

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
des Zentrums Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Georg W. Mayr

Posttranskriptionelle Regulation und onkogene Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase Untereinheit p85 α

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von

Bianca Thidahan Hofmann
aus Freiberg

Hamburg 2010



**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.08.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. M. Jücker

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. W. Fiedler

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. B. Brandt

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	3
2 Abkürzungsverzeichnis	6
3 Abbildungsverzeichnis.....	9
3.1 Abbildungen	9
3.2 Tabellen	10
4 Arbeitshypothese und Fragestellung.....	11
5 Einleitung.....	13
5.1 Phosphatidylinositol 3-Kinasen	13
5.1.1 Einteilung der PI3-Kinasen	13
5.1.1.1 Einteilung der regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinasen Klasse IA.....	15
5.1.1.2 p110 α - die katalytische Untereinheit	17
5.1.1.3 p85 α - die regulatorische Untereinheit.....	17
5.1.1.4 Modelle des strukturellen Aufbaus von p110 α und Anteilen von p85 α	18
5.1.2 Signalweg der Klasse I PI3-Kinasen.....	20
5.1.2.1 Aktivierung.....	20
5.1.2.2 Produkte der PI3-Kinasen	21
5.1.2.3 Funktion und Regulation von PIP ₃	21
5.1.2.4 Repräsentative Ziele von Akt.....	23
5.1.2.5 Biologische Funktionen des PI3-Kinase Signalwegs	23
5.1.3 PI3-Kinase-Signalweg vermittelte Tumorgenese	24
5.1.3.1 Somatische Mutationen im PI3-Kinase-Signalweg.....	24
5.1.3.2 Somatische Mutationen des p85 α	25
5.1.3.3 p85 α in der Hodgkin-Lymphom Zelllinie (CO)	26
5.1.3.4 p85 α Mutationen mit erhöhter PI3-Kinase Aktivität in vitro	27
5.1.4 <i>Knockout</i> Mäuse der p85 α regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase	29
5.1.5 PI3-Kinase Inhibitoren	29
5.2 Genexpression	29
6 Material und Methoden.....	31
6.1 Material	31
6.1.1 Verwendete Geräte.....	31
6.1.2 Verbrauchsmaterialien	32
6.1.3 Oligonukleotide.....	32
6.1.3.1 Primer	32

6.1.4	Puffer- und Stammlösungen.....	34
6.1.5	Antikörper	38
6.1.6	Inhibitoren	40
6.2	Methoden	41
6.2.1	Zellbiologische Methoden.....	41
6.2.1.1	Zellkultur Stammhaltung.....	41
6.2.1.2	Sekundärkultur der CEF	41
6.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	42
6.2.2	Molekularbiologische Methoden	42
6.2.2.1	RNA Isolation nach der Trizol-Methode.....	42
6.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
6.2.2.3	Agarosegelelektrophorese	44
6.2.2.4	Erststrang cDNA Synthese.....	44
6.2.2.5	Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation des 3' UTR von Wildtyp und mutierter 85 α mRNA.....	45
6.2.2.6	Polymerasekettenreaktion zur Verteilung von Wildtyp und mutiertem p85 α	45
6.2.2.7	Mutagenese.....	46
6.2.2.8	Quantitative <i>real time</i> Polymerasekettenreaktion	47
6.2.2.9	PCR Aufreinigung.....	48
6.2.2.10	Gelextraktion	48
6.2.2.11	Ligation	49
6.2.2.12	Transformation	49
6.2.2.13	Minipräparation von Plasmid-DNA	50
6.2.2.14	Midipräparation von Plasmid-DNA	51
6.2.2.15	Restriktionsverdau.....	51
6.2.2.16	Sequenzierung	51
6.2.2.17	Polysomen Präparation.....	52
6.2.2.18	Lentivirale Transfektion und Transduktion.....	53
6.2.2.19	Zellkernisolation.....	54
6.2.2.20	Virusinfektion.....	55
6.2.2.21	RCAS Transfektion und DMSO-Schock	55
6.2.2.22	Focus Assay.....	57
6.2.3	Proteinbiochemische Methoden	57
6.2.3.1	Proteinlysate	57
6.2.3.2	Zellkernlysate	58
6.2.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	58
6.2.3.4	Polyacrylamidgelelektrophorese	58
6.2.3.5	Western Blot.....	59
6.2.3.6	Western Blot <i>Stripping</i>	60
7	Ergebnisse.....	61

7.1 Untersuchungen zur Abwesenheit des p85α-Wildtyp-Proteins.....	61
7.1.1 Verhältnis von Wildtyp zu mutierter p85 α -mRNA in Zellkernen von CO-Zellen	61
7.1.2 Verhältnis von Wildtyp zu mutierter p85 α -mRNA im Zytoplasma von CO-Zellen	63
7.1.3 Qualitatives Verhältnis von Wildtyp p85 α zu mutierter p85 α -mRNA in Polysomen- Gradientenfraktionen	64
7.1.4 Relative Quantifizierung der Gradientenfraktionen.....	67
7.1.5 Beziehung der quantitativen und qualitativen Gradientendaten	73
7.1.6 Inhibition des proteasomalen Abbaus durch den Inhibitor MG-132 in CO-Zellen	74
7.1.7 Sequenzierung des 5'UTR und des ORF	76
7.1.8 Sequenzierung des 3'UTR	78
7.2 Onkogene Aktivität von p85α und p85α Mutanten.....	79
7.2.1 Expression von p76 α und p85 α in CEF Zellen	79
7.2.2 Transformierendes Potential von p76 α und p85 α Protein.....	81
7.2.3 Expression der Mutationen R340E und K379E in p76 α und p85 α in CEF	82
7.2.4 Transformierendes Potential der R340E und K379E Mutationen	83
8 Diskussion	86
8.1 Regulation von Wildtyp p85 α in CO-Zellen	86
8.2 Onkogene Aktivität von p76 α und anderen p85 α Mutanten.....	91
9 Zusammenfassung.....	93
10 Literaturverzeichnis	96
11 Danksagung	104
12 Lebenslauf.....	105
13 Erklärung.....	106

2 Abkürzungsverzeichnis

10x	zehnfach
1x	einfach
3x	dreifach
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes <i>Eagle</i> -Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelseitige Desoxyribonukleinsäure
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
ECL	<i>Electrochemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)

g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertami
M	molar
mA	Milliampere
miRNA	<i>micro</i> RNA
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger</i> RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP40	Nonylphenylpolyethylenglykol (Nonident P 40)
OD	optische Dichte
ORF	Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	pH-Wert
PI	Phosphatidylinositol
PI3	Phosphatidylinositoltrisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>round per minute</i>)
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
rRNA	ribosomale RNA

RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
shRNA	<i>small/short hairpin</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
ssDNA	einzelstrang Desoxyribonukleinsäure (<i>single strand</i> DNA)
ssRNA	einzelstrang Ribonukleinsäure (<i>single strand</i> RNA)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	Einheit (<i>unit</i>)
UTR	untranslatierter Bereich (<i>untranslated Region</i>)
UV	ultraviolett
V	Volt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

3 Abbildungsverzeichnis

3.1 Abbildungen

Abbildung 1.	Übersicht und Einteilung der katalytischen Untereinheiten der PI3-Kinase Klassen I bis III nach ihrem strukturellen Aufbau.....	14
Abbildung 2.	Hauptisoformen der regulatorischen Untereinheit der Klasse IA der PI3-Kinasen.....	16
Abbildung 3.	Übersicht über p110 α	17
Abbildung 4.	Aufbau und Reihenfolge der p85 α Domänen.....	18
Abbildung 5.	Schema zur Anordnung der Domänen des p110 α /niSH2 Heterodimers.....	19
Abbildung 6.	Aktivierung der Klasse IA und IB der PI3-Kinasen.....	20
Abbildung 7.	Repräsentative Interaktionen im PI3-Kinase Signalweg.....	22
Abbildung 8.	Aufbau der 76 kDa großen p85 α Untereinheit der PI3-Kinase (Jucker <i>et al.</i> , 2002).....	27
Abbildung 9.	Aminosäureaustausch und Interaktionen zwischen p110 α und p85 α Mutationen.....	28
Abbildung 10.	RCAS-A Plasmidkarte mit Insert (vsv-p85 del Sfi + Stop Codon).....	56
Abbildung 11.	Western Blot mit Lamin-B und GAPDH Signal von Zellkern- und Zytoplasmaproteinen.....	62
Abbildung 12.	Diagramm zum Verhältnis der Wildtyp p85 α und mutierten p85 α -mRNA zur gesamten p85 α -mRNA in Zellkernen der CO-Zellen.....	63
Abbildung 13.	Diagramm zum Verhältnis von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA im Zytoplasma von CO-Zellen.....	64
Abbildung 14.	Agarosegelelektrophorese der RNA aus der Polysomen Präparation; 1,3,5,7,9 und 11 bezeichnen einzelne Gradientenfraktionen.....	65
Abbildung 15.	Diagramm zum relativen Verhältnis von Klonen mit Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA in Polysomen-Gradientenfraktionen.....	67
Abbildung 16.	Schmelzkurve zur <i>real time</i> PCR der Verdünnungsreihe mit cDNA aus CO-Zellen.....	68
Abbildung 17.	Fluoreszenzkurve je LightCycler Zyklus der cDNA Verdünnungsreihe.....	68
Abbildung 18.	Diagramm zum Verhältnis von eingesetzter cDNA Konzentration und Zyklenzahl der RT-PCR.....	69
Abbildung 19.	Relative Verteilung der p85 α -mRNA in den Fraktionen 1 bis 11 des Polysomen-Gradienten.....	72
Abbildung 20.	Relative Quantifizierung mit Verteilung der Wildtyp und mutierten p85 α -mRNA.....	74
Abbildung 21.	MG-132 Western Blot.....	75
Abbildung 22.	Western Blot des p85 α /p76 α Proteinsignals und GAPDH mit MG-132 behandelten CO-Zellen.....	76
Abbildung 23.	Ausschnitt aus der Wildtyp und der mutierten p85 α Sequenz an der Stelle der Basendeletion. Die Base 1907 (bp = Basenpaar) ist mit einem Pfeil markiert.....	77
Abbildung 24.	Expression und Coexpression von p76 α und p85 α	80
Abbildung 25.	Focus Assay von p76 α und p85 α . Die Zellen wurden nach 9 Tagen Kultur mit Crystallviolett gefärbt.....	82

Abbildung 26. Western Blot der p76 α und p85 α R340E, K379E und R340E + K379E Mutationen.	83
Abbildung 27. Focus Assay der R340E und K379E Mutationen in p76 α und p85 α	84
Abbildung 28. Focus Assay der K379E Mutation in p76 α und p85 α mit verschiedenen Konzentrationen des RCAS Plasmids.	85
Abbildung 29. Qualitative und quantitative Verteilung der p85 α -mRNA in den Fraktionen des Sucrosegradienten. Schwarze Balken Wildtyp p85 α -mRNA, weiße Balken mutierte p85 α -mRNA.	87
Abbildung 30. Möglichkeiten von Regulationsmechanismen des Wildtyp p85 α	90

3.2 Tabellen

Tabelle 1. Übersicht zu Herkunft, Art und Mutation natürlich aufgetretener p85 α Mutationen.	26
Tabelle 2. 3' UTR PCR Programmablauf.	45
Tabelle 3. Verteilung von Wildtyp und mutiertem p85 α PCR Programmablauf.	46
Tabelle 4. Mutagenese PCR Programmablauf.	47
Tabelle 5. <i>Real time</i> PCR Programmablauf.	48
Tabelle 6. Sequenzierung PCR Programmablauf.	52
Tabelle 7. Übersicht des HKM Puffer im Sucrose-Stufengradient.	52
Tabelle 8. Virusverdünnungsreihe.	55
Tabelle 9. Analyse der Zytoplasmaverteilung von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA in 3 unabhängigen Experimenten.	64
Tabelle 10. Absoluten Verteilung von Klonen mit Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA Sequenz in den Polysomen-Gradientenfraktionen.	66
Tabelle 11. Relative Verteilung von Klonen mit Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA Sequenz in den Polysomen-Gradientenfraktionen.	66
Tabelle 12. Übersicht der LightCycler Zyklen je eingesetzter cDNA Verdünnung.	68
Tabelle 13. Übersicht über die RT-PCR Werte und deren nachfolgende Berechnungen.	70
Tabelle 14. Berechnung der relativen Konzentration der mRNA in den Polysomen-Gradientenfraktionen.	71
Tabelle 15. Relative Quantifizierung der p85 α -mRNA in den Polysomen-Gradientenfraktionen. Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen RT-PCR Versuchen.	72
Tabelle 16. Qualitatives Verhältnis von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA, sowie relativer Anteil der p85 α -mRNA in den Polysomen-Gradientenfraktionen.	73
Tabelle 17. Daten der Verteilung von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA bezogen auf die relative Quantifizierung der Polysomen-Gradientenfraktionen.	73
Tabelle 18. Übersicht über die Sequenzunterschiede im <i>open reading frame</i>	78
Tabelle 19. Übersicht über die Sequenzunterschiede im 3' untranslatierten Bereich des p85 α	78

4 Arbeitshypothese und Fragestellung

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-Kinasen) sind bedeutende Regulatoren zellulärer Aktivität. Sie beeinflussen Wachstum, Überleben, Motilität, Zellmetabolismus und Zellteilung. PI3-Kinasen bestehen aus einer regulatorischen (z.B. p85 α) und einer katalytischen Untereinheit (z.B. p110 α).

In der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie (CO) wurde eine c-terminal verkürzte Form der PI3-Kinase Untereinheit p85 α identifiziert. Die verkürzte p85 α Variante hat ein Molekulargewicht von 76 kDa im Western Blot und wird deshalb als p76 α bezeichnet. Da im Western Blot p76 α nicht aber das Wildtyp-Protein p85 α nachgewiesen werden konnte, wurde das Genome der CO-Zellen untersucht. Es wurde sowohl ein Allel für das Wildtyp-p85 α , als auch ein Allel für die mutierte Form des p85 α gefunden (Jücker *et al.*, 2002).

Innerhalb meiner Dissertation soll deshalb die Abwesenheit des p85 α -Wildtyp-Proteins untersucht werden. Außerdem soll das transformierende Potential von p76 α , der K379E p85 α Mutante und die Kombination K379E p76 α untersucht werden.

Um die Abwesenheit des p85 α -Wildtyp-Proteins zu untersuchen, soll das Verhältnis von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA im Zellkern bestimmt werden. Dafür werden Zellkerne isoliert, RNA extrahiert und mittels PCR die p85 α -mRNA amplifiziert. Durch Klonierung und anschließender Sequenzierung einzelner Klone, kann so das Verhältnis von Wildtyp zu mutierter p85 α -mRNA bestimmt werden. Anschließend soll in einzelnen Fraktionen eines Sukrosegradienten Ribosomen assoziierte mRNA aus CO-Zellen untersucht und wiederum das Verhältnis von Wildtyp zu mutierter p85 α -mRNA bestimmt werden. Mit Hilfe einer *real time* PCR kann dann die Menge der p85 mRNA in den Gradientenfraktionen bestimmt werden. Eine mögliche posttranslationale Degradation soll durch die Inhibition des proteasomalen Abbaus von p85 α Protein mit dem Proteasomen Inhibitor MG-132 ausgeschlossen werden.

Da eine Veränderung im 3'- und 5'- untranslatierten Bereich der Wildtyp und der mutierten p85 α -mRNA für das Fehlen des p85 α -Wildtyp-Proteins verantwortlich sein kann, sollen die untranslatierten Bereiche sequenziert und verglichen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll die onkogene Aktivität des p76 α Proteins aus CO-Zellen, der künstlich erzeugten K379E Mutante des p85 α und eine Kombination

beider (K379E p76 α) untersucht werden. Dazu wird mittels eines Retrovirus die gewünschte DNA Sequenz stabil in das Genom von CEF Zellen integriert und ein Focus Assay durchgeführt. Mit diesem Assay kann dann, anhand von Größe und Anzahl der Mikrotumorbildung der CEF Zellen, das Potential zur onkogenen Transformation der Mutanten untersucht werden. Danach soll mit Hilfe eines Western Blots die Aktivierung des nachgeschalteten Signalwegs durch die p85 α Mutanten untersucht werden.

5 Einleitung

5.1 Phosphatidylinositol 3-Kinasen

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-Kinasen) sind Lipidkinasen, die in allen eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Ihre Substrate sind Phosphatidylinositole, die zu den Zellmembran Phospholipiden zählen. Die Phosphorylierung dieser Phosphatidylinositole stellt eine wichtige Funktion der zellulären Signaltransduktion dar (Engelman *et al.*, 2006).

PI3-Kinasen sind außerdem bedeutende Regulatoren zellulärer Aktivität und haben unter anderem Einfluss auf Wachstum, Überleben, Motilität, Zellmetabolismus und Zellteilung (Cantley, 2002; Katso *et al.*, 2001; Vivanco & Sawyers, 2002).

5.1.1 Einteilung der PI3-Kinasen

PI3-Kinasen bilden eine Proteinfamilie, die sich anhand ihrer Struktur, ihrer Substratpräferenz, ihrer Gewebeverteilung, der Art ihrer Aktivierung und ihrer Funktion in drei unterschiedliche Klassen einteilen lässt (Abbildung 1) (Bader *et al.*, 2005; Deane & Fruman, 2004; Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2003; Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999).

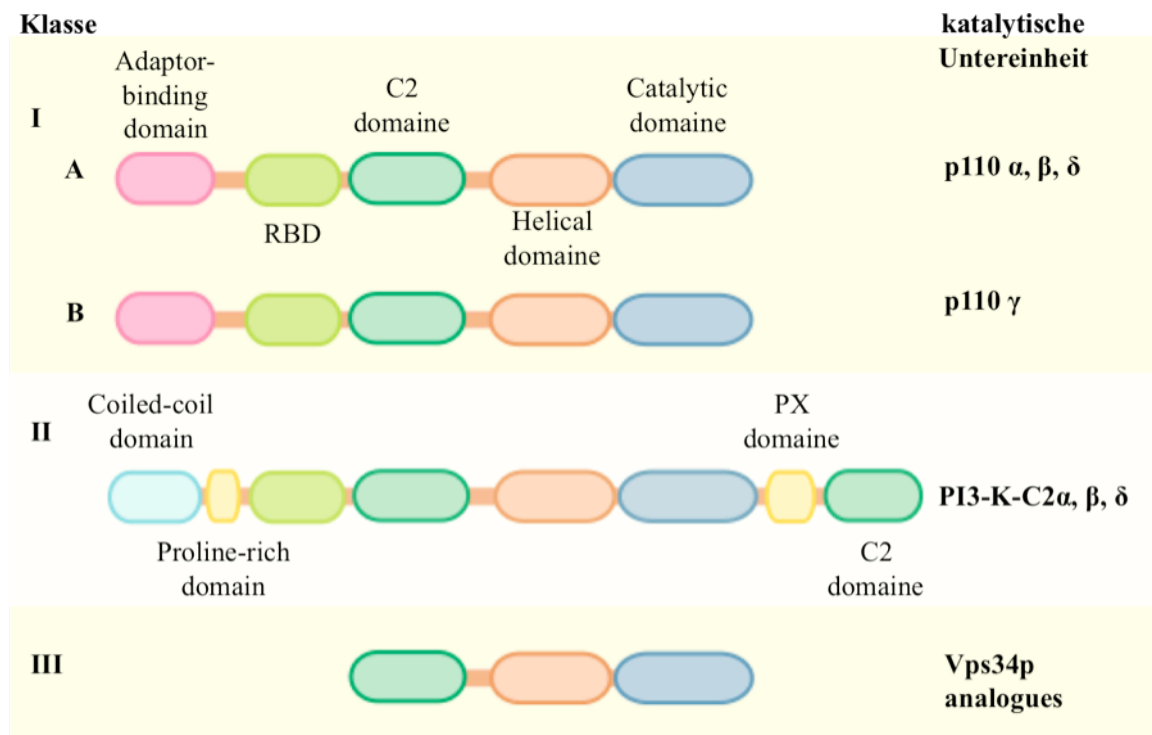


Abbildung 1. Übersicht und Einteilung der katalytischen Untereinheiten der PI3-Kinase Klassen I bis III nach ihrem strukturellen Aufbau.

RBD bezeichnet die *RAS binding domain*, C2 die *protein-kinase-C homology-2* Domäne und PX die *phox domain* (modifiziert nach Bader et al., 2005).

Die PI3-Kinasen der Klasse I sind bisher am besten charakterisiert. Sie werden in die Klasse IA und IB unterteilt und enthalten insgesamt 4 katalytische Isoformen (Vanhaesebroeck *et al.*, 2005). Die katalytische Untereinheit der Klasse I (p110 α , β , δ und γ) besteht aus einer *adaptor-binding domain* (Adapter bindenden Domäne), einer *RAS binding domain* (RBD, RAS bindenden Domäne), einer *C2 domain* (*protein-kinase-C homology-2* Domäne), einer *helical domain* (helikalen Domäne) und aus einer *catalytic domain* (katalytischen Domäne). Alle Isoformen besitzen eine intrinsische Proteinkinase-Aktivität.

Die Enzyme der Klasse IA werden von Rezeptor-Tyrosinkinasen und RAS aktiviert und sind konstitutiv mit einer Adapteruntereinheit verbunden, mit der sie einen heterodimeren Komplex bilden.

Das einzige Mitglied der Klasse IB ist p110 γ , das mit der regulatorischen Untereinheit p101 oder p84 verbunden ist. Die Struktur von p110 γ ist seit 1999 bekannt (Walker *et al.*, 1999). Nur ca. 35% der Sequenz von p110 γ sind mit der Sequenz von p110 α identisch. Anders als p110 α benötigt p110 γ für seine Kinaseaktivität keine Bindung

an eine regulatorische Untereinheit. p110 γ wird durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert.

Enzyme der Klasse II besitzen eine PI3-Kinase-C2 α , β oder γ Domäne. Ihnen fehlt eine Adapter bindende Domäne, aber sie besitzen an ihrem c-Terminus eine *phox domain* (PX Domäne) und eine *C2 domain* (*protein-kinase-C homology-2* Domäne), die die Bindung an Phosphoinositide vermitteln könnten. Obwohl noch keine regulatorischen Untereinheiten bekannt sind, wird davon ausgegangen, dass die Enzyme der Klasse II durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren und durch Tyrosinkinase Rezeptoren reguliert werden.

