratories, Mountain View, CA)	25
Forward Primer (10 $\mu\text{M}$ )	1
Reversed Primer (10 $\mu\text{M}$ )	1
Plasmid (1 ng/ $\mu\text{l}$ )	1
Nuklease freies Wasser (Ambion the RNA Company, Waltham, MA)	22

Die Touch Down-PCR für die Amplifizierung von den DNA-Fragmenten wurde in einem Thermocycler (Thermocycler T- Gradient Thermoblock, Biometra, Deutschland) durchgeführt (Tab. 2.8)

**Tab. 2.8** Programmierung für die Touch Down-PCR

Prozesse		Temperatur	Dauer
Denaturierung		94°C	1 Sek
15x	Denaturierung	98°C	10 Sek
	Primeranlagerung	72°C	10 Sek
	Elongation	72°C	5 Min
20x	Denaturierung	98°C	10 Sek
	Annealing	57°C	10 Sek
	Elongation	72°C	5 Min
	Elongation	72°C	10 Min
Finale Elongation		57°C	10 Sek

Für die *site-directed mutagenesis* wurde folgender PCR-Ansatz zusammengestellt (Tab. 2.9).

**Tab. 2.9** PCR-Reaktionsansatz für site-directed mutagenesis

Komponente	Eingesetztes Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Primestar HS DNA Polymerase (Clontech Laboratories, Mountain View, CA)	10
Forward Primer (67,5 ng/ $\mu\text{l}$ )	0,8
Reversed Primer (67,5 ng/ $\mu\text{l}$ )	0,8
Template pGEX-C2 (1 ng/ $\mu\text{l}$ )	1
Nuklease freies Wasser (Ambion the RNA Company, Waltham, MA)	7,4

Die PCR für die *site-directed mutagenesis* wurde entsprechend programmiert (Tab. 2.10). Nach der PCR wurde ein Verdau mit FastDigest DpnI (Thermo Scientific, Waltham, MA) für eine Stunde bei 37°C angesetzt. Danach erfolgte die Transformation in kompetente *E.coli* Zellen (siehe 2.2.8.1).

**Tab. 2.10** PCR-Programm für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Prozesse		Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		94°C	1 Sek
18x	Denaturierung	98°C	10 Sek
	Primeranlagerung	60°C	10 Sek
	Elongation	72°C	1 Min
Finale Elongation		72°C	10 Min

### 2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Bei dieser Methode werden die DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA kann durch die Einlagerung von PAGE GelRed™ (Biotium, Hayward, CA) unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Je nach DNA-Fragmentgröße wurde ein 1-2%iges (w/v) Agarosegel genutzt. Die PCR-Ansätze wurden mit 6X DNA Loading (Thermo Scientific, Waltham, MA) (1/10) versetzt. Die Auftrennung der Fragmente bei einer mittleren Gelgröße erfolgte bei 110V für ca. 90 Minuten. Je nach aufgetragener DNA-Fragmentgröße wurde entweder ein 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland) oder ein Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA) mit aufgetrennt. Das Gel ist unter einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht worden. Die jeweiligen Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten.

### 2.2.3 DNA Extraktion aus dem Agarosegel

Um die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu lösen, wurde das "DNA extraction purification Kit von Thermo Scientific" (Waltham, MA) genutzt. Dabei wurde nach dem Protokoll A gearbeitet. Danach erfolgte die Konzentrationsmessung der DNA-Fragmente mit Hilfe des Nano Drops (PreQLab, Erlangen, Deutschland).

### 2.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme werden genutzt, um Spaltfragmente mit einer bestimmten Länge zu erzeugen (Abb. 3.6). Die Restriktionsstellen sind notwendig, um bei der Klonierung das zu untersuchende Zielfragment gerichtet in den Vektor einzufügen.

Um die DNA an gezielten Positionen zu schneiden wurde ein 50 µl Ansatz angesetzt (Tab. 2.11).

**Tab. 2.11** Allgemeine Übersicht des Restriktionsverdauansatzes für Inserts

Komponente	Eingesetztes Volumen ( $\mu$ l)
10 x Fast Digest Buffer (Thermo Scientific Waltham, MA)	5
Restriktionsenzym	2
Restriktionsenzym	2
Gesamte PCR-Produkt (ca. 10 $\mu$ g)	28
Nuklease freies Wasser (Ambion the RNA Company, Waltham, MA)	auf 50

**Tab. 2.12** Allgemeine Übersicht des Restriktionsverdauansatzes für Vektoren

Komponente	Eingesetztes Volumen ( $\mu$ l)
10 x Fast Digest Buffer (Thermo Scientific Waltham, MA)	10
Restriktionsenzym	4
Restriktionsenzym	4
Gesamte Vektor-Produkt (ca. 10 $\mu$ g)	28
Nuklease freies Wasser (Ambion the RNA Company, Waltham, MA)	auf 100

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von FastDigest, Thermo Fisher (Waltham, MA) bezogen (Tab. 2.13 & 2.14).

**Tab. 2.13** Liste der verwendeten Restriktionsenzyme für die Ligation in pcDNA-Vektor

Konstrukt	Restriktionsenzym
C2 $\beta$ -F3	KpnI: 5'GGTACC/ 3' EcoRI: 5'G/ AATTC 3'
C2 $\beta$ -F5	KpnI: 5'GGTAC/ C 3' EcoRI: 5'G/ AATTC 3'
C2 $\beta$ -F3-RBD	KpnI: 5'GGTAC/ C 3' EcoRI: 5'G/ AATTC 3'
C2 $\beta$ -F5-RBD	KpnI: 5'GGTAC/ C 3' EcoRI: 5'G/ AATTC 3'
C2 $\alpha$ -F3-RBD	KpnI: 5'GGTAC/ C 3' NotI: 5' GC/ GGCCGC 3'
C2 $\alpha$ -F3-RBD	KpnI: 5'GGTAC/ C 3' NotI: 5' GC/ GGCCGC 3'
C2 $\alpha$ -VL-RBD	BamHI: 5' G/GATCC3' EcoRI: 5'G/ AATTC 3'
C2 $\beta$ -VL-RBD	BamHI: 5' G/GATCC3' EcoRI: 5'G/ AATTC 3'
C2 $\gamma$ -VL	NotI: 5' GC/ GGCCGC 3' XhoI: 5' C/ TCGAG 3'

**Tab. 2.14** Liste der verwendeten Restriktionsenzyme für die Ligation mit pBacPak

Konstrukt	Restriktionsenzym
C2 $\alpha$ -F3	XhoI: 5' C/ TCGAG 3' NotI: 5' GC/ GGCCGC 3'
C2 $\alpha$ -F5	XhoI: 5' C/ TCGAG 3' NotI: 5' GC/ GGCCGC 3'
C2 $\alpha$ -F3-RBD	XhoI: 5' C/ TCGAG 3' NotI: 5' GC/ GGCCGC 3'
C2 $\alpha$ -F5-RBD	XhoI: 5' C/ TCGAG 3' NotI: 5' GC/ GGCCGC 3'
C2 $\beta$ -F3	KpnI: KpnI: 5'GGTAC/ C 3' NotI: 5' GC/ GGCCGC 3'
C2 $\beta$ -F5	KpnI: KpnI: 5'GGTAC/ C 3' NotI: 5' GC/ GGCCGC 3'
C2 $\beta$ -VL	BamHI: 5' G/GATCC3' NotI: 5' GC/ GGCCGC 3'
C2 $\gamma$ -VL	XhoI: 5' C/ TCGAG 3' NotI: 5' GC/ GGCCGC 3'

Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C. Für die Kontrolle des vollständigen Verdau der Vektor-DNA wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine unverdaute Probe verwendet.

### 2.2.5 Dephosphorylierung von geschnittener Vektor-DNA

Damit eine Vektor-Selbstligation nach einem Restriktionsverdau verhindert wird, wurde durch eine Dephosphorylierungsreaktion das 5' Phosphatende entfernt (Tab. 2.15).

**Tab. 2.15** Vektor-Dephosphorylierung

Komponente	Eingesetztes Volumen ( $\mu$ l)
10 x NEB Buffer (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)	5
Aufgereinigter, geschnittener Vektor (0,5 $\mu$ g/ 10 $\mu$ l)	28
Nuklease freies Wasser (Ambion the RNA Company, Waltham, MA)	auf 50
CIP (4 U/ $\mu$ g) (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)	2

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte eine Stunde bei 37°C, danach erfolgte die Aufreinigung des Ansatzes.

### 2.2.6 PCR Reinigung

Für die Reinigung von PCR Ansätzen wurde das Kit „Thermo Scientific GeneJet PCR Purification“ (Waltham, MA) gewählt. Dabei wurde das Protokoll A mittels Zentrifuge verwendet. Danach wurde die Konzentration der DNA mittels Nano Drop (PreQLab, Erlangen, Deutschland) bestimmt und die Proben bei -20°C gelagert.

### 2.2.7 Ligation von Insert und Vektor-DNA

Nachdem die DNA- Fragmente aus der ursprünglichen DNA mit Restriktionsenzymen verdaut wurden, konnten diese über die palindromischen Schnittstellen mit dem Vektor ligiert werden. Dabei katalysierte eine Ligase die Phosphodiesterbindung der benachbarten DNA-Ketten (Tab. 2.16).

**Tab. 2.16** Reaktionsansatz für die Ligation

Komponente	Eingesetztes Volumen (µl)
10 x Ligase Buffer (10 mM) (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)	2
30 fmol Vektor	x
90 fmol Insert	x
Nuklease freies Wasser (Ambion the RNA Company, Waltham, MA)	auf 19
T4 DNA (5 U/µl )Ligase (Thermo Scientific, Waltham, MA)	1

Berechnung der benötigten Konzentrationen:

Vektor:  $0,03 \text{ (30fmol)} * \text{ Länge der DNA Fragmente (bp)} * 660 / 1000 = \text{DNA in ng}$

Insert:  $0,09 \text{ (90fmol)} * \text{ Länge der DNA Fragmente (bp)} * 660 / 1000 = \text{DNA in ng}$

Die berechnete Nanogramm DNA wird durch die ermittelte DNA-Konzentration (ng/ µl) (Nano Drop) geteilt, so dass man für den Ligationsansatz die jeweiligen Mikroliter erhält.

Erklärung:

Die molekulare Masse eines doppelstrangigen DNA Moleküls setzt sich aus der Anzahl der Basenpaare, die mit 660 Da/bp mutlipliziert wird, zusammen. Die doppelstrangige DNA wird von pmol zu ng umgerechnet, daher wird am Ende durch 1000 geteilt.

Die Länge der Vektor-DNA (bp) können den Vektorkarten entnommen werden. Die Länge der DNA Fragmente (bp) des Inserts wurde über die Datenbank NCBI ermittelt (Tab. 2.17).

**Tab. 2.17** Theoretische DNA Länge der verwendeten Konstrukte

Konstrukt	Theoretische DNA Länge (bp)
F3	4000
F5	3000
F3-RBD (ohne RBD)	3500
F5-RBD (ohne RBD)	2500
C2β-VL	5000
C2γ-VL	5000

Der Ansatz wurde für 15-60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden für die Transformation 1 µl in kompetente Bakterien überführt.

## 2.2.8 Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen

Für die Transformation wurden für die vorliegende Arbeit einerseits „ $\alpha$ -select chemically competent cells gold efficiency“ und zum anderen „Bio Blue chemically competent cells“ (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) verwendet.

### 2.2.8.1. $\alpha$ - kompetente Bakterien

25  $\mu$ l der „ $\alpha$ -select chemically competent cells gold efficiency“ wurden in ein 15ml-Gefäß überführt und mit 1  $\mu$ l des Ligationsansatz ergänzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Als Nächstes erfolgte die Inkubation bei 42°C für 35 Sekunden und anschließend für 2 Minuten auf Eis. Im nächsten Schritt wurden 450  $\mu$ l von dem SOC-Medium dazu gegeben und die Gefäße in den Schüttelinkubator gestellt und bei 200rpm, 37°C für 60 Minuten inkubiert. Eine Ampicillin-Agarplatte (100 $\mu$ g/ml) wurde mit 200  $\mu$ l Zellsuspension ausplattiert und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Durch das Resistenzgen im Plasmid konnten transformierte Zellen Kolonien ausbilden.

### 2.2.8.2 BL-21 DE3

Die Transformation erfolgte wie bei den  $\alpha$ -kompetenten Bakterien, nur dass die Inkubationszeiten unterschiedlich waren. Die erste Inkubation erfolgte für 20 Minuten auf Eis, danach bei 42°C für 45 Sekunden und anschließend für 2 Minuten auf Eis.

## 2.2.9 Plasmidpräparation

### 2.2.9.1 Plasmidpräparation „Miniprep Kit“

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde das GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA) verwendet. Nachdem das PCR-Produkt in kompetente Bakterien amplifiziert wurden, wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in 3 ml LB-Medium mit 1000x Ampicillin (1/1000) über Nacht bei 37°C geschüttelt. Danach erfolgte die Plasmidpräparation nach der Anleitung A. Nachdem die Plasmid-DNA Konzentration mittel Nano Drop (PreQLab, Erlangen, Deutschland) bestimmt wurden, wurden die Proben bei -20°C gelagert.

### 2.2.9.2 Plasmidpräparation „Maxiprep Kit“

Die Plasmid-Präparation im größeren Maßstab dient dazu, über einen größeren Ansatz mehr Plasmid-DNA zu erhalten. Nachdem eine Tageskultur (3 ml LB-Medium, Ampicillin) mit einer einzelnen Kolonie transformierter *E.coli* Zellen angesetzt wurde, wurde diese 1/1000 in 300 ml LB-Medium mit Ampicillin (1/000) über Nacht bei 37°C und 180rpm kultiviert. Für das weitere Vorgehen wurde das Protokoll B nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (GeneJet Plasmid Maxiprep Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA). Die Konzentration der DNA (ng/ml) wurde mittels Nano Drop (PreQLab, Erlangen, Deutschland) bestimmt und die Proben bei -20°C gelagert.

### 2.2.10 Sequenzierung

Für die Sequenzierung der hergestellten Konstrukte wurde der Ansatz, wie folgt zusammengesetzt: 10-50 ng/  $\mu$ l DNA, 10 pmol/  $\mu$ l des jeweiligen *forward* oder *reversed* Primers. Der Ansatz wurde mit Nukleasen freiem Wasser versetzt, um ein Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l zu erhalten. Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

### 2.2.11 Proteinexpression und Affinitätsreinigung

Bei der Proteinexpression wird die Synthese des rekombinanten Proteins eines gewünschten Gens in einer Zelle hervorgerufen. Das entstandene Lysat wurde danach entsprechend gereinigt.

#### 2.2.11.1 RAS-Bindungsdomäne

Über Nacht wurden 50 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Protein der RBD-Isoform bei 37 °C angesetzt. Die RBDs wurden dabei von dem jeweiligen Glycerolstock „gepickt“ und in einen 250-Erlenmeyerkolben überführt. Am nächsten Tag wurde die Kultur 1:10 in 200 ml LB-Medium verdünnt und erneut bei 37°C geschüttelt. Nach 2 Stunden wurde die Kultur auf 16°C abgekühlt und die Proteinexpression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG finale Konzentration über Nacht bei 16°C induziert. Am folgenden Tag wurden die Proben bei 5.000g zentrifugiert und das Pellet in 10 ml bakteriellem Lysis-Puffer homogenisiert. Als Nächstes erfolgte der Einfrier- und Auftauzyklus in Trockeneis und im lauwarmen Wasserbad (Julabo TW12, Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland). Die Proben wurden homogenisiert für 20-30 Sekunden (Sonoplus WW3100, Bandelin, Berlin, Deutschland). Anschließend wurden 20  $\mu$ l DNase (1 mg/ml) und 500  $\mu$ l 20% Triton X-100 hinzupipettiert. Die Proben wurden 30 Minuten bei 4°C über Kopf rotiert und danach für 30 Minuten bei 18.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 15ml-Gefäß überführt, in Trockeneis eingefroren und schließlich bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle wurde das jeweilige bakterielle Lysat 1:30 mit GST-Lysis Puffer vorverdünnt, auf Glutathione Sepharose 4B (Beads) (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) geladen, für 1 Stunde bei 4°C inkubiert, mit den Waschpuffern (dreimal mit WP1 und einmal mit WP2) gewaschen und danach mit 40  $\mu$ l SDS- Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für ca. 5 Minuten auf 98°C erhitzt und für 10 Sekunden zentrifugiert. Danach erfolgt die Auftrennung mittels SDS- PAGE. Über Nacht wurde das Gel mit Coomassie Blue gefärbt. Am nächsten Tag wurde der Farbstoff Coomassie mit MeOH:Eisessig:H<sub>2</sub>O (30/10/60; v/v/v) ausgewaschen und die Überprüfung der exprimierten Proteine konnte erfolgen. Die Banden wurden mit Hilfe des Odyssey (B446-LI-COR Odyssey, LI-COR Biosciences-GmbH, Bad Homburg, Deutschland) anhand einer Albuminkontrolle quantifiziert, um die jeweilige Proteinmenge (zwischen 1,25 und 5  $\mu$ g) für den Pulldown zu berechnen.

### **2.2.11.2 GTPasen, Reinigung und Nucleotidladung**

Für die Proteinexpression und deren Reinigung wurde gleich vorgegangen wie bei den isolierten RBDs. Für die Nucleotidladung mit GDP/GTP $\gamma$ S wurde ein 15ml-Gefäß mit 1 ml GSH-Agarose Beads gefüllt, gewaschen und mit dem jeweiligen GTPase-Lysat (10 ml) für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Als Nächstes wurde der Überstand entfernt, dreimal mit WP 1 und einmal mit WP 2 gewaschen, jeweils 10 ml. Danach wurden, um die GST-Markierung von den GTPasen RAC1, RHOA, CDC42 und HRAS zu entfernen, die Beads über Nacht bei 4°C mit HRV 3C Protease inkubiert (2 ml Waschpuffer 2, 2 mM DTT, 1/1000 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)). Am Folgetag wurden die Reaktionsansätze zentrifugiert und der Überstand gefiltert. Die Beads wurden erneut mit den Waschpuffern gewaschen und der Überstand ebenfalls filtriert. Mit Hilfe des Nano Drops wurde die Proteinkonzentration berechnet. Als Nächstes erfolgte die Beladung mit GDP oder GTP $\gamma$ S (20-facher molarer Überschuss) und EDTA (5 mM Endkonzentration) für 30 Minuten bei 30°C. Die Proben wurden für 2 Minuten auf Eis inkubiert, bevor dann 20 mM MgCl<sub>2</sub> hinzugefügt wurde, um eine Endkonzentration von 10 mM zu erhalten. Die geladenen GTPasen wurden gefiltert, konzentriert (für eine Endkonzentration von 100 nM) und schockgefroren für die Lagerung bei -80°C.

