

2. **Abgeschlossenes Teilprojekt A11**

Zwischenbericht

Thema des Projekts: **Molekulare Mechanismen und physiologische Bedeutung der G-Protein-abhängigen Regulation von Phosphoinositol-3-Kinasen im exokrinen Pankreas**

Projektleiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Abteilung Pharmakologie und Toxikologie
Universitätsklinikum Ulm

ab 01.03.2002: Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
Universitätsklinikum, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Der Abschlußbericht wird im Juni 2004 vorgelegt.

2.1 **Vorbemerkung**

Das Projekt A11 wurde im Zeitraum 01.07 2001 bis zum 28.02.2003 durch den SFB 518 gefördert. Nach Wechsel an die Universität Düsseldorf wurden zunächst die wichtigsten Arbeitsbedingungen etabliert, um das Projekt fortzuführen. Ein Teil des Projektplans wird derzeit u.a. zusammen mit einem Diplomanden der Universität Ulm bearbeitet. Der Abschluss dieser Arbeiten ist bis zum 31.05.2004 geplant.

2.2 **Zwischenbericht**

Unsere Arbeiten haben sich zunächst darauf konzentriert, die Regulation der Rezeptor-regulierten Phosphoinositol 3-Kinasen (PI3K) mit zellbiologischen Methoden zu untersuchen (Goetze et al., 2002; Hanke et al., 2001). Hierbei haben wir mit Hilfe spezifischer Antikörper PI3-Kinasen aus Zellhomogenaten isoliert und auf ihre Sensitivität gegenüber G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Rezeptortyrosinkinasen untersucht. Leider ist dieser Ansatz durch eine mäßige Spezifität und teilweise unzureichende Sensitivität der verwendeten Antiseren limitiert (Nürnberg & Piekorz, 2004).

Deshalb haben wir im nächsten Schritt Plasmide zur Expression von GFP-Fusionsproteinen mit Untereinheiten von G-Protein-sensitiven Rezeptor-regulierten Klasse I PI3-Kinasen erzeugt und nach heterologer Expression in Zellkulturzelllinien funktionell charakterisiert. In einer ersten Publikation (Brock et al., 2003) konnten wir die konfokale Laserscanningmikros-

kopie als Methode zur Untersuchung der Stimulation der PI3K γ durch G-Proteine, G-Proteingekoppelte Rezeptoren und Ras beschreiben. Hierbei fiel uns auf, dass die PI3K γ sowohl in einer zellmembrangebundenen Form als auch in einer löslichen zytosolischen Form vorkommt. Die Aktivierung des zytosolischen PI3K γ -Pools wird durch rezeptorstimulierte G-Protein $\beta\gamma$ -Dimere bewirkt, die über Bindung an die nicht-katalytische p101-Untereinheit der PI3K γ eine Rekrutierung der Kinase an die Membran induzieren. Die membrangebundene Fraktion der PI3K γ wird hingegen p101-unabhängig allosterisch durch G $\beta\gamma$ stimuliert.

Nachdem wir inzwischen auch Plasmide zur Expression weiterer p85-gebundener GFP-Fusionsproteine generiert haben, testen wir gegenwärtig diese Konstrukte funktionell nach Transfektion von Zelllinien.

In einem weiteren Projektteil haben wir die Bedeutung der zweiten Enzymqualität der PI3-Kinasen, ihre Serin-/Threonin-Kinaseaktivität, untersucht. Mit Hilfe einer Kombination massenspektroskopischer und molekularbiologischer Methoden konnten wir den extremen C-Terminus von PI3K β und PI3K γ als Substrat der Autophosphorylierungsaktivität identifizieren (Czupalla et al., 2003a,b). Während die Autophosphorylierung der PI3K β zu einer Inhibition der Lipidkinaseaktivität führt, ist dies bei der PI3K γ nicht zu beobachten. Jedoch fällt nach Expression von PI3K γ -Mutanten, die eine konstitutive Autophosphorylierung imitieren, auf, dass die basale ERK-Phosphorylierung vermindert ist. Welche funktionelle Bedeutung eine bereits früher von anderen Arbeitsgruppen postulierte Proteinkinase-abhängige Beeinflussung der MAP-Kinase-Aktivität besitzt, ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

Publikationen, die in der Antragsphase ganz oder teilweise aus dem SFB-geförderten Projekt entstanden sind

Brock C, Schaefer M, Reusch P, Czupalla C, Michalke M, Spicher K, Schultz G, **Nürnberg**

B. Roles of G $\beta\gamma$ in membrane recruitment and activation of p110 γ /p101 phosphoinositide 3-kinase γ . *J. Cell Biol* 2003; 160:89-99

Czupalla C, Culo M, Müller EC, Brock C, Reusch P, Spicher K, Krause E, **Nürnberg B.**

Identification and characterization of the autophosphorylation sites of phosphoinositide 3-kinase isoforms β and γ . *J Biol Chem* 2003a; 278:11536-11545

- Czupalla C, **Nürnberg B**, Krause E. Analysis of class I phosphoinositide 3-kinase auto-phosphorylation sites by mass spectrometry. *Rap Commun Mass Spectr* 2003b; 17:690-696
- Götze S, Bungenstock A, Czupalla C, Eilers F, Stawowy P, Kintscher U, Spencer-Hänsch C, Graf K, **Nürnberg B**, Law RE, Fleck E, Gräfe M. Leptin induces endothelial cell migration through Akt which is inhibited by PPAR γ -ligands. *Hypertension* 2002; 40:748-754
- Hanke S, **Nürnberg B**, Groll DH, Liebmann C. Cross talk between β -adrenergic and bradykinin B₂ receptors results in cooperative regulation of cyclic AMP accumulation and mitogen-activated protein kinase activity. *Mol Cell Biol* 2001; 21:8452-8460
- Nürnberg B**, Piekorz RP. Phospholipid kinases. *X-Pharm* 2004; im Druck