Die Enzyme der Klasse III sind Analoga der Hefe Vps34p PI3-Kinase Untereinheit. Sie interagieren mit der Adapteruntereinheit p150 und haben lediglich Phosphatidylinositol (PI) zum Substrat. Es wird angenommen, dass sie konstitutiv aktiv sind (Cantley, 2002; Deane & Fruman, 2004; Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2003; Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999; Wymann *et al.*, 2003).

5.1.1.1 Einteilung der regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinasen Klasse IA

Es gibt in Säugetieren drei Gene, die für 5 unterschiedliche regulatorische Untereinheiten (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β und p55 γ) kodieren (Abbildung 2). p85 α , p55 α und p50 α stammen vom selben Gen und entstehen durch alternatives Splicen der mRNA, die bestimmte Startcodons enthält (Fruman *et al.*, 1996). Alle Adapteruntereinheiten können an phosphorylierte Tyrosine mit dem Tyr-Xaa-Xaa-Met (YXXM) Motiv durch ihre SH2 (*Rous-Sarcome-oncoprotein homology-2*) Domäne binden (Bader *et al.*, 2005).

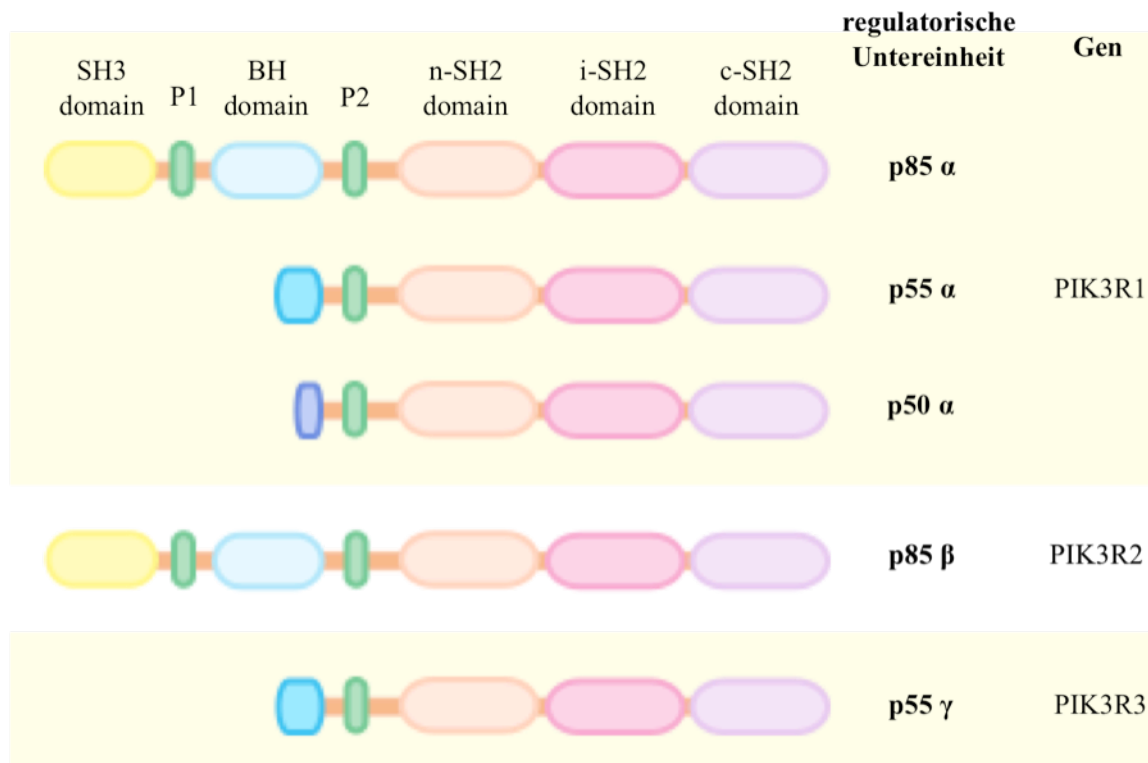


Abbildung 2. Hauptisoformen der regulatorischen Untereinheit der Klasse IA der PI3-Kinasen.

P1/P2 sind prolinreiche Regionen, i-SH2 *domain* ist die inter-SH2 Domäne, n-SH2 *domain* liegt n-terminal und c-SH2 *domain* liegt c-terminal. Die BH *domain* (*Bcr Homology* Domäne) ist homolog zur Triphosphatase aktivierenden Protein-Domäne (RhoGAP) von Bcr. SH3 *domain* beschreibt eine prolinreiche Sequenz (modifiziert nach Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2001).

Die regulatorischen Untereinheiten haben viele verschiedene Funktionen in Interaktion mit den PI3-Kinasen. Sie inhibieren die basale Aktivität und stabilisieren die katalytische Untereinheit, zudem aktivieren sie nachgeschaltete Rezeptor-Tyrosinkinasen und Ras (*rat sarcoma*) (Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2001; Yu *et al.*, 1998). In p85 Knockout-Mäusen wurde beobachtet, dass die katalytische Untereinheit p110 in Abwesenheit von p85 instabil und nicht mehr nachweisbar wird (Fruman *et al.*, 2000).

Die Einheit aus N-SH2 und iSH2 stellt das kleinste Element der regulatorischen Untereinheit dar, das fähig ist, die Aktivität der PI3-Kinase zu regulieren (Yu *et al.*, 1998).

5.1.1.2 p110 α - die katalytische Untereinheit

Die p110 α Untereinheit der PI3-Kinase α hat fünf Domänen: eine n-terminale Domäne, die *adaptor-binding domain* (ABD Domäne) genannt wird und p85 α bindet, eine *Ras-binding domain* (RBD), eine Domäne, die C2 genannt wird und vermutlich an Zellmembranen bindet, eine *helical domain* (helikale Domäne) und eine *catalytic domain* (Domäne mit katalytischer Aktivität) (Cantley, 2002; Katso *et al.*, 2001; Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999; Vivanco & Sawyers, 2002).

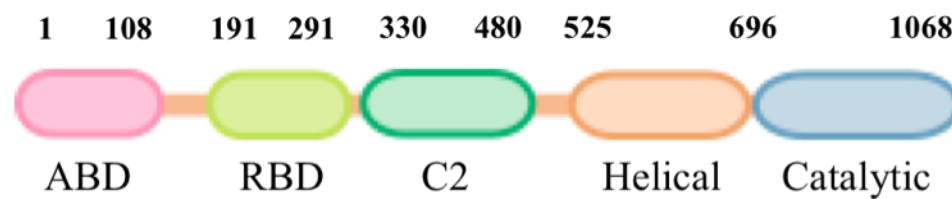


Abbildung 3. Übersicht über p110 α .

Die Abbildung zeigt ein Schema der Organisation der einzelnen Proteindomänen von p110 α sowie die Start und Endposition der kodierenden Aminosäuren (modifiziert nach Huang *et al.*, 2007).

Wenn p110 α ohne p85 α gebildet wird, ist es katalytisch aktiv, aber bei 37°C instabil. Im Komplex mit p85 α ist p110 α thermisch stabil, seine Kinaseaktivität wird allerdings inhibiert. Diese Kinaseaktivität wird wiederhergestellt, wenn p85 α mit seiner SH2 Domäne an phosphorylierte Tyrosine bindet (Yu *et al.*, 1998).

Im Normalzustand ist die p110 α Untereinheit an die p85 α Untereinheit gebunden und die katalytische Aktivität wird von p85 α inhibiert (Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2001).

5.1.1.3 p85 α - die regulatorische Untereinheit

Das p85 α Protein hat genau wie p110 α fünf bekannte Domänen. Diese sind zwei SH2 Domänen (die n-terminale n-SH2 und die c-terminale c-SH2), die von einer inter-SH2 (i-SH2) Domäne getrennt werden. Diese i-SH2 Domäne bindet an die katalytische Untereinheit. Durch geeignete zelluläre Signale binden die n-SH2 und die c-SH2 Domäne phosphorylierte Tyrosine in aktivierten Rezeptoren und Adaptermolekülen. Diese Bindung vermittelt wiederum eine Aktivierung der p110 α katalytischen Untereinheit ohne das p85 α aus dem Heterodimer entlassen wird (Huang *et al.*, 2007).

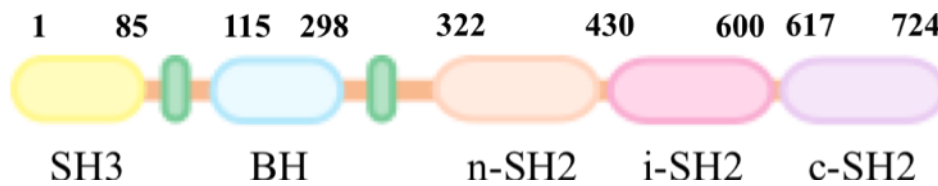


Abbildung 4. Aufbau und Reihenfolge der p85 α Domänen.

Schema der einzelnen Proteindomänen von p85 α sowie die Anfangs- als auch die Endposition der kodierenden Aminosäuren. *i-SH2 domain* (inter-SH2 Domäne), die *n-SH2 domain* liegt n-terminal, die *c-SH2 domain* liegt c-terminal, *BH domain* (*Bcr Homology* Domäne) (modifiziert nach Huang *et al.*, 2007).

5.1.1.4 Modelle des strukturellen Aufbaus von p110 α und Anteilen von p85 α

2007 konnte die Kristallstruktur von p110 α im Komplex mit der p110 α bindenden Domäne von p85 α generiert werden. Das p110 α /i-SH2 Heterodimer hat eine dreieckige Form mit einer langen Basis, bestehend aus der *coiled-coil* i-SH2 Domäne des p85 α . Die ABD Domäne ist am Ende der i-SH2 Domäne lokalisiert und hat dort Kontakt zu ihr. Seitlich interagiert die C2 Domäne mit der i-SH2 Domäne. Die *helical* und die Kinase Domäne formen eine Komplex im Zentrum des Proteins und haben keinen direkten Kontakt zur i-SH2 Domäne. Die RBD Domäne liegt an der Spitze des Komplexes und ist am weitesten von der i-SH2 Domäne entfernt gelegen (Abbildung 5) (Huang *et al.*, 2007).

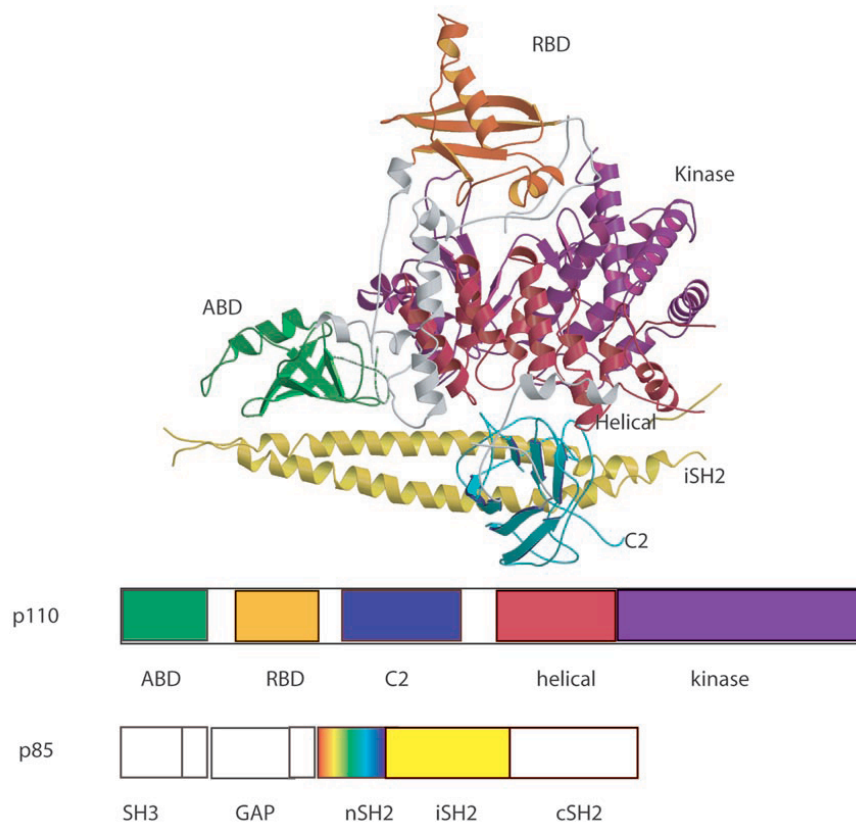


Abbildung 5. Schema zur Anordnung der Domänen des p110 α /niSH2 Heterodimers.

Graue Regionen markieren Verbindungsstücke zwischen zwei Domänen. ABD (Adaptor *binding domain* von p110 α) ist grün, RBD (Ras *binding domain*) ist orange, C2 Domäne ist blau, die *helical* Domäne ist rot und die Kinase-Domäne lila markiert. Die i-SH2 Domäne des p85 α ist gelb dargestellt (Huang *et al.*, 2008).

p110 α Mutationen, die mit Krebsentstehung in Verbindung gebracht werden, wurden in der ABD, C2 *helical* und Kinase Domäne gefunden. Einige dieser Mutationen zeigten *in vitro* und *in vivo* eine erhöhte enzymatische Aktivität (Kang *et al.*, 2005). Die Lage dieser Mutationen in der Kristallstruktur zeigte, dass viele an der Grenzfläche von p110 α und p85 α oder an der Grenzfläche der p110 α Kinase Domäne und anderer Domänen der katalytischen Untereinheit lokalisiert sind. Dadurch Unterbrechen die Mutationen die Interaktion von p85 α mit p110 α und somit die regulatorische Funktion des p85 α . Eine erhöhte Kinaseaktivität wird daraufhin verzeichnet.

5.1.2 Signalweg der Klasse I PI3-Kinasen

5.1.2.1 Aktivierung

Nach der Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren durch Bindung von Wachstumsfaktoren, werden PI3-Kinasen der Klasse IA nachfolgend aktiviert (Cantley, 2002; Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999). Die Translokation und die Aktivierung der Kinaseaktivität wird durch die hoch affine Bindung der zwei SH2 Domänen des p85 α an phosphorylierte Tyr-Xaa-Xaa-Met (YXXM) Motive von Rezeptor-Tyrosinkinasen vermittelt.

Die PI3-Kinase p110 γ aus der Klasse IB wird durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Zusätzlich zur Aktivierung durch Thyrosinkinase-Rezeptoren kann p110 β (Klasse IA) auch durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Abbildung 6).

Ras moduliert sowohl die Aktivierung der Klasse IA als auch die Aktivierung der Klasse IB PI3-Kinasen. Die Aktivierung des p85/p110 Komplexes führt zur Translokation der normalerweise zytosolischen Proteine zur Zellmembran und geht mit einem Anstieg der katalytischen Aktivität des Heterodimers einher (Cantley *et al.*, 1991; Rordorf-Nikolic *et al.*, 1995).



Abbildung 6. Aktivierung der Klasse IA und IB der PI3-Kinasen.

G α (alpha Untereinheit eines G-Proteins), G $\beta\gamma$ (beta/gamma Untereinheit eines G-Proteins), IRS (Insulinrezeptorsubstrat), PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat), PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat) (modifiziert nach Engelman *et al.*, 2006).

5.1.2.2 Produkte der PI3-Kinasen

Die PI3-Kinasen sind Lipidkinasen, die Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylinositol 4-Phosphat (PIP), Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂) an der D3 Hydroxylgruppe des Inositolrings phosphorylieren. Diese Phosphorylierung hat einen raschen Anstieg von Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat (PIP₃) und Phosphatidylinositol 3,4-Bisphosphat (PIP₂) zur Folge (Cantley, 2002; Stephens *et al.*, 1993).

Die PI3-Kinasen der Klasse I stellen *in vivo* hauptsächlich PIP₃ her. Die PI2-Kinasen der Klasse II bilden hauptsächlich PIP₂ und die Klasse III Kinasen PIP (Katso *et al.*, 2001).

5.1.2.3 Funktion und Regulation von PIP₃

PIP₃ kann an Proteine, die eine Pleckstrin homologe (PH)-Domäne besitzen, binden. Die PH-Domäne formt eine Tasche, in der Phospholipide, im besonderen PIP₃ binden können (Corvera & Czech, 1998).

Akt (Protein Kinase B), eine Serin-Threonin-Kinase, ist ein solches Ziel mit PH-Domäne (Vanhaesebroeck & Alessi, 2000). PIP₃ rekrutiert Akt und PDK1 zur Zellmembran. Sobald sich Akt an der Membran befindet, wird es durch Phosphorylierung an zwei Stellen aktiviert und phosphoryliert daraufhin eine Vielzahl anderer Ziele (Cardone *et al.*, 1998; del Peso *et al.*, 1997; Romashkova & Makarov, 1999; Vivanco & Sawyers, 2002). Die biologischen Konsequenzen der Akt Aktivierung sind breit und beinhalten sowohl die Regulation der Zellproliferation, das Überleben der Zelle als auch die Zellmotilität sowie die Zellmorphologie (Bader *et al.*, 2005; Cantley, 2002; Katso *et al.*, 2001; Vivanco & Sawyers, 2002).

Auch **PDK1** (*3-phosphoinositide-dependent kinase 1*) und möglicherweise auch PDK2 werden durch PIP₃ rekrutiert (Sarbasov *et al.*, 2005). PDK1 phosphoryliert Akt am T308 und ist an dessen Aktivierung beteiligt.

Der PIP₃ Spiegel wird durch die Aktivität von Phosphatasen reguliert. **PTEN** (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*) ist der wichtigste negative wirkende Regulator der PI3-Kinasen (Maehama & Dixon, 1999). PTEN spaltet PIP₃ zu PIP₂ und einem Phosphat und agiert exakt als katalytischer Antagonist zu den PI3-Kinasen (Parsons, 2004). PTEN ist demnach als Tumorsuppressor

anzusehen, da es negativ auf das Wachstumssignal, das PIP_3 vermittelt, wirkt (Wishart & Dixon, 2002). PTEN vermittelt außerdem den Zellzyklusarrest in der G1 Phase und steigert die Apoptoserate (Ramaswamy *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2007).

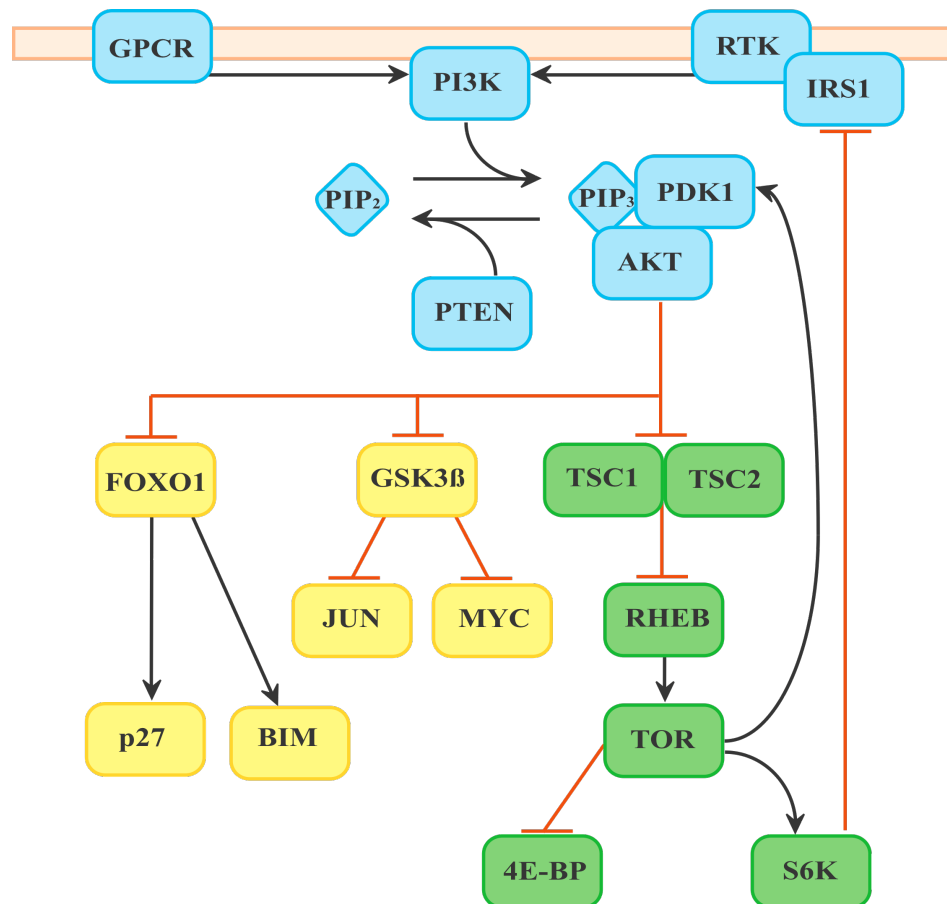


Abbildung 7. Repräsentative Interaktionen im PI3-Kinase Signalweg.

G-protein-coupled receptor (GPCR), Phosphatidylinositol (3,4,5,-)trisphosphat (PIP_3), Phosphatidylinositol (4,5,-)bisphosphat (PIP_2), PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), Akt (*cellular homolog of murine thymoma virus Akt8 oncoprotein*), Phosphatidylinositol-dependent Kinase (PDK), TSC (*tuberous sclerosis complex*), Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), TOR (*target of rapamycin*), S6K (p70 S6 Kinase), 4E-BP (*eukaryotic initiation factor 4E-binding protein*), FOXO (*forkhead box O transcription factor*), BIM (Bcl-2 interacting mediator of cell death), Jun (*cellular homolog of the JUN oncoprotein aof avian retrovirus ASV17*), Myc (*cellular homolog of the avian myelocytoma retroviral oncogene*), IRS1 (*insulin receptor substrate1*) (modifiziert nach Vogt *et al.*, 2007).

5.1.2.4 Repräsentative Ziele von Akt

FOXO, ein Transskriptionsfaktor, wird durch die Akt vermittelte Phosphorylierung inaktiviert und dadurch das nachgeordnete p27 und das proapoptotische Protein BIM herabreguliert (Hennessy *et al.*, 2005).

Die Phosphorylierung von **GSK3 β** (Glykogen-Synthase-Kinase-3 β) hemmt die GSK3-Kinaseaktivität und hebt den hemmenden Effekt auf die wachstumsstimulierenden Transskriptionsfaktoren Jun und Myc auf.