### **2.2.12 GST-Pulldown**

Pulldown Assays werden verwendet um Protein-Protein-Interaktionspartner zu identifizieren. Dabei wird im ersten Schritt z.B. ein rekombinantes GST Fusionsprotein an GSH Agarose Beads gebunden. Durch Waschschrte werden ungebundene Proteine entfernt. Danach erfolgt die Inkubation des zweiten Proteins. Kommt es zu einer Interaktion, bindet das zuvor immobilisierte „Köderprotein“ das „Beuteprotein“. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern können die Banden der Proteine detektiert werden.

#### **2.2.12.1 GST-Pulldown Assay für exprimierte RBDs**

Um Interaktionspartner für die RBDs der Isoformen der PI3Ks zu identifizieren, wurden GST-Pulldown Assays genutzt. Bei dieser Methode dienen die RBD-Konstrukte als Köderproteine, da diese die GST-Markierung besitzen, und die GTPasen als Beuteprotein. Dazu wurden 30  $\mu$ l Beads gewaschen und für 30 Sekunden bei 4°C und 4.000rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurden die Beads mit der entsprechenden Menge an RBD-Lysat (verdünnt mit GST-Lysis Puffer) für 1 Stunde inkubiert und danach dreimal mit 1 ml GST-Lysis Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Beads mit der jeweiligen Konzentration an immobilisierten GDP/GTP $\gamma$ S GTPasen beladen und für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend, nach den Waschschrten, wurden 40  $\mu$ l 1x SDS-Probenpuffer zugegeben. Danach wurden die Proben für 5 Minuten bei 98°C auf dem Heizblock inkubiert. Die Proben wurden entweder bei -20°C eingefroren, oder

direkt für die SDS-PAGE und Western Blot verwendet. Die Fluoreszenzmembran (Immobilon-FL Transfer Membrane, Darmstadt, Deutschland) wurde mit dem jeweiligen primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde am darauf folgenden Tag dreimal mit 10 ml TBST gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur bei leichten Schwänken. Im Anschluss wurde die Membran erneut gewaschen. Zur Detektion der Proteinbanden wurde das LI-COR Odyssey Imaging System (B446-LI-COR Odyssey, LI-COR Biosciences-GmbH, Bad Homburg, Deutschland) genutzt.

#### **2.2.12.2 GST-Pulldown Assay für exprimierte Proteine aus der Zellkultur**

Bei dieser Methode diente die GTPase als Köderprotein und die PI3K-Proteine als Beuteprotein. Mit den aufgereinigten, rekombinanten Proteinen, die über Säugerzellen oder Insektenzellen exprimiert wurden, wurden Interaktionsstudien mit verschiedenen GTPasen durchgeführt. Ziel war es, GTPasen zu identifizieren, die spezifisch mit der RBD der exprimierten PI3K-Proteine interagieren. Dazu wurden 30 µl der Beads mit 1 ml WP 1 gewaschen, bei 4°C für 30 Sekunden bei 4.500rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach wurden die jeweiligen GTPasen mit GST-Buffer verdünnt, auf die Beads aufgetragen und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert und zweimal mit Waschpuffer 1 und einmal mit Waschpuffer 2, jeweils 1 ml, gewaschen. Als Nächstes wurden die Beads mit dem immobilisierten GTPasen mit 50 µl „GTP loading buffer“ und jeweils mit 1,5 µl GDP oder GTP $\gamma$ S (100 mM) geladen und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben für 1 Minute auf Eis gekühlt und mit 1 µl 1M MgCl<sub>2</sub> versetzt. Das rekombinante PI3-Kinase Protein wurde mit „1x Binding-Buffer“ auf die gewünschte Konzentration verdünnt und wieder für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte der Waschschrift mit je 1 ml: dreimal mit WP 1 und einmal mit WP 2. Als Nächstes wurden 40 µl SDS-Probenpuffer zugegeben und für 5 Minuten bei 98°C gekocht. Die Proben wurden entweder bei -20°C eingefroren oder direkt auf ein 8%iges Gel geladen.

#### **2.2.13 SDS-PAGE**

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Der negativ geladene SDS-Proteinkomplex wandert im elektrischen Feld zum Pluspol, so dass eine Auftrennung über das Molekulargewicht erfolgen kann.

Die Proben der GST-Pulldown Assays wurden vor der Auftragung auf dem Gel erneut für 5 Minuten bei 98°C auf dem Heizblock inkubiert. Als Marker wurden 8 µl der „Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific, Waltham, MA) verwendet. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für 60-90 Minuten bei 130-190 V in Lauf-Puffer. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine diskontinuierliche Gelelektrophorese. Dabei

wandern die Proteine zuerst durch das Sammelgel, danach erfolgt die Separierung anhand ihrer Größe im Trenngel. Je nach Größe des Proteins wurde ein 12%iges oder ein 8%iges Polyacrylamidgel hergestellt (Tab. 2.18).

**Tab. 2.18** Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen

	<b>12% Trenngel</b>	<b>8% Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	6,6 ml	9,3 ml	5,5 ml
<b>30% Acrylamid</b>	8 ml	5,3 ml	1,3 ml
<b>1,5 M TRIS.HCL pH 8,8 Trenngelpuffer</b>	5 ml	5 ml	-
<b>1M TRIS.HCL pH 6,8 Sammelgelpuffer</b>	-	-	1 ml
<b>10% SDS</b>	200 µl	200 µl	80 µl
<b>10% APS</b>	200 µl	200 µl	80 µl
<b>TEMED</b>	20 µl	20 µl	8 µl

#### 2.2.14 Western Blot

Diese Methode dient der Immobilisierung und Detektion von Proteinen mittels Antikörpern auf einer Membran. Dabei werden die Proteine elektrophoretisch auf eine adsorbierende Membran übertragen.

Nach dem Zusammenbau des „Sandwichs“ in den Transferkammern wurden die Proteine für eine Stunde bei 100 V und 4°C von dem Gel auf die Fluoreszenzmembran (Immobilon- FL Transfer Membrane, Darmstadt, Deutschland) geblottet. Danach wurde die Membran getrocknet und 1 Stunde bei RT mit Odyssey Blocking-Buffer inkubiert. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C unter leichter Rotation inkubiert. Am folgenden Tag erfolgten drei Waschschritte mit je 10 ml TBST für jeweils 10 Minuten unter leichten Rotationen. Als Nächstes erfolgte die Inkubation mit dem sekundären 700/800 Antikörper für 1 Stunde bei RT bei leichten Schwänken. Im Anschluss wurde die Membran erneut gewaschen. Zur Identifikation der Proteinbanden nutzte man das LI-COR Odyssey Imaging System.

#### 2.2.15 PtdIns(3)P Mass ELISA

Über die Datenbank Cosmic zeigte sich, dass Klasse II PI3K in Tumoren oft amplifiziert, überexprimiert oder mutiert sind. Der PtdIns(3)P-Mass „Enzyme-linked immunosorbent Assay“ (ELISA) wurde genutzt, um die Gesamtmenge an dem spezifischen Lipid PtdIns(3)P, die aus den Zellen extrahiert wurden, zu quantifizieren. Die Lipide werden mit einem PI(3)P Detektor inkubiert und danach auf eine PI(3)P-beschichtete Platte für die kompetitive Bindung zugegeben. Ein Sekundärdetektor ist mit der Peroxidase verknüpft und ein kolorimetrisches Substrat wird genutzt, um PI(3)P-Detektor-Protein, die an die Platte gebunden sind, zu detektieren. Das Signal wird bei einer Extinktion von 450 nm gemessen und ist proportional zu der Menge an PI(3)P aus den extrahierten Zellen. Mit Hilfe des kompetitiven ELISA kann der Unterschied an der Umsetzung von PI(3)P gemessen werden. Für diesen ELISA wurden

Mutanten, die bei Tumorerkrankungen gehäuft vorkommen, genutzt, um den signifikanten Anstieg in der PI(3)P Ebene im Vergleich zur Wildtyp PI3KC2 $\alpha$  zu untersuchen.

Da die Proteine schon vorhanden waren, konnte direkt die Transfektion erfolgen. Nach 48 Stunden wurden die transfizierten COS-7 Zellen geerntet (siehe 2.2.16.2) und die Lipidextraktion nach Protokoll-Angaben (K-3300) durchgeführt. Beim PI(3)P Mass ELISA wurde ebenfalls nach den Protokoll-Angaben K-3300 von Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT) vorgegangen.

### 2.2.16 Zellkultur COS-7 und HEK-293

COS-7 Zellen, sind eine Fibroblastenzelllinie, die aus dem Nierengewebe von *Cercopithecus aethiops* gewonnen und mit einer Mutante des SV-40 Virus transformiert wurden.

HEK-293 ist eine humane Zelllinie, die aus menschlichen embryonalen Nierenzellen gewonnen und mit DNA Bruchstücken des menschlichen Adenovirus 5 transformiert wurden.

#### 2.2.16.1 Auftauen, Einfrieren und Kultivierung

Das Kryo-Röhrchen wurde im Wasserbad (Julabo TW12, Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland) aufgetaut und in 10 ml Vollmedium überführt. Das 50ml-Gefäß wurde für 5 Minuten bei 1.200rpm zentrifugiert und das Zellpellet mit frischem Vollmedium resuspendiert. Die Zelllinien wurden in Kulturflaschen mit einer Fläche von 175 cm<sup>2</sup> in 25 ml Vollmedium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 10%igen CO<sub>2</sub>.

Beide Zelllinien wurden beim Splitten im Verhältnis 1:10 mit PBS gewaschen, bei 37°C mit Trypsin gelöst und mit frischem Vollmedium versetzt. Für die Lagerung der Zelllinien wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und für 5 Minuten bei 1.200rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde im hergestellten Freezing-Medium (20 ml Serum-freies DMEM, 25 ml FCS, 5 ml DMSO) resuspendiert und in Kryo-Röhrchen überführt. Zuerst wurden die Zellen über Nacht bei -80°C tiefgefroren und am Folgetag im Flüssigstickstofftank gelagert.

#### 2.2.16.2 Transfektion und Ernten COS-7 und HEK-293

Die Zelllinien wurden einen Tag vor Versuchsbeginn so verdünnt, dass am folgenden Tag eine Konfluenz von ca. 70-90% erreicht wurde. Für die Transfektion wurden bei diesen Zelllinien pcDNA- oder pSG5-Konstrukte verwendet. Dabei hat man zwei Varianten der Transfektion genutzt.

#### **Tansfektion mit Lipofectamin 2000**

Das Optimem-Medium (Gibco- Life Technology, Carlsbad, CA) wurde mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen Life Technology, Carlsbad, CA) (40  $\mu$ l/ Ansatz) versetzt. In einem weiteren Ansatz wurde die gewünschte pcDNA Menge (15 cm Petrischale 32  $\mu$ g pcDNA-/pSG5-Konstrukt) mit 2 ml Optimem versetzt. Nach der Inkubationszeit von 5 Minuten wurden 2 ml vom Optimem/Lipofectamin 2000 Lösung zum anderen Ansatz hinzu pipettiert und für 20 Minuten

inkubiert. Während dieser Inkubationszeit ist das alte Medium der COS-7 Zellen durch frisches Vollmedium ausgetauscht worden. Das Gemisch (4 ml) wurde auf die Zellen pipettiert und anschließend vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Danach wurde die Kulturschale 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 10%igen CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **Transfektion mit linearen Polyethylenimine (PEI) 25 kD**

Kostengünstiger und mit dem gleichbleibenden Effekt zeigte sich die Transfektion mit PEI (Polysciences Inc., Warrington, UK). Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausgesät, so dass eine Konfluenz von ca. 70-90% gegeben war. Eine halbe Stunde vor der Transfektion wurde das Medium durch Serum-freien DMEM ausgetauscht. Für die Herstellung des Transfektionsmix wurde zuerst 8,3 µl PEI (1 mg/ml pH7,4) mit 2 ml Serum-freien DMEM für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde bei einer Zellkulturplatte mit einer Fläche von 20 cm<sup>2</sup> 25 µg DNA zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 2 ml des DNA/PEI Mix wurden auf die HEK-293 Zellen pipettiert. Nach 4 bis 6 Stunden wurde das Medium durch Vollmedium ausgetauscht. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet.

### **Ernten**

Für das Ernten der COS-7 wurde die benötigte Menge GST-Lysis Puffer mit dem Protease Inhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (1:100) versehen. Die Petrischalen wurden in eine Eis Wanne gestellt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Dann wurden 4 ml GST-Lysis Puffer/Protease Inhibitor zugeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Scraper abgekratzt und für 10 Minuten bei 4°C und 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem 15 ml-Gefäß gesammelt. Für die Kontrolle der Proteinexpression wurden 80 µl des Lysats mit 30 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt.

### **2.2.17 Insektenzellen**

Für die Etablierung der Expression der rekombinanten Proteine wurden Sf-21 und High-5 (Hi-5) Zelllinien verwendet. Hi-5 und Sf-21 sind adhärent oder in Suspensionskultur wachsende Zelllinien. Die Sf-21 Zelllinie wurde aus dem Eierstockgewebe von *Spodoptera frugiperda* etabliert und diente in der vorliegenden Arbeit zur Transfektion und Amplifikation von rekombinanten Baculoviren. Die Hi-5 Zellen wurden aus den Eierstockzellen von *Trichoplusia ni* etabliert und dienten der Proteinexpression.

#### **2.2.17.1 Auftauen, Einfrieren und Kultivierung**

Das Kryotube aus dem Stickstoffbehälter wurde im Wasserbad (Julabo TW12, Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland) aufgetaut, in 10 ml Vollmedium zugegeben und für 5

Minuten bei 1.200rpm zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit frischem Vollmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) überführt. Die Kultivierung der adhärennten Zellen erfolgte im Brutschrank bei 27°C und 1%igen CO<sub>2</sub>.

Die im Stickstofftank gelagerten Sf-21 oder Hi-5, die schon einmal in Schüttelkultur waren, wurden auf die selbe Weise aufgetaut. Anhand der Zellzahlmessung der Zelllinie konnte auf die Menge des Mediums die Zellzahl angepasst werden. Die Zellen inkubierten bei 140rpm und 27°C. Für die Lagerung der Zelllinien wurden die Zellen aus der Kulturflasche gelöst oder der Suspensionskultur entnommen, die Zellzahl bestimmt und für 5 Minuten bei 1.200rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde im hergestellten Freezing-Medium (46,5% Medium SF900, 46,5% Medium aus der Kultur, 7,5% DMSO) resuspendiert, so dass eine Zelldichte von  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml vorlag und in Kryo-Röhrchen überführt.

### 2.2.17.2 Suspensionkultur/ Subkultivierung

Für die Subkultivierung wurde das Sf 900 Medium auf RT gebracht. Währenddessen wurde die Zellzahl der Schüttelkultur gezählt und bei einer Dichte von  $3 \cdot 10^6$  Zellen/ml auf  $3 \cdot 10^5$  verdünnt. Die adhärennten Zelllinien wurden in Kulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm<sup>2</sup> in 15 ml Vollmedium kultiviert. Bei einer Konfluenz von über 80% wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Medium abgesaugt und mit 10 ml frischem Vollmedium versetzt. Die Hi-5 wurden durch Klopfen von der Kulturflasche gelöst, während die Sf-21 vorsichtig abgekratzt wurden. Durch die Bestimmung der Zellzahl wurde eine bestimmte Zellanzahl ( $4 \cdot 10^5$  Zellen/ml) wieder in der Flasche ausgesät und weiterkultiviert. Nach ca. 30 Passagen wurden die Zellen verworfen und „frische“ Zellen aus einer Stocksammlung aufgetaut.

### 2.2.17.3 Baculovirus-Expressionssystem

Baculoviren sind Insektenviren, die vor allem Insektenlarven des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* infizieren. Mit dem Ziel, einer heterologen Expression des gewünschten Konstrukts näher zu kommen, ist auf der Basis des AcMNPV- Genoms (Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus) die Insertion der Fremd-DNA vorgenommen worden.

Die filamentösen Baculoviren haben ein stabförmiges Nucleocapsid mit einer Größe von 30-60 zu 250-300 nm. Es besteht aus der doppelsträngigen, zirkulären DNA (90-180 kBp). AcMNPV hat ein bi-Phasen Lebenszyklus und bildet daher 2 Virusphenotypen aus: *budded virions* (BV) und *occlusion-derived virions* (ODV). Die BVs entstehen nach der Reproduktion eines einzelnen Virus durch die Knospung aus den infizierten Zellen. Der BV ist notwendig, um das fremde Gen in die Wirtsinsektenzellen zu schleusen. In der späten Infektionsphase bilden sich *occlusion bodies* (OB). Diese schützen die DNA vor Umwelteinflüssen und sind notwendig, um das Überleben zwischen den Wirten zu gewährleisten (baculo complete all-in-one User Guide 2012). Da das Baculovirus-Genom zu groß ist, kann das Fremde Gen nicht direkt eingesetzt werden. Daher muss das zu interessierende Gen in einen geeigneten

Vektor übertragen werden. Dann werden das Virusgenom und der Transfervektor in die Sf-21 eingebracht. Durch die homologe Rekombination zwischen den flankierten Sequenzen in beiden DNA Molekülen bewirkt es die Insertion des gewünschten Gens ins Virusgenom. Als Ergebnis entsteht ein rekombinantes Virusgenom. Das Genom wird repliziert, um das rekombinante Virus zu bilden. Dieser kann dann vom Zellkulturmedium geerntet werden.

#### **2.2.17.4 Transfektion**

Für die Durchführung der Transfektion wurde das „baculo complete all-in-one Baculovirus Protein Expression Kit“ (Oxford Expression Technologies, Oxford, England) verwendet. Das Vorgehen der Transfektion erfolgte nach Protokoll-Angaben des Herstellers. Nachdem das Virus geerntet wurde, konnte dieses bei 4°C dunkel gelagert werden. Als Nächstes konnte die Amplifizierung des Virus erfolgen. Die Zellen, die nach der Cotransfektion übrig waren, konnten genutzt werden, um die Genexpression zu überprüfen. Dafür wurden die transfizierten Sf-21 geerntet und mit SDS-Probenpuffer resuspendiert, bei 98°C gekocht und für 10 Sekunden mit Ultraschall (Sonoplus WW3100, Bandelin, Berlin, Deutschland) behandelt. Die Proben wurden auf ein 8%iges Gel aufgetragen. Nach der Durchführung von SDS-PAGE und Western Blot wurden die Proteinbanden im Odyssey Imaging System (LICOR Biosciences-GmbH, Bad Homburg, Deutschland) detektiert.

#### **2.2.17.5 Virusamplifikation**

Für die erste Virusamplifikation nach der Transfektion von den Sf-21 Zellen mit anschließender Ernte des Überstands wurden  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml Sf-21 in 50 ml Medium überführt und in einem Ansatz mit je 500 µl Virus infiziert. Anschließend wurden die Zellen 4,5 bis 5 Tage bei 260rpm und 27 °C inkubiert. Der Virusstock wurde bei 4°C dunkel gelagert. Danach wurde der Virustiter bestimmt.