TSC (*tuberous sclerosis complex*) ist ein weiteres wichtiges Ziel von Akt. Es besteht aus den Proteinen TSC1 und TSC2. Die Phosphorylierung von TSC2 durch Akt inhibiert dessen GTPase aktivierende Funktion und ist daher als ein inhibitorisches Protein für das Ras-homolog Rheb anzusehen. Die Aktivierung von Rheb führt zur Aktivierung der Kinase TOR, die als Aktivator der Proteinsynthese durch seine Ziele S6K (p70 S6 Kinase) und 4E-BP (eukaryotischer Initiationsfaktor 4 Bindeprotein) dient (Aoki *et al.*, 2001; Bader *et al.*, 2005; Cantley, 2002; Mamane *et al.*, 2006; Vogt *et al.*, 2007).

5.1.2.5 Biologische Funktionen des PI3-Kinase Signalwegs

In Muskel- und Fettgewebe wird der **Zellmetabolismus** durch Akt reguliert. Akt stimuliert dabei die Glukoseaufnahme, indem es die Membranlokalisierung des Glukosetransporters GLUT4 vermittelt (Thong *et al.*, 2005). Zusätzlich aktiviert Akt die Glycogen-Synthase, indem es die Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3) inhibiert (Cohen & Frame, 2001). In der Leber inhibiert Akt die Glukoneogenese, indem es FOXO blockiert, welches die Transkription von Enzymen der Glukoneogenese fördert (Barthel *et al.*, 2005).

Akt vermittelt den Übergang von der G1 in die S-Phase des **Zellzyklus**, indem es FOXO blockiert und somit die Transskription von Zellzyklusinhibitoren hemmt (Burgering & Medema, 2003). Akt stabilisiert indirekt das Zellzyklus Protein c-Myc und cyclin D1, indem die GSK3 gehemmt wird (Vivanco & Sawyers, 2002).

Das **Zellüberleben** wird durch die Blockade von FOXO vermittelten proapoptotischen Proteinen, wie FasL (Fas-Ligand) und Bim (BCL2-like 11), gesichert. Akt kann außerdem das proapoptotische Protein BAD (BCL2-*antagonist of cell death*) phosphorylieren und dadurch inaktivieren. Die Degradation von p53 wird

durch die Phosphorylierung von MDM2 (*transformed 3T3 cell double-minute 2 p53-binding protein*) durch Akt eingeleitet (Vivanco & Sawyers, 2002).

Akt kann außerdem das *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2) Protein Tuberin phosphorylieren, welches daraufhin nicht mehr GTPase aktivierend auf Rheb (*small G protein Ras homologue enriched in the brain*) wirkt. Dadurch kann GTP gebundenes Rheb akkumulieren und den mTOR-raptor Kinase Komplex aktivieren. Dieser wiederum vermittelt die 4E-BP (*eukaryotic initiation factor 4E-binding protein*) Phosphorylierung, die letztendlich zu einer Steigerung der **Proteinbiosynthese** führt (Richardson *et al.*, 2004).

Das **Bewegungsvermögen** der Zelle und die **Zellpolarität** werden von den PI3-Kinasen zusammen mit Rac (small GTPase) and Cdc42 durch eine Umordnung des zellulären Aktins reguliert (Van Haastert & Devreotes, 2004).

Der intrazelluläre **Vesikelversand** wird durch Klasse III PI3-Kinasen reguliert und durch eine Aktivierung von mTOR durch Aminosäuren vermittelt (Byfield *et al.*, 2005; Nobukuni *et al.*, 2005).

5.1.3 PI3-Kinase-Signalweg vermittelte Tumorgenese

5.1.3.1 Somatische Mutationen im PI3-Kinase-Signalweg

Der PI3-Kinase Signalweg wurde das erste Mal mit Krebsentwicklung in Zusammenhang gebracht, als Vogt und Kollegen berichteten, dass das Genom des *avian sarcoma virus16* ein Onkogen enthielt, dass von einem zellulären PI3-Kinase Gen abstammte (Chang *et al.*, 1997).

Die Klasse IA der PI3-Kinasen hat sich als sehr bedeutend für die Regulation von Wachstum und Tumorgenese gezeigt. Am häufigsten mit Tumorgenese assoziiert ist dabei die PI3-Kinase α aus der Klasse IA (Samuels *et al.*, 2004). Die meisten Mutationen im Gen PIK3CA, das für die katalytische Untereinheit der PI3-Kinase α kodiert, liegen in konservierten Regionen der Helikalen- und der Kinase-Domäne von p110 α (Samuels *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich um drei *Hotspot* Regionen, in denen einzelne Aminosäuren substituiert vorliegen: E542K, E545K and H1047R (Vogt *et al.*, 2007). Eine Studie von Saal *et al* zeigte, dass in 50% der analysierten Mammakarzinome eine Mutation der PI3-Kinase α oder von PTEN vorliegt (Saal *et al.*, 2005). Laut Sangerdatenbank zur Verteilung von somatischen Mutationen im PIK3CA Gen zeigen unter anderem 26% aller Mammakarzinome, 20% der Cervix-

und Endometriumkarzinome und 14% aller Prostatakarzinome eine Mutation im PIK3CA Gen (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) (Maruyama *et al.*, 2007; Samuels & Velculescu, 2004; Velho *et al.*, 2005).

Mutationen in PTEN, die zum Verlust der PTEN Phosphataseaktivität führen, resultieren in vermehrtem Wachstum und Tumorbildung (Dahia, 2000). Die Erkenntnis, dass PTEN durch verschiedene Mutationen in Tumoren inaktiviert vorliegt, unterstreicht die Bedeutung des PI3-Kinase Signalwegs in menschlichen Karzinomen (Li *et al.*, 1997; Sansal & Sellers, 2004).

5.1.3.2 Somatische Mutationen des p85 α

Onkogene Mutationen kommen nicht nur in der katalytischen Untereinheit, sondern auch in der regulatorischen p85 α -Untereinheit vor, die von dem Gen PIK3R1 codiert wird. So sind somatische Mutationen von p85 α (Übersicht in Tabelle 1), die in soliden Tumoren von Patienten entdeckt wurden, Gegenstand gegenwärtiger Forschung (Jaiswal *et al.*, 2009).

In der Vergangenheit konnten Mutationen in PIK3R1 in Hodgkin-Lymphomzellen (Jucker *et al.*, 2002), Glioblastomen (Mizoguchi *et al.*, 2004) und Adenokarzinomen (Shi *et al.*, 2006) nachgewiesen werden. In Ovarial- und Kolontumoren wurde außerdem eine Deletionsmutante des p85 α beschrieben (Philp *et al.*, 2001). Diese Deletion befindet sich in einer Region des p85 α , die benachbart zu einer inhibitorischen Serinautophosphorylierungsstelle liegt (Ser-608) (Dhand *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass der Verlust der Autophosphorylierungsaktivität an dieser inhibitorischen Stelle zur Tumorentstehung führt (Foukas *et al.*, 2004).

Ein ähnliches Beispiel zeigt eine p85 Mutante, in der die Reste 572-724 durch ein nicht-katalytisches Fragment der Eph Tyrosinkinase ausgetauscht wurden. Diese Mutation führt zu einer konstitutiven Aktivierung der PI3-Kinase (Jimenez *et al.*, 1998).

Eine verkürzte Form des p85 (1-571), bezeichnet als p65, führt ebenfalls zu einem Anstieg der PI3-Kinase Aktivität in transfizierten Zellen. Da im p65 die iSH2 und die cSH2 Domäne fehlen, ist davon auszugehen, dass an dieser Stelle eine inhibitorische Domäne verloren gegangen ist (Chan *et al.*, 2002).

Tabelle 1. Übersicht zu Herkunft, Art und Mutation natürlich aufgetretener p85 α Mutationen.

Publikation	Gewebeart	Tumorherkunft	p85 α Domain	Position	Mutationen: Vorgang
Jimenez <i>et al.</i>, 1998	Thymus-Lymphom	Zelllinie (Maus)	i-SH2	1714	ab Base 1714 Virusequenz
Baynes <i>et al.</i>, 2000		Patient (SN- <i>polymorphism</i>)		1227 978	R409Q M326I
Philp <i>et al.</i>, 2001	Kolon Karzinom	Zelllinien (LIM2537, LIM1899, LIM2414)	Intron 12		C zu G = del exon 13
	ovarial Karzinom	(OVCAR-3)	i-SH2		A zu T
Jücker <i>et al.</i>, 2002	Hodgkin Lymphom	Zelllinie	c-SH2	1948	A 1948 del
Mizoguchi <i>et al.</i>, 2004	Glioblastom	Patient	i-SH2	1738-1745	9 Basen del
Shi <i>et al.</i>, 2006	Kolon Karzinom	Zelllinie (HCC 2998)	Intron 9	1381	T zu C C 1381 T
TCGA Network 2008	Glioblastom	Patienten	i-SH2	1128	G 376 R
			i-SH2	1311	E 439 del
			i-SH2	1377	KS 459 del N
			i-SH2	1680	DKRMNS 560 del
			i-SH2	1680	D 560 Y
			i-SH2	1692	N 564 K
			i-SH2	1722	R 574 fs
			i-SH2	1728	T 576 del
i-SH2	1749	W 583 del			

5.1.3.3 p85 α in der Hodgkin-Lymphom Zelllinie (CO)

Die Zelllinie CO wurde aus einer Patientin mit einem nodulär sklerosierenden Subtyp eines Hodgkin-Lymphoms gewonnen (Jones *et al.*, 1985). CO-Zellen sind, aufgrund des Zustandes und der Expression ihrer T-Zell-Rezeptor-Gene, als Abkömmlinge des T-Zell-Stammbaums anzusehen (Falk *et al.*, 1987). Die Zellen der CO Zelllinie

exprimieren außerdem die Protoonkogene N-myc und lck sowie ein verändertes Transkript des Protoonkogens c-fes (Jucker *et al.*, 1990).

In den CO-Zellen entdeckten Jücker und Kollegen 2002 eine veränderte Form des p85 α . Die CO-Zellen exprimieren ein 76 kDa großes Protein, das mit einem monoklonalen Antikörper gegen die n-terminale SH2 Domäne von p85 α im Western Blot nachweisbar ist. Das normale p85 α Protein war nicht nachweisbar (Jucker *et al.*, 2002).

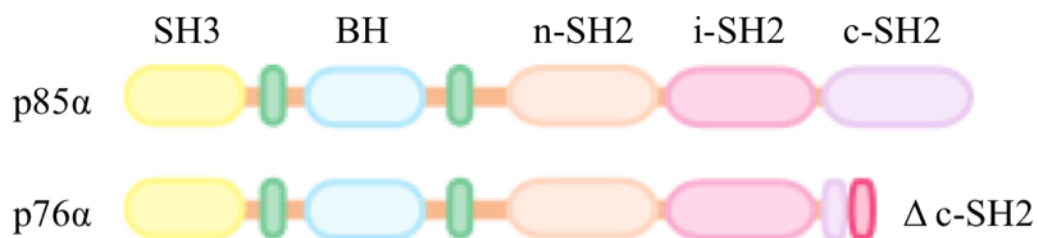


Abbildung 8. Aufbau der 76 kDa großen p85 α Untereinheit der PI3-Kinase (Jucker *et al.*, 2002).

SH2 beschreibt die Src homologe Domäne 2 (n: n-terminal; i: inter; c: c-terminal), SH3 eine Src homologe Domäne 3, BH markiert eine *Bcr* homologe Domäne.

Im Vergleich zur normalen Sequenz von p85 α liegt die Deletion eines Adenin an Position 1907 vor. Diese Basendeletion ist die Ursache für eine Leserasterverschiebung.

Die Mutante enthält 635 der ursprünglich 724 Aminosäuren und hat zusätzlich 25 neue Aminosäuren (Abbildung 8). Der Verlust der C-SH2 Domäne bedeutet den Verlust eines hoch konservierten FLVRES Motivs, das für die Bindung an phosphorylierte Tyrosine notwendig ist (Siegal *et al.*, 1998).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine PI3-Kinase abhängige konstitutive Aktivierung von Akt in CO-Zellen vorliegt. Diese Aktivierung wirkt auf die Zellen antiapoptotisch und fördert die Proliferation (Jucker *et al.*, 2002).

5.1.3.4 p85 α Mutationen mit erhöhter PI3-Kinase Aktivität in vitro

Miled und Kollegen nutzten Daten der Kristallstruktur und biochemische Verfahren, um eine bessere Kenntnis der Wirkungsweise von PI3-Kinase Mutationen zu erhalten.

Es wurden Mutationen in der ABD Domäne und der helikalen Domäne von p110 α untersucht.

E542K und E545K *hotspot* sind Mutationen der helikalen Domäne des p110 α . Bei diesen Mutationen liegt eine Substitution des negativ geladenen Glutamates zum positiv geladenen Lysin vor. Dieser Aminosäureaustausch verhindert die normale Ladungsinteraktion der helikalen Domäne des p110 α mit der n-terminalen SH2 Domäne des p85 α . Um diese Ladungsinteraktion wieder herzustellen, wurde in korrespondierenden Arealen des p85 α die natürlich vorhandenen negativ geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin zu Glutamat ausgetauscht. Durch diesen Austausch konnte die onkogene Aktivität der E542K und E545K Mutationen in vitro gehemmt werden (Miled *et al.*, 2007) (Abbildung 9).

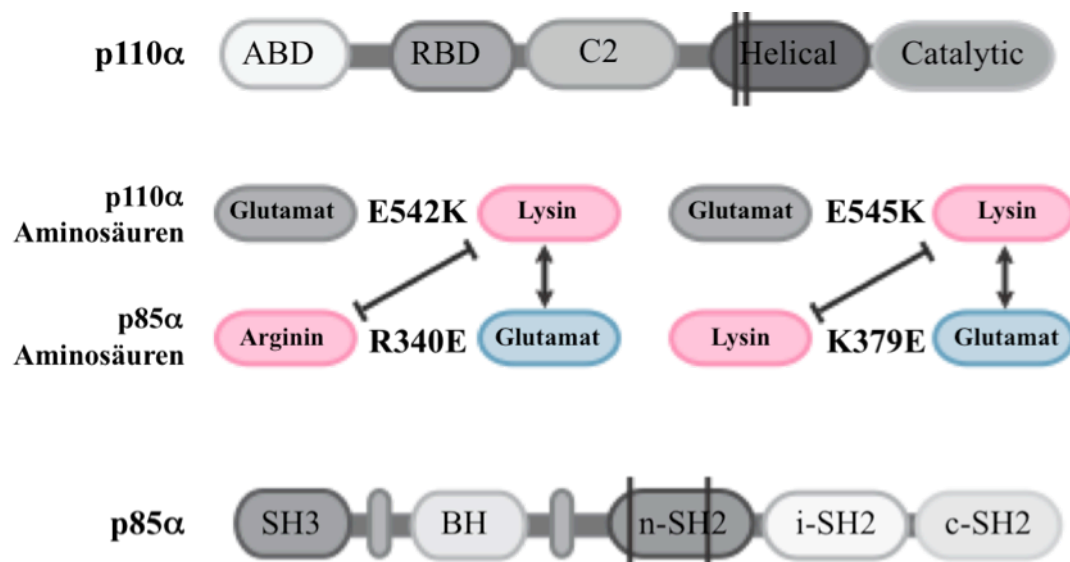


Abbildung 9. Aminosäureaustausch und Interaktionen zwischen p110 α und p85 α Mutationen.

Durch senkrechte Linien wurde in der p110 α und p85 α Übersicht die Lage der Aminosäuren 542 und 545 bzw. 340 und 379 markiert. Der mittlere Bereich der Abbildung stellt korrespondierende Aminosäuren von p110 α und p85 α , deren Ladung sowie deren Interaktion dar. Rot bedeutet positive und blau negative Ladung.

5.1.4 *Knockout* Mäuse der p85 α regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase

Eine homozygote *knockout* Maus für p85 α inklusive aller ihrer Isoformen (p55 α und p50 α) zeigte eine hohe perinatale Sterblichkeit, Lebernekrose, Hypoglykämie und Hypoinsulinämie (Fruman *et al.*, 2000).

Die nur für die p85 α Isoform spezifische *knockout* Maus zeigte Hypersensitivität für Insulin, Hypoglykämie und war lebensfähig (Terauchi *et al.*, 1999).

Die *knockout* Mäuse der p55 α und p50 α Isoformen (p85 α vorhanden) zeigen eine erhöhte Insulinsensitivität (Chen *et al.*, 2004).

5.1.5 PI3-Kinase Inhibitoren

Prinzipiell kann man Breitspektrum-inhibitoren oder Isoformen spezifische Inhibitoren der PI3-Kinase unterscheiden. Es existieren für die p110 α , β und δ Isoform spezifische Inhibitoren. Nur die p110 γ Isoform kann bisher nur mit Breitspektrum-inhibitoren erreicht werden.

Breitspektrum-inhibitoren der PI3-Kinase, wie zum Beispiel LY294002 oder Wortmannin, bewirken einen Anstieg der Apoptoserate, ein Absinken der Proliferation und konnten Metastasierungsraten *in vitro* und in Tumormodellen reduzieren (Wetzker & Rommel, 2004; Wymann & Marone, 2005). Kürzlich entwickelte duale Inhibitoren der PI3-Kinase in Kombination mit einer Hemmung von mTor induzieren einen Wachstumsarrest und Zelltod in Tumorzellen und zeigen im Vergleich zu Breitspektrum-inhibitoren eine geringere Toxizität (Fan *et al.*, 2006; Hayakawa *et al.*, 2006)).

5.2 Genexpression

Die Genexpression beginnt im weitesten Sinne mit der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und endet mit der Synthese eines voll funktionsfähigen Proteins. Die Expressionslevel der meisten Gene werden durch Transkriptionsfaktoren reguliert. Diese Proteine binden an einen regulatorischen Abschnitt der DNA, der sich 5' bzw. oberhalb der Stelle des Transkriptionsstarts befindet. Es wird angenommen, dass mehr als 5% unserer Gene für

Transkriptionsfaktoren kodieren (Tupler *et al.*, 2001). Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren wird durch unterschiedlichste Signalwege reguliert.

Einmal aktiviert, binden die Transkriptionsfaktoren im Verbund mit einer Reihe anderer regulatorischer Elemente an die DNA und rekrutieren die RNA Polymerase (I, II oder III) zum Ort des Transkriptionsstarts. Die RNA Polymerase II katalysiert die Transkription von Protein-kodierenden Genen.

Kurz nach der Initiation der Transkription wird das 5' Ende der mRNA mit einem 7-Methyl-Guanosin modifiziert. Diese *Cap*-Struktur verhindert den Abbau durch Nukleasen und dient als Exportsignal für die reife mRNA ins Zytoplasma (Proudfoot *et al.*, 2002).

In der Verlängerungsphase (Elongation) der Transkription dienen Elongationsfaktoren als regulierende Elemente (Uptain *et al.*, 1997). Durch *Splicing* der pre-mRNA werden die nicht-kodierenden Sequenzen (Introns) zwischen den kodierenden Sequenzen (Exons) entfernt.

Der Stop der Transkription erfolgt in der Terminationsphase und die neu synthetisierte mRNA wird am 3' Ende polyadenyliert (Proudfoot *et al.*, 2002).

Der Export der mRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma, dem Ort der Proteinsynthese, erfolgt durch Proteine, die Zellkernporen formen und einen bidirektionalen Transport zwischen Zytoplasma und Zellkern erlauben (Reed & Hurt, 2002).

Die Translation der mRNA zu einem Protein erfolgt an einem Ribonukleoprotein-Komplex (Ribosom) und durchläuft ebenso wie die Transkription eine Initiations-, Elongations- und Terminationsphase (Dever, 2002; Ramakrishnan, 2002).

Die Polypeptidkette durchläuft dann einen Faltungsprozess (Fersht & Daggett, 2002) und wird meist posttranslational chemisch modifiziert, um schließlich das voll aktive Protein zu erhalten.

Neueste Studien zeigen, dass jeder Schritt (Transkription und Translation) der Genexpression nur als Ausschnitt eines kontinuierlichen Prozesses anzusehen ist. Das heißt, dass alle Abläufe physisch und funktionell aneinander gekoppelt sind und als gemeinsamer ganzheitlicher Prozess zu betrachten sind (Orphanides & Reinberg, 2002).

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Verwendete Geräte

Agarose-Elektrophoresekammer	eurofins MWG GmbH (Ebersberg)
Axiovert 25	Zeiss (Jena)
Bakterienbrutschrank	Memmert (Schwabach)
Bakterienwerkbank	Intermed (Wiesbaden)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Elektrophoresekammer Protean [®] IixiCell	BioRad (München)
Feinwaage	Sauter (Ebingen)
Heizrührer Typ 50301	Heidolph (Schwabach)
Horizontalschüttler Rocky 1000/N	Fröbel Labortechnik GmbH (Lindau)
Intelligent Dark Box	Fujifilm (Japan)
Labovert	Leitz (Solms)
Las-3000	Fujifilm (Japan)
Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Olympus Tokyo	CK (Japan)
pH-Meter CG 820	Schott-Geräte GmbH (Mainz)
Power Supply EPS200	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
PowerPac 1000	Bio-Rad (München)
PowerPac [™] Universal	Bio-Rad (München)
Schutron Schnippherm	MS-Laborgeräte (Heidelberg)
Schüttelinkubator Typ 625 (USA)	New Brunswick Scientific Co. Inc.
Sonifier 450	Branson (USA)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 5415/5415C/5415R	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR (Korea)
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman (USA)

UV-Tisch (312 nm)	Bachofer (Reutlingen)
Vortexer IKAMAG [®] RH	IKA [®] -Labortechnik (USA)
Waage PM2000	Mettler (Giessen)
Wasserbad 1002/1012/1086	GFL (Hannover)
Zellkulturbrutschränke	Heraeus (Hanau)
Zellkulturwerkbank	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Sorvall [®] RC-5B	Du Pont Instruments (Frankreich)
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus (Hanau)

6.1.2 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml-Reaktionsgefäße	Biozym (Hess. Oldendorf)
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
2,0 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
10 ml-Röhrchen	Greiner (Frickenhausen)
15 ml -Röhrchen	Greiner (Frickenhausen)
25 ml-Weißkappenröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
50 ml-Röhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Polypropylenrundbodenröhrchen	Beton-Dickinson (Sparks, MD, USA)
Ultrazentrifugenröhrchen	Kontron Instruments (Neufahrn)
Gewebekulturflaschen T25	Greiner (Frickenhausen)
Gewebekulturflaschen T75	Greiner (Frickenhausen)
Gewebekulturschalen (9 cm)	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)

6.1.3 Oligonukleotide

6.1.3.1 Primer

Die folgenden Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Software *Primer3* Version 3.0 (Rozen 2003) ermittelt und von der Firma MWG Biotech GmbH hergestellt. Die Oligonukleotide wurden mit der Datenbank des *National Institute for Biotechnology Information* (NCBI) auf ihre Spezifität abgeglichen und dann in Polymerasekettenreaktionen sowie in Sequenzierungen eingesetzt.

Primer *real time* PCR:

P85 FP 1755: 5' - CCA GCT GAG AAA GAC GAG AGA - 3'

P85 RP 2029: 5' - CCA CTA CAG AGC AGG CAT AGC - 3'

Primer zur Amplifizierung des 3'UTR von p85 α :

p85 FP 1 1213: 5' -GGC TTC TCT GAC CCA TTA ACC - 3'

p85 RP 7 5878: 5' -CTA TTT CCT CCC CAC CCA TAA- 3'

Primer zur Sequenzierung des 3'UTR

SQ FP 1: 5' - TCC AGC TGA GAA AGA CGA GAG - 3'

SQ FP 2: 5' - ACA GCA ACT GGC TAT GGC TTT - 3'

SQ FP 3: 5' - GTA GGG GAA GAC ATG CAG CCT - 3'

SQ FP 4: 5' - GTT TGG TCC AGC CTG GTT TAG - 3'

SQ FP 5: 5' - GAT GGA TTT GTA TCA ATA CCA - 3'

SQ FP 6: 5' - CTT GTA CAG AGT ACT TGG CTG - 3'

SQ FP 7: 5' - GGC AAG GTT ATA TGC ACT TTC - 3'

SQ FP 8: 5' - TGG TGG TAT GTT GGT TAC CCT - 3'

SQ FP 9: 5' - GTG TTG GGA GGC ATA AAG ACT - 3'

SQ FP 10: 5' - GCA AGA CTG TTA GCC CTC AAA - 3'

SQ FP 11: 5' - CTT TGC AAG ATG ATA CGG TAT - 3'

SQ FP 12: 5' - TAT CCA TGC GTC AGT TTT TCC - 3'

SQ FP 13: 5' - TGG GAT TTT TCC CTT TGA GGT - 3'

SQ FP 14: 5' - CCT ACT GAT GTT CCT TTG GAA - 3'

Mutagenese-Primer zur Zerstörung der Sfi Schnittstelle in p85 α :

p85 delSfi Forward:

5' -ACA CCA AAG CCC CGA CCA CCT CGA CCT CCT CCT GTT GCA - 3'

p85 delSfi Reverse:

5' -TGC AAC AGG AAG AGG TCG AGG TGG TCG GGG CTT TGG TGT - 3'

Mutagenese-Primer für p85 α Mutation, die zu E545K und E542 in p110 α

korrespondieren:

p85 R340E Fwd:

5' -CTG GGG AGA TAT CTC GGA GGA AGA AGT GAA TGA AAA AC - 3'

p85 R340E Rev:

5' - GTT TTT CAT TCA CTT CTT CCT CCG AGA TAT CTC CCC AG - 3'

p85 K379E Fwd:

5' - GGA AAG GGG GAA ATA ACG AAT TAA TCA AAA TAT TTC ATC - 3'

p85 K379E Rev:

5' - GAT GAA ATA TTT TGA TTA ATT CGT TAT TTC CCC CTT CC - 3'

PCR Primer zur Einführung von MluI bzw. Sall Enden:

p85 MluI Fwd: 5' - GTA CGC GTA TGA GTG CTG AGG GGT ACC AG - 3'

p85 Sall Rev: 5' - GTG GTC GAC TCA TCG CCT CTG CTG TGC ATA TAC - 3'

6.1.4 Puffer- und Stammlösungen

Blockierlösung
 95% 1 x TBS/0,5% Tween 20
 5% *NonFatDryMilk*

CLM-Medium
 500 ml F10 Medium
 62,5 ml *Bovine Calf Serum*
 25 ml *Chicken Serum*
 6,25 ml *Vitamins*
 6,25 ml *Folic Acid*
 5 ml Penicillin/Streptomycin
 2,5 ml DMSO

Crystalviolett
 2% Crystalviolett
 20% Methanol
 H₂O

DC3-Medium
 500 ml F10 (2x) Medium
 35 ml FCS
 12,5 ml *Chicken Serum*
 100 ml *Tryptose Phosphate*
 12,5 ml DMSO
 10 ml Penicillin/Streptomycin

DNA-Ladepuffer (1x)	166,7 μ M EDTA pH 8,0 5% Glycerin 0,025% Bromphenolblau 0,025% Xylencyanol
GM-Medium	500 ml F10 Medium 31,5 ml <i>Bovine Calf Serum Iron Supplemented</i> 5 ml Penicillin/Streptomycin
Homogenisationspuffer	20 mM Hepes pH 7,8 100 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 0,5% Triton C-100 2 mM DTT 1 x Complete (EDTA-free) 100 μ g/ml Cycloheximid H ₂ O
Ladepuffer (1x)	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 3% SDS 10% Glycerol 0,01% Bromphenolblau
Ladepuffer (3x)	180 mM Tris-HCl pH 6,8 6% SDS 30% Glycerol 0,01% Bromphenolblau
Laufpuffer (10x)	144 g Glycin 30 g Tris <i>ad</i> 1 L ddH ₂ O
LB-Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% Natriumchlorid pH 7,4 mit Natronlauge einstellen

MOPS Puffer (10x)	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA DEPC-H ₂ O pH 7,0
NP40-Lysepuffer	50 mM Hepes pH 7,5 150 mM Natriumchlorid 1% Nonident P 40 1% Aprotinin 2 mM EDTA 50 mM Natriumfluorid 10 mM Natriumpyruvat 10% Glycerol 1 mM Natriumorthovanadat 1 mM PMSF
PBS	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 4,3 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 1,4 mM Dikaliumhydrogenphosphat pH 7,4 mit Salzsäure einstellen
SOB Medium (pro Liter)	20,0 g Trypton 5,0 g Hefeextrakt 0,5 g Natriumchlorid add dH ₂ O to 1 Liter 10 ml Magnesiumchlorid (1M) 10 ml Magnesiumsulfat (1M)
SOC Medium (100 ml)	1 ml Glukose (2M) 99 ml SOB Medium
<i>Stripping</i> -Puffer	40 ml 10% SDS 6,25 ml Tris/HCL 2M pH 6,7 1,578 ml β-Mercaptoethanol 152,172 ml H ₂ O

Sukrose-Gradienten-Puffer HKM	20 mM Hepes pH 7,6 100 mM Kaliumchlroid 20 mM Magnesiumchlorid H ₂ O
Sukrose-Gradienten-Puffer HKM70	20 mM Hepes pH 7,6 100 mM Kaliumchlroid 20 mM Magnesiumchlorid 70% Sukrose H ₂ O
TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris-HCl pH 8,0 13 mM Essigsäure 1 mM EDTA
TBS (1x)	0,1 M Tris-HCl pH 8,0 1,4 M Natriumchlorid
Transferpuffer	1x Laufpuffer 1/5 Volumen Methanol 1% SDS
TSS (<i>Transformation and Storage Solution</i>)	1 g Tryptone 0,5 g Yeast Extract 0,5 g NaCl 0,41 ml MgCl ₂ (4,9 M) or 2 ml (1M MgCl ₂) 0,36 g Glukose 10g PEG 8000 5 ml DMSO mit H ₂ O auf 100 ml pH 6,5 – 6,8
Waschlösung	97,5% 1 x TBS/0,5% Tween 20 2,5% <i>NonFatDryMilk</i>

Zellkernlysepuffer	20 mM Tris-HCl
	70 mM NaCl
	1 mM EDTA
	10% Glycerol
	1% Triton X-100
	0,5% NP-40 Lysepuffer
	50 mM Natriumfluorid
	10 mM Natriumpyrophosphat
	1 mM Natriumorthovanadat
	200 kIU/ml Aprotinin Trasylol ®
	1 mM PMSF

6.1.5 Antikörper

Folgende Primär-Antikörper wurden verwendet:

β -Aktin (#4967): wird von der Firma Cell Signaling Technology, Inc. hergestellt. Der polyklonale Kaninchenantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 im Western Blot verwendet.

c-SRC (SRC 2): sc-18 hergestellt von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc. c-SRC hat ein Molekulargewicht von 60 kDa. Es handelt sich um einen polyklonalen Kaninchenantikörper, der in einer Verdünnung von 1:250 verwendet wurde.

GAPDH (6C5): sc-32233 hergestellt von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc. GAPDH hat ein Molekulargewicht von 37 kDa. Der GAPDH Antikörper ist ein monoklonaler Mausantikörper, der in einer Verdünnung von 1:250 verwendet wurde.

Lamin B (M-20): sc-6217 hergestellt von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc. Das Molekulargewicht von Lamin B beträgt 67 kDa. Der Antikörper ist ein polyklonaler Ziegenantikörper, der gegen Peptide des C-Terminus von Lamin B1 in Mäusen gerichtet ist. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:250 verwendet.

Phospho-Akt (Ser 473) (193 H 12) wird von der Firma Cell Signalling Technology, Inc. hergestellt. Der Antikörper ist ein Kaninchenantikörper, der Akt erkennt, wenn es an Ser473 phosphoryliert ist. Phospho-Akt hat ein Molekulargewicht von 60 kDa. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

PI3-Kinase p85 α (B-9): sc-1637 hergestellt von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc. Der Antikörper ist ein monoklonaler Mausantikörper, der gegen die Aminosäuren 333-430 der N-terminalen SH2 Domäne des humanen p85 α gerichtet ist und in der Verdünnung 1:1000 oder 1:250 verwendet wurde.

PI3-Kinase p85 Klon UB93-3 hergestellt von der Firma Upstate[®] Cell Signaling Solutions (#05-217) ist ein Mausantikörper, der die N-terminale SH2 Domäne von p85 α erkennt und in einer Verdünnung von 1:500 verwendet wurde.

PI3-Kinase p110 (D-4): sc-8010 hergestellt von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc. Der Antikörper ist ein monoklonaler Mausantikörper, der gegen die Aminosäuren 800-1039 des humanen p110 gerichtet ist. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:150 verwendet.

Ubiquitin (P4D1) wird von der Firma Cell Signaling Technology, Inc. hergestellt. Der monoklonale Mausantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 im Western Blot verwendet.

VSV-G tag (ab1874) wird von der Firma Abcam hergestellt. Der monoklonale Kaninchenantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:625 im Western Blot verwendet.

Folgende Sekundär-Antikörper wurden verwendet:

Ziege anti-Maus IgG-HRP: sc-2055 hergestellt von der Firma Santa Cruz Biotechnology (*human-adsorbed*). Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet.

Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP: sc-2004 hergestellt von Santa Cruz Biotechnology.

Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet.

Esel anti-Ziege IgG-HRP: sc-2056 hergestellt von der Firma Santa Cruz Biotechnology. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet.

6.1.6 Inhibitoren

Der Proteasomen Inhibitor MG-132 # 474790 wurde von der Firma Calbiochem bezogen, 5 mg in 500 µl Ethanol gelöst und bei -20°C gelagert.

6.2 Methoden

6.2.1 Zellbiologische Methoden

6.2.1.1 Zellkultur Stammhaltung

Die Suspensionszellen der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie CO wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert. 500 ml des RPMI 1640-Mediums, das Glutamax enthielt, wurden zusätzlich 50 ml fetales Kälberserum, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugefügt. Die Zellen wurden durchschnittlich nach 3 Tagen im Verhältnis 1:3 geteilt und bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt der Luft kultiviert.

Die Kultivierung der adhärenenten embryonalen Nierenzell-Zelllinie HEK 293T erfolgte in DMEM Medium, das mit fetalem Kälberserum (Endkonzentration 10%), 50 µg/ml Streptomycin sowie 50 U/ml Penicillin ergänzt wurde. Bei einer Konfluenz von ca. 75% wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 geteilt und bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt der Luft kultiviert.

Die Kultivierung der CEF-(*chicken embryo fibroblasts*) Zellen erfolgt in den ersten Tagen der Sekundärkultur in GM-Medium. Danach wird die Sekundärkultur dieser Zellen in CLM-Medium bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt der Luft kultiviert und durchschnittlich nach 2 Tagen im Verhältnis 1:4 gesplittet.

6.2.1.2 Sekundärkultur der CEF

Der Agarüberzug der Primärkultur wird entfernt, die Kulturschale mit 5 ml PBS gespült und das PBS abgenommen. Danach erfolgt die Trypsinierung für 25 Sekunden. Das Trypsin wird dann schnell abgenommen und die Kulturschale leicht mit dem Boden angeschlagen, um die Zellen zu lockern. Die Kulturschale wird mit 5 ml GM-Medium gespült, die Zellen im Medium aufgenommen und in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Nach der Bestimmung der Zellzahl, werden pro well einer 6-well Platte 5×10^5 Zellen in 2 ml Medium und pro 10cm Kulturschale $2,5 \times 10^6$ Zellen in 10 ml Medium ausgesät.

6.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Nach gründlicher Suspension der Zellen im Medium wurde ein Aliquot aus der Kultur entnommen und 1:1 mit dem Farbstoff Trypanblau versetzt. Der Farbstoff Trypanblau wurde benutzt, um tote von lebendigen Zellen zu unterscheiden. Tote Zellen werden durch ihre degradierte Zellmembran komplett gefärbt, während lebendige Zellen hell erscheinen, da sie den Farbstoff erst nach längerer Inkubation aufnehmen.

Das Gemisch aus Farbstoff und Zellsuspension wurde in eine Neubauerzählkammer gegeben und eine durchschnittliche Zellzahl aus allen 4 Quadranten ermittelt.

6.2.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.2.1 RNA Isolation nach der Trizol-Methode

Es wurden 1×10^7 CO-Zellen aus der Kultur entnommen, zentrifugiert, in reinem RPMI 1640 Medium resuspendiert und nochmals zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde dann in 1 ml Trizol resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l 1-Brom-3-chlorpropan wurde die Probe für 15 Sekunden geschüttelt, 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 11000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde die obere Phase, die die RNA Fraktion enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Reinigung der RNA wurden je 500 μ l von Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis von 125:25:1 zugegeben, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation wurde die obere farblose Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Fällung der RNA wurde 1 μ l Glycogen (20 mg/ml) und 500 μ l Isopropylalkohol zugegeben, das Reaktionsgefäß 5 Mal invertiert und danach für 10 Minuten bei -20°C inkubiert.

Der Überstand wurde nach für 10 Minuten Zentrifugieren mit 13000 rpm bei 4°C verworfen und die RNA nach Zugabe von 1 ml Ethanol (75%) bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurden folgende Schritte durchgeführt.

Das RNA/Ethanolgemisch wurde für 5 Minuten bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurde noch einmal 1 ml Ethanol (75%) zugegeben, für 5 Minuten bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das RNA Pellet 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, 30 Minuten in 20 µl TE Puffer gelöst und 5 Minuten bei 70°C inkubiert.

Zur Bestimmung der Konzentration der RNA wurde die optische Dichte bei 260 nm im Photometer gemessen. Der Quotient der Wellenlänge 260/280 gibt außerdem Auskunft über die Reinheit der RNA (siehe Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren).

Um über den Degradationszustand der RNA Auskunft zu erhalten, wurden 0,5 µg RNA pro Probe in einem Agarosegel (1%) aufgetragen. Die undegradierete RNA zeigte bei 800 bp und bei 1,5 kb zwei Banden im Verhältnis von 1:2, welche der 18S und der 28S Untereinheit der ribosomalen RNA entsprechen.

Zur abschließenden Lagerung bei -80°C wurde die in TE Puffer gelöste RNA mit dH₂O auf 45 µl aufgefüllt und 5 µl NaCl (5 M) sowie 125 µl Ethanol (100%) zugegeben.

6.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Proben der Nukleinsäuren wurden in einer Verdünnung von 1:100 in eine Einmalküvette gegeben und in einem Eppendorf BioPhotometer 6131 analysiert. Anhand der Absorbtionswerte konnten die Konzentrationen für verschiedene Nukleinsäuren wie folgt berechnet werden:

dsDNA: $A_{260} = 1 \text{ OD} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$

ssDNA: $A_{260} = 1 \text{ OD} = 33 \text{ ng}/\mu\text{l}$

ssRNA: $A_{260} = 1 \text{ OD} = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$

Der Grad der Verunreinigung durch Proteine konnte anhand des Quotienten der OD bei 260 nm durch 280 nm beurteilt werden. Dies war möglich, da Nukleinsäuren unter UV Licht von 260 nm ein Absorbtionsmaximum aufweisen, wohingegen Proteine und Salze bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm ein Absorbtionsmaximum besitzen. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2 wies auf eine hohe Reinheit der Nukleinsäuren hin.

6.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die horizontale Agarosegelelektrophorese wurde benutzt um DNA bzw. RNA Moleküle entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Dabei wandern kleinere negativ geladene Fragmente schneller zur positiv geladenen Anode als größere Fragmente.

Zur Herstellung eines 1% Agarosegels wurden TAE und peq GOLD Universal Agarose im Verhältnis von 100:1 in ein Becherglas gegeben und in der Mikrowelle drei Mal aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid und der Transfer in einen Gelträger. Nachdem der Kamm im Gel positioniert wurde, härtete das Gel für ca. 30-45 Minuten bei 4°C Raumtemperatur und wurde dann mit dem Gelträger in eine Gelelektrophoresekammer überführt.

Das Agarosegel wurde dann wahlweise mit DNA oder RNA beschickt, die mit TE Puffer verdünnt und mit Ladepuffer (5% Glycerin, 166,7µM EDTA ph 8, 0,0025% Bromphenolblau, 0,0025% Xylencyanol) gemischt wurde. Außerdem wurde ein Größenmarker aufgetragen. Wahlweise standen Hyperladder I von Bioline oder der Lambda DNA/Hind III Marker zur Verfügung.

Da Ethidiumbromid in DNA bzw. RNA interkaliert und bei UV Licht von 312 nm Wellenlänge fluoresziert, konnten unter einem Transilluminator die Banden der DNA bzw. RNA Fragmente sichtbar gemacht und fotografiert werden.

6.2.2.4 Erststrang cDNA Synthese

Um eine optimale cDNA Synthese zu gewährleisten, wurde das Gemisch aus RNA, TE Puffer, H₂O, NaCl und Ethanol für 30 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurde dabei genau so viel RNA präzipitiert, wie in der cDNA Synthese benötigt wurde. Das RNA Pellet wurde dann 10 Minuten in der Lyophilie getrocknet und anschließend in RNase freiem Wasser von Stratagene resuspendiert.

Zur Erststrang cDNA Synthese wurde das Accu Scirpit © High Fidelity RT-PCR System von Stratagene benutzt und der Ansatz laut Protokoll mit 0,5 µg RNA und oligo (dT) Primern (100 ng/µl) benutzt. Pro 0,5 µg RNA konnten 10 µl cDNA hergestellt werden.

6.2.2.5 Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation des 3' UTR von Wildtyp und mutierter 85 α -mRNA

Nach dem Protokoll des Accu Scirpit © High Fidelity RT-PCR System der Firma Stratagene wurden folgenden Komponenten für die Polymerasekettenreaktion verwendet.

- 40 μ l RNase freies Wasser
- 5 μ l 10x PCR Puffer
- 1 μ l dNTP Mischung (10 mM von jedem)
- 1 μ l Primer: p85 FP 1 1213 (10 pM/ μ l)
- 1 μ l Primer: p85 RP 7 5878 (10 pM/ μ l)
- 1 μ l cDNA
- 1 μ l Pfu Ultra HF DNA Polymerase (2,5 U/ μ l)

Das PCR Reaktionsgemisch wurde in einem Thermocycler der Firma Eppendorf platziert und folgendes Programm durchlaufen:

Tabelle 2. 3' UTR PCR Programmablauf

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	94°C	3 Minuten
40	94°C	1 Minute
	58°C	2 Minuten
	72°C	15 Minuten
1	72°C	7 Minuten
1	4°C	unbestimmt

Abschließend wurde die DNA isoliert und in den *pSC-B Blunt PCR Clonig* Vektor kloniert.

6.2.2.6 Polymerasekettenreaktion zur Verteilung von Wildtyp und mutiertem p85 α

Folgende Komponenten wurden für einem 50 μ l PCR Ansatz benutzt:

- 5 µl 10x PCR Puffer (enthält 15 mM MgCl₂)
 10 µl 5x Q-Solution
 1 µl dNTP Mischung (10 mM von jedem)
 1 µl Primer: p85 FP1 1213
 1 µl Primer: p85 RP1 2182
 1 µl Taq Polymerase (Qiagen)
 2 µl cDNA
 29 µl dH₂O

Das Reaktionsgemisch wurde in einem Thermocycler der Firma Eppendorf platziert und folgendes Programm verwendet.

Tabelle 3. Verteilung von Wildtyp und mutiertem p85α PCR Programmablauf

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	94°C	2 Minuten
40	94°C	1 Minute
	55°C	2 Minuten
	72°C	5 Minuten
1	72°C	7 Minuten
1	4°C	unbestimmt

Danach wurden die PCR Proben in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die DNA isoliert und in den Vektor *pCR® 2.1-TOPO®* kloniert.

6.2.2.7 Mutagenese

Folgende Komponenten werden zu einem 50 µl Reaktionsansatz benutzt:

- 5 µl Reaktionspuffer (Pfu Turbo)
 1 µl Vektor-DNA (10 ng)
 1 µl sense Primer (125 ng/µl)
 1 µl antisense Primer (125 ng/µl)
 1 µl dNTPs
 3 µl Qick Solution
 38 µl H₂O

Das Reaktionsgemisch wird für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Dann wird 1µl der Polymerase Pfu Turbo zugegeben und das Reaktionsgefäß 2 Minuten auf Eis inkubiert, bis deren Temperatur unter 37°C gesunken ist.

Danach wird im Thermocycler Perkin Elmer PCR System 2400 folgendes Programm ausgeführt:

Tabelle 4. Mutagenese PCR Programmablauf

Zyklen	Temperatur	Dauer
18	95°C	50 Sekunden
	60°C	50 Sekunden
	68°C	7 Minuten
1	68°C	7 Minuten
1	4°C	unbestimmt

Die 60°C der Annealingtemperatur werden an die verwendeten Primer und die Zeit der Elongation der verwendeten Ausgangs-DNA angepasst.