#### **2.2.17.6 Virustiterbestimmung**

Um den gebildeten Virustiter der jeweilig infizierten Zellen zu bestimmen, wurde das „baculo quant all-in-one extraction and quantification Kit“ (Oxford Expression Technologies, Oxford, England) verwendet. Das Prinzip dieser qPCR beruht auf dem FRET- („Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer“) System. Diese Sonde ist mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert, dem Reporter 6FAM und dem Quencher IOWA BLACK FQ. Durch Anregung des ersten Fluorochroms kommt es zur Lichtemission, wodurch das zweite Fluorochrom durch die räumliche Nähe angeregt wird. Aufgrund der 5'-3'-Nukleaseaktivität der Polymerase kann der Reporter von der Sonde abgespalten werden und die erzeugten Fluoreszenzsignale werden gemessen. Dabei beschreibt der Ct-Wert (cycle threshold) den Zyklus, an dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Daraus ergibt sich, dass je höher die Konzentration der Ziel-DNA ist, desto schneller kann ein

signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität und damit einhergehend ein niedrigerer Ct-Wert vorliegen.

Beim Vorgehen wurde nach Protokoll-Angaben vorgegangen, bis auf die Angaben der verwendeten Lösungsmengen des mitgelieferten Mastermix (Tab. 2.19).

**Tab. 2.19** Ansatz Mastermix für die qPCR

Reagenzien	Volumen
2x Brilliant QPCR Low Rox Mix	5 $\mu$ l
RNase freies Wasser	2,8 $\mu$ l
Probe und Primer Mix	1,2 $\mu$ l
DNA (von unbekanntem Virus und Kontrollen (DNA positiv ca. $10^8$ pfu/ml))	1 $\mu$ l

Die qPCR erfolgte in einem Roche LightCycler 480 (Mannheim, Deutschland). Durch die Virustiterbestimmung konnte für die nächste Virusamplifikation die Infektion der Insektenzellen in einem bestimmten zahlenmäßigen Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu deren Zielzellzahl durchgeführt werden.

#### **2.2.17.7 Proteinexpression in High-5**

Für die optimale Proteinsynthese wird die Infektion von Zellen mit einer niedrigen MOI (1pfu/Zelle) empfohlen. Um die optimale Zeitdauer für die Proteinsynthese zu ermitteln wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml Hi-5 in entsprechender Menge an Medium in einem 25 ml Erlenmeyerkolben überführt. Danach wurden die Hi-5 mit dem Virus der verschiedenen MOI infiziert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (24, 48, 72, 96 Stunden) wurden jeweils 2 ml dem Schüttelkultur entnommen. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit SDS-Probenpuffer resuspendiert. Bevor die Proben auf ein 8%iges Gel aufgetragen wurden, wurden sie mit Ultraschall (Sonoplus WW3100, Bandelin, Berlin, Deutschland) behandelt. Nach der SDS-PAGE und dem Western Blot wurden die Proteinbanden mit Hilfe des GST-Antikörpers im Odyssey detektiert. Aufgrund dieser Daten wurden entsprechend Hi-5 Zellen, mit der bestmöglichen MOI und Inkubationszeit, für die Proteinexpression infiziert.

#### **2.2.17.8 Proteinaufreinigung**

GST-Fusionsproteine können durch die Affinitätschromatographie unter Zuhilfenahme von Glutathion-Sepharose 4B aufgereinigt werden. Dadurch wurden nach der Proteinexpression im größeren Maßstab die Proteinfragmente PI3KC2 $\alpha$ -F3 und -F5 gereinigt. Als erstes wurden die infizierten Hi-5 Zellen bei 3.000rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in einem Lysis Buffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 0,5%iges Triton X-100, 10% Glycerol, 10 mM B- Glycerolphosphat, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM DTT und 1/100

Protease-Inhibitor) resuspendiert und für 10 bis 15 Minuten inkubiert. Der Nachweis der Lyse erfolgte im Lichtmikroskop. Danach wurden die Proben zentrifugiert. Dann erfolgte die Anbindung des präparierten Extraktes an GSH-Agarose Beads. Dazu wurde in ein 15ml-Gefäß je 1 ml GST-Beads gegeben und mit 10 ml des klaren Lysats für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden dabei über Kopf rotiert. Dann erfolgten Zentrifugationsschritte (3.000rpm, 10 Minuten, 4°C) im Wechsel mit den Waschschritten. Dafür wurde das Pellet 5 mal mit WP 1 und 1 mal mit WP 2, jeweils 10 ml, gewaschen. Um die GST-Markierung zu entfernen, wurden die immobilisierten Lysate mit 2 ml Waschpuffer 2, 2 mM DTT und 3C-Protease (1/100) bei 4 °C über Nacht und über Kopf Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand über die Pierce Centrifuge Columns (Thermo Scientific, Waltham, MA) aufgereinigt. Danach wurde die Proteinkonzentration mit Nano Drop (PreQLab, Erlangen, Deutschland) und Bradford (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) bestimmt, die Proben aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### **2.2.17.9 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Um die Konzentration an Proteinen zu bestimmen wurde das „Bio-Rad Protein Assay Reagent“ (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) genutzt. Dabei bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 die Proteine. Als Folge kommt es zu einer Deprotonierung des Farbstoffs und das Absorptionsmaximum verschiebt sich. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen und anhand der BSA-Eichkurve konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

#### **2.2.17.10 Messung der Proteinaktivität**

Um die Proteinaktivität der PI3K $\alpha$ -F3 zu untersuchen, wurde der Transcreener ADP<sup>2</sup> FI Assay (BellBrook Labs, Fitchburg, USA) verwendet. Der Assay basiert auf dem Nachweis von ADP und kann somit für die PI3K Klasse II genutzt werden. Der Assay beinhaltet einen ADP Alexa594 Tracer, der mit einem ADP<sup>2</sup> monoklonalen AK gebunden ist und mit einem IRDye QC1 Quencher konjugiert ist. Der Tracer wird durch ADP verdrängt, welches durch die enzymatische Reaktion erzeugt wird. Dabei ist die ADP Bildung proportional zur Zunahme der Fluoreszenz-Intensität.

Für die Bestimmung der basalen Aktivität der PI3K $\alpha$ -F3 wurden verschiedene Phospholipide angeboten. Die Verdünnungsreihe des Proteins F3 wurde mit Puffer 1 (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,03% CHAPS, 4 mM DTT auf 10 ml mit dH<sub>2</sub>O hinzufügen, pH 7,4). Für die ADP/ATP Standardkurve wurde Puffer 2 genutzt (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,03% CHAPS, 6 mM MgCl<sub>2</sub> 2 mM EGTA, auf ein Endvolumen von 10 ml mit dH<sub>2</sub>O, pH 7,4). Die Lipide Phosphatidylinositol diC8 (PI diC8), PtdIns(4)P (PI(4)P diC8) und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (PI(4,5)P<sub>2</sub> diC8) je 0,1 mg (Echelon Biosciences Inc, Salt Lake City, UT) wurden in 1 ml Puffer 2 gelöst. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l in einer Corning 96

Well Platte durchgeführt. Der Gesamtansatz beinhaltete eine Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  ATP, 75  $\mu\text{M}$  Lipide und eine Verdünnungsreihe der Proteinprobe C2 $\alpha$ -F3 von 0 nM bis 10<sup>7</sup> nM (pro Well 12,5  $\mu\text{l}$ ). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 12,5  $\mu\text{l}$  Stop-Detektion-Puffer (1xStop&Detect Buffer B, APD Alexa 594 Tracer (800 nM), 46  $\mu\text{g/ml}$  ADP<sup>2</sup> Antibody-IRDye QC-1) gestoppt. Die Platte wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte bei einer Extinktion von 585 nm und einer Emission von 627 nm. Die Anzahl der Blitze betrug 25 und die Integrationszeit 25  $\mu\text{s}$ . Die Messung der Fluoreszenz-Intensität erfolgte im Tecan M200 (NanoQuant, infinite M200, Männedorf, Schweiz).

### 2.2.18 Statistische Methoden

Alle Messwerte wurden als Mittelwerte oder Standardabweichungen von Doppel-, oder Dreifachbestimmungen dargestellt. Für die Berechnung des statistischen Unterschieds wurde ein zweiseitiger „Student's t-Test“ verwendet. Dabei wurden die Werte in GraphPad Prism 5 übertragen. Repräsentiert werden die Signifikanzen als Sternchen:

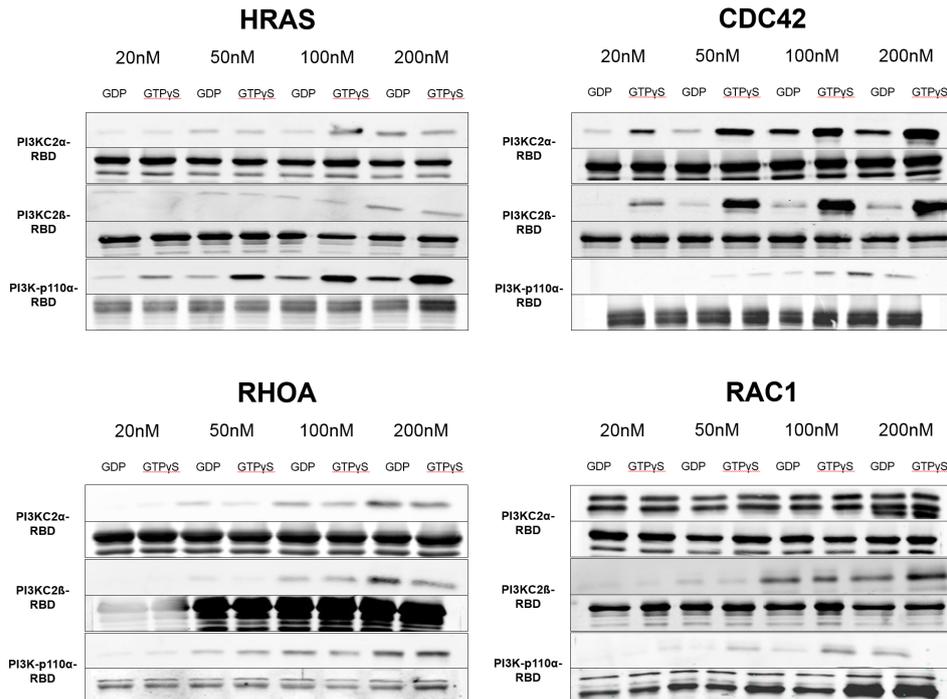
- $p > 0,05$ : nicht signifikant
- $p < 0,05$ : \*
- $p < 0,01$ : \*\*
- $p < 0,001$ : \*\*\*

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Protein-Protein-Interaktion isolierter RBDs

Um mögliche Interaktionspartner mit der RBD von Klasse II (C2 $\alpha$  und C2 $\beta$ ) zu identifizieren, wurden GST-Pulldowns durchgeführt. Dabei dienten die in *E.coli* exprimierten RBD-Proteine als Köderprotein und die immobilisierten GDP/GTP $\gamma$ S GTPasen als Beuteprotein. Nach dem die Proteinlysate aufgereinigt wurden, erfolgte der Nachweis und die Quantifizierung der Proteine über eine Coomassie-gefärbte Membran. Die Expression der GTPasen HRAS, RAC1, CDC42 und RHOA wurden ebenfalls quantifiziert. Danach wurde der GST-Teil der GTPase-Fusionsproteine abgespalten, die Proteine ankonzentriert und mit GDP oder GTP $\gamma$ S beladen.

Um zu zeigen, dass die GTPasen an die isolierte RBD der Isoformen C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  GTP $\gamma$ S-abhängig und dosisabhängig binden, wurden Proteininteraktionsstudien mit den GTPasen HRAS, CDC42, ROHA und RAC1 durchgeführt (Abb. 3.1). Dabei wurden die GTPasen mit steigender GDP/GTP $\gamma$ S Konzentration eingesetzt. Die Klasse I p110 $\alpha$ -RBD wurde als Kontrolle verwendet.



**Abb. 3.1 Proteininteraktion zwischen der RBD von PI3KC2 $\alpha$  und -C2 $\beta$  und HRAS, CDC42, RHOA und RAC1.** Nachdem die gereinigten RBD Proteine durch Coomassie quantifiziert wurden, wurde das RBD-Lysat mit GST-Beads inkubiert. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit steigender GDP/GTP $\gamma$ S-Konzentration (20, 50, 100 und 200 nM) der jeweiligen GTPase. Durch Waschvorgänge, wurden unspezifische Proteine entfernt. Klasse I p110 $\alpha$ -RBD diente als Kontrolle. Nach der Durchführung von SDS-PAGE und Western Blot erfolgte die Detektion im LI-COR Odyssey Imaging System. Die jeweilige untere Bande zeigt die GST-Bande, die als Ladekontrolle diente (Anti-GST, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland). Die Detektion von HRAS erfolgte mit Anti-Pan-RAS (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), CDC42 erfolgte mit Ant-CDC42 (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland), RHOA mit Anti-RHOA (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) und RAC1 mit Anti-RAC1(C-14) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland).

Eine GTP $\gamma$ S-Bande war zwischen p110 $\alpha$ -RBD und HRAS und zwischen RBDs von C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  und CDC42 zu erkennen, da sich hier jeweils eine stärkere Bandenintensität im Vergleich zur GDP Bande zeigte. Im Vergleich kam es zwischen den RBDs von PI3KC2 $\alpha$  und C2 $\beta$  mit HRAS zu keiner veränderten Bandenintensität. Für die Interaktion zwischen C2 $\beta$ -RBD und RAC1 wurde erst bei einer höheren Konzentrationen (200 nM) ein Unterschied in der Bandenintensität sichtbar. Zwischen C2 $\alpha$ -RBD und RAC1 wurden Doppelbanden detektiert. Bei RHOA war bei keinem der 3 isolierten RBDs eine unterschiedliche Bandenintensität zwischen GDP und GTP $\gamma$ S festzustellen. Das jeweilige untere Bild zeigt die GST-gefärbte Membran. Die RBD-Proteinkonstrukte lagen als GST-Fusionsproteine vor und somit konnte die Detektion von GST als Ladekontrolle dienen (jeweilige untere Bande Abb. 3.1).

Auf Basis der erkennbaren Interaktion zwischen C2 $\alpha$ -RBD mit CDC42-GTP $\gamma$ S wurden Mutanten der C2 $\alpha$ -RBD generiert.



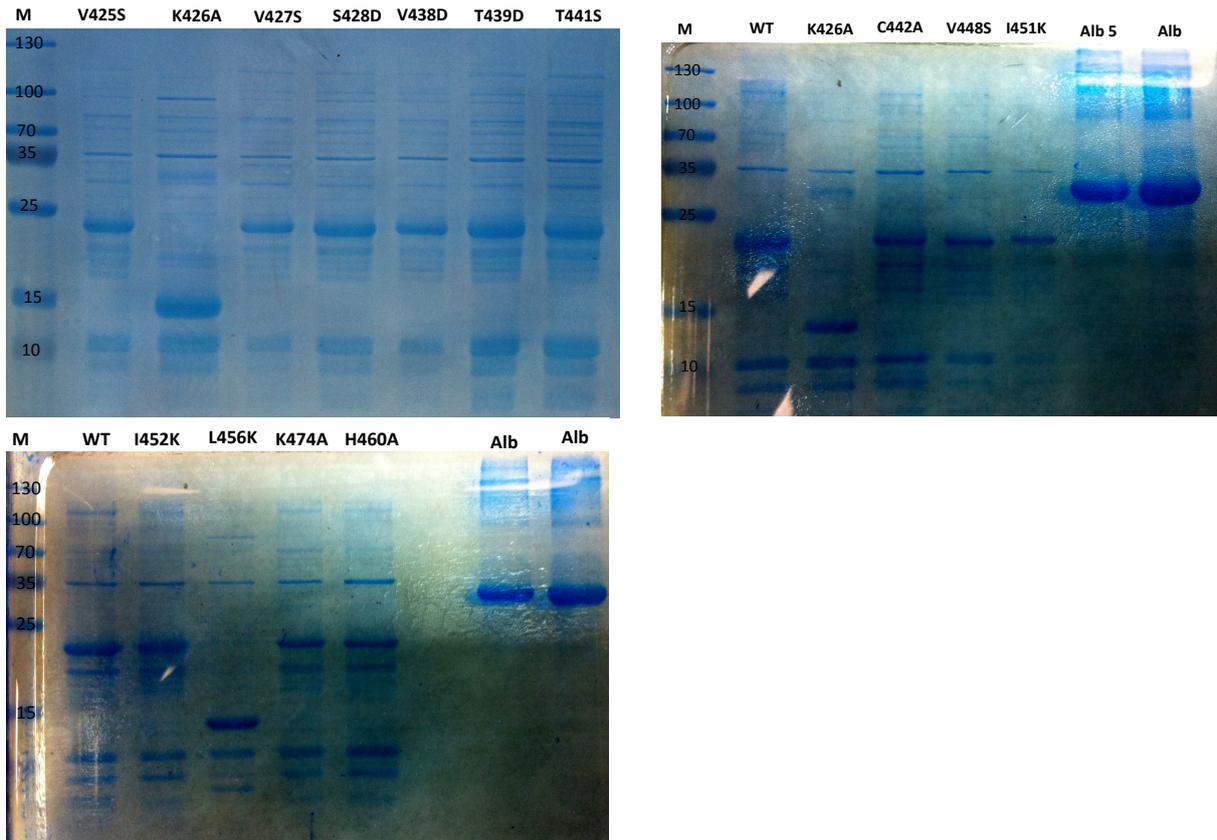
**Tab. 3.1** Abschnitt der Sequenzierungsdaten der RBD von C2 $\alpha$  im Vergleich zu den Mutanten

	DNA-Sequenz
C2 $\alpha$ -RBD M1: V425S	AATGCCAGTGTGAAG AATGCCAGTTCTGAAG
C2 $\alpha$ -RBD M2: K426A	CCAGTGTGAAGGTCT CCAGTGTGGCCGTCT
C2 $\alpha$ -RBD M3: V427S	GTGAAGGTCCTCCATT GTGAAGAGCTCCATT
C2 $\alpha$ -RBD M4: S428D	AAGGTCTCCATTGA AAGGTCGACATTGA
C2 $\alpha$ -RBD M5: V438S	AACTACCAGTTACTT AACTACCAAGTACTT
C2 $\alpha$ -RBD M6: T439D	CAGTTACTTTTACATGTGA CAGTTGATTTTACATGTGA
C2 $\alpha$ -RBD M7: T441S	CAGTTACTTTTACATGTGATGTG CAGTTACTTTTTCATGTGATGTG
C2 $\alpha$ -RBD M8: C442A	TTACTTTTACATGTGATGTGAGTT TTACTTTTACAGCTGATGTGAGTT
C2 $\alpha$ -RBD M9: V448S	TTCTACTGTAGAAATAAT TTCTACTTCAGAAATAAT
C2 $\alpha$ -RBD M10: I451K	AAATAATTATAATGCAAG AAATAAAGATAATGCAAG
C2 $\alpha$ -RBD M11: I452K	TAATTATAATGCAAGCCCTT TAATTAAAATGCAAGCCCTT
C2 $\alpha$ -RBD M12: L456K	AATAATTATAATGCAAGCCCTTTGCT AAATA-TTATAATGCAAGCCAAGTGCT
C2 $\alpha$ -RBD M13: K474A	ACATTCTGAAAAGTTTG ACATTCTGGCAGTTTG
C2 $\alpha$ -RBD M14: H460A	GCTGGGTACATGATGA GCTGGGTAGCTGATGA

Nach erfolgreicher Analyse der Sequenzen, erfolgte die Überprüfung der Expression.