6.2.2.8 Quantitative *real time* Polymerasekettenreaktion

Bei der *real time* PCR (RT-PCR) wird die Produktakkumulation in Echtzeit verfolgt. Dadurch kann die exponentielle Phase der Reaktion identifiziert werden und in der Folge für eine Quantifizierung der Ausgangsmenge genutzt werden. Die Messung der Produktzunahme geschieht durch Fluoreszenzlicht, das in Abhängigkeit der Produktmenge emittiert wird.

Zur Durchführung der quantitativen *real time* Polymerasekettenreaktion wurde das LightCycler-FastStart SYBR Green Kit der Firma Roche verwendet. Der *real time* PCR Ansatz für eine Probe wurde folgendermaßen angesetzt.

9,6 µl dH₂O

2,4 µl MgCl₂ 25mM

2,0 µl Primer 1 (5 pmol)

2,0 µl Primer 2 (5 pmol)

2,0 µl LightCycler-FastStart DNA Master SYBR-Green I

Der PCR Ansatz wurde vorsichtig in die Glaskapillare pipettiert. Dann wurden 2,0 µl cDNA zugegeben, die Kapillaren in einem gekühlten Adapter für 30 Sekunden bei 1200 rpm zentrifugiert und abschließend in das Karussell des *Light Cyclers* gestellt.

Folgendes Programm wurde im LightCycler benutzt.

Tabelle 5. Real time PCR Programmablauf

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95°C	600 Sekunden
45	95°C	0 Sekunden
	57°C	5 Sekunden
	72°C	20 Sekunden
1	65°C	15 Sekunden
1	40°C	30 Sekunden

6.2.2.9 PCR Aufreinigung

Die PCR Aufreinigung wird mit dem *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen durchgeführt. Dazu wird das PCR-Reaktionsgemisch (eine Volumeneinheit) mit 5 Volumeneinheiten des Puffers PBI gemischt und durch Zentrifugieren an eine *QIAquick* Säule gebunden. Danach wird 0,75 ml Puffer PE auf die Säule gegeben. Nach 30 Sekunden zentrifugieren wird der Überstand verworfen und die Säule nochmals ohne Puffer zentrifugiert. Die gereinigte Säule wird in eine neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 30 µl H₂O eluiert und gleichzeitig konzentriert.

6.2.2.10 Gelextraktion

Der Gelextraktion vorausgehend, wurden die gewünschten Banden des PCR Produktes blind aus dem Gel ausgeschnitten. Das heißt, dass die Lage der gewünschten Banden durch eine Kontrollbande unter UV Licht markiert und alle anderen Banden, die in der Gelextraktion weiter verarbeitet werden sollen, wurden ohne UV Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Dieses Vorgehen vermied unerwünschte Doppelstrangbrüche durch UV Licht.

Zur weiteren Verarbeitung wurde das *QiaquickTM Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen verwendet. Pro Volumeneinheit Gelstück wurden 3 Volumeneinheiten QG Puffer zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei 50°C waren die Gelstücke gelöst. Nach Zugabe von einer Gelvolumeneinheit Isopropanol wurde das Gemisch auf eine Säule gegeben, für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Nun folgten zwei Waschschriffe, um Gelbestandteile von der Säule zu entfernen. Auf die Säule wurde nun 500 µl QG Puffer gegeben, die Säule zentrifugiert und das Eluat verworfen. Danach folgte die Zugabe von 750 µl PE Puffer, 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugieren. Auch dieses Eluat wurde verworfen. Nach Zugabe von 50 µl H₂O wurde die gebundene cDNA bei 13000 rpm in einem neuen Reaktionsgefäß zentrifugiert und das Eluat bei 4°C gelagert.

6.2.2.11 Ligation

Der jeweiligen Polymerase entsprechend, wurde mit Rücksicht auf *blunt* oder TA Enden des PCR Produktes entweder eine *blunt* oder TA Klonierung vorgenommen.

Das aufgereinigte PCR Produkt (siehe Gelextraktion) wurde nach dem Protokoll des *StrataCloneTM Blunt PCR Cloning Kit* zusammen mit dem Klonierungspuffer und dem Vektor (pSC-B 3,5 kb) 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach auf Eis bzw. bei -20°C gelagert.

Alternativ dazu wurde das *TOPO TA Cloning® Kit* mit dem 3,9 kb großen pCR®2.1-TOPO® Vektor verwendet. 4 µl des PCR Produktes, 1 µl Salzlösung und 1 µl TOPO® Vektor wurden gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur und danach auf Eis inkubiert.

6.2.2.12 Transformation

Zur Transformation wurden kompetente Zellen aus dem *StrataCloneTM Blunt PCR Cloning Kit* verwendet. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zusammen mit dem Ligationsansatz für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Der Transformationsansatz wurde dann für 2 Minuten auf Eis inkubiert und dann mit 250 µl SOC Medium für eine Stunde bei 37°C mit 200 rpm geschüttelt. Zur Unterscheidung zwischen Kolonien, die zwar einen Vektor, aber kein

Insert trugen und Kolonien, die das vollständige Vektor-Insert-Konstrukt enthielten, wurde das *Blue-White-Screening* eingesetzt. Dazu wurde vor der Ausplattierung der Bakterien auf einer Ampicillin-Agarplatte 40 µl X-Gal (2%) ausgestrichen. Der Transformationsansatz wurde dann auf LB-Ampicillin-X-Gal Platte ausplattiert und 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

Wenn das *TOPO TA Cloning® Kit* verwendet wurde, wurde folgende Transformation durchgeführt. 2 µl des Ligationsansatzes wurden mit TOP10 *E. coli* von Invitrogen gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 30 Sekunden Hitzeschock bei 42°C wurde der Ansatz auf Eis gestellt, 250 µl SOC Medium zugegeben und eine Stunde bei 37°C mit 200 rpm geschüttelt. Danach wurden 25 µl, 50 µl und 160 µl Ansatz jeweils auf einer LB Agarplatte ausplattiert und 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

6.2.2.13 Minipräparation von Plasmid-DNA

Eine Anzahl ausgewählter Klone wurde von der Agarplatte gepickt und je Klon in 5 ml LB-Medium, das 50 µg/ml Ampicillin enthielt, 16 Stunden bei 37°C geschüttelt. Es wurden dann zweimal 2 ml Bakteriensuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß 20 Sekunden zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Auf das Bakterienpellet wurde dann 100 µl des Puffers P1 (*QIAfilter Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen) gegeben und das Pellet gut resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µl des Puffers P2, wurde das Reaktionsgefäß 8 Mal invertiert und danach 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dann folgte die Zugabe von 150 µl des Puffers P3 und wieder wurde das Reaktionsgefäß 8 Mal invertiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 4°C und 13000 rpm wurde der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gemischt. Nach 30 Minuten Fällung bei -20°C folgten 30 Minuten Zentrifugieren bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen, 500 µl Ethanol (-20°C, 70%) zugegeben, 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Ethanol wurde vorsichtig aus dem Reaktionsgefäß abgegossen, das Pellet aus Plasmid-DNA für 10 Minuten in der Lyophille getrocknet und abschließend in 25 µl H₂O resuspendiert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde dann photometrisch bestimmt.

6.2.2.14 Midipräparation von Plasmid-DNA

Die Midipräparation von Plasmid-DNA wird mit dem *Qiagen Plasmid Midi Kit* durchgeführt. 50 ml Bakterienkultur werden bei 6000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 4 ml P1 Puffer resuspendiert. Dann werden 4 ml P2 Puffer dazugegeben, das Falcon 5 x invertiert und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P3 wird der Ansatz gemischt und nochmals für 10 Minuten bei Raumtemperatur in der QIAfilter *Cartridge* inkubiert. Die Quiagen-tip Säule wird mit Puffer äquilibriert, das Bakterienlysat auf die Säule gegeben und mit Waschpuffer gereinigt. Danach erfolgt die Elution der Plasmid-DNA aus der Säule und die Fällung mit 3,5 ml Isopropanol. Die Plasmid-DNA wird dann für 45 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 2 ml 70% Ethanol wird nochmals für 20 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das DNA Pellet wird dann luftgetrocknet, in 100-200 µl H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

6.2.2.15 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde zur Kontrolle der Plasmidisolation durchgeführt. Enzymkonzentration, Pufferzusammensetzung und Verdauungstemperatur wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die DNA Fragmente wurden dann in einer Agarosegelelektrophorese nach der Höhe der sichtbaren Bande und somit ihrer Größe beurteilt.

6.2.2.16 Sequenzierung

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA basierte auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger, bei der der Einbau von Didesoxynukleotiden zum Abbruch der Polymerisation führt (Sanger *et al.* 1977). Sowohl Puffer (HT-Puffer) als auch Enzymansatz (*Big Dye*) wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bezogen. Der Reaktionsansatz von insgesamt 20 µl bestand aus 0,5 µg Plasmid-DNA, 15 pmol Primer, 6 µl HT-Puffer, 2µl *Big Dye* und H₂O.

Folgendes Programm wurde in einem Thermocycler der Firma Eppendorf durchlaufen:

Tabelle 6. Sequenzierung PCR Programmablauf

Zyklus	Temperatur	Zeit
1	95°C	1 Minute
35	96°C	30 Sekunden
	50°C	15 Sekunden
	60°C	4 Minuten
1	4°C	unbestimmt

Das PCR Produkt wurde nach Beendigung des Programms im Thermocycler mit 80 µl Natriumacetat (0,3 M) und 250 µl gekühltem Ethanol gemischt. Nach 30 Minuten Zentrifugieren mit 13000 rpm bei 4°C wurde der Überstand verworfen und 1 ml kaltes Ethanol (70%) in das Reaktionsgefäß gegeben. Danach erfolgten 15 Minuten Zentrifugieren mit 13000 rpm bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Analyse fand unter Einsatz des Sequenziergerätes *3100 Genetic Analyser* von Applied Biosystems im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf statt.

6.2.2.17 Polysomen Präparation

Zur Vorbereitung der Polysomen Präparation wurde der Sucrose-Stufengradient nach folgendem Schema in 5 Stufen a 1,8 ml angesetzt und über Nacht bei 4°C gelagert.

Tabelle 7. Übersicht des HKM Puffer im Sucrose-Stufengradient

	10%	20%	30%	40%	50%
HKM Puffer	6 ml	5 ml	4 ml	3ml	2 ml
HKM70 Puffer	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml

Um die Polysomenkomplexe zu stabilisieren, wurden 8×10^7 CO-Zellen 20 Minuten vor der Zellernte mit Cycloheximid (100 µg/ml) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension zentrifugiert, das Medium abgesaugt, das Zellpellet mit PBS gespült, nochmals zentrifugiert und das PBS verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und 130 µl Zellsediment im Homogenisator verwendet. Das Pistill wurde 20 Mal auf und ab bewegt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit auf Eis wurde das Pistill nochmals 20 Mal auf und ab bewegt

und das Homogenat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 16400 x g und 4°C wurde das Sediment verworfen und der Überstand, in dem sich die Polysomen befanden, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Etwa 1,1 ml des Überstandes wurde auf den vorbereiteten Sukrose-Stufengradienten geschichtet, das Gradientenröhrchen sorgfältig tariert und 105 Minuten bei 41000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Aus dem Sukrose-Stufengradienten wurden dann vorsichtig 500 µl Fraktionen abgenommen und jede zweite Fraktion zur Fällung der RNA verwendet.

Es wurden 500 µl Gradientenfraktion, 2 µl tRNA als Carrier (20 mg/ml) und 20 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gemischt, das 2,5 fache Volumen Ethanol zugegeben und das Gemisch zur Fällung der RNA 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach 30 Minuten Zentrifugieren bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit Ethanol (80%) gewaschen, zentrifugiert und die RNA getrocknet.

Zur Reinigung der RNA wurde das RNA Pellet in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert und 1000 µl *PeqGold RNA Pure* dazugegeben, sorgfältig gemischt und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform zugegeben, 15 Sekunden gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 5 Minuten mit 12000 x g zentrifugiert. Aus dem Reaktionsgefäß wurde dann die wässrige Phase abgenommen und der Rest verworfen. Zur Fraktion der wässrigen Phase wurde 500 µl Isopropanol zugefügt, gut gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 12000 x g wurde der Überstand abgenommen, das RNA Pellet in Ethanol (80%) gewaschen und das Ethanol entfernt. Nach der Trocknung des RNA Pellet bei Raumtemperatur wurde die RNA abschließend in RNase freiem Wasser (Stratagene) gelöst und ein Aliquot von 7,5 µl für eine Kontroll-Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

6.2.2.18 Lentivirale Transfektion und Transduktion

Als Vorbereitung der Transfektion wurden 2×10^6 HEK 293T Zellen in eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt der Luft inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 5 µg Plasmid der shRNA, 12 µg psPAX2 (lenti gag/pol) und 2 µg pMD2.G (VSV-G) in 750 µl DMEM ohne Serum gegeben und nach Zugabe von 20 µl Plus Reagenz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugaben von 30 µl Lipofectamine, das im Verhältnis von 1:25 in

DMEM verdünnt wurde, wurde der Ansatz durch invertieren gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde das Medium der HEK 293T Zellen abgenommen, durch 5 ml DMEM ersetzt, der Transfektionsansatz zugegeben und für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml DMEM Medium wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das alte Medium gegen 10 ml frischen DMEM (10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) ausgetauscht.

Am vierten Tag wurden 1×10^5 CO-Zellen in 2 ml RPMI (10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) ausgesät. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium der HEK 293T Zellen abgenommen, steril filtriert (0,45 µm) und auf diese Weise der Virusüberstand gesammelt und von HEK 293T Zellen befreit. Pro 1×10^5 CO-Zellen in 2 ml RPMI wurden 2 ml Virusüberstand zugegeben.

Das Sammeln, Filtrieren und die Transduktion der CO-Zellen erfolgte nach eben beschriebenenem Schema nochmals nach 72 und nach 96 Stunden, wobei die CO-Zellen jeweils abzentrifugiert, in 2 ml frischem Medium resuspendiert wurden, bevor 2 ml des frisch filtrierten Virusüberstandes dazugegeben wurden.

Die transduzierten Zellen wurden dann für 5 Tage in RPMI (10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert und anschließend durch die Zugabe von 5 µg/ml Puromycin selektiert. Die Selektion mit Puromycin wurde durchgeführt, bis keine lebende Zelle in der untransduzierten Kontrolle nachzuweisen war. Anschließend erfolgte eine Western Blot Analyse der transduzierten CO-Zellen.

6.2.2.19 Zellkernisolation

Die Kernisolation wurde mit dem *Nuclei Isolation Kit: Nuclei PURE Prep* der Firma Sigma durchgeführt. Es wurden 12 große Kulturflaschen mit $3,3 \times 10^7$ Zellen pro Flasche CO-Zellen kultiviert. Die Zellen wurden in 50 ml Reaktionsgefäßen für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Nach Zugabe von 1 ml 1 x PBS wurde das Zellpellet resuspendiert, weitere 9 ml 1 x PBS zugegeben, zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die *Lysis Solution* (11 ml *Nuclei PURE Lysis Buffer*; 11 µl DTT 1M; 110 µl Triton X-100 10%) wurde auf Eis angesetzt, das gewaschene Zellpellet in 1 ml resuspendiert und dann mit 9 ml *Lysis Solution* aufgefüllt. Nach 5 Minuten Inkubation auf Eis, wurden die Zellkerne von restlichen Lysatbestandteilen durch Zentrifugieren durch ein Sukrosekissen gereinigt. Die Lösung des Sukrosekissen (27 ml *Nuclei PURE 2 M*

Sucrose Cushion Solution; 3 ml *Nuclei PURE Sucrose Cushion Buffer*; 30 µl DTT 1M) wurde mit einer Sukrosekonzentration von 1,8 M auf Eis angesetzt und 10 ml Lysat mit 18 ml Sukroselösung gemischt. Von der Sukroselösung wurden 10 ml in ein Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und vorsichtig 28 ml der Sukrose-Lysat-Lösung aufgeschichtet. Die Proben wurden dann in einer Beckman Ultrazentrifuge für 45 Minuten bei 4°C und 13 000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand, der zytoplasmatische Bestandteile enthielt, abgenommen und das Zellkernpellet in 1 ml *Nuclei PURE Storage Buffer* gelöst. Die gelösten Zellkerne wurden dann für 5 Minuten bei 4°C mit 500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellkerne in 200 µl *Nuclei PURE Storage Buffer* gelöst und bei -80°C gelagert.

6.2.2.20 Virusinfektion

Zwei Stunden nach der Aussaat der Sekundärkultur der CEF wird das GM-Medium durch frisches Medium ersetzt. Eine typische Verdünnung des Virus besteht aus 100 µl Virus und 900 µl GM-Medium. Diese Verdünnung wird in einem sterilen 2 ml Glasröhrchen angesetzt. Folgende Verdünnungsreihe wird für eine 6-well Platte ausgeführt:

Tabelle 8. Virusverdünnungsreihe

	1	2	3	4	5	6
Virusverdünnung	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	Ø

Nachdem alle benötigten Virusverdünnungen hergestellt wurden, werden 100 µl Virus in das jeweils korrespondierende well der 6-well Platte pipettiert. Abschließend wird die Platte leicht geschwenkt, um den Virus gleichmäßig zu verteilen. Die infizierten Zellen werden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt der Luft über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wird das Medium abgenommen und die Zellen mit einem 1:1 Gemisch aus 1% Agarose und DC3-Medium überschichtet.

6.2.2.21 RCAS Transfektion und DMSO-Schock

Ein Teil des RCAS (*replication-competent avian retrovirus*) Plasmids enthält eine virale Sequenz, die für einen Provirus kodiert. Der andere Teil des RCAS-Plasmid ist ein Teil des Bakterienplasmids (pBR322) und liegt zwischen den beiden LTR (*long*

terminal repeat) Signalsequenzen. Das Plasmid enthält außerdem ein Ampicillinresistenzgen (Hughes *et al.*, 1987). Das RCAS Plasmid wird benutzt, um die Nukleotidsequenz des zu untersuchenden Proteins in das Wirtsgenom zu integrieren und wiederum andere Zellen durch die Virusproduktion zu infizieren.

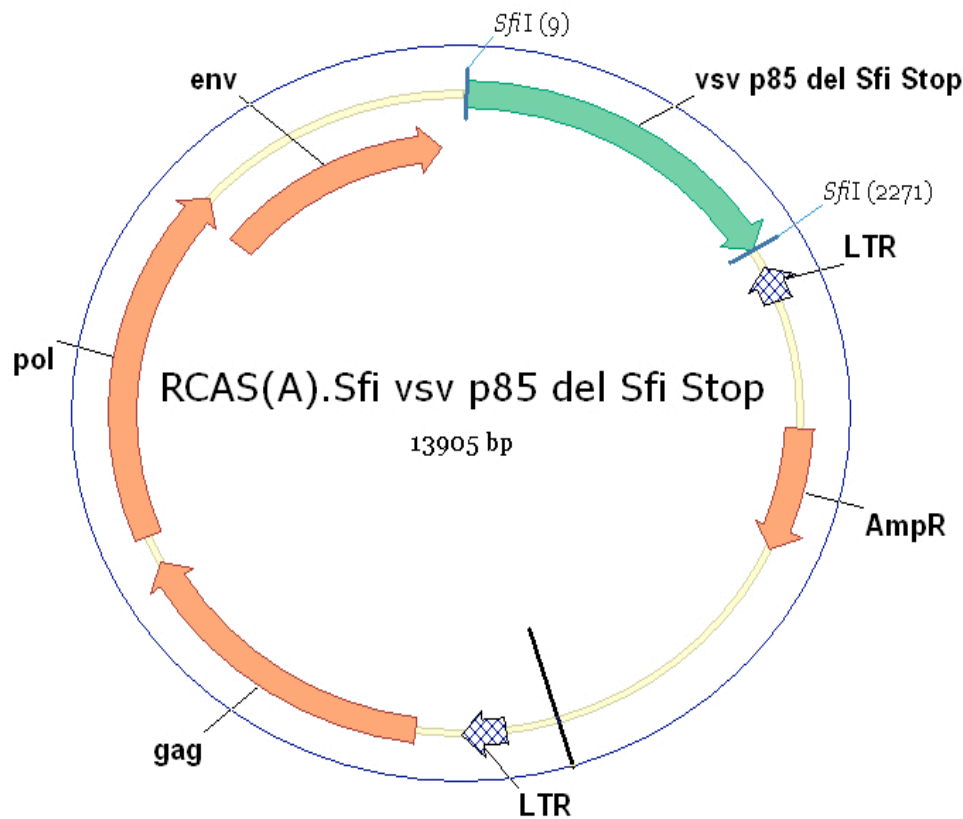


Abbildung 10. RCAS-A Plasmidkarte mit Insert (vsv-p85 del Sfi + Stop Codon)

In die über Nacht kultivierte Sekundärkultur der CEF Zellen wird pro 10 cm Kulturschale 3 μg des RCAS Plasmids gegeben. Die Kulturschale wird dann geschwenkt, um das Plasmid gleichmäßig zu verteilen. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C und 95% CO₂ wird ein DMSO-Schock durchgeführt, um die Aufnahme des Plasmids in die Zellen zu unterstützen. Dazu wird das Medium aus der Kulturschale abgesaugt. Die Schale wird dann für 60 Sekunden mit 5 ml von 20%DMSO/F10 inkubiert. Durch die Zugabe von 10 ml F10-Medium werden die Zellen geschockt. Danach wird das F10-DMSO-Gemisch abgenommen, mit 10 ml F10 gespült und abschließend GM-Medium in die Kulturschale gegeben und die Zellen bei 37°C und 95% CO₂ im Brutschank inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgt der Wechsel des Mediums. Ist eine Flüssigkultur geplant, wird zu CLM-Medium gewechselt. Für einen Focus-Essay wird ein 1:1 Gemisch aus 1% Agarose und DC3-Medium auf die Zellen gegeben.

6.2.2.22 Focus Assay

Primäre CEF Zellen werden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro 6-well oder 3×10^6 pro 10 cm Platte ausgesät. Die Zellen werden in GM-Medium, das 2 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene enthält, über Nacht kultiviert.

Am nächsten Tag werden die CEF Zellen mit 3 μg des entsprechend konstruierten RCAS Vektors für 5 Stunden inkubiert und danach mit Hilfe eines DMSO Schock transfiziert. Dazu wird Medium mit 20% DMSO auf die Zellen gegeben. Nach 60 Sekunden erfolgt die Zugabe von zusätzlich 10 ml F10 Medium. Danach wird das Medium abgenommen, mit 10 ml Medium gewaschen und 10 ml GM-Medium auf die Zellen gegeben und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die Platten mit Agar überschichtet. Diese Überschichtung wird jeden Tag wiederholt, bis nach 1 bis 3 Wochen die Bildung von Foci beobachtet wird. Danach werden die Platten mit Crystallviolett gefärbt und die Anzahl der Foci der transformierten Zellen gezählt.

6.2.3 Proteinbiochemische Methoden

6.2.3.1 Proteinlysate

Die benötigte Zellzahl wurde im Medium unter Zugabe von gekühltem PBS/Natrium-Ortho-Vanadat (1mM) für 10 Minuten mit 1200 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Röhrchen kurz über Kopf getrocknet. Zum Zellpellet wurde dann gekühlter NP40-Lysepuffer (5×10^7 Zellen pro ml) zugegeben, 5 Mal auf und ab pipettiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 4°C mit 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

6.2.3.2 Zellkernlysate

Die Zellkerne wurden auf Eis aufgetaut, 10 Minuten mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 250 µl Zellkern-Lysepuffer resuspendiert, 5 Minuten auf Eis inkubiert und 5 x 5 Sekunden sonifiziert. Danach wurde die Probe für 10 Minuten mit 20800 x g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand, der die Kernproteine enthielt, bei -80°C gelagert.

6.2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das *Bio-Rad DC Protein Assay* verwendet. Bei jeder Messung wurde eine Standardreihe, bestehend aus 8 verschiedenen Konzentrationen von BSA in NP40-Lysepuffer mitgeführt.

Zuerst wurden 5 µl der Lysatprobe in das Well einer Mikrotiterplatte gegeben, 25 µl der Arbeitslösung A' und 200 µl der Lösung B dazu pipettiert. Danach wurde die Platte vorsichtig geschwenkt und Luftblasen entfernt. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und die Konzentration der Probe mittels der Standardreihe berechnet.

6.2.3.4 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Lysatprobe (20 µg) wurde auf ein Volumen von 13,3 µl mit dH₂O aufgefüllt. Der 3 x Ladepuffer wurde mit DTT (2,3:1) angesetzt und 6,7 µl der Mischung zur Lysatprobe zugegeben.

Danach wurde das *NuPage 10% 10 Well* Gel der Firma Invitrogen vertikal in das BioRad Elektrophoresegerät eingespannt und die Innenkammer mit MOPS Puffer und DTT komplett, die Außenkammer mit MOPS Puffer ohne DTT ca. zu 1/3 gefüllt. Danach wurden die Taschen des Gels mit einer Hamiltonspritze gespült und die Proteinproben für 5 Minuten bei 100°C inkubiert. Zur Größenbestimmung wurde ein biotinylierter *low/high range* SDS-PAGE-Marker benutzt. Nach dem Auftragen der Proben mittels der Hamiltonspritze, wurde das Gel bei 80 V gestartet. Nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Nach ca. 1,5 Stunden hatten die Proben das Gel komplett durchlaufen und die Elektrophorese wurde gestoppt.

6.2.3.5 Western Blot

Der Gelgröße entsprechend, wurde eine Nitrozellulosemembran und zwei Blätter Watman® 3M Filterpapier mit dH₂O vorgewässert und im Transferpuffer äquilibriert. Die Western Blot Kammer, ein Tankblotsystem *Trans-Blot™Cell* der Firma Biorad, wurde vorbereitet und die Schwämme ebenfalls in dH₂O und anschließend in Transferpuffer gelegt. Das Proteingel und die Nitrozellulosemembran wurden zwischen zwei Blätter Filterpapier und diese zwischen zwei Schwämmen des Blot Systems platziert und in einem Western Blot *Tray* in der Blot Kammer positioniert. Der Blot Tank wurde dann mit einem Kühlakku ausgestattet und komplett mit Transferpuffer gefüllt. Bei 4°C und 50 V wurden für 2 Stunden die Proteine aus dem Gel in die Nitrozellulosemembran transferiert.

Danach wurde die Membran in 1 x TBS gewaschen, der biotinylierte Marker aus der Membran ausgeschnitten und sowohl die Markermembran als auch die Proteinmembran für eine Stunde in Blockierlösung inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in Waschlösung verdünnt und über Nacht bei 4°C auf die Proteinmembran gegeben. Die Markermembran verblieb über Nacht in der Blockierlösung.

Am nächsten Morgen wurden die Lösung des primären Antikörpers und die Blockierlösung dekantiert, die Proteinmembran in Waschlösung und die Markermembran in 1 x TBS/0,5% Tween 20 für 3 x 10 Minuten gewaschen.

Der sekundäre Antikörper wurde in der Verdünnung 1:5000 in Waschlösung angesetzt und die Proteinmembran eine Stunde in der Antikörperlösung inkubiert. Zeitgleich wurde die Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase der Firma Amersham Biosciences in 1 x TBS/0,5% Tween 20 (1:3000) verdünnt und die Markermembran darin für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Proteinmembran und Markermembran wurden dann zweimal in 1 x TBS, zweimal in 1 x TBS/0,5% Tween 20 für 10 Minuten, einmal in 1 x TBS/3% Tween 20 für 10 Minuten, zweimal in 1 x TBS/0,5% Tween 20 für 15 Minuten, zweimal in 1 x TBS/0,5% Tween 20 für 30 Minuten und abschließend zweimal in 1 x TBS für 30 Minuten gewaschen.

Die Entwicklungslösung bestand aus 1,5 ml ECL SuperSignal West Dura und 300 µl ECL SuperSignal West Pico der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. Die Proteinmembran wurde für 5 Minuten, die Markermembran für 1 Minute in der Entwicklungslösung inkubiert, danach in eine Folie gelegt und im Entwickler der Firma Fujifilm analysiert.

Nach einer kurzen Testaufnahme wurde die Expositionszeit für ein Bild festgelegt und dann im *increment* Modus einzelne Aufnahmen addiert, bis die gewünschte Sättigung der Proteinbanden erreicht wurde.

Danach wurden die Membranen entweder erneut blockiert und für eine weitere Inkubation mit einem primären Antikörper vorbereitet oder in einer Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

6.2.3.6 Western Blot *Stripping*

Der Strippingpuffer wird ohne β -Mercaptoethanol angesetzt und auf 70°C im Wasserbad erwärmt. Dann wird unter dem Abzug 1,578 ml β -Mercaptoethanol zugegeben und gemischt. In diesem Gemisch werden die Western Blot Folien für 30 Minuten unter schütteln bei 70°C inkubiert. Danach wird 5 Mal für 10 Minuten in 1 x TBS/0,5%Tween20 gewaschen. Danach kann die Membran blockiert werden und mit dem gewohnten Western Blot Protokoll erneut entwickelt werden.

7 Ergebnisse

Im ersten Schwerpunkt wurde die Abwesenheit des p85 α -Wildtyp-Proteins untersucht. Dabei wurde das Verhältnis von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA im Zellkern, im Zytoplasma und an Ribosomen bestimmt. Außerdem wurde durch Inhibition des proteasomalen Abbaus eine mögliche posttranslationale Degradation des p85 α Proteins untersucht. Da ein Unterschied im 3'- und 5'- untranslatierten Bereich der Wildtyp und der mutierten p85 α -mRNA die Ursache für die Abwesenheit des p85 α -Wildtyp-Proteins sein könnte, wurden die untranslatierten Bereiche sequenziert.

Im zweiten Schwerpunkt wurde die onkogene Aktivität des p76 α Proteins und anderer p85 α Mutanten untersucht. Dafür wurde das veränderte p85 α stabil in das Genom von CEF Zellen integriert und ein Focus Assay durchgeführt. Anhand der molekularen Aktivierung des Signalwegs als auch der Mikrotumorbildung in vivo war die onkogene Aktivität einschätzbar.

7.1 Untersuchungen zur Abwesenheit des p85 α -Wildtyp-Proteins

In vorausgegangenen Experimenten konnte in CO-Zellen sowohl Wildtyp p85 α -mRNA als auch mutierte p85 α -mRNA nachgewiesen werden. Da eine Regulation der Wildtyp mRNA für die Abwesenheit des p85 α Proteins verantwortlich sein konnte, wurde die mutierte und Wildtyp p85 α -mRNA in verschiedenen Zellkompartimenten untersucht.

7.1.1 Verhältnis von Wildtyp zu mutierter p85 α -mRNA in Zellkernen von CO-Zellen

Zur Untersuchung des Verhältnis von mutierter p85 α zu Wildtyp p85 α -mRNA in den Zellkernen der CO Zelllinie wurden Zellkerne isoliert.

Um Verunreinigungen der isolierten Kerne von restlichen zellulären Bestandteilen zu überprüfen, wurden Proteine aus der Kernfraktion und Proteine aus dem Überstand extrahiert. Es wurden im Western Blot jeweils zwei Proben der jeweiligen Lysate

aufgetragen und die Membran mit Lamin-B und mit GAPDH Antikörper inkubiert und anschließend entwickelt (Abbildung 11).

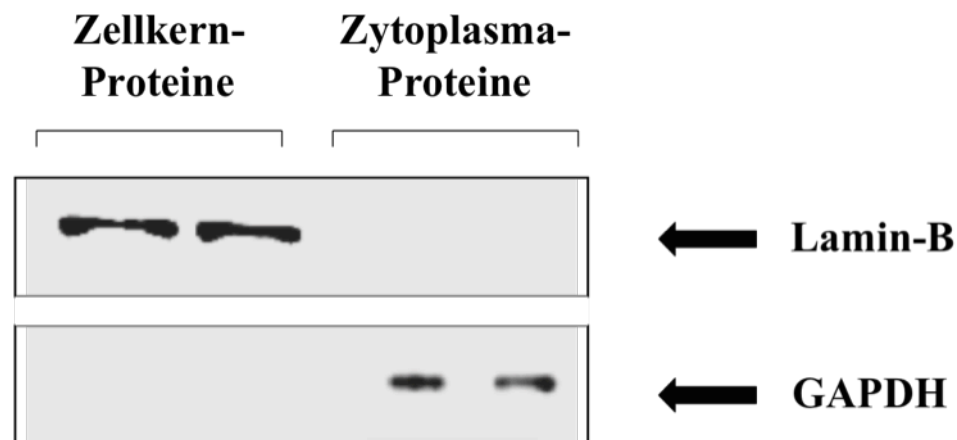


Abbildung 11. Western Blot mit Lamin-B und GAPDH Signal von Zellkern- und Zytoplasmaproteinen.

Lamin-B fungierte als Marker für Zellkernproteine. Im Überstand der Kernpräparation war kein Lamin-B nachweisbar. Die Fraktion der Zellkernproteine zeigte eine starke Lamin-B Bande. Umgekehrt fungierte GAPDH als Marker für Proteine des Zytoplasmas. In der Kernfraktion war kein GAPDH und in der Zytoplasmafraktion war GAPDH nachweisbar.

Nach erfolgreicher Aufreinigung der CO Zellkerne wurde die RNA extrahiert und cDNA synthetisiert. Die gewonnene cDNA wurde dann in eine PCR eingesetzt und ein Bereich der Basendeletionsstelle des mutierten p85 α amplifiziert. Das PCR Produkt wurde in einen Vektor kloniert und 34 Klone der Kernfraktion sequenziert. Die Analyse ergab 18 Klone der mutierten p85 α -mRNA und 16 Klone der Wildtyp p85 α -mRNA.

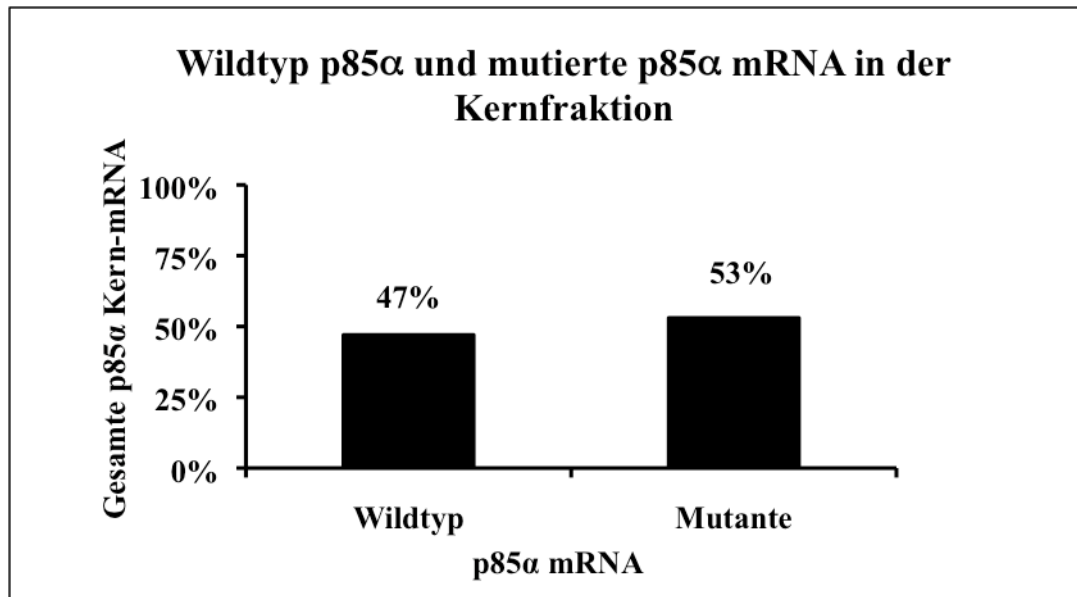


Abbildung 12. Diagramm zum Verhältnis der Wildtyp p85 α und mutierten p85 α -mRNA zur gesamten p85 α -mRNA in Zellkernen der CO-Zellen.

Im Verhältnis zur Gesamtmenge der p85 α Kern-mRNA sind 47% Wildtyp p85 α -mRNA und 53% mutierte p85 α -mRNA nachgewiesen worden (Abbildung 12).

7.1.2 Verhältnis von Wildtyp zu mutierter p85 α -mRNA im Zytoplasma von CO-Zellen

Die mRNA im Zytoplasma der CO-Zellen wurde mittels Trizol-RNA-Extraktion isoliert und cDNA hergestellt. Die cDNA wurde in einer PCR verwendet, die p85 α -mRNA amplifiziert und dabei die Stelle der Mutation im *open reading frame* berücksichtigt. Das PCR-Produkt wurde dann in einen Vektor kloniert, einzelne Klone kultiviert und sequenziert.

Tabelle 9. Analyse der Zytoplasmaverteilung von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA in 3 unabhängigen Experimenten.

	Wildtyp p85 α - mRNA	mutierte p85 α - mRNA
Experiment 1	0,15	0,85
Experiment 2	0,24	0,76
Experiment 3	0,28	0,72
Mittelwert	0,22	0,78
Standardabweichung	0,07	0,07

Die Analyse von Klonen aus drei unabhängigen Experimenten ergab 22% Wildtyp p85 α -mRNA und 78% mutierte p85 α -mRNA. Die Standardabweichung beträgt 7% und der p-Wert 0,0005 (Tabelle 9).

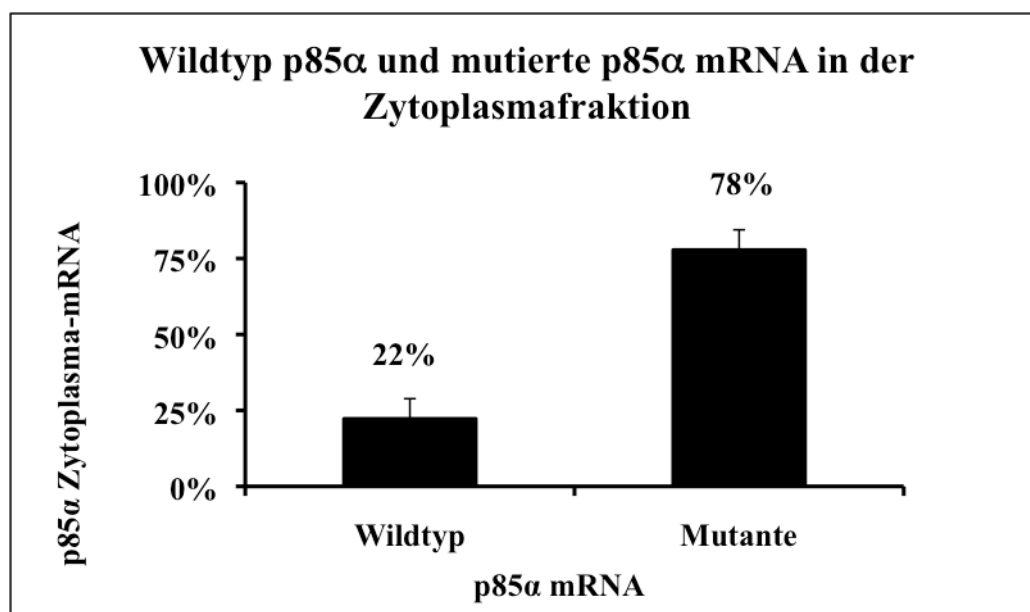


Abbildung 13. Diagramm zum Verhältnis von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA im Zytoplasma von CO-Zellen.

7.1.3 Qualitatives Verhältnis von Wildtyp p85 α zu mutierter p85 α -mRNA in Polysomen-Gradientenfraktionen

Durch eine Polysomen-Präparation wurde in einem Sukrosegradienten die mRNA entsprechend der Menge der assoziierten Ribosomen aufgetrennt. Der Gradient wurde

in 11 Fraktionen geteilt. Fraktion 1 enthielt die niedrigste und Fraktion 11 die höchste Sukrosekonzentration. Entsprechend befand sich die RNA, die keine oder nur minimalen Besatz mit Ribosomen enthielt, in den ersten Fraktionen und die RNA mit dem meisten Ribosomenbesatz in den letzten Fraktionen. Die Fraktionen 1,3,5,7,9 und 11 wurden zur weiteren Untersuchung verwendet. Aus den ausgewählten Fraktionen wurde dann RNA extrahiert.

Als Kontrolle der Polysomen Präparation und RNA Extraktion wurden 7,5 μ l der isolierten RNA in einem Agarosegel aufgetragen und die Elektrophorese bei 100v und 45 mA durchgeführt.

Die 18 S und die 28 S Untereinheit der ribosomalen RNA erscheinen im Gel als distinkte Banden im mittleren Bereich. Im unteren Bildrand ist die zugesetzte als auch endogene tRNA zu erkennen (Abbildung 14).

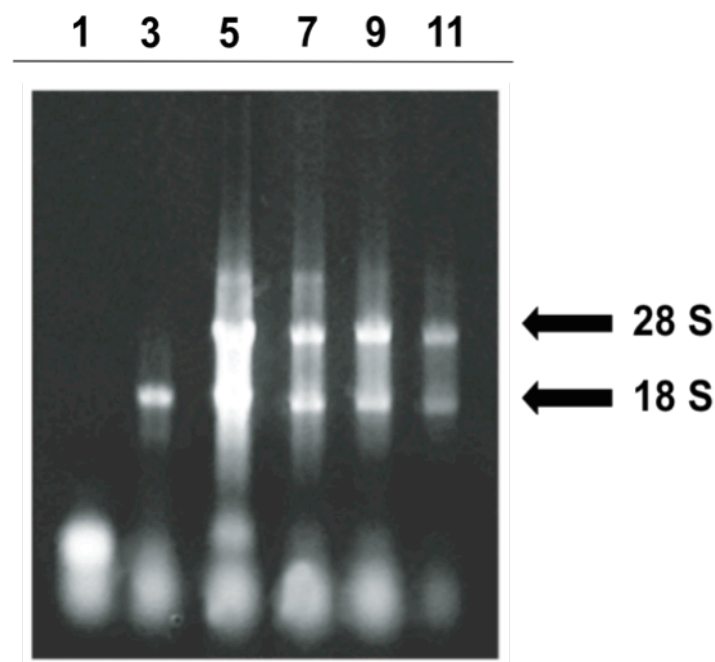


Abbildung 14. Agarosegelelektrophorese der RNA aus der Polysomen Präparation; 1,3,5,7,9 und 11 bezeichnen einzelne Gradientenfraktionen.

Um das qualitative Verhältnis der an Ribosomen gebundenen Wildtyp p85 α und mutierter p85 α -mRNA zu untersuchen, wurde cDNA aus den Fraktionen 1,3,5,7,9 und 11 synthetisiert. Nach erfolgter PCR, bei der der Bereich der Basendeletion im *open reading frame* berücksichtigt wurde, wurde das PCR Produkt in einen Vektor kloniert und pro Fraktion mindesten 30 Klone analysiert. In der Polysomen-

Gradientenfraction 1 konnte nach cDNA Synthese keine p85 α -mRNA amplifiziert werden. Da in Fraktion 3 und 11 ein größerer Unterschied in der Anzahl der Klone mit Wildtyp p85 α und mutierter p85 α -mRNA zu erkennen war, wurde die Sequenzierung von Klonen für diese Fraktionen, mit der Bezeichnung **3**₍₂₎ und **11**₍₂₎, wiederholt. Die Verteilung in den einzelnen Fraktionen stellte sich wie folgt dar (Tabelle 10):

Tabelle 10. Absoluten Verteilung von Klonen mit Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA Sequenz in den Polysomen-Gradientenfraktionen.

	Gradientenfraktionen							
	1	3 ₍₁₎	3 ₍₂₎	5	7	9	11 ₍₁₎	11 ₍₂₎
Klone mit Wildtyp p85 α Sequenz	0	23	20	13	18	15	6	11
Klone mit mutierter p85 α Sequenz	0	13	16	18	15	18	29	24
Gesamt	0	36	36	31	33	33	35	35

Zur Auswertung der Daten wurde die Anzahl der Klone aus **3**₍₁₎ **und** **3**₍₂₎ sowie **11**₍₁₎ **und** **11**₍₂₎ addiert. Die Gesamtzahl der Klone je Polysomen-Gradientenfraction wurde dann normiert und der jeweilige Anteil der Wildtyp und mutierten p85 α -mRNA bestimmt (Tabelle 11 und Abbildung 15).

Tabelle 11. Relative Verteilung von Klonen mit Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA Sequenz in den Polysomen-Gradientenfraktionen.