### 3.2.2 Expression der RBD-Mutanten

Um die Molekülgröße der RBD Mutanten zu überprüfen wurde nach Analyse der Sequenzierung und der Expression in *E.coli* das gereinigte Protein mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt (Abb. 3.3).

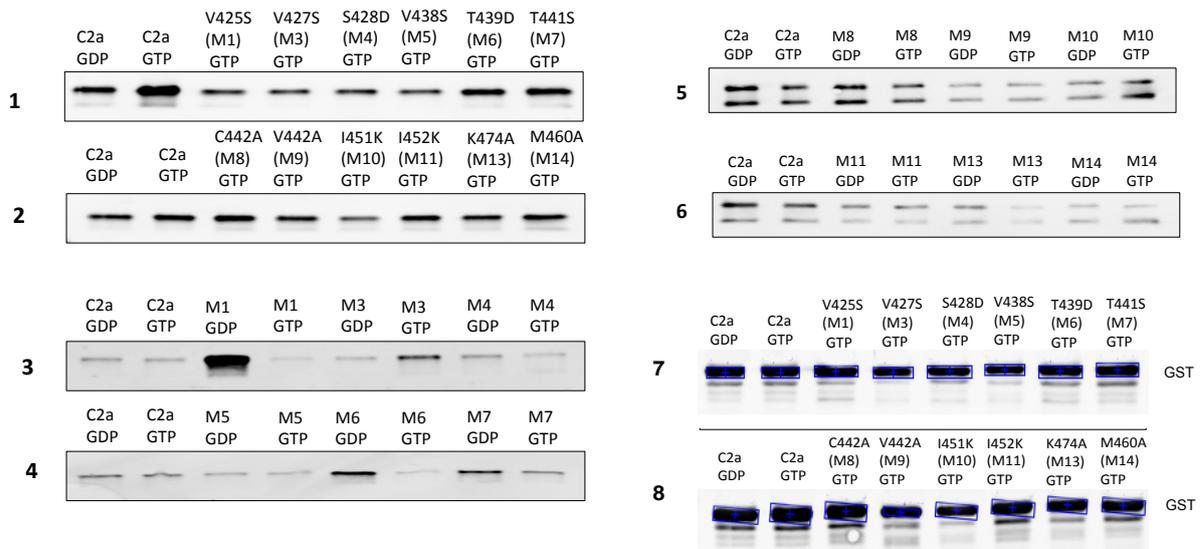


**Abb. 3.3 Überprüfung der Molekülgröße der gereinigten PI3K-C2 $\alpha$ -RBD Mutanten.** Durch die designten Primer konnte die PCR mit dem pGEX-C2 Template erfolgen. Danach erfolgte die Transformation in *E.coli*. Nach der Sequenzierung erfolgte die Proteinexpression, die durch 0,1 mM IPTG induziert wurde. Die gereinigten Lysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und das 12%ige Gel wurde mit Coomassie über Nacht gefärbt. Am Folgetag wurde das Gel entfärbt. 5  $\mu$ g und 10  $\mu$ g Albumin wurden zur Kontrolle aufgetragen. M= PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Vilnius, Litauen).

Das Expressionsprofil zeigte, dass 2 Mutanten (K426A, L456K) nicht die zu erwartenden Bande mit dem theoretischen Molekulargewicht von ca. 22 kDa hatten (Abb. 3.3). Die anderen Mutanten wiesen die erwartete Molekülgröße auf und wurden für die Interaktionsstudie mit CDC42 verwendet.

### 3.2.3 Interaktion der RBD-C2 $\alpha$ -Mutanten mit CDC42 GDP/GTP $\gamma$ S

Um RBD Mutanten zu finden die nicht mehr mit CDC42 interagieren wurde der GST-Pulldown gewählt. Dabei dienten die exprimierten C2 $\alpha$ -RBD Mutanten als Köderprotein und das immobilisierte GDP/GTP $\gamma$ S CDC42 als Beuteprotein (Abb. 3.4).



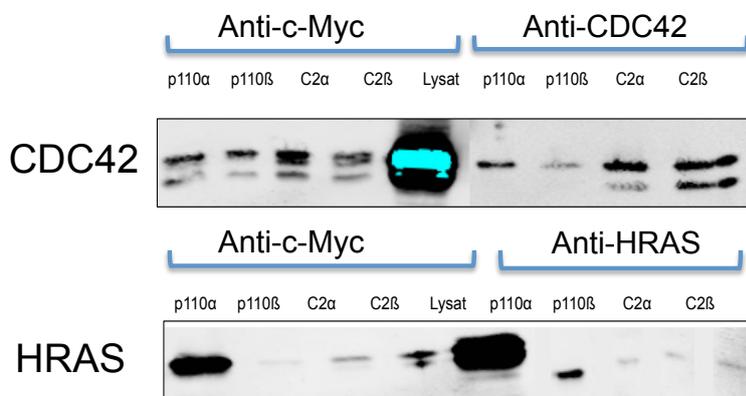
**Abb. 3.4 Proteininteraktionsidentifizierung zwischen CDC42 und RBD-C2 $\alpha$  Wildtyp und C2 $\alpha$ -RBD Mutanten.** Bei diesem Pulldown wurden GST-Beads mit dem gereinigten RBD-Lysat inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation von GDP/GTP $\gamma$ S CDC42 (50 nM). Nach der Ladung des 12%igen Gels erfolgte die SDS-PAGE und der Western Blot. Abb. 1-6 wurden mit Anti-CDC42 (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) detektiert. Die Ladekontrolle (Abb. 7/8) wurde mit Anti-GST (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) detektiert. Die Detektion erfolgte im Odyssey Imaging System.

Das Ergebnis der ersten durchgeführten Experimente (Abb. 3.4 1/2) zeigte für den Wildtyp C2 $\alpha$ -RBD eine stärkere Bandenintensität mit CDC42-GTP $\gamma$ S als bei GDP. Eine schwächere Bande mit CDC42-GTP $\gamma$ S (50 nM) konnte für die RBD-Mutanten M1, M3, M4, M5 und M10 beobachtet werden. Die anderen Mutanten zeigten vergleichbare Bandenintensitäten wie die Wildtyp C2 $\alpha$ -RBD und CDC42-GTP $\gamma$ S. Die Daten des zweiten Experiments (Abb. 3.4 3/4) zeigten keinen Unterschied mehr in der Bandenintensität zwischen Wildtyp C2 $\alpha$ -RBD und der immobilisierten GTPase CDC42. Dies zeigte sich auch für die Mutanten M4 und M5. Für die Mutanten M1, M6 und M7 zeigte sich bei diesem Experiment eine GDP-abhängige Bindung mit CDC42, während M3 eine GTP $\gamma$ S-abhängige Bindung vermittelte. Bei dem letzten durchgeführten Experiment (Abb. 3.4 5/6) wurden Doppelbanden detektiert. Auch hier wurde keine eindeutige GTP $\gamma$ S-Bande für den Wildtyp C2 $\alpha$ -RBD analysiert. Für Mutante M8 zeigte sich bei diesem Experiment eine starke Bande für CDC42-GDP, während M10 eine stärkere Bandenintensität mit CDC42-GTP $\gamma$ S zeigte. Die restlichen Mutanten M9, M11, M13 und M14 zeigten keine unterschiedlichen Bandenintensitäten mit GDP- oder GTP $\gamma$ S-CDC42. Für die Ladekontrolle der GST-Fusionsproteine diente die Detektion mit GST (Abb. 3.4 7/8). Die Ergebnisse der ersten Pulldowns (Abb. 3.4 1/2) konnten in Wiederholungen (Abb. 3.4 3/4/5/6) nicht reproduziert werden.

Um CDC42 als möglichen Interaktionspartner eindeutig festzulegen, wurden aktive Mutanten von HRAS und CDC42 für die Interaktionsstudie genutzt.

### 3.3 Proteininteraktion isolierter RBDs mit aktiven GTPasen

Der Versuch mit den Mutanten Myc-V12-CDC42 und Myc-V12-HRAS diente zur Identifizierung der Interaktion mit den RBD Proteinen von PI3KC2 $\alpha$  und C2 $\beta$ . Die mutierten GTPasen sind in der konstitutiv aktiven Form. Das Ziel war die Interaktion der RBDs mit CDC42 zu bestätigen. Dazu wurden die GTPasen in COS-7 Zellen exprimiert und danach geerntet. Die RBD-Lysate wurden bakteriell exprimiert und gereinigt. Die RBDs p110 $\alpha$  und p110 $\beta$  der PI3K Klasse I dienten als Kontrolle. Zum Vergleich wurde ebenfalls ein Pulldown durchgeführt zwischen den RBD-Proteinen, p110 $\alpha$  und p110 $\beta$  der Klasse I und C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  der Isoform der Klasse II und den immobilisierten GTPasen CDC42- und HRAS-GTP $\gamma$ S (50 nm) (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5 Pulldown zur Identifizierung von Interaktionspartnern der C2 $\alpha$ - und C2 $\beta$ -RBD.** Zuerst wurden die RBD-Lysate mit GST-Beads inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den GTPasen. Dabei wurden die ersten 4 angezeigten Banden mit denen aus COS-7 exprimierten Mutanten CDC42 und HRAS inkubiert. Dazu wurden die exprimierten GTPasen in COS-7 transfiziert und nach 48 Stunden ein Lysat hergestellt. Das Lysat zeigt die Expressionskontrolle der GTPasen, die aus den COS-7 geerntet wurden. Auf der rechten Seite des Lysats wurden die RBD-Konstrukte mit der jeweiligen GTP $\gamma$ S GTPase (50 nM) inkubiert. Die Detektion erfolgte im LI-COR Odyssey Imaging System mit Anti-HRAS (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), Myc-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) und CDC42 Antikörper (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland).

Die gezeigten Lysat-Banden dienen als Expressionskontrolle der konstitutiv aktiven Form von CDC42 und HRAS. Der Pulldown mit der Mutante CDC42 zeigt bei allen 4 RBD-Proteinlysaten eine Bande. Für p110 $\alpha$  ist bekannt, dass aktivierte RAS Proteine an die RBD binden (Rodriguez-Viviana et al., 1994, 1996). Banden wurde zwischen RBD-p110 $\alpha$ , -C2 $\alpha$  und -C2 $\beta$  mit der immobilisierten CD42-GTP $\gamma$ S (50 nM) beobachtet.

Bei der aktiven HRAS-Mutante ist eine eindeutige Bande für p110 $\alpha$ -RBD feststellbar und keine für RBD-p110 $\beta$ . Diese Befunde stimmen mit jenen aus der Literatur überein (Fritsch et al., 2013). Bei den RBD-Proteinen der PI3K Klasse II wurde eine schwache Bande der Isoform C2 $\alpha$ -RBD und eine stärkere Bandenintensität bei C2 $\beta$ -RBD mit der Mutante HRAS detektiert. Bei dem anderen durchgeführten Pulldown, bei dem die Proteinlysate bakteriell exprimiert wurden, konnte eine Bande zwischen p110 $\alpha$ -RBD und HRAS-GTP $\gamma$ S detektiert werden und keine bei den anderen drei RBD-Proteinen.

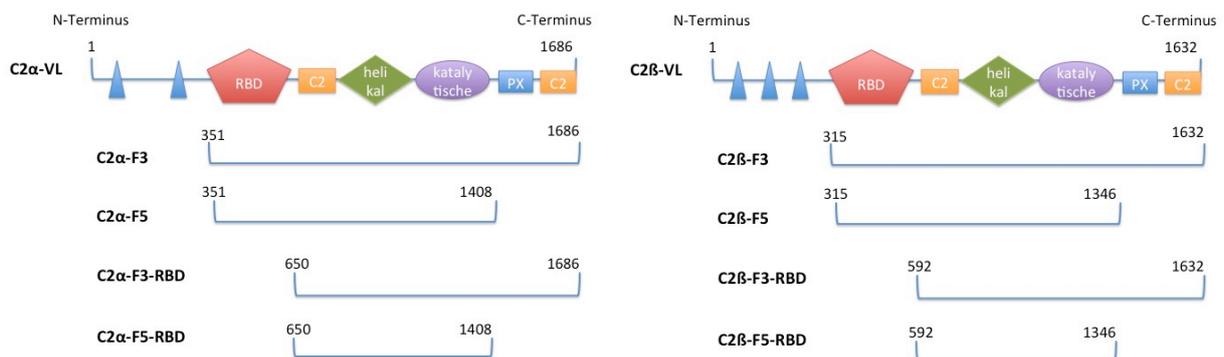
Aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit mit den isolierten RBDs von Klasse II PI3-Kinasen wurde entschieden, Proteine gesamter Länge und Fragmente der jeweiligen Isoformen zu exprimieren. Um größere Proteinfragmente exprimieren zu können, wurde in Folge mit Säugerzellen gearbeitet.

### 3.4 Konstrukte für Säugerzellen

PIK3C2A kodiert die Isoform PI3KC2 $\alpha$ . Dieses Gen ist in der Maus auf dem Chromosom 7 lokalisiert und enthält 32 kodierende Exons (insg. 34 Exons). Das Protein hat ein Molekulargewicht von ca. 190 kDa. Die kodierende Sequenz setzt sich aus 1.686 Aminosäuren zusammen auf denen sich in verschiedenen AS-Bereichen die unterschiedlichen Proteindomänen befinden. PI3KC2 $\beta$  wird von PIK3C2B kodiert und befindet sich in der Maus auf dem Chromosom 1. Die Isoform C2 $\beta$  hat ein Molekulargewicht von ca. 184 kDa und umfasst 1.632 Aminosäuren. PI3KC2G ist in der Maus auf dem Chromosom 12 lokalisiert und kodiert die Lipidkinase PI3KC2 $\gamma$ . Dieses Transkript hat 11 Exons mit einem Molekulargewicht von etwa 126 kDa. Das jeweilige DNA Fragment, das die jeweilige kodierende Sequenz enthielt, sollten in den Vektor pcDNA3.1(+) kloniert werden. Die Proteine sollten in Folge in Säugerzellen exprimiert werden.

#### 3.4.1 PCR zur Amplifikation der Konstrukte

Von der PI3K Klasse II der Isoformen C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  wurden verkürzte Fragmenten mit der Bezeichnung F3 und F5 designt. Ebenfalls wurden Konstrukte designt, bei denen die RBD fehlte (Abb. 3.5).



**Abb. 3.6 Vereinfachte Darstellung der kodierenden Proteinsequenz und den kürzeren Fragmenten, F3 und F5 von PI3KC2 $\alpha$  und -C2 $\beta$ . Dabei wurde aus genomischer DNA ab der jeweilig angegebenen Aminosäuren-Positionen amplifiziert und in dem jeweiligen Vektor (pcDNA oder PBacPak) kloniert. Bei dem Fragment F3 wurden die am N-Terminus liegenden prolin-reichen Regionen entfernt. Bei Fragment F5 wurden des weiteren zwei Proteindomänen am C-Terminus entfernt, die Phox- und C2-Domäne. Bei den letzten zwei Fragmenten wurde die RBD entfernt. (VL= Gesamtlänge Protein)**

Die jeweiligen verkürzten Fragmente F3 und F5 begannen mit Positionen, die vor der RBD liegen. Bei Fragment 3 wurde die restliche kodierende Sequenz amplifiziert, während F5 nur

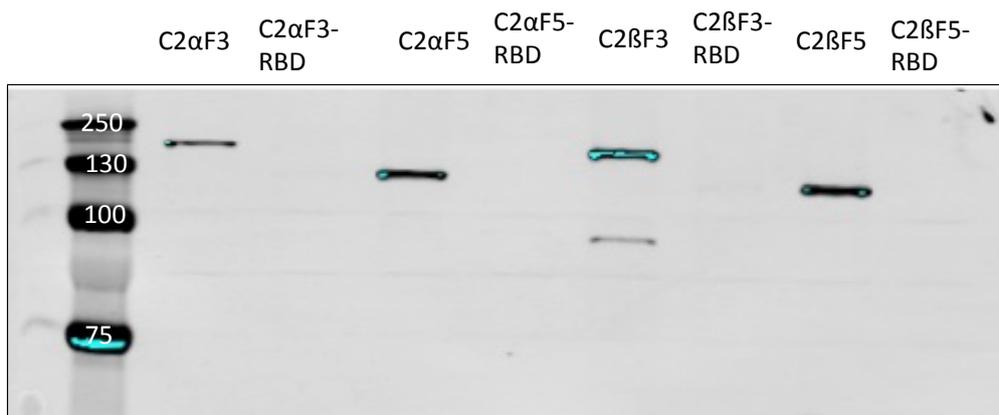
bis zum Ende der katalytischen Domäne amplifiziert wurde. Bei Fragment F3 wurden die prolin-reichen Regionen am N-Terminus entfernt. Bei Fragment F5 wurde sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus, mit der PX und C2-Domäne, gekürzt. Durch die verkürzten Fragmente, bei denen die Domänen auf der C- und/ oder N-terminalen Verlängerung entfernt wurden, könnte die Funktion im Vergleich zum Gesamtlängen-Protein untersucht werden. Des Weiteren wurden Konstrukte designt, in denen die RBD isoliert wurde. Diese Konstrukte sollten als Kontrolle für die Interaktionsstudien dienen, da die Annahme vorlag, dass durch das Entfernen der RBD die GTPasen nicht mehr mit dem PI3K Klasse II interagieren sollte. Für die jeweilige Amplifizierung der Sequenzen (siehe 2.1.4.2) wurde genomische DNA als „Template“ verwendet.

### 3.4.2 Klonierung

Nachdem die Klonierungsschritte durchgeführt wurden, konnte die DNA verdaut werden (Tab. 2.13) und das Insert mit dem Vektor ligiert werden. Danach erfolgte die Transformation in kompetente BL-21 DE3 (siehe 2.2.8.2). Im nächsten Schritt erfolgten die Plasmid-DNA-Gewinnung und die Überprüfung der Konstrukte mittels Sequenzierung (nicht dargestellt). Nach erfolgreicher Sequenzanalyse wurde das Expressionsprofil überprüft.

### 3.4.3 Expression in COS-7

Da die Experimente mit den isolierten RBDs der C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  Isoformen nicht reproduzierbare Ergebnisse geliefert hatten, wurde das Protein der Klasse II in COS-7 Zellen exprimiert. Für die Überprüfung der Expression der Fragmente F3, F5 und der entfernten RBD wurde ein Western Blot durchgeführt (Abb. 3.7).



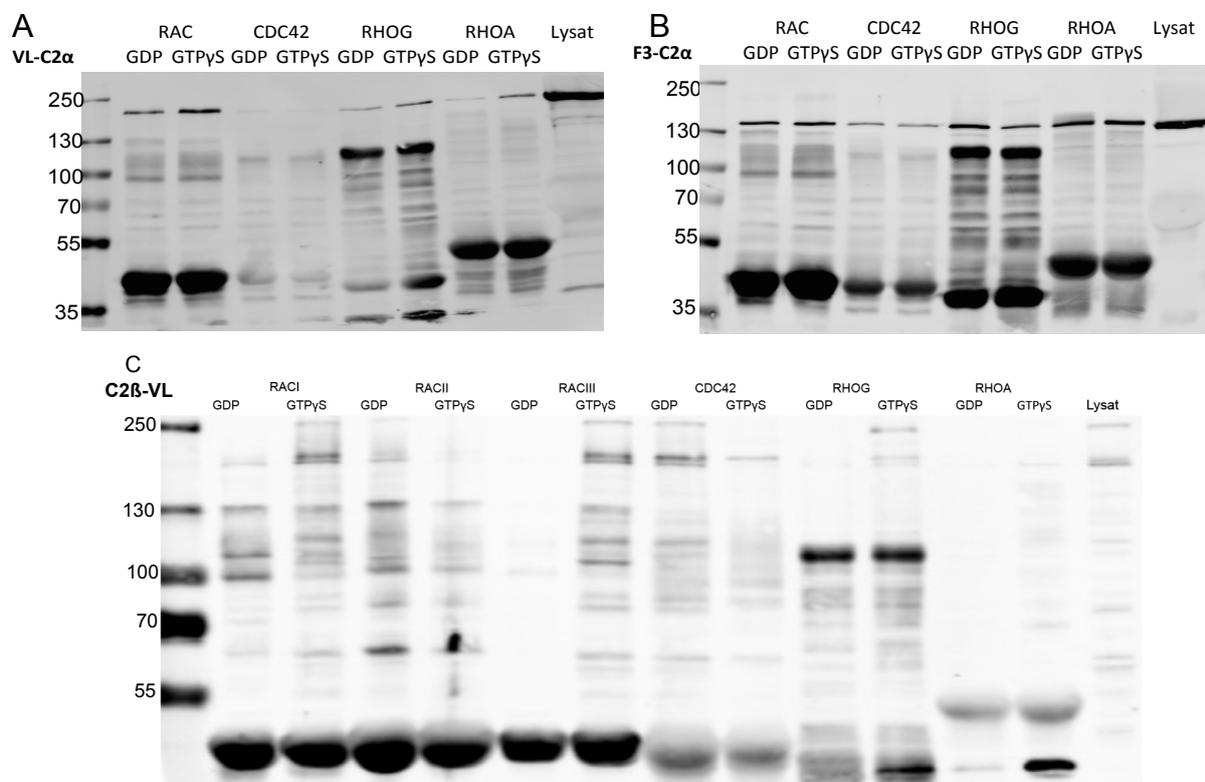
**Abb. 3.7 Analyse der Expression von verschiedenen Konstrukten der PI3KC2 $\alpha$  und -C2 $\beta$ . COS-7 Zellen wurden in einer 6 Well Platte ausgesät, transfiziert (4  $\mu$ g/ml DNA) und nach 48 Stunden geerntet. Die Lysate wurden auf ein 12%iges Gel geladen. Nach der SDS-PAGE und Western Blot erfolgte die Detektion der Fusionsproteine mit dem  $\alpha$ -Flag M2 Antikörper (Sigma-Aldrich, Steingheim, Deutschland). Dafür wurde das LICOR Odyssey Imaging System verwendet.**

Bei gleichen experimentellen Bedingungen wurden die Proteinfragmente F3 und F5 der Isoformen C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  unterschiedlich stark exprimiert. Bei den Proteinen bei denen die RBD entfernt wurde, war keine Bande zu sehen. Das Expressionsprofil zeigte, dass die

jeweiligen Fragmente mit dem theoretischen Molekulargewicht von 150 kDa für das verkürzte F3-Fragment und ca. 130 kDa für F5 exprimiert wurden.

### 3.4.4 Protein-Protein-Interaktion

In Folge wurden die PI3K-Lysate für den Pulldown Assay verwendet, um eine Interaktion zwischen Klasse II Isoformen mit GTPasen zu untersuchen. Dabei wurden zuerst die GTPasen, RAC1, CDC42, RHOG, RHOA und HRAS, die als Köderproteine dienten, mit den GSH-Agarose Beads inkubiert. In einem nächsten Schritt wurden die GTPasen entsprechend mit GDP und GTP $\gamma$ S geladen. Danach wurde die COS-7 Zelllysate der PI3KC2 $\alpha$  und dem C2 $\alpha$ -F3 Fragment, das Beuteprotein, inkubiert (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8** Nachweis der Proteininteraktion von Gesamtlänge PI3KC2 $\alpha$ , PI3KC2 $\beta$  (VL) und den Fragment C2 $\alpha$ -F3 mit verschiedenen GTPasen. Nach dem die Konstrukte und in Plasmiden kloniert wurden, erfolgte die Transfektion in COS-7. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und das Lysat hergestellt. Nachdem die Quantifizierung des Expressionsprofil erfolgte wurden die unterschiedlichen GTPasen auf den GSH-Agarose Beads gebunden. Danach erfolgt die Beladung mit GDP oder GTP $\gamma$ S (Endkonzentration von 100 mM). Als Nächstes wurden die Beads mit COS-7 Zelllysaten (100 nM) inkubiert. Danach erfolgte die SDS-PAGE und der Western Blot. Die Auswertung erfolgte mit dem LICOR Odyssey Imaging System mit dem  $\alpha$ -Flag M2 Antikörper (Sigma-Aldrich, Steingheim, Deutschland) und GST (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland).

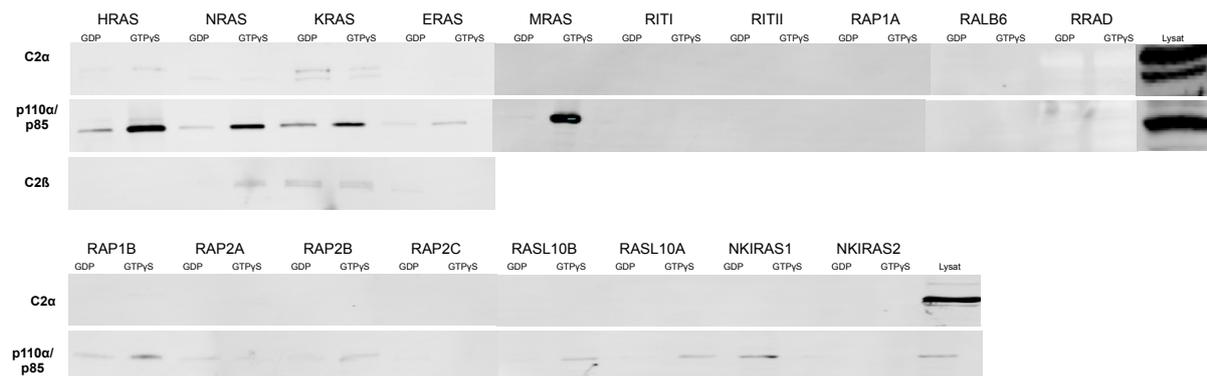
Das Protein der Gesamtlänge von PI3KC2 $\alpha$  zeigte mit RAC1, RHOG und RHOA eine stärkere Bandenintensität mit GTP $\gamma$ S im Vergleich zu den jeweiligen GDP-Banden. Mit CDC42 konnten im Vergleich keine Banden erfasst werden (Abb. 3.8 A). Die Interaktionen dieser GTPasen mit dem verkürzten Fragment F3 zeigte ein anderes Bindungsverhalten. Die Banden von C2 $\alpha$ -F3 und den GDP/GTP $\gamma$ S RAC1, CDC42 und RHOA liesen sich nicht

voneinander unterscheiden, da diese mit gleicher Bandenintensität detektiert wurden. Bei der GTPase RHOG zeigte sich bei GDP eine stärkere Bandenintensität im Vergleich zu der Bande mit GTP $\gamma$ S (Abb. 3.8 B). Für PI3KC2 $\beta$  zeigte sich mit RACI eine stärkere Bande im Vergleich zur GDP Bande. Bei der GTPase RACII zeigte sich kein Unterschied, da die GTP-Banden, die eigentlich bei 184 kDA detektiert werden sollte, keine Intensität hatten. Für RACIII kann keine Aussage getroffen werden, da die GDP Probe nur geringe Signale aufwies. Zwischen VL-C2 $\beta$  und CDC42 war der Unterschied in der Bandenintensität mit GDP im Vergleich zu CDC42-GTP $\gamma$ S klar erkennbar. Auch bei RHOG wurde keine GDP-Bande detektiert, die eigentlich beim theoretischen Molekulargewicht von 184 kDA liegen sollte. Bei RHOA wurde weder eine GDP noch eine GTP $\gamma$ S-Bande detektiert.

Als nächstes wurden Protein-Protein-Interaktionen mit Vertretern der RAS-GTPase durchgeführt.

### Kandidaten-Screen mit RAS-GTPasen

Die isolierten RBD Daten haben gezeigt, dass C2 $\alpha$ - und C2 $\beta$ -RBD nicht mit HRAS-GTP $\gamma$ S spezifisch interagierten, da sich die Bandenintensitäten zwischen GDP und GTP $\gamma$ S nicht voneinander unterschieden. Um herauszufinden, ob die PI3-Kinasen Klasse II (C2 $\alpha$  und C2 $\beta$ ) mit Vertreter der RAS-GTPase interagieren, wurde der Pulldown Assay genutzt. Dabei wurden Vertreter der RAS-GTPase, die als Köderprotein dienten, mit den GSH-Agarose Beads inkubiert. Danach erfolgte die Immobilisierung mit GDP/GTP $\gamma$ S. Die aufgereinigten HEK-293 Lysate der PI3K Klasse II, die als Beuteprotein dienten, wurden danach inkubiert. Als Kontrolle wurde die Klasse I p110 $\alpha$ /p85 Isoform (p110 $\alpha$ /p85) verwendet (Abb. 3.9).



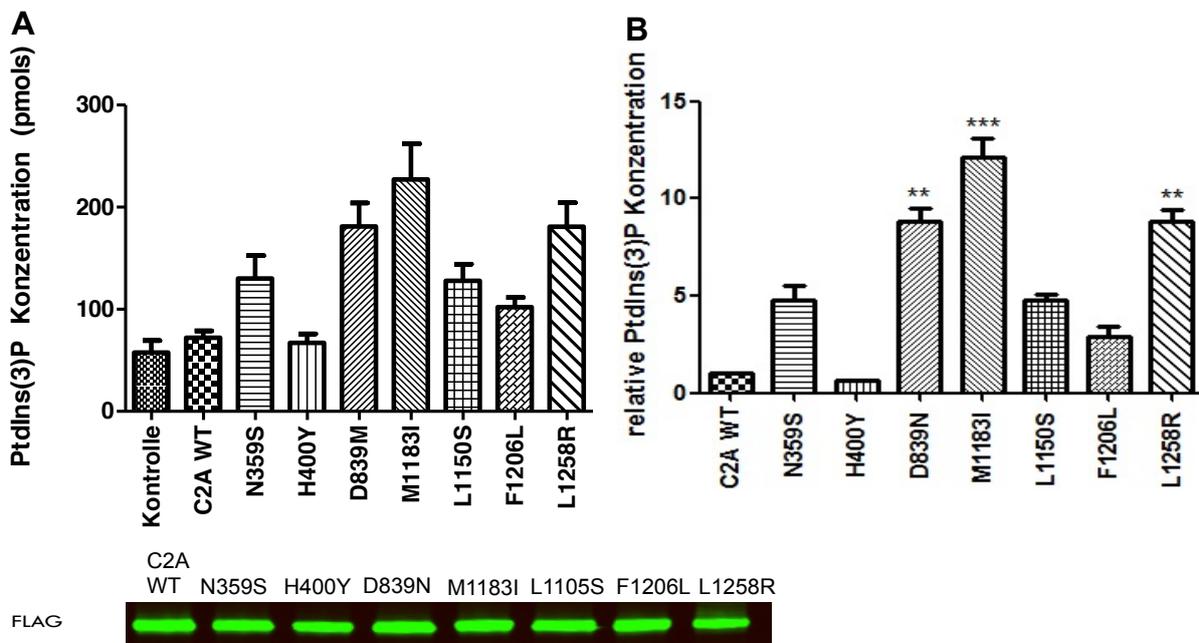
**Abb. 3.9 Protein-Protein-Interaktion von PI3KC2 $\alpha$  und -C2 $\beta$  mit Vertretern der RAS-GTPasen.** Die Konstrukte wurden in HEK-293 transfiziert, nach 48 Stunden geerntet und quantifiziert. Danach erfolgte der Pulldown Assay. Im ersten Schritt wurden die verschiedenen GTPasen (50 nM) mit den GSH-Agarose Beads inkubiert. Als Nächstes erfolgte die Beladung mit GDP/GTP $\gamma$ S und dann die Inkubation mit dem Beuteprotein (ca.10ug). Nach der SDS-PAGE und Western Blot wurden die Proteinbanden im LICOR Odyssey Imaging System mit dem Antikörper Flag M2 (Sigma-Aldrich, Steingheim, Deutschland) detektiert.

Zwischen p110 $\alpha$ /p85 und den GTPasen HRAS, NRAS, KRAS und MRAS war der Unterschied in der Bandenintensität mit GDP im Vergleich zu GTP $\gamma$ S klar erkennbar, was aus der Literatur bekannt ist (Fritsch et al., 2013). Im Vergleich zu diesem Bandenmuster,

zeigte sich für die PI3KC2 $\alpha$  keine spezifische GDP oder GTP $\gamma$ S-Banden mit den hier gezeigten GTPasen. Für PI3KC2 $\beta$  mit HRAS, NRAS, KRAS und ERAS wurden ebenfalls keine Unterschiede in der Bandenintensität aufgezeigt.

### 3.5 PtdIns(3)P Mass ELISA

Um zu untersuchen, ob die PI3-Kinase Klasse II Isoform C2 $\alpha$  onkogenes Potenzial besitzt, wurde der Mass ELISA durchgeführt. Dieser Assay wurde verwendet, um die Gesamtmenge an dem spezifischen Lipid PtdIns(3)P, die aus den Zellen extrahiert wurden, zu quantifizieren (siehe 2.2.15). Für den Assay wurden Mutanten von PI3KC2 $\alpha$  generiert, basierend auf der Information der Datenbank Cosmic. Die folgenden bereits vorhandenen Konstrukte wurden in COS-7 transfiziert: N359S, H400Y, D839N, M1183I, L1150S, F1206L und L1258R. Als Kontrolle wurde der leere pSG5 Vektor und die PI3K-C2 $\alpha$  Wildtyp genutzt. Der Western Blot zeigt das Expressionslevel der Flag-markierten Proteine (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10** Aktivitätsbestimmung von PI3K-C2 $\alpha$  Mutanten mittels PtdIns(3)P. Für den ELISA wurden COS-7 Zelllysate transfiziert und nach 48 Stunden geerntet. Der pSG5 Vektor diente als Kontrolle. Zur Kontrolle der Expression erfolgte nach der SDS PAGE und Western Blot die Detektion der Fusionsproteine mit dem  $\alpha$ -Flag M2 Antikörper (Sigma-Aldrich, Steingem, Deutschland). Die Lipidextraktion und die Durchführung des PI(3)P Mass ELISA erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Echelon Biosciences Inc, Salt Lake City, UT). Das Signal wurde bei einer Extinktion von 450 nm im Plattenlesegerät gemessen. Dabei ist das Signal proportional zur Menge an PtdIns(3)P aus den extrahierten Zellen. Zur Kontrolle der Expression wurden die verschiedenen Proteinlysate auf ein 8%iges Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE und Western Blot erfolgte die Detektion von Anti-Flag M2 im Odyssey Imaging System. A: zeigt die gemessene PtdIns(3)P Konzentration in pmol der unterschiedlich extrahierten Lipide. B: zeigt die relative Abweichung von den Mutanten zum C2 $\alpha$ -Wildtyp. Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichungen. Zur Berechnung des statistischen Unterschiedes wurde ein zweiseitiger Student's t-Test verwendet.  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*

Einen Unterschied der PtdIns(3)P Konzentration im Vergleich zur Wildtyp C2 $\alpha$  war ersichtlich. Einige dieser Mutanten wiesen einen starken Anstieg der PtdIns(3)P Konzentration auf. Einen Unterschied zeigte sich für die Mutante M1183I. Diese Mutante

fürte zu einem vielfachen Anstieg von der PtdIns(3)P-Konzentration im Vergleich zu jenen von C $\alpha$ -Wildtyp-Konstrukt. Weitere Mutanten, D839N und L1258R zeigten ebenfalls eine starke Erhöhung an der PtdIns(3)P-Konzentration. Die Mutanten N359S, H440Y, L1150S, F1206L zeigten keine signifikante Erhöhung von PtdIns(3)P im Vergleich zur C $\alpha$ -Wildtyp.

### 3.6 Herstellung Baculoviren für die Expression von Proteinen

Für die Herstellung rekombinanter Viren kloniert man die gewünschte cDNA in einen speziellen Transfektor. Dieses Konstrukt wurde gemeinsam mit der Wildtyp-Virus-DNA in die Insektzellen Sf-21 transfiziert. Größere Fragmente werden schlechter in den Vektor ligiert und mit geringerer Effizienz in Zellen aufgenommen. Es wurden nicht nur Proteine der Gesamtlänge, sondern auch die kürzeren Fragmente der PI3K Klasse II herangezogen.