	Gradientenfraction					
	F1	F3	F5	F7	F9	F11
Wildtyp p85 α -mRNA	0%	60%	42%	55%	46%	24%
mutierte p85 α -mRNA	0%	40%	58%	46%	55%	76%

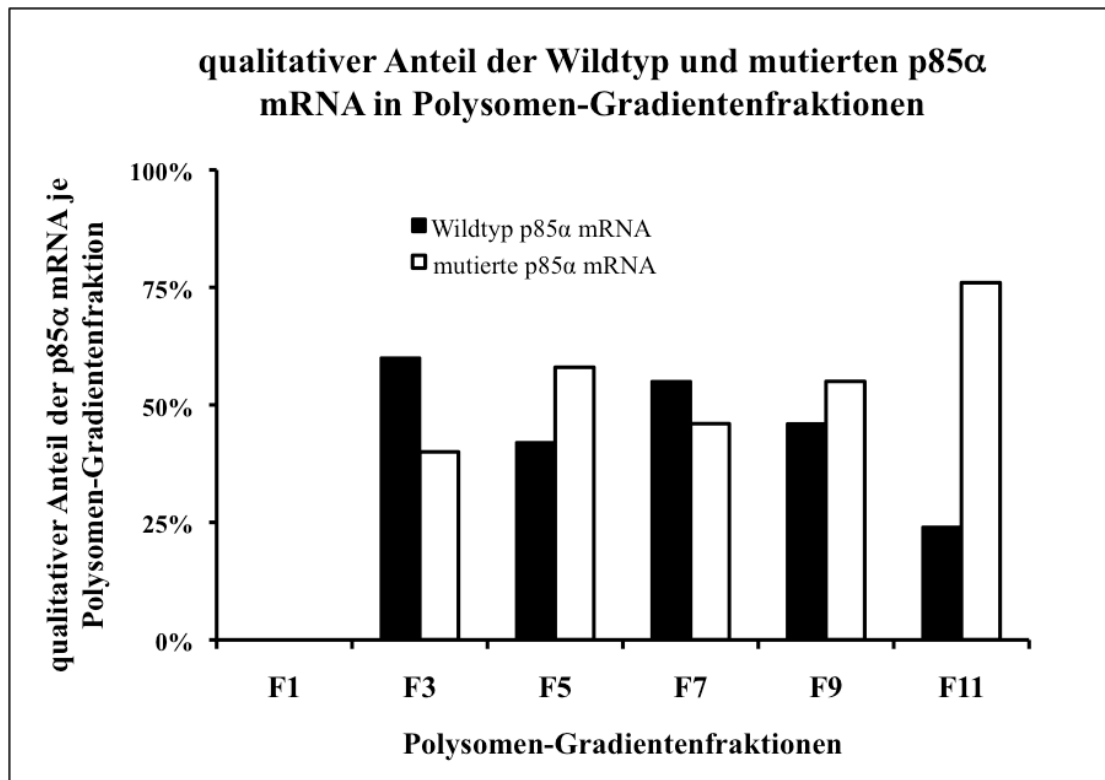


Abbildung 15. Diagramm zum relativen Verhältnis von Klonen mit Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA in Polysomen-Gradientenfraktionen.

7.1.4 Relative Quantifizierung der Gradientenfraktionen

Um eine quantitative Aussage über das Verhältnis der Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA in den einzelnen Fraktionen des Polysomen-Gradienten zu erhalten, wurde eine quantitative *real time* PCR durchgeführt.

Als Grundlage für die Auswertung der nachfolgenden Experimente wurde eine Verdünnungsreihe von cDNA aus CO-Zellen hergestellt. Die cDNA stammte aus einer reversen Transkription extrahierter RNA.

Der Übergang in die Exponentielle Phase der Amplifikation wurde durch das Programm LightCycler LCDA Version 3.5.28 von Roche bestimmt. Jede Probe wurde in Duplikaten amplifiziert und eine Negativkontrolle, die Wasser anstatt der cDNA enthielt, wurde mitgeführt. Die Schmelzkurven dienten zur Unterscheidung von potentiell erscheinenden Primer-Dimeren und wirklich amplifizierten Produkten und dienten somit als Kontrolle für eine homogene Amplifizierung der Zielsequenz (Abbildung 16).

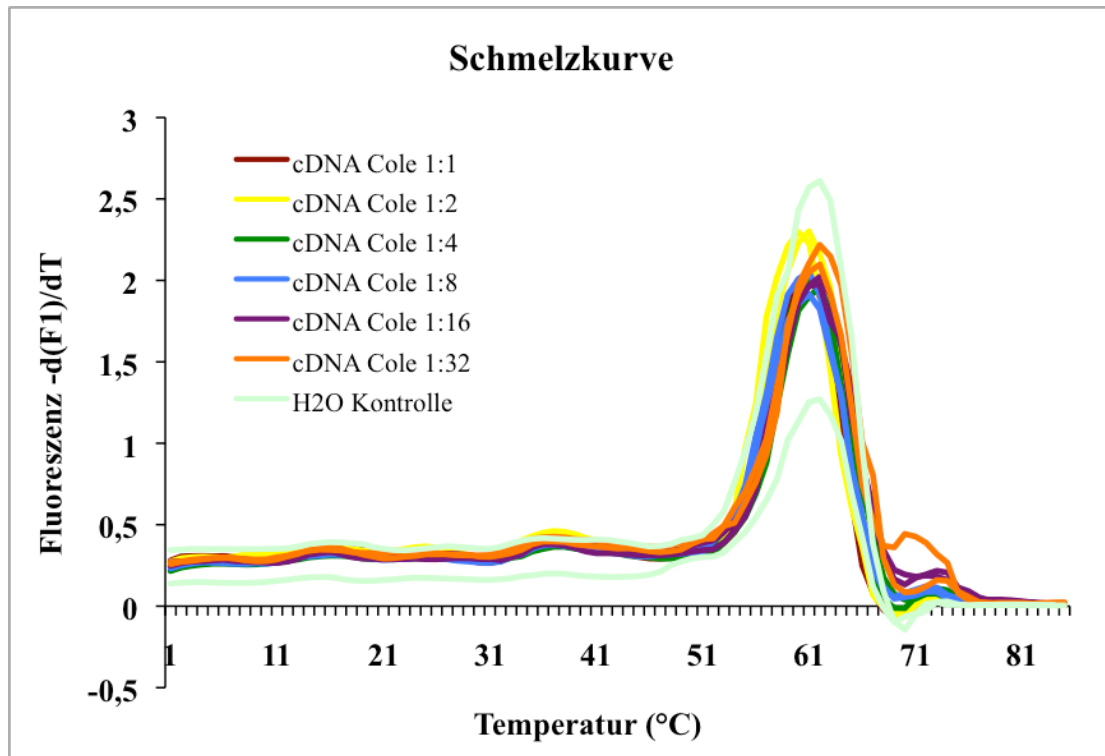


Abbildung 16. Schmelzkurve zur *real time* PCR der Verdünnungsreihe mit cDNA aus CO-Zellen.

Folgende LightCycler Zyklen wurden für den Verdünnungsversuch ermittelt (Tabelle 12) (Abbildung 17).

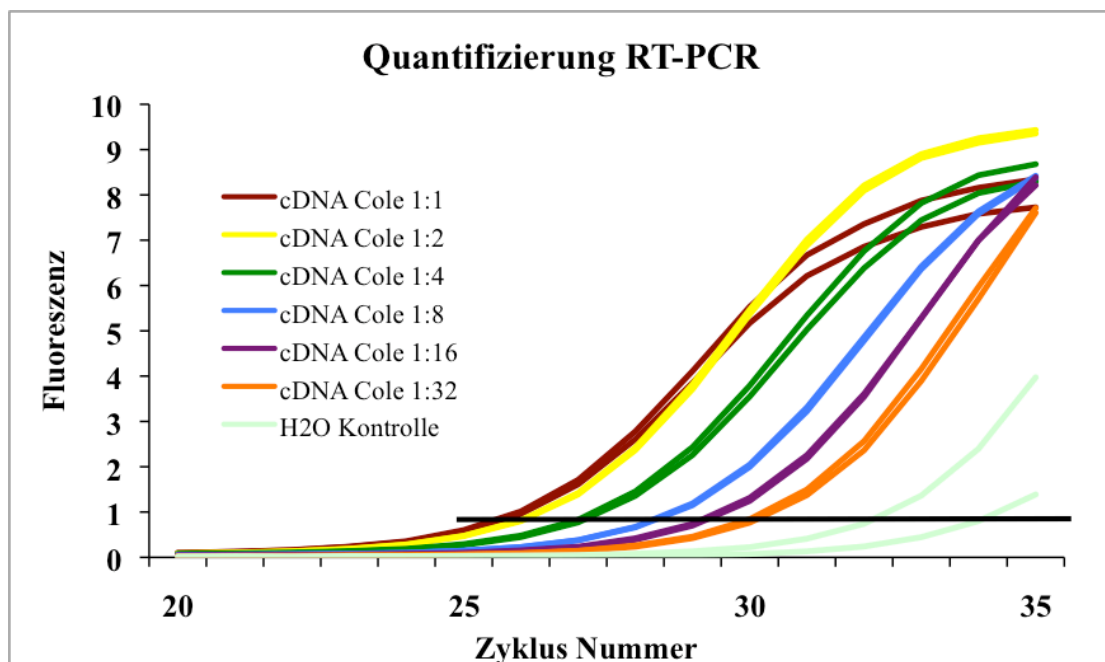


Abbildung 17. Fluoreszenzkurve je LightCycler Zyklus der cDNA Verdünnungsreihe.

Tabelle 12. Übersicht der LightCycler Zyklen je eingesetzter cDNA Verdünnung.

Verdünnung	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Zyklus	25,80	26,48	27,29	28,68	29,66	30,57

Aus den ermittelten Werten wurde ein Diagramm mit halblogarithmischer Achseneinteilung erstellt. Die Werte der eingesetzten cDNA Verdünnung wurden logarithmisch, die entsprechend ermittelten Zyklen in der RT-PCR linear aufgetragen (Abbildung 18).

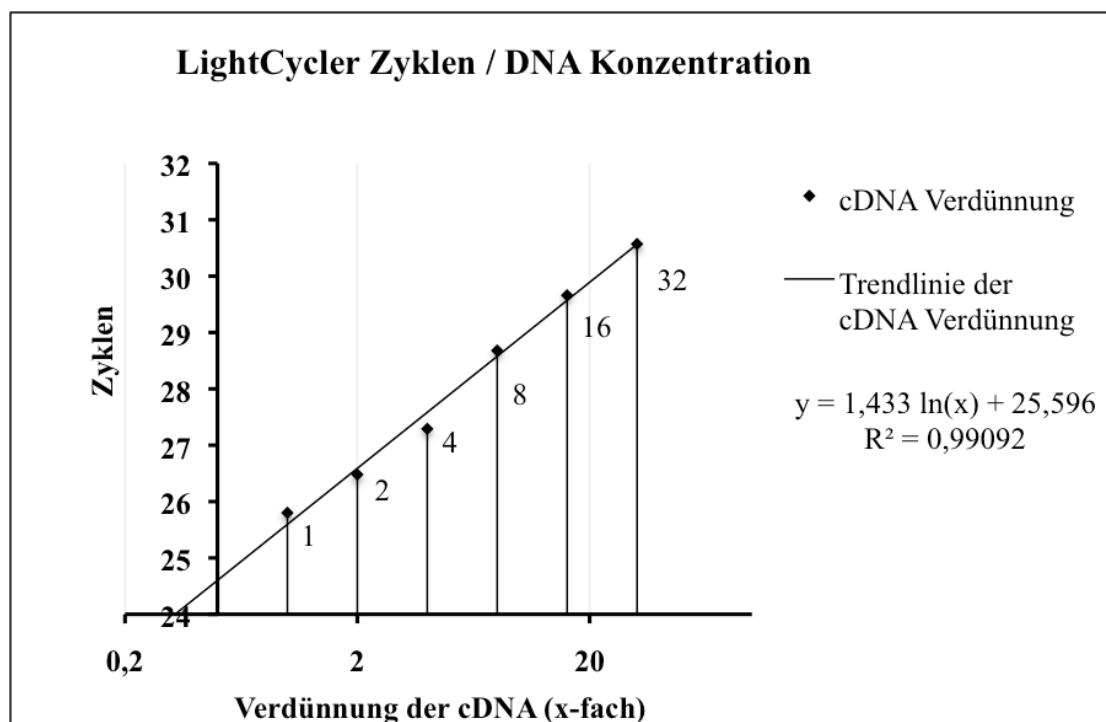


Abbildung 18. Diagramm zum Verhältnis von eingesetzter cDNA Konzentration und Zyklenzahl der RT-PCR.

Mit der Formel I. :

$$I. \quad y = 1,433 \ln(x) + 25,596$$

die aus der Trendlinie des Verdünnungsexperiments ermittelt wurde, war es möglich das Verhältnis von Konzentrationen anderer RT-PCR Daten zu ermitteln.

Da die Zahl der Zyklen (y) pro Probe durch das Programm LightCycler LCDA Version 3.5.28 von Roche bestimmt wurden, wurde die Gleichung I. nach x (Verdünnung) umgestellt.

$$\text{II. } x = e^{(y-25,596)/1,433}$$

Mit Gleichung II. war es nun möglich die Verdünnung einzelner Proben aus den Polysomen-Gradientenfractionen zu berechnen, die unter den gleichen Bedingungen, wie die der Standardreihe, erstellt wurden. Auf die relative Ausgangskonzentration der Fractionen konnte nun durch die Berechnung mit Formel II. auf die relative Verdünnung der einzelnen Proben geschlossen werden. Danach wurden die ermittelten Werte der relativen Konzentration addiert, und die Summe auf 100% normiert. Im letzten Schritt wurde dann der relative Anteil der einzelnen Fractionen zu den 100% der relativen Gesamtkonzentration ermittelt (Tabelle 13).

Tabelle 13. Übersicht über die RT-PCR Werte und deren nachfolgende Berechnungen.

A: Bezeichnung der cDNA Gradientenfractionen, B: Zykluszahl der Fraction entnommen aus dem Programm LigthCycler LCDA Version 3.4.28, C: Berechnung des Verdünnungsfaktor der Probe mit $x = e^{(y-25,596)/1,433}$, D: Berechnung der Konzentration durch $1/\text{Verdünnungsfaktor}$, E: Normierung der relativen Konzentration der einzelnen Fractionen F_1 bis F_{11} auf $F_{\text{gesamt}} = 100\%$.

A	B	C	D	E
F1	37,7	4659,2766603705	0,000214626	0,0052 %
F3	30,87	39,6618904573	0,02521312	0,6152 %
F5	27,4	3,5215365632	0,283966951	6,9283 %
F7	25,68	1,0603704024	0,943066685	23,0092 %
F9	24,9	0,6152698373	1,625303142	39,6545 %
F11	25,31	0,8190736291	1,220891461	29,7876 %

Bei der RNA Isolation wurden unterschiedliche Konzentrationen der RNA pro Gradientenfraction hergestellt. Aus allen Fractionen wurde $1\mu\text{g}$ RNA in die cDNA Synthese eingesetzt, um die Effizienz der cDNA Synthese unter standardisierten Bedingungen durchzuführen. Dies hatte zur Folge, dass dadurch unterschiedliche Volumina der RNA aus den Polysomen-Fractionen des Gradienten benutzt wurden.

Um die Verteilung der RNA in gleichen Volumina zu berechnen, mussten die Relation der einzelnen Volumina untereinander in die berechnete relative Konzentration mit einbezogen werden.

Tabelle 14. Berechnung der relativen Konzentration der mRNA in den Polysomen-Gradientenfraktionen.

A: Bezeichnung der cDNA Gradientenfraktionen, F: eingesetzte Volumen von RNA in μl pro Gradientenfraktion, G: Normierung der Werte in F auf $F_{\text{gesamt}} = 1$, H: Quotient aus relativer Probenkonzentration (E) dividiert durch das eingesetzte Volumen (G), I: Normierung der Werte aus Spalte H auf die relative Konzentration aller Gradientenfraktionen = 100%.

A	F	G	H	I
F1	1,12	0,0887480	0,00059004	0,0064 %
F3	3,88	0,3074485	0,020008418	0,2163 %
F5	0,48	0,0380349	1,821564055	19,6926 %
F7	0,73	0,0578447	3,977749501	43,0027 %
F9	1,93	0,1529319	2,59295484	28,0319 %
F11	4,48	0,3549921	0,839106199	9,0714 %

Dazu wurde das eingesetzte Volumen der RNA der einzelnen Fraktionen auf ein Gesamtvolumen von 1 normiert. Anschließend erfolgte die Division der ermittelten relativen Konzentrationen durch den Anteil am Gesamtvolumen. Zum Schluss wurden diese ermittelten Werte wieder auf eine totale relative Konzentration von 100% normiert (Tabelle 14).

Die *real time* PCR wurde in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und folgende Verteilungen berechnet (Tabelle 15):

Tabelle 15. Relative Quantifizierung der p85 α -mRNA in den Polysomen-Gradientenfraktionen. Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen RT-PCR Versuchen.

	RT-PCR 1	RT-PCR 2	RT-PCR 3	Mittelwert	Standardabweichung
F1	0,0064 %	0,0060 %	0,0099 %	0,01 %	0,002 %
F3	0,2163 %	0,1395 %	0,2310 %	0,20 %	0,05 %
F5	19,6926 %	18,5167 %	18,6775 %	18,96 %	0,64 %
F7	43,0027 %	44,5846 %	45,6040 %	44,40 %	1,31 %
F9	28,0319 %	27,4851 %	26,5870 %	27,37 %	0,73 %
F11	9,0714 %	9,2748 %	8,8474 %	9,06 %	0,21 %

Die niedrigsten Werte waren mit 0,01% und 0,2% in den Fraktionen F1 und F3 ermittelt worden. Den höchsten Wert mit 44,4% zeigte die Fraktion F7. Die Fraktionen F5, F9 und F11 enthielten 9,06% bis 27,37% der p85 α -mRNA (Abbildung 19).

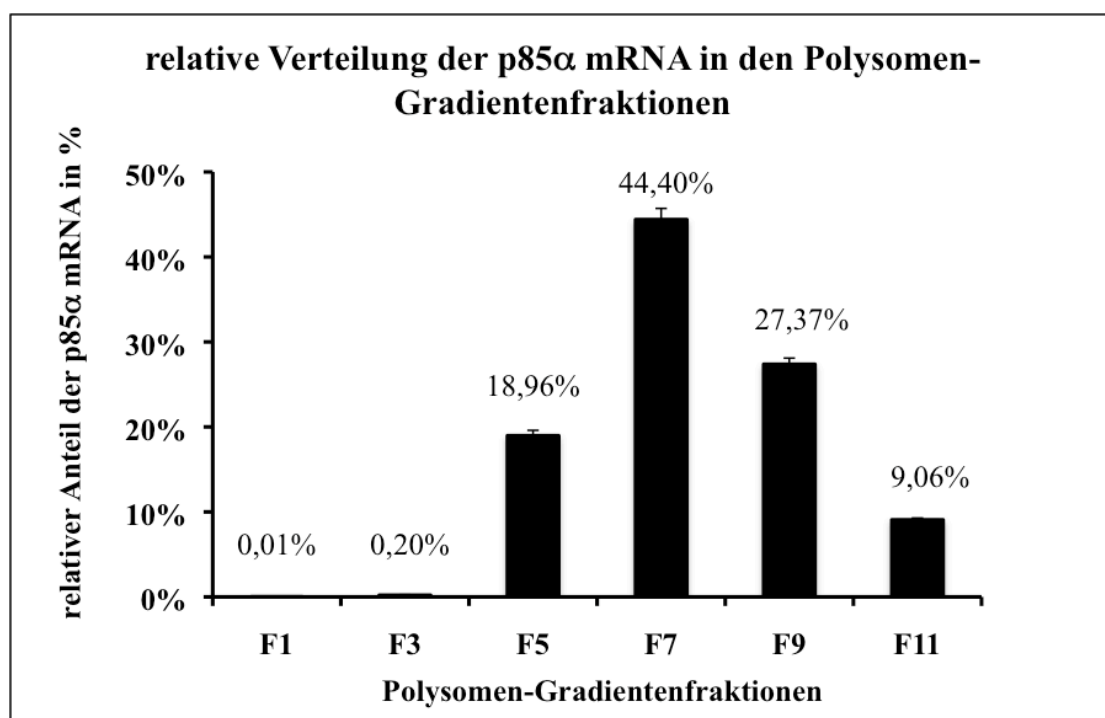


Abbildung 19. Relative Verteilung der p85 α -mRNA in den Fraktionen 1 bis 11 des Polysomen-Gradienten

7.1.5 Beziehung der quantitativen und qualitativen Gradientendaten

Die Daten des qualitativen Verhältnisses von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA und die Daten des relativen Anteils der p85 α -mRNA in den Fraktionen des Polysomen-Gradienten (Tabelle 16), wurden nun in eine Gesamtauswertung einbezogen.

Tabelle 16. Qualitatives Verhältnis von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA, sowie relativer Anteil der p85 α -mRNA in den Polysomen-Gradientenfraktionen.

	Gradientenfraktionen					
	F1	F3	F5	F7	F9	F11
Wildtyp p85 α -mRNA	0%	60%	42%	55%	46%	24%
mutierte p85 α -mRNA	0%	40%	58%	46%	55%	76%
Relative Verteilung der p85 α -mRNA pro Fraktion	0,01%	0,2%	18,96%	44,4%	27,37%	9,06%

Dafür wurde der Anteil der Wildtyp und der Anteil der mutierten p85 α -mRNA auf die relative Verteilung der gesamten p85 α -mRNA je Polysomen-Gradientenfraktion berechnet. Da für Gradientenfraktion 1 kein Anteil bestimmt werden konnte und in der relative Verteilung nur 0,01% der p85 α -mRNA nachzuweisen war, wird diese Fraktion nicht mit in die Berechnung einbezogen (Tabelle 17).

Tabelle 17. Daten der Verteilung von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA bezogen auf die relative Quantifizierung der Polysomen-Gradientenfraktionen.

	Gradientenfraktionen					
	F1	F3	F5	F7	F9	F11
Wildtyp p85 α -mRNA	-	0,12%	8%	24%	13%	2%
mutierte p85 α -mRNA	-	0,08%	11%	20%	15%	7%

Abschließend wurde eine Darstellung der relativen Quantifizierung erstellt. Besonders die Fraktionen F5, F7, F9 und F11, die mit einer steigenden Assoziation von Ribosomen einhergehen, enthielten p85 α -mRNA. In diesen Fraktionen war auch eine annähernd gleiche Verteilung von Wildtyp und mutierter p85 α -mRNA festzustellen (Abbildung 20).