#### 3.6.1 Subklonierung der Fragmente in pBacPak-His3-GST

Das Gen mit der kodierenden Sequenz (Abb. 3.5) wurde in den Vektor pBacPak-His3-GST ligiert. Danach erfolgte die Amplifizierung (Touch Down-PCR) der Fragmente (Abb. 3.5) unter Verwendung der Primer (siehe 2.1.4.3). Als Nächstes erfolgte der Restriktionsverdau der Inserts und des Vektors, um die gewünschten Restriktionsschnittstellen zu erhalten. Verdau mit: XhoI/NotI für die C2 $\alpha$ -Fragmente und Gesamtlänge PI3K-C2 $\gamma$ , KpnI/NotI für die C2 $\beta$ -Fragmente zu erhalten. Im nächsten Schritt erfolgte die Ligation mit dem dephosphorylierten Vektor, mit anschließender Transformation in BL-21 DE3. Nachdem jeweils eine Kolonie gepickt wurde, erfolgte die Plasmidpräparation im kleinen Maßstab. Nach erfolgreicher Sequenzierung (nicht dargestellt) wurde die Plasmidpräparation im größerem Maßstab durchgeführt.

#### 3.6.2 Transfektion in SF-21-Zellen

Es wurden 5 verschiedene Konstrukte pBacPak-C2 $\alpha$ , pBacPak-C2 $\alpha$ -F3, pBacPak-C2 $\alpha$ -F1266L, pBacPak-C2 $\beta$ , pBacPak-C2 $\beta$ -F3 in SF-21 transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für die Überprüfung der Genexpression verwendet (nicht dargestellt).

#### 3.6.3 Virusamplifikation

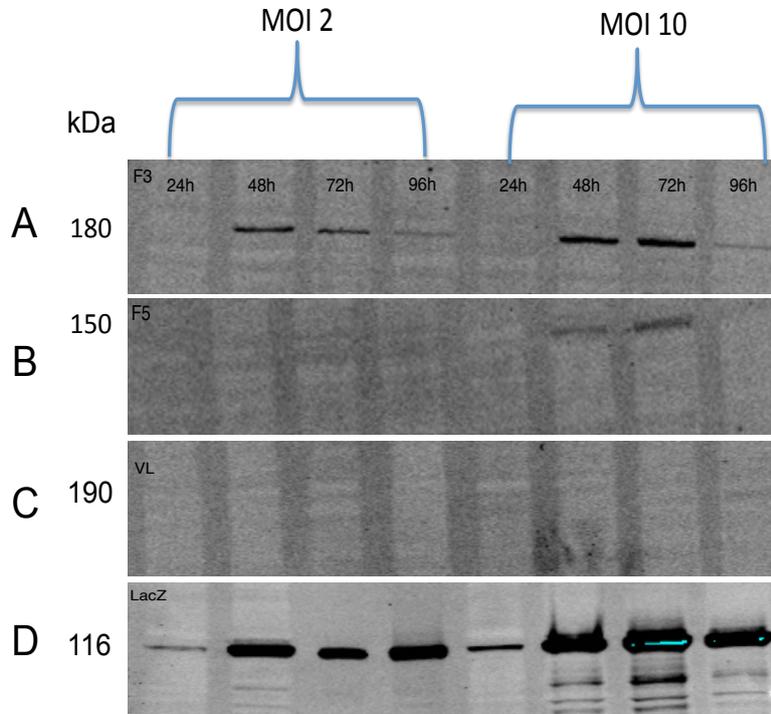
Mit Hilfe der berechneten pfu-Werte (Plaquebildende Einheit) konnte für die weitere Virusamplifikation die ml-Menge für den nächsten Virusstock berechnet werden (nicht dargestellt). Die Amplifikation erfolgte erst in einem Maßstab von 50 ml, 100 ml und 250 ml mit je  $2 \cdot 10^6$  Sf-21/ml.

#### 3.6.4 Bestimmung Virustiter

Nach der letzten Virusamplifikation (250 ml) betrug der Virustiter  $10^7$  pfu/ml. Durch die Virustiterbestimmung konnte die Infektion der Insektzellen in einem bestimmten zahlenmäßigen Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu deren Zielzellzahl, der MOI (*multiplicity of infection*), durchgeführt werden.

### 3.6.5 Proteinexpression in Hi-5-Zellen

Für die Überprüfung und Optimierung der Proteinexpression wurden  $1 \cdot 10^6$  Hi-5 Zellen mit zwei unterschiedlichen MOI (2 und 10) infiziert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten, 24, 48, 72 und 96 Stunden geerntet (Abb. 3.11).



**Abb. 3.11 Überprüfung der Proteinexpression von PI3KC2 $\alpha$ -VL, C2 $\alpha$ -F3, C2 $\alpha$ -F5 und der Kontrolle LacZ. Nach der Infektion der High-5 Schüttelkultur ( $1 \cdot 10^6$  Zellen in 10 ml) mit dem Virustiter  $10^7$  pfu/ml wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 24, 48, 72 und 96 Stunden) je 2 ml entnommen. Für die Infektion nutze man 2 verschiedene MOI Werte (2 und 10). Nachdem die Proben auf ein 8%iges Gel aufgetragen wurden, erfolgte die SDS-PAGE und der Western Blot. Die Detektion der Banden erfolgte über das LICOR Odyssey Imaging System mit dem GST-Antikörper für Gesamtlänge-PI3KC2 $\alpha$ , Fragment 3 und 5 (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland). LacZ wurde mit Anti- $\beta$ -Galactosidase (Thermo Scientific, Waltham, MA) detektiert.**

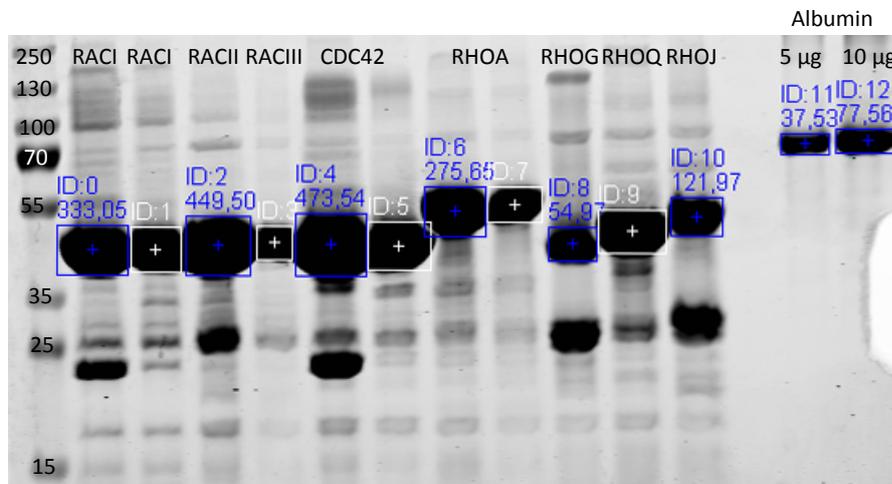
Bereits nach 48 Stunden und bei MOI=2 und 10 war eine leichte Expression der Proteinfragmente C2 $\alpha$ -F3 und -F5 zu erkennen (Abb. 3.11 A/B). Dabei zeigte sich, dass nach 72 Stunden und bei MOI=10 die stärkste Expression von F5, F3 und der Kontrolle LacZ stattgefunden hat (Abb. 3.11 A/B/D). Die Banden der Fragmente wiesen das zu erwartende theoretischen Molekulargewicht von ca. 180 kDa für C2 $\alpha$ -F3 und 150 kDa für C2 $\alpha$ -F5 auf. Beim Gesamtlänge Protein PI3KC2 $\alpha$ , das ein Molekulargewicht von 190 kDa hat, war keine Bande sichtbar (Abb. 3.11 C). Durch die Analyse zeigte sich, dass die Fragmente von C2 $\alpha$ -F3 und -F5 in diesem eukaryotischen System exprimiert wurden.

Nach dieser Expressionskontrolle wurde ein größerer Maßstab gewählt ( $1 \cdot 10^6$  Hi-5 Zellen/ml in 250 ml Medium und MOI=10), um eine größere Proteinmenge der Fragmente 3 und 5 der PI3KC2 $\alpha$  zu exprimieren. Diese Proteine wurden gereinigt (siehe 2.2.17.8), damit anschließend Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt werden konnten.

### 3.6.6 Protein-Protein-Interaktionsstudien

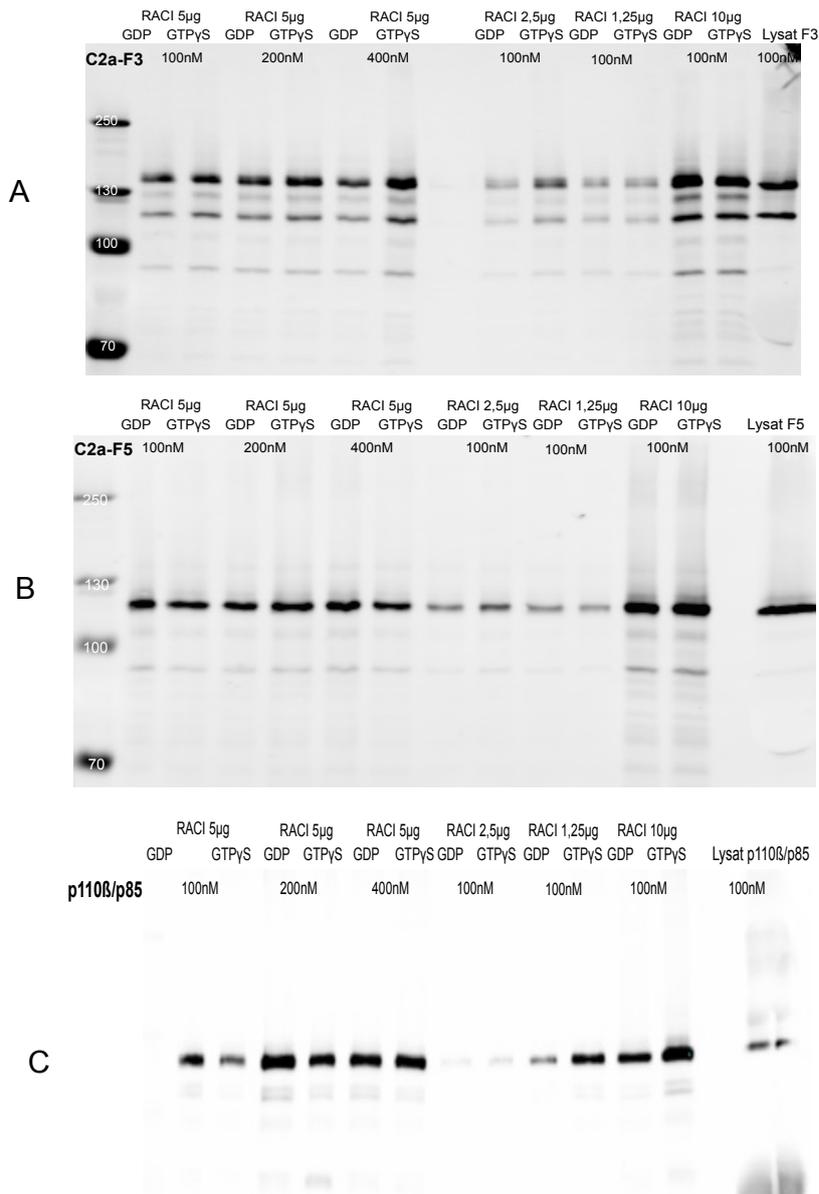
Die anschließend gereinigten Proteine C2 $\alpha$ -F3 und -F5, die in Hi-5 exprimiert wurden, wurden genutzt, um Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Vertretern der RHO/RAC/CDC42-Familie durchzuführen.

Die Quantifizierung der exprimierten, gereinigten GTPase erfolgte mit Hilfe einer Coomassie gefärbten Membran. Die Detektion des Expressionsprofils erfolgte mit dem Odyssey Imaging System (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12 Expressionsprofil zur Quantifizierung der GTPasen.** Die GTPasen wurden nach der Herstellung des jeweiligen Lysats mit GST-Beads inkubiert. Danach wurden die GTPasen mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein 12% iges Gel geladen. Über Nacht wurde das Gel mit Coomassie Blue inkubiert und am Folgetag wurde das Gel entfärbt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte im Odyssey Imaging System. Zur Kontrolle wurden 5 und 10 µg Albumin aufgetragen.

Um aussagekräftige Ergebnisse der Protein-Protein Interaktionsstudien zu erhalten, wurden verschiedene Optimierungsschritte durchgeführt. Ziel dabei war, eine spezifische Proteininteraktion mit aktivierten GTPasen und dem rekombinanten Protein zu erhalten. Dabei wurden unterschiedliche GTPasen-Konzentration und Proteinkonzentration getestet, um die Proteininteraktion deutlich nachweisbar zu machen. Dabei dienten die GTPasen als Köderprotein, die jeweils mit GDP/GTP $\gamma$ S immobilisiert wurden und das Fragment C2 $\alpha$ -F3 und -F5 als Beuteprotein. Als Kontrolle diente das rekombinante Protein p110 $\beta$ /p85 der PI3K Klasse I (Abb. 3.13).



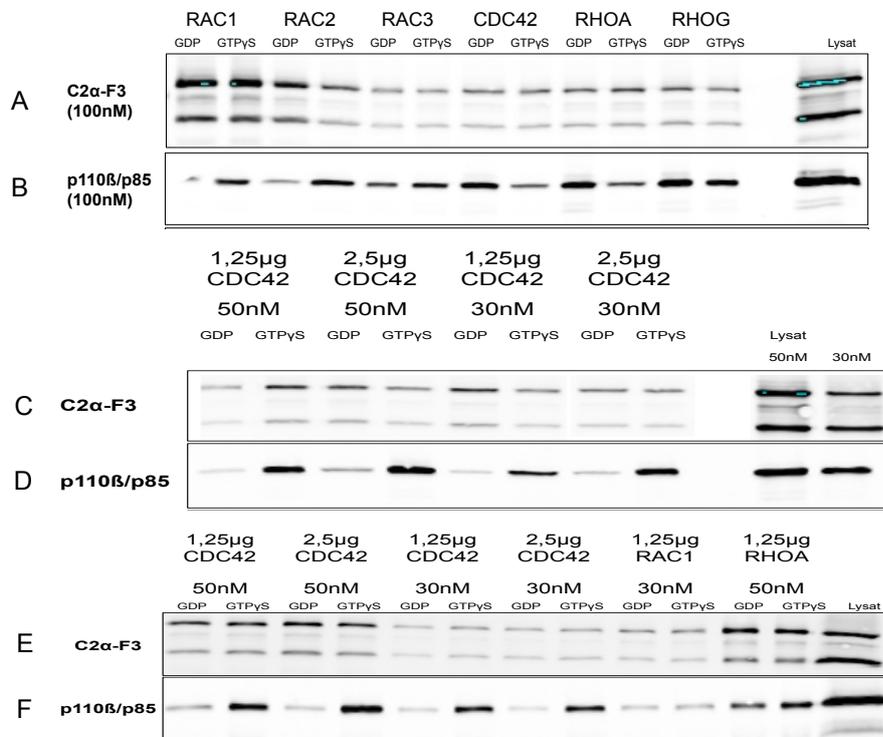
**Abb. 3.13 Optimierung der Protein-Protein-Interaktionsbedingungen.** Im ersten Schritt wurden die verschiedenen GTPasen, mit unterschiedlichen RACI Mengen (10 μg, 5 μg, 2,5 μg, 1,25 μg) mit GSH-Agarose Beads inkubiert. Als Nächstes erfolgte die Beladung mit GDP/GTPγS, dann die Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (100 nM, 200 nM, 300 nM) des PI3K-Beuteprotein (C2α-F3 und C2α-F5). Als Kontrolle wurde PI3K Klasse I p110β/p85 verwendet. Nach der Auftragung der Proben auf ein 8%iges Gel erfolgte die Durchführung von SDS-PAGE und Western Blot. Für die Detektion der Proteinbanden wurde für p110β der Anti-PI3 Kinase p110β (Rabbit mAB von Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland), für die Fragmente der Klasse II C2α und C2β der Anti-PI3-Kinase p170 Antikörper (BD Biosciences Laboratories, Heidelberg, Deutschland) genutzt.

Bei der Optimierung der Bindungen wurde die GST-markierte GTPase RACI Menge zwischen 10 μg, 5 μg, 2,5 μg und 1,25 μg mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (100 nM, 200 nM, 300 nM) von PI3KC2α-F3 bzw. -F5 inkubiert. Für alle drei rekombinanten Proteine zeigte sich bei einer RACI Menge von 5 μg und ansteigender Proteinkonzentration von 100 auf 400 nM kein Interaktionsunterschied zwischen der GDP und GTPγS abhängigen Bindung (Abb. 3.13 A/B/C). Erst als die RACI Menge reduziert wurde, konnte ein Unterschied zwischen der GDP/GTPγS Bindung beobachtet werden. Dieser Befund zeigte

sich für die Fragmente C2 $\alpha$ -F3 und -F5 bei einer Konzentration von 100nM und einer RAC1 Menge von 2,5  $\mu$ g (Abb. 3.13 A/B). Als die RAC1 Menge auf 1,25  $\mu$ g reduziert wurde, konnte keine spezifische GTP $\gamma$ S-abhängige Bindung mit C2 $\alpha$ -F3 und -F5 detektiert werden. Dies zeigte sich auch bei einer erhöhten RAC1 Menge (10  $\mu$ g) (Abb. 3.13 A/B).

Die Optimierung für p110 $\beta$ /p85 (100 nM) mit 1,25  $\mu$ g RAC1 zeigte den deutlichsten Unterschied zwischen der GDP und GTP Bindung. Auch bei einer RAC1 Menge von 10  $\mu$ g konnte eine GTP $\gamma$ S-abhängige Bindung beobachtet werden (Abb. 3.13 C).

Aus den Daten zeigte sich, dass die Proteinkonzentration von den PI3-Kinasen weiter reduziert werden musste. Daher wurden weitere Optimierungen durchgeführt, bei denen die Proteinkonzentration des Beuteproteins von 30, 50 und 100 nM variierten (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14 Interaktionsexperimente mit Klasse II Isoform PI3KC2 $\alpha$ -F3 mit RAC1, CDC42, RHOA und RHOG.** Zuerst wurden zuerst die GTPasen, RAC1, CDC42, RHOG, RHOA, die als Köderproteine dienten, mit den GSH-Beads inkubiert und danach entsprechend mit GDP und GTP $\gamma$ S geladen. Danach wurden die Beuteproteine, C2 $\alpha$ -F3 und p110 $\beta$ /p85 inkubiert. Die Proben wurden auf ein 8%iges Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und der Western Blot durchgeführt. Danach erfolgte die Detektion der Proteinbanden im Odyssey System mit den Antikörpern für p110 $\beta$  der Anti-PI3 Kinase p110 $\beta$  (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) und für F3 der Klasse II C2 $\alpha$  Anti-PI3-Kinase p170 Antikörper (BD Biosciences Laboratories, Heidelberg, Deutschland).

Für die Kontrolle p110 $\beta$ /p85 der Klasse I PI3K zeigte sich eine RAC1- und CDC42- GTP $\gamma$ S-abhängige Bindung, welche aus der Literatur bekannt ist (Fritsch et al., 2013). Der Unterschied in der Bandenintensität mit GTP war im Vergleich zu jenen mit GDP klar erkennbar (Abb 3.14 B/D).

Bei der ersten durchgeführten Interaktionsstudie zwischen C2 $\alpha$ -F3 (100 nM) und CDC42 konnte keine GTP $\gamma$ S-abhängige Bindung detektiert werden. Ebenfalls zeigte sich mit den

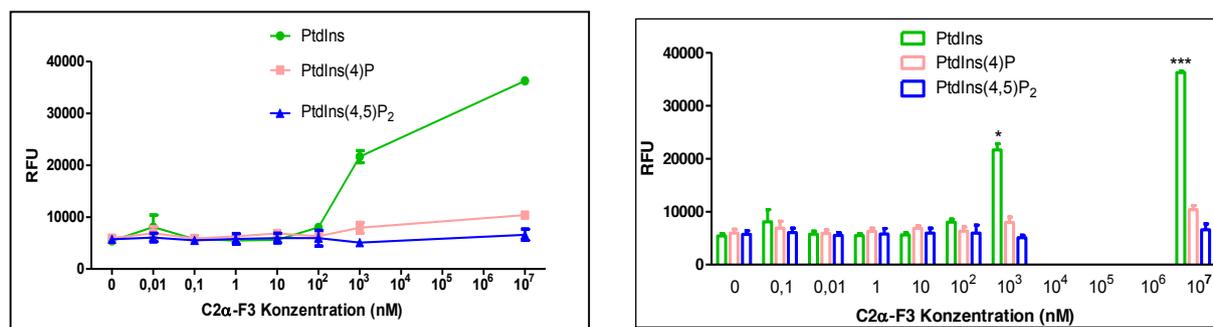
andern GTPasen RAC1, RAC2 und RHOG keine GTPγS-abhängige Bindung, da sich die Intensität der Banden nicht voneinander unterschieden (Abb. 3.14 A). Bei der Wechselwirkung von C2α-F3 mit RHOA war ein leichter Unterschied in der Bandenintensität mit GDP und GTPγS erkennbar (Abb. 3.14 A). Die Interaktion von F3 mit CDC42 war inkonsistent. Bei einer 1,25 μg CDC42-Menge und einer F3 Konzentration von 50 nM wurde eine stärkere Bandenintensität mit GTPγS detektiert (Abb. 3.14 C). Beim dritten Experiment zeigte sich bei den selben experimentellen Bedingungen kein Unterschied zwischen der Bandenintensität von CDC42-GDP und -GTPγS (Abb. 3.14 E).

Die Kontrolle mit p110β/p85 konnte im Vergleich zum C2α Fragment-3 in allen drei durchgeführten Experimenten reproduziert werden. Für Klasse II C2α-F3 waren die Ergebnisse nicht produzierbar, da drei unabhängig durchgeführte Experimente zu drei unterschiedlichen Bindungsverhalten führten.

Als nächstes erfolgte der Nachweis der Proteinaktivität von C2α-F3.

### 3.6.7 Messung der Proteinaktivität

Der Nachweise der Proteinaktivität von C2α-F3 erfolgte *in vitro* durch den Transcreener ADP<sup>2</sup> FI Assay (siehe 2.2.17.10). Im Assay wurden 3 verschiedene ATP-Lipide angeboten, PtdIns, PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Durch die enzymatische Aktivität von C2α-F3 wurde das Lipid z.B. PtdIns zu PtdIns(3)P phosphoryliert, das dabei freierwerdende ADP konnte detektiert werden. Die ADP-Bildung ist dabei proportional zur Zunahme der Fluoreszenz Intensität (Abb. 3.15).



**Abb. 3.15 Transcreener ADP<sup>2</sup> FI Assay für Klasse II PI3K C2α-F3.** Das Fragment C2α-F3 wurde mit 3 verschiedene ATP-Lipiden (jeweils 75μM) PtdIns, PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in einer 96 Well Platte inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Stop-Detektion-Puffer gestoppt. Durch die enzymatische Aktivität von C2α-F3 wurde das Lipid an der 3. Position des Inositolrings z.B. von dem Substrat PtdIns zu PtdIns(3)P phosphoryliert, das dabei freierwerdende ADP konnte detektiert werden. Dabei ist die ADP-Bildung proportional zur Zunahme der Fluoreszenz Intensität. Die Detektion der Platte im Tecan M200 erfolgte bei einer Extinktion von 585 nm, Emission 627 nm, 25 Blitze und 25 μs Integrationszeit. Auf der x-Achse wurden die Proteinkonzentrationen von 0 bis 10<sup>7</sup> nM und auf der y-Achse wurden die gemessenen RFU (relative fluorescence units) aufgetragen. Die zweite Abbildung zeigt die relative Abweichung von den Proteinkonzentrationen zur 0 nM Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Zur Berechnung des statistischen Unterschiedes wurde ein zweiseitiger Student's t-Test verwendet. p<0,05: \*; p<0,001: \*\*\*

Für das rekombinante Protein C2α-F3 zeigte sich ein messbarer Umsatz an PtdIns im Vergleich zu den anderen angebotenen Substraten PtdIns(4) und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Bei einer

Proteinkonzentration von 1000 nM konnte ein signifikanter Anstieg an der Umsetzung von PtdIns beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigte es bei der Substratumsetzung von PtdIns(4)P kein signifikanter Anstieg des Umsatzes. Als Kontrolle wurde noch die PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> als Substrat angeboten, welches von C2 $\alpha$ -F3 nicht als Substrat umgesetzt wurde.

## 4. Diskussion

Die drei Isoformen der Klasse II PI3K sind monomere Lipidkinasen. Strukturell liegt bei diesen Enzymen keine regulatorische Domäne vor. Daher wird vermutet, dass die RBD bei der Aktivierung und Funktion der drei Isoformen der Klasse II PI3K eine entscheidende Rolle einnimmt. Für Klasse I PI3K wurde gezeigt, dass aktivierte GTP-gebundene monomere GTPasen der RAS- und RHO-Familien Isoform-spezifisch an die RBDs binden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Lipidkinaseaktivität der Klasse I co-reguliert wird (Fritsch et al., 2013).

Um die molekulare Regulation der Lipidkinase mit den Isoformen PI3KC2 $\alpha$ , PI3KC2 $\beta$  und PI3KC2 $\gamma$  besser verstehen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Protein-Protein-Interaktionsstudien mit verschiedenen GTPasen der RAS und RHO-Familie durchgeführt. Dazu wurden Pulldown-Experimente durchgeführt. Dabei fungiert ein Protein als Köderprotein. Kommt es zu einer Interaktion, kann das zweite Protein, als Beuteprotein bezeichnet, mit dem Köderprotein interagieren und wird durch die verschiedenen Waschschriffe nicht entfernt. Der Nachweis der Interaktion erfolgt nach der SDS-PAGE und Western Blot mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Die Detektion der Banden geben einen Hinweis darauf, ob eine Interaktion stattgefunden hat. Als Folge der Ergebnisse lassen sich qualitative Aussagen treffen, ob die Proteine miteinander interagieren.

### 4.1 Konstrukte

In dieser Arbeit wurden verschiedene Konstrukte und Expressions-Systeme verwendet. Die isolierten RBDs wurden als erstes verwendet. Die bakteriellen Protein-Expressions-Systeme sind im Vergleich zu anderen Expressions-Systemen bei der Kultivierung unkompliziert. Aufgrund der inkonsistenten Ergebnisse der RBD mit GTPasen wurde zu anderen Expressions-Systemen gewechselt. Um eine größere Menge an rekombinanten PI3K Klasse II Proteinen zu erhalten, wurde auf die Expression in Insektenzellen umgestiegen. Bis die rekombinanten Proteine hergestellt waren, wurde in der Zwischenzeit mit dem Mammalia Expressions-System gearbeitet. Da von Anfang an nicht klar war, wie stark die PI3-Kinase Klasse II Proteine in den anderen Expressionssystemen exprimiert werden, wurden verschiedene Konstrukte generiert. Die Fragmente F3 und F5 von den Isoformen PI3KC2 $\alpha$

und -C2 $\beta$ . Bei beiden Fragmenten wurde die N-terminale Verlängerung mit den prolinreichen Bereichen entfernt. Bei F5 wurden die C-terminalen Domänen PX und C2 ebenfalls entfernt. Durch die verkürzten Fragmente, bei denen die Domänen auf der C- und/oder N-terminalen Verlängerung entfernt wurden, konnte die Funktion dieser Domänen im Vergleich zum Gesamtlänge-Protein untersucht werden. Es wurden ebenfalls Proteinkonstrukte designt, bei denen die RBD entfernt wurde. Die Überlegung war, dass das Protein als negativ Kontrolle bei den Protein-Protein-Interaktionsstudien dienen sollte. Laut Hypothese sollten die GTPasen aufgrund der Entfernung von der RBD nicht mehr mit der Lipidkinase interagieren. Jedoch zeigten sich bei der Expressionsüberprüfung der Proteinkonstrukte in COS-7, bei denen die RBD entfernt wurde, nach SDS-Page und Western Blot keine Banden (Abb. 3.7). Möglicherweise war das Protein zu instabil, um in den Säugerzellen COS-7 exprimiert zu werden. Eine Alternative wäre diese Konstrukte über das Baculoviren-basierte Expressionsystems herzustellen. Nachdem das Protein PI3KC2 $\alpha$  nicht in Insektenzellen exprimiert wurde (Abb. 3.11 C), wurde die gesamte Sequenz sequenziert (nicht dargestellt). Obwohl die Sequenzanalyse der pBacPak-PI3KC2 $\alpha$  Isoform keine Fehler aufzeigte und ein hoher Virustiter ( $10^7$  pfu/ml) erreicht wurde, konnte das Protein nicht in den Insektenzellen nachgewiesen werden. Möglicherweise hatte die Co-Transfektion nicht funktioniert. Die Proteine bei denen die RBD isoliert wurde, die PI3KC2 $\alpha$  und -C2 $\beta$  Proteine die in Säugerzellen exprimiert wurden und das C2 $\alpha$ -F3 Protein das in Insektenzellen exprimiert wurde, wurden für die Protein-Protein-Interaktion mit verschiedenen Vertretern der RAS- und RHOA-GTPasen genutzt.

## 4.2 Protein-Protein-Interaktionen

Der *in vitro* GST-Pulldown Assays dienten in dieser Arbeit dazu, mögliche Interaktionspartner von Klasse II PI3-Kinasen zu identifizieren. Bei diesen Interaktionsstudien wurden zwei verschiedene Pulldown Assays verwendet. Bei den isolierten RBD-Pulldowns wurden die RBD Proteinlysate aus Bakterien gewonnen. Dabei fungierte die isolierte RBD von Klasse II Isoformen (C2 $\alpha$ - und C2 $\beta$ -RBD) als Köderprotein und die immobilisierte GDP/GTP $\gamma$ S geladene GTPase als Beuteprotein. Bei dem anderen Assay, bei dem die Proteine (PI3KC2 $\alpha$  und -C2 $\beta$ ) in Säugerzellen oder in Insektenzellen (C2 $\alpha$ -F3) exprimiert wurden, fungierte die GTPase als Köderprotein und das PI3-Kinase-Lysat als Beuteprotein. Interagieren die Proteine miteinander, konnte Protein-Protein-Interaktion mittels Antikörper nachgewiesen werden.

### 4.2.1 Interaktion mit RAS-GTPasen

Bei den isolierten RBD-Proteinen wurde die Interaktion mit HRAS untersucht (Abb. 3.1). Im Vergleich zur Kontrolle p110 $\alpha$  der Klasse I PI3K lag für die isolierte C2 $\alpha$  und C2 $\beta$ -RBD weder eine GTP $\gamma$ S noch eine GDP Bindung vor. Bei der Interaktion mit der konstitutiv aktiven

Mutante HRAS konnte eine eindeutige Interaktion mit der RBD-p110 $\alpha$  gezeigt werden. Dies bestätigte auch das Ergebnis mit der immobilisierten GTP $\gamma$ S HRAS (50 nM) (Abb. 3.5). Die Wechselwirkung von C2 $\beta$ -RBD mit der konstitutiv aktiven HRAS zeigte eine wesentlich schwächere Bande. Die beiden anderen RBD-Proteine C2 $\alpha$  und p110 $\beta$  interagierten nicht mit der konstitutiv aktiven HRAS (Abb. 3.5). Dass keine spezifische Interaktion mit HRAS vorliegt, konnte durch die exprimierten Proteinlysate von PI3KC2 $\alpha$  und -C2 $\beta$  bestätigt werden. Ebenfalls wurde bei weiteren Vertretern der RAS-GTPasen keine spezifische Interaktion beobachtet (Abb. 3.9). Zur Kontrolle wurde das Heterodimer p110 $\alpha$ /p85 verwendet. Im Gegensatz zu PI3K Klasse II Isoformen C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  konnten aus der Literatur bekannte Interaktionen von p110 $\alpha$  mit HRAS, NRAS, KRAS und MRAS bestätigt werden (Fitsch et al., 2013). Aus diesem Befund heraus könnte man schlussfolgern, dass die Isoformen C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  nicht von RAS reguliert werden. Diese Erkenntnis wurde für Klasse I p110 $\beta$  schon gezeigt, da diese von RAC1, CDC42 und von einigen Vertretern der RAS-GTPasen (z.B. DIRAS1 und DIRAS2) reguliert wird (Fritsch et al., 2013).

#### 4.2.2 Interaktion mit CDC42

Bei der Interaktion mit CDC42, die zur RHO-Familie gehört, wurde bei den isolierten RBD von C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  eine GTP $\gamma$ S-abhängige und dosis-abhängige Bindung beobachtet, da sich hier die Bandenintensität mit GTP im Vergleich zu jenen mit GDP klar unterschieden (Abb. 3.1). Im Vergleich interagierte p110 $\alpha$ -RBD nicht mit CDC42. Dies ist aus verschiedenen Studien bekannt (Rodriguez-Viviana et al., 1994, 1996). Die Experimente mit der konstitutiv aktiven GTPase CDC42 zeigte eine Interaktion der isolierten RBDs von p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  (Abb. 3.5). Für p110 $\alpha$  ist bekannt, dass aktivierte RAS Proteine an die RBD binden. Daher sollte eigentlich keine Bande mit CDC42 beobachtet werden (Rodriguez-Viviana et al., 1994, 1996). Möglicherweise war die Expression der hyperaktive Mutante CDC42 zu stark, so dass eine nicht spezifische Bindung detektiert wurde. Bei dem Pulldown mit CDC42-GTP $\gamma$ S (50 nM) kam es möglicherweise zur Verwechslung der p110 $\alpha$  und p110 $\beta$  Probe, daher konnte evtl. für p110 $\beta$ -RBD keine Interaktion nachgewiesen werden.

Bei mehrmaligen Wiederholungen der Protein-Protein-Wechselwirkung konnte die Interaktion von C2 $\alpha$ -RBD nicht reproduziert werden (Abb. 3.4). Dieses Problem lag sowohl bei den Säuger exprimierten PI3KC2 $\alpha$ -Lysaten als auch bei den hergestellten C2 $\alpha$ -F3 Protein vor. Die aus den COS-7 isolierten PI3K Proteine zeigen mit CDC42 keine Interaktion. Weitere Interaktionsstudien mit CDC42 und diesen Lysaten führte zu variablen Ergebnissen (nicht dargestellt). Dies zeigte sich auch bei dem rekombinanten C2 $\alpha$ -F3 Protein, das in Insektenzellen exprimiert wurde. Durch Optimierung gelang es qualitative Daten der Kontrolle, Klasse I p110 $\beta$ /p85, zu erhalten (Abb. 3.14 D/F). Verschiedene Optimierungen führten nicht zu aussagekräftigen Interaktionen der Klasse II PI3KC2 $\alpha$ -F3. Die

Wechselwirkung von C2 $\alpha$ -F3 mit CDC42 zeigte bei drei unabhängig durchgeführten Experimenten variable Ergebnisse. Insofern kann keine GTP $\gamma$ S-spezifische Interaktion bestätigt werden. Mal lag eine GTP-abhängige Bindung vor, beim nächsten Versuch eine GDP-abhängige Bindung, bei dem dritten Versuch sah man gar keine unterschiedliche Bandenintensität mehr (Abb. 3.14 A/C/E). CDC42 scheint ein vielversprechender Bindungskandidat für PI3KC2 $\alpha$  und -C2 $\beta$  zu sein. Daher ist es notwendig im weiteren Verlauf optimale Bedingungen für die Interaktion zu schaffen.

#### 4.2.3 Interaktion mit RHOA

Die Ergebnisse der isolierten RBD von C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  zeigte mit aufsteigender RHOA Konzentration keine GTP $\gamma$ S-abhängige Bindung (Abb. 3.1). Möglicherweise ist die Bindung nicht GTP-abhängig. Der Vergleich zwischen den Proteinlysaten der Gesamtlänge PI3KC2 $\alpha$  und der verkürzten Variante C2 $\alpha$ -F3, die aus den COS-7 isoliert wurden, zeigten unterschiedliche Proteinbindungsverhältnisse mit RHOA (Abb. 3.8 A/B). Bei der Gesamtlänge C2 $\alpha$  kann möglicherweise eine Interaktion vorliegen, da die Bandenintensität von RHOA-GTP $\gamma$ S wesentlich stärker als im Vergleich zu RHOA-GDP erschienen. Stattdessen zeigte das Fragment 3 der C2 $\alpha$ -Isoform mit RHOA keine spezifische Bindung, da sowohl unter GDP als auch GTP-Bindungen die Bandenintensitäten gleich stark waren. Das unterschiedliche Bindungsverhalten von PI3KC2 $\alpha$  und dem Fragment C2 $\alpha$ -F3 könnte vielleicht auf die entfernten N-terminalen Domänen zurückzuführen sein. Möglicherweise sind die an der N-terminalen Verlängerung notwendigen prolinreichen-Regionen, die bei F3 entfernt wurden, notwendig, um die Protein-Protein-Interaktion zu vermitteln (Vanhaesebroeck et al., 2010). Für das aus den Insektenzellen exprimierte Fragment C2 $\alpha$ -F3 kann keine Aussage getroffen werden, da sich die Bandenintensitäten nicht voneinander unterschieden (Abb. 3.14 A/E). Im Vergleich dazu zeigte das Kontrollprotein p110 $\beta$ /p85 eine RHOA-GDP-abhängige Bindung, da die Bandenintensität im Vergleich zur GTP $\gamma$ S-Bande stärker erscheint (Abb. 3.14 B). Es liegt nahe, dass die GDP und GTP Proben beim auftragen auf das Gel vertauscht wurden, da aus der Literatur bekannt ist, dass p110 $\beta$ /p85 eine GTP-abhängige Bindung mit RHOA eingeht (Fritsch et al., 2013). Dieser Befund konnte bei einem weiteren Experiment bestätigt werden (Abb. 3.14 F). Für PI3KC2 $\beta$  mit RHOA wurde weder eine GDP noch eine GTP $\gamma$ S-Bande detektiert. Wahrscheinlich war das die Expression des Lysats zu schwach, so dass das Beuteprotein nicht mit der GTPase RHOA interagieren konnte (Abb. 3.8 C).

#### 4.2.4 Interaktion mit RAC1

Die Ergebnisse der isolierten RBD von C2 $\alpha$  und C2 $\beta$  mit RAC1 sind im Gegensatz zur Interaktion mit CDC42 nicht vergleichbar. Für C2 $\beta$  konnte erst bei einer höheren RAC1-Konzentration (200 nM) eine GTP-abhängige Bindung beobachtet werden (Abb. 3.1). Jedoch

könnte dies auch eine unspezifische Bindung sein. Bei der isolierten RBD-C2 $\alpha$  kann keine Aussage getroffen werden, da Doppelbanden vorlagen und unklar blieb, auf welcher Höhe welches Protein detektiert wurde. Der Vergleich zwischen den rekombinanten Proteinlysaten der Gesamtlänge PI3KC2 $\alpha$  und der verkürzten Variante C2 $\alpha$ -F3, die aus COS-7 Zellen isoliert wurden, zeigten variable Ergebnisse (Abb. 3.8 A/B). Während für PI3KC2 $\alpha$  eine Interaktion mit RAC1 zu sehen war, kann bei dem verkürzten Fragment F3 keine eindeutige Aussage getroffen werden, da die Intensitätsstärke der Banden keinen Unterschied zeigten. Bei PI3KC2 $\beta$  könnte vielleicht mit RAC1 eine spezifische Interaktion vorliegen, da die GTP $\gamma$ S-Bande eine stärkere Intensität als im Vergleich zur GDP-Bande zeigte (Abb. 3.8 C). Das Proteinfragment C2 $\alpha$ -F3, das in den Hi-5 Zellen exprimiert wurde, zeigte bei den experimentellen Bedingungen von einer RAC1 Menge 2,5 $\mu$ g und einer F3 Konzentration von 100 nM, bei der Interaktion mit RAC1 eine spezifische GTP $\gamma$ S-abhängige Bindung (Abb. 3.13 A). In weiteren Versuchen lag keine spezifische Bindung mehr vor (Abb. 3.14. A/C). Dies zeigte sich auch für das Kontrollprotein p110 $\beta$ /p85. Zuerst lag eine GTP-abhängige Bindung vor, was aus der Literatur bekannt ist (Fritsch et al., 2013) (Abb. 3.14 B/C). Im weiteren Verlauf konnte dies nicht reproduziert werden, da keine unterschiedliche Bandenintensität zwischen der GDP- und GTP $\gamma$ S-Bande detektiert wurde (Abb. 3.14 F). Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch das Auftauen und Einfrieren die GTPase Aktivität zerstört wurde.

#### 4.2.5 C2 $\alpha$ -RBD Mutanten mit CDC42

Über die „site-directed mutagenesis“ wurden Mutanten der C2 $\alpha$ -RBD generiert, die durch eine Punktmutation in der RBD verändert wurden, so dass ein intaktes Protein produziert wurde, aber die GTPase CDC42 nicht mehr binden kann. Als Folge sollte die C2 $\alpha$ -RBD nicht mehr co-aktiviert werden. Somit könnte die Bedeutung und die Funktion der GTPase, die im Vergleich mit C2 $\alpha$ -RBD interagieren, festgestellt werden. Um die Generierung von den RBD-Mutanten der Isoform C2 $\alpha$  zu überprüfen, wurden die gereinigten Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Das Expressionsprofil zeigte, dass 2 Mutanten (K426A, L456K) Banden ergaben, die nicht das erwartete Molekulargewicht von ca. 22 kDa hatten (Abb. 3.3). Es lag zwar ein rekombinantes Protein vor, aber möglicherweise kam es bei den Mutanten zu einem *Frame Shift*, so dass ein verkürztes Protein mit ca. 14 kDa vorlag. Dies konnte mit Hilfe der Sequenzanalyse für die Mutante L456K bestätigt werden (Tab. 3.1). Die Protein-Protein-Interaktion von C2 $\alpha$ -RBD mit CDC42 zeigte für den Wildtyp-C2 $\alpha$  in drei unabhängig durchgeführten Experimenten jeweils unterschiedliche Resultate (Abb. 3.4 1-7). Damit zeigt sich, dass die Daten der isolierten RBD Interaktionen nicht reproduzierbar waren. Mögliche Gründe könnten sein, dass die RBD nicht mehr korrekt gefaltet vorlagen. Des Weiteren könnten Strukturdomänen, die entfernt von der RBD liegen, notwendig sein, um die Interaktion zu gewährleisten.

#### 4.2.6 Mögliche Einschränkungen der Pulldown-Methode

Die Ergebnisse der Interaktionsstudien dieser vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die Pulldown-Methode Vor- und Nachteile mit sich bringt. Mit Hilfe von *in vitro* GST-Pulldown Assays können direkte Interaktionen beobachtet werden. Jedoch muss das rekombinante Protein löslich sein, da die Methode sonst nicht gewählt werden könnte. Die in Säugern exprimierten Proteine kommen der *in vivo* Faltung ziemlich nahe, so dass es möglich sein könnte, Parallelen zwischen der *in vivo* und *in vitro* Funktion zu ziehen (Bauer & Kuster, 2003). Wie sich gezeigt hat, birgt die Methode experimentell einige Nachteile, die zum Teil schon aufgeführt wurden. Leichte Veränderungen am Puffersystem können z.B. zur Denaturierung der Proteine führen. Z.B. könnte die falsche Menge von Triton dazu führen, dass unspezifische Bindungen nicht blockiert werden. Die BSA-Menge ist vor allem bei rekombinanten Proteinen notwendig, um das Enzym zu stabilisieren. Ebenfalls muss beachtet werden, dass die Pulldown Methode diffizil ist, da im minimalsten Bereich ( $\mu$ l) gearbeitet wird und eine spezifische Bindung an die Beads und Protein zu Protein bestimmte stringente Bedingungen voraussetzt. Matrixeffekte können nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann man aus den Ergebnissen der Protein-Protein-Interaktionsexperimenten schlussfolgern, dass sowohl bei den isolierten RBDs, bei den exprimierten Proteinen in Säugorzellen als auch bei den rekombinant erzeugten Proteinfragment C2 $\alpha$ -F3 in Insektenzellen keine reproduzierbaren Proteininteraktionen mit verschiedenen Vertretern der RAS- und RHO-Familie gezeigt werden konnten. Daher bleibt die Frage, ob Vertreter dieser GTPasen direkt an die Klasse II PI3K RBD binden und somit die Lipidkinase co-aktiviert, offen. Die Ergebnisse aus den Pulldown Experimenten, bei denen die Proteine aus den drei verschiedenen Expressionssystemen exprimiert wurden, veranschaulichen, dass die GTPasen CDC42 und RAC1 möglicherweise binden können. Im Endeffekt kann man sagen, dass möglicherweise für die Interaktionsstudien der vorliegenden Arbeit nicht die optimalen Bedingungen ermittelt werden konnten, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

#### 4.3 Messung der Proteinaktivität

*In vitro* konnte die PI3KC2 $\alpha$ -F3 Aktivität bei der Anwesenheit von PtdIns-ATP beobachtet werden. Bei dem Assay variierte die Konzentration am Protein C2 $\alpha$ -F3 (0 nM bis  $10^7$  nM). Erst bei einer C2 $\alpha$ -F3 Konzentration von 1000 nM kam es zu einem signifikanten Anstieg an der Umsetzung von PtdIns (Abb. 3.15). Um konkrete Aussagen treffen zu können, mit welcher Rate der Umsatz von PtdIns erfolgte, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Dafür müssten mehr Messpunkte zwischen 100 nM und  $10^7$  nM gemacht werden. Aufgrund der Mehrzahl an Messungen wird daraufhin die Fehlerrate minimiert und dadurch die Ergebnisse genauer.

Für das angebotene Lipide PtdIns(4)P-ATP konnte ein sehr geringer Umsatz beobachtet werden (Abb. 3.15). Dies könnte daraufhin deuten, dass die Lipidkinase PI3KC2 $\alpha$ -F3 PtdIns(4)P nicht als Substrat akzeptiert wird, um dieses Lipid zum Produkt PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> umzusetzen. Im Vergleich zu PtdIns-ATP zeigte C2 $\alpha$ -F3 für PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-ATP keine Aktivität. Interessant wäre der Vergleich mit etablierten Mutanten von den verschiedenen Isoformen, um die onkogene Aktivität des Proteins zu untersuchen.

#### 4.4 PtdIns(3)P Mass ELISA

Der PtdIns(3)P-Mass Elisa, zeigt im Vergleich von Wildtyp-C2 $\alpha$  mit den Mutanten M1183I, D839N und L1258R einen zum Teil vielfachen Anstieg der PtdIns(3)P Konzentration (Abb. 3.10). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass möglicherweise onkogene Mutanten von PI3KC2 $\alpha$  existieren, die zu einem signifikanten Anstieg in der PtdIns(3)P Konzentration führen könnten. Dieser Befund müsste durch weitere Wiederholungen des Experiments bestätigt werden.

### 5. Ausblick

Viele Fragen sind offen, die durch weiterführende Experimente geklärt werden müssen. Zum einen müsste eine Methode gefunden werden, um die Protein-Protein-Interaktion zwischen der PI3K Klasse II und den GTPasen v.a. von CDC42, RAC1 nachzuweisen z.B. ELISA. Durch eine andere Methode könnten die diffizilen Probleme des Pulldown Assays umgangen werden. Im Rahmen eines Kandidatenscreens könnte daraufhin, die Interaktion von RAS-GTPasen und Vertretern der RHO-Familie mit den Klasse II Isoformen weiter untersucht werden. Aufgrund reproduzierbarer Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktion wäre die Etablierung von Tumormutanten aller Isoformen von PI3KC2 vorstellbar, die ein intaktes Protein hervorbringen, an das die GTPasen nicht mehr binden könnten, damit die PI3K Klasse II nicht mehr co-aktiviert werden könnten. Dadurch könnte die Bedeutung und die Funktion der GTPasen, die an die RBD nicht mehr binden, festgestellt werden. Über funktionale Assays könnte dann eine erhöhte Stimulation im Vergleich zur ungebunden Interaktion detektiert werden. Würden eindeutige Interaktionspartner mit der Lipidkinase PI3K Klasse II vorliegen, könnten im weiteren Verlauf thermodynamische Experimente erfolgen, um die Bindungsaffinität der wechselwirkenden Proteine zu ermitteln.

Die molekulare Regulation der PI3K Klasse II ist noch immer unzureichend verstanden. Weitere Versuche sind notwendig, um die intrazelluläre Funktion dieser Lipidkinase zu untermauern. Um die Rolle im Signalweg zu erforschen, der Aktivierung bis hin zur Interaktion von Effektoren, ist noch ein langer Weg. Welche Rollen nehmen dabei die GTPasen ein? Es gibt Hinweise, dass die Klasse II PI3Ks bei der Entstehung von

Krankheitsprozessen eine wichtige Rolle spielen, so dass ein verbessertes Verständnis dieser Lipidkinase zur Entwicklung neuer Therapiestrategien führen könnte.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Akt	Serin/Threonin-Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome, Klonierungsvektor
bp	Basenpaar
BH	breakpoint cluster homology domain
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
C2-Domäne	conserved region 2 domain
CDC42	cell division control protein 42
ClustalW	multiple Sequenzalignment von EMBL-EBI (England)
COSMIC	Catalogue of somatic mutations in cancer (England) Datenbank
COS-7	<i>Cercopithecus aethiops</i>
C-terminal	Carboxy-Terminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FCS	foetal calf serum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor
GFP	green fluorescent protein
GSH	Gluthation-Agarose Beads (Trägermatrix)
GST	Glutathione-S-transferase
GTP $\gamma$ S	Guanosintriphosphat-Gamma-S
HEK-293	Humane embryonale Nieren-Zelllinie
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hi-5	Eierstockzellen von <i>Trichoplusia ni</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactosid
iSH2	inter-SH2-Domäne
kDa	Kilodalton
LB	Lauria Broth, Bakterienmedium
MG	Molekulargewicht
MOI	multiplicity of infection
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA), Datenbank
nm	Nanometer
N-terminal	Amnio-Terminus
p110	katalytische Untereinheit der Klasse IA PI3Ks $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$

PEI	Polyethylenimin
PH- Domäne	Pleckstrin-Homologiedomäne
PI3Ks	Phosphoinositol-3-Kinasen
Pfu	plaquebildende Einheit
PX-Domäne	Phox Homology Domäne
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAS	Rat sarcoma
RBD	RAS-Bindungsdomäne
RHO	Transformin Protein RHO
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf-21	Zelllinie des Insekts <i>Spodoptera Frugiperda</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylenediamine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
WP	Waschpuffer

## 7. Referenzen

- Alberts, Bruce; Schäfer, Ulrich; Häcker, Bärbel; Alberts-Johnson-Lewis-Raff-Roberts-Walter (Hg.) (2011): *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 978-3-527-32384-5
- Anderson Karen E.; Jackson Shaun P (2003): Class I phosphoinositide 3-kinases. In: *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1028–1033 doi:10.1016/S1357-2725(02)00270-4
- Alexandre Arcaro; Stefano Volinia; Marketa J. Zvelebil; Rob Stein; Sandra J. Watton; Meredith J. Layton; Ivan Gout; Khatereh Ahmadi; Julian Downward; Michael D. Waterfield (1998): Human Phosphoinositide 3-Kinase C2 $\beta$ , the Role of Calcium and the C2 Domain in Enzyme Activity. In: *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 33082-33090 doi: 10.1074/jbc.273.49.33082
- Bauer A; Kuster B. (2003): Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur. J. Biochem.*;270(4):570- 578. Doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03428.x
- Colicelli, John (2004): Human RAS superfamily proteins and related GTPases. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* (250), S. RE13. DOI: 10.1126/stke.2502004re13.
- Falasca, M.; Maffucci, T. (2007): Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. In: *Biochemical Society transactions* 35 (Pt 2), S. 211–214. DOI: 10.1042/BST0350211.
- Falasca, Marco; Maffucci, Tania (2012): Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. In: *The Biochemical journal* 443 (3), S. 587–601. DOI: 10.1042/BJ20120008.
- Fritsch, Ralph; Krijger, Inge de; Fritsch, Kornelia; George, Roger; Reason, Beth; Kumar, Madhu S. et al. (2013): RAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms. In: *Cell* 153 (5), S. 1050–1063. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.031.
- Fritsch, Ralph; Julian Downward (2013): Snapshot: Class I PI3K isoform signaling. In: *Cell* 154 (4):940-940.e1. DOI: 10.1016/j.cell.2013.07.045
- Jean, Steve; Kiger, Amy A. (2014): Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. In: *Journal of cell science* 127 (Pt 5), S. 923–928. DOI: 10.1242/jcs.093773.
- Maffucci, Tania; Falasca, Marco (2014): Analysis, regulation, and roles of endosomal phosphoinositides. In: *Methods in enzymology* 535, S. 75–91. DOI: 10.1016/B978-0-12-397925-4.00005-5.
- Maffucci, Tania; Falasca, Marco (2014): New insight into the intracellular roles of class II phosphoinositide 3-kinases. In: *Biochemical Society transactions* 42 (5), S. 1378–1382. DOI: 10.1042/BST20140140.
- Mazza, S. and Maffucci, T. (2011) Class II phosphoinositide 3-kinase C2 $\alpha$ : what we learned so far. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2 (2): 168–182 ISSN:2152-4114/IJBMB1104003
- Posor, York; Eichhorn-Gruenig, Marielle; Puchkov, Dmytro; Schöneberg, Johannes; Ullrich, Alexander; Lampe, André et al. (2013): Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. In: *Nature* 499 (7457), S. 233–237. DOI: 10.1038/nature12360.
- Rodriguez-Viciano, P.; Warne, P.H.; Dhand, R.; Vanhaesebroeck, B.; Gout, I.; Fry, M.J.; Waterfield, M.D.; Downward, J. (1994): Phosphatidylinositol-3- OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 527–532. Dx.doi.org/10.1038/170527a0
- Rodriguez-Viciano, P.; Warne, P.H.; Vanhaesebroeck, B.; Waterfield, M.D.; Downward, J. (1996): Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J.* 15, 2442–2451.
- Ksenia Rostislavleva; Nicolas Soler; Yohei Ohashi; Lufei Zhang; Els Pardon; John E. Burke; Glenn R. Masson; Chris Johnson; Jan Steyaert; Nicholas T. Ktistakis; Roger L. Williams (2015): Structure and

flexibility of the endosomal Vps34 complex reveals the basis of its function on membranes In: *Science* 350, aac7635; DOI: 10.1126/science.aac7365

Thorpe, Lauren M.; Yuzugullu, Haluk; Zhao, Jean J. (2015): PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. In: *Nature reviews. Cancer* 15 (1), S. 7–24. DOI: 10.1038/nrc3860.

Vanhaesebroeck, B.; Leever, S. J.; Ahmadi, K.; Timms, J.; Katso, R.; Driscoll, P. C. et al. (2001): Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. In: *Annual review of biochemistry* 70, S. 535–602. DOI: 10.1146/annurev.biochem.70.1.535.

Vanhaesebroeck, Bart; Guillermet-Guibert, Julie; Graupera, Mariona; Bilanges, Benoit (2010): The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (5), S. 329–341. DOI: 10.1038/nrm2882.

Vanhaesebroeck, Bart; Stephens, Len; Hawkins, Phillip (2012): PI3K signalling: the path to discovery and understanding. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (3), S. 195–203. DOI: 10.1038/nrm3290.

Veronica Dominguez; Claudio Raimondi; Sageeta Somanath; Marco Bugliani; Merewyn K.Loder; Charlotte E. Edling; Nullin Diceacha; Gabriela da Siva-Xavier; Lorella Marselli; Shanta J. Persaud; Mark D. Turner; Guy A. Rutter; Pero Marchetti; Marco Falsace; Tania Maffucci (2011): Class II phosphoinositide 3-kinase regulates exocytosis of Insulin Granules in Pancreatic  $\beta$  cells. In: *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 4216–4225. Doi: 10.1074/jbc.M110.200295

Wheeler, Matthew; Domin, Jan (2006): The N-terminus of phosphoinositide 3-kinase-C2beta regulates lipid kinase activity and binding to clathrin. In: *Journal of cellular physiology* 206 (3), S. 586–593. DOI: 10.1002/jcp.20507.

TL Yuan, LC Cantley (2008) PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. In: *Oncogene*, 27(41): 5497–5510. doi:10.1038/onc.2008.245.