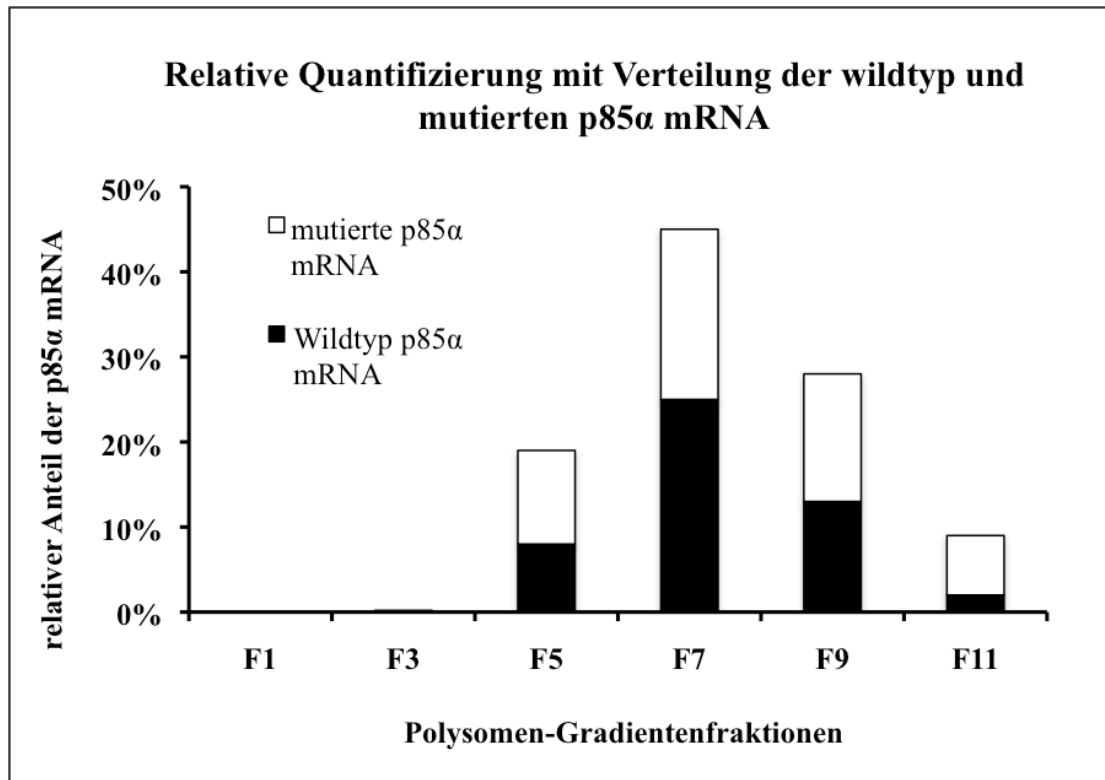


Abbildung 20. Relative Quantifizierung mit Verteilung der Wildtyp und mutierten p85 α -mRNA

7.1.6 Inhibition des proteasomalen Abbaus durch den Inhibitor MG-132 in CO-Zellen

Da in den vorangegangenen Experimenten eine Assoziation von p85 α Wildtyp mRNA an Ribosomen nachgewiesen werden konnte, wurde nun die Abwesenheit von p85 α Protein durch eine posttranslationale Degradation des Proteins diskutiert. In vergangenen Arbeiten konnten sowohl Versuche zum Ubiquitylierungs- und Sumoylierungsgrad als auch Versuche mit verschiedenen Lysemethoden und Hemmung der DNA-Methylierung sowie Histondeacetylierung die fehlende Expression von p85 α nicht klären.

Um eine weitere wichtige Möglichkeit der posttranslationalen Regulation zu untersuchen, wurde der Abbau von ubiquitylierten Proteinen im Proteasom durch MG-132 gehemmt.

MG-132 ist ein potenter Inhibitor, der spezifisch und reversibel Proteasomen inhibiert. Dadurch wird die Degradation von Ubiquitin konjugierten Proteinen in

Säugetierzellen reduziert.

MG-132 wurde in Ethanol gelöst und so verdünnt, dass 0 μM , 1 μM , 5 μM oder 10 μM Inhibitor sowie 0,1% Ethanol pro ml Medium vorlagen. Dann wurden CO-Zellen für 6 oder 12 Stunden in den angegebenen MG-132 Konzentrationen inkubiert. Nach der Herstellung von Proteinlysaten wurden zwei Western Blots durchgeführt. Der erste Blot diente dazu, die Wirksamkeit von MG-132 zu bestätigen. Ein Ubiquitin-Antikörper diente zum Nachweis der Akkumulation von ubiquitinylierten Proteinen. GAPDH diente als Ladungskontrolle (Abbildung 21).

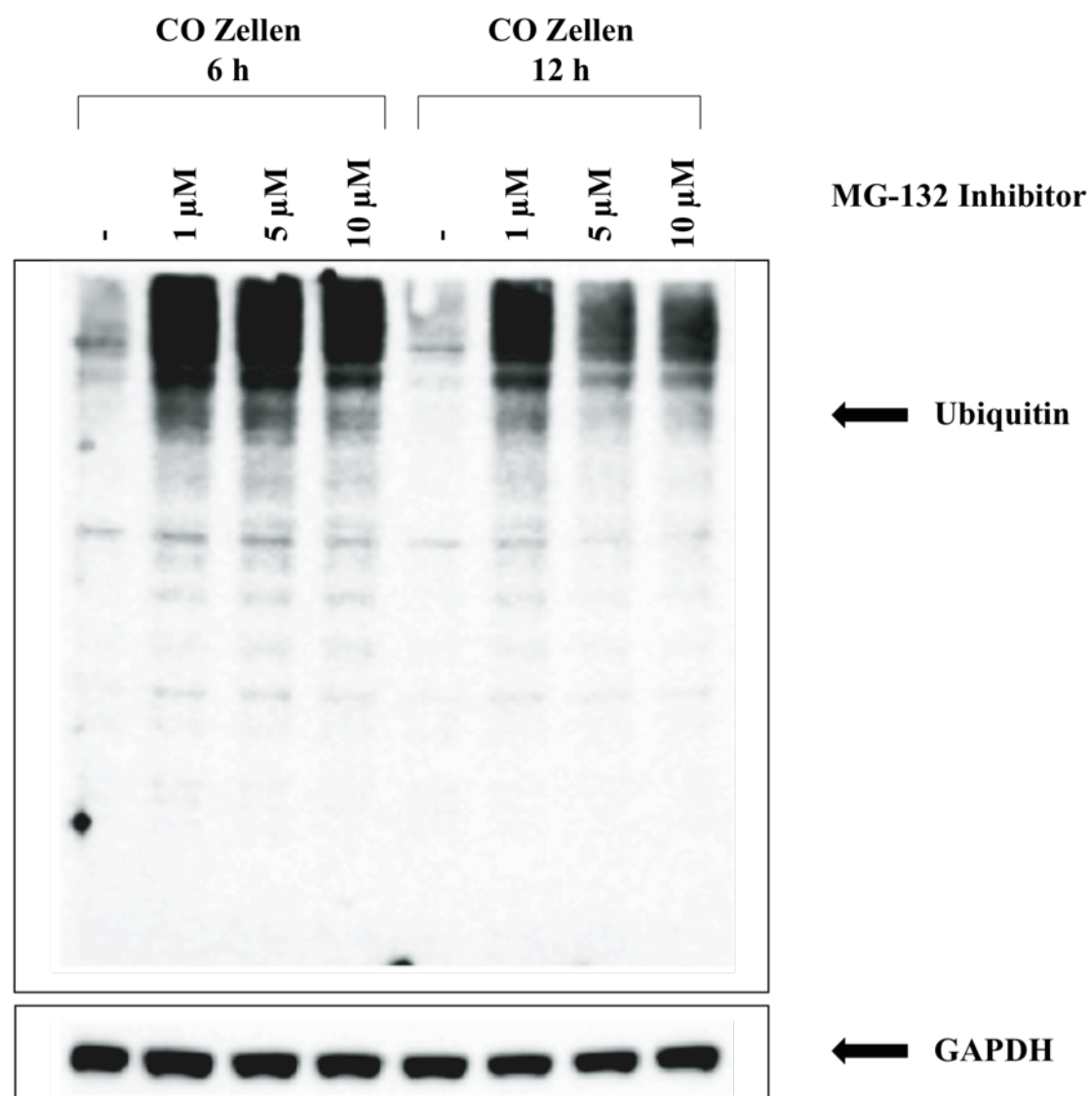


Abbildung 21. MG-132 Western Blot.

CO-Zellen wurden für 6 h bzw. 12 h in 0 μM , 1 μM , 5 μM oder 10 μM MG-132 inkubiert. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

In der 6 und 12 Stunden Fraktion ohne Inhibitor wurde ein schwaches Signal des

Ubiquitin-Antikörpers detektiert. Eine deutliche Färbung zeigten dagegen die 1 μM , 5 μM und 10 μM Fraktionen bei 6 h und bei 12 h. Die Banden des GAPDH Antikörpers wiesen eine gleichmäßige Verteilung auf.

Die gleichen Proteinlysate, die auch schon für den Ubiquitin Western Blot benutzt wurden, wurden nochmals in einem Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Proteinlysat aus Jurkat Zellen benutzt. Der darauf durchgeführte Western Blot, wurde mit einem Antikörper, der gegen p85 α gerichtet war, inkubiert (Abbildung 22).

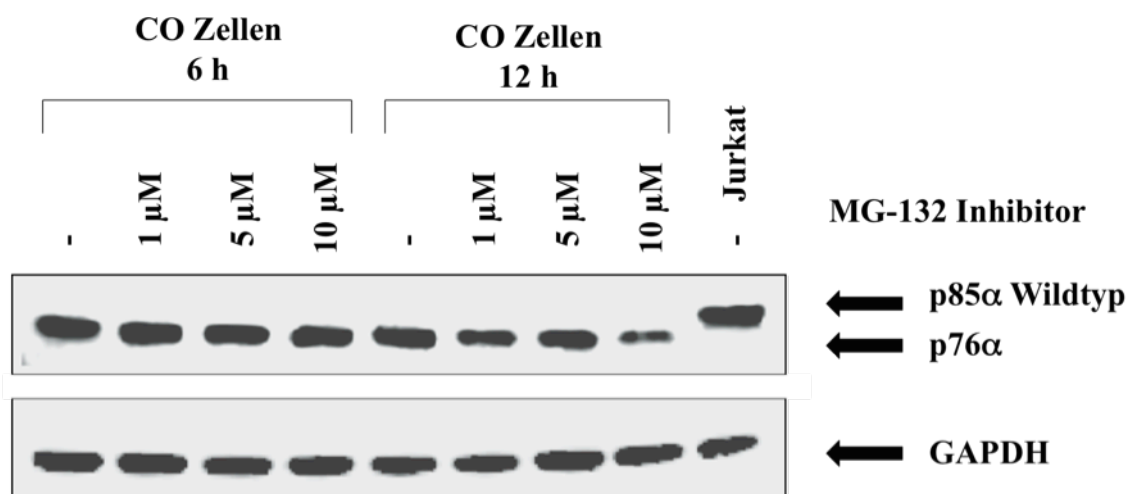


Abbildung 22. Western Blot des p85 α /p76 α Proteinsignals und GAPDH mit MG-132 behandelten CO-Zellen.

Es zeigten sich sowohl in den CO Zell-Fractionen ohne und in denen mit Inhibitor jeweils eine einzelne Bande. Diese Bande lag etwas niedriger als die p85 α Bande der Jurkat-Zellen. Eine Entwicklung mit GAPDH Antikörper diente als Ladungskontrolle des Western Blots.

7.1.7 Sequenzierung des 5'UTR und des ORF

Obwohl Wildtyp und mutierte p85 α -mRNA an Ribosomen gebunden sind, ist das p85 α -Wildtyp-Protein in CO-Zellen nicht nachweisbar. Eine Blockade der Translation oder die Degradation des Transkripts könnte beispielsweise durch *microRNA* vermittelt werden. Dabei binden *microRNA* an komplementäre Stellen im 3' und oder

5' untranslatierten Bereich der *messenger* RNA. Da nur die mutierte Form des p85 α Proteins translatiert wird, könnte ein Sequenzunterschied der Wildtyp und der mutierten p85 α -mRNA für die unterschiedliche Regulation verantwortlich sein. Eine Sequenzierung der Wildtyp und mutierten p85 α -mRNA soll deshalb mögliche Unterschiede in der Basenfolge der beiden mRNAs finden.

Damit zwischen der Wildtyp und mutierten p85 α Sequenz unterschieden werden konnte, wurde die Stelle der Basendeletion im *open reading frame* bei der Amplifizierung der Sequenz berücksichtigt (Abbildung 23).

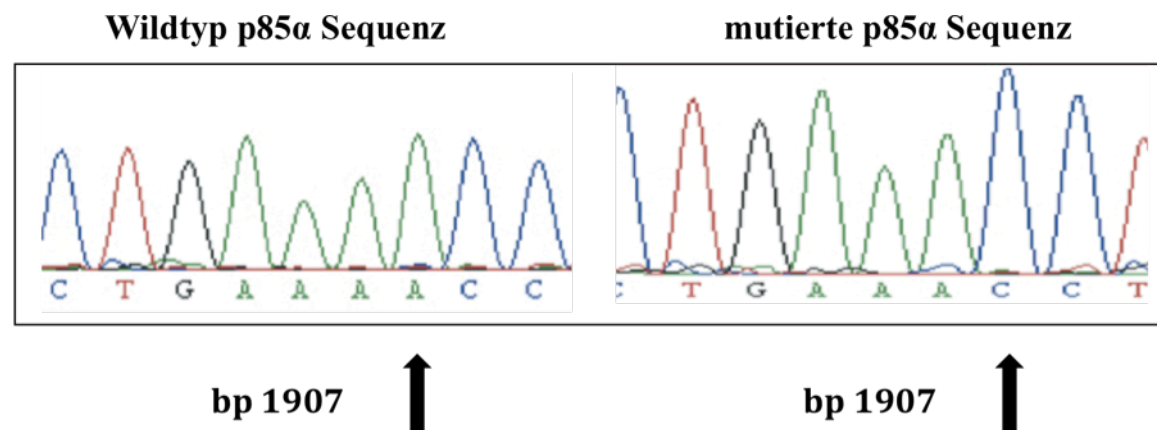


Abbildung 23. Ausschnitt aus der Wildtyp und der mutierten p85 α Sequenz an der Stelle der Basendeletion. Die Base 1907 (bp = Basenpaar) ist mit einem Pfeil markiert.

Die Sequenzierung des 5'UTR ergab keine Abweichung im Vergleich zur Sequenz der p85 α -mRNA NM_181523.1 aus der NCBI Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*).

In beiden mRNA war im *open reading frame* in Position 1120 ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin erfolgt, der bei der Translation einen Wechsel der Kodierung von Methionin (ATG) zu Isoleucin (ATA) zur Folge hat (Tabelle 18).

Tabelle 18. Übersicht über die Sequenzunterschiede im *open reading frame*.

Position	p85α Sequenz der NCBI Datenbank NM_181523.1	mutierte p85α Sequenz in CO- Zellen	Wildtyp p85α Sequenz in CO- Zellen
1120	g	a	a
1948	a	-	a

7.1.8 Sequenzierung des 3'UTR

Der 3' untranslatierte Bereich der mRNA befindet sich zwischen *open reading frame* und poly-A Signal der mRNA. Der 3' untranslatierte Bereich startet mit der Base 2218 und geht mit einem Guanin in Position 6435 in das poly-A Signal über.

Der 3'UTR konnte bis zur Base 5881 sequenziert werden. Folgende Unterschiede wurden zwischen den Sequenzen der Wildtyp p85 α , mutierten p85 α und der p85 α -mRNA NM_181523.1 aus der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) Datenbank gefunden (Tabelle 19):

Tabelle 19. Übersicht über die Sequenzunterschiede im 3' untranslatierten Bereich des p85 α .

Position	p85α Sequenz der NCBI Datenbank NM_181523.1	mutierte p85α Sequenz in CO- Zellen	Wildtyp p85α Sequenz in CO- Zellen
1948	a	-	a
2622	g	g und a	g und a
4649	c	a	a
4876	g	a	a
5548	g	a	g
5721	c	t	t

7.2 Onkogene Aktivität von p85 α und p85 α Mutanten

p85 α stabilisiert die katalytische Untereinheit und inhibiert deren Kinaseaktivität. Wird p85 α phosphoryliert, wird dadurch die katalytische Untereinheit aktiviert und der *second messenger* PIP₃ generiert. Bei bestimmten Veränderung des p85 α , kann die katalytische Untereinheit nicht länger ihre inhibitorische Funktion ausüben und es kommt zur konstitutiven Aktivierung des Signalwegs. Daher soll untersucht werden, ob das mutierte p85 α Protein aus den CO-Zellen *in vivo* einen transformierenden Effekt zeigt.

Außerdem sollen zusätzlich zwei künstlich veränderte p85 α Mutanten, die *in vitro* eine gesteigerte Kinaseaktivität aufwiesen (Miled *et al.*, 2007), *in vivo* auf ihr transformierendes Potential hin untersucht werden.

7.2.1 Expression von p76 α und p85 α in CEF Zellen

Zur Untersuchung des p76 α aus CO-Zellen wurde nicht nur dessen Sequenz sondern auch die Sequenz für das Wildtyp p85 α Protein aus CO-Zellen verwendet. Um p76 α bzw. p85 α in den RCAS-Vektor zu klonieren, wurde jeweils eine Sfi Restriktionsschnittstelle durch eine Mutagenese-PCR entfernt. Die eingefügten Mutationen waren still und die Kodierung der Aminosäuresequenz blieb unverändert. Nach erfolgter Mutagenese wurde zusätzlich mittels PCR ein *vsv-tag* an den c-Terminus des p76 α /p85 α angefügt. Das *vsv* markierte p76 α /p85 α wurde sowohl in den RCAS A Vektor als auch in den RCAS B Vektor kloniert. RCAS A und B unterscheiden sich in der Kodierung für unterschiedliche Hüllproteine, die an verschiedene zelluläre Rezeptoren binden. Durch die Nutzung unterschiedlicher RCAS Vektoren ist eine Co-Transfektion möglich. Als Kontrolle für die Aktivierung des PI3-Kinase Signalwegs wurde ein humanes p110 α und die transformierende Mutante H1047R des p110 α verwendet.

Nach erfolgter Transfektion wurden CEF Zellen (*chicken embryo fibroblasts*) mindestens dreimal gesplittet. Der replikationskompetente Virus hatte in diesem Zeitraum alle Zellen infiziert. Vor der Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen in Serum freiem Medium inkubiert. Nach einer Polyacrylamidgelelektrophorese wurde ein Western Blot durchgeführt (Abbildung

24). Im Western Blot wurde die Expression des p76 α und p85 α in jeweils RCAS A und B sowie deren Coexpression untersucht.

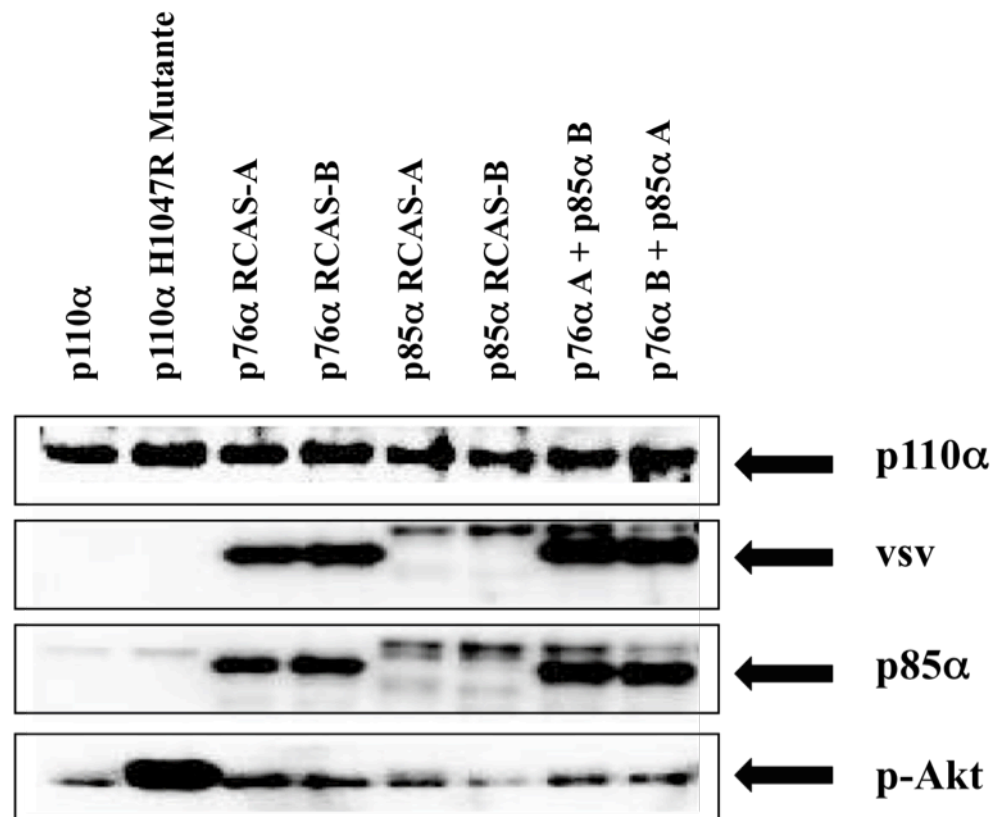


Abbildung 24. Expression und Coexpression von p76 α und p85 α .

Die Western Blot Membran wurde mit einem p110 α Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war spezifisch für Hühnchen p110 α und detektierte kein humanes p110 α . Eine gleichmäßige Bande des endogenen p110 α war in jeder Fraktion zu erkennen.

Außerdem wurde ein p85 α Antikörper benutzt, der sowohl humanes als auch Hühnchen p85 α detektierte. Das endogene Hühnchen p85 α war als sehr schwache Bande etwas oberhalb des humanes p85 α zu sehen. Auffällig war, dass das p76 α Protein ein deutlich stärkeres Signal zeigte, als das Signal der p85 α Überexpression. Auch in der Co-Expression war das Signal des p76 α deutlich stärker als das p85 α . Außerdem war kein Unterschied zur Einfach-Expression erkennbar.

Das p-Akt Signal des p110 α zeigte eine sehr geringe, das p-Akt Signal der H1047R Mutante eine sehr starke p-Akt Aktivierung. Sowohl die einfach exprimierten als auch die coexprimierten p85 α /p76 α zeigten ein p-Akt Signal auf dem Level des p110 α Wildtyp.

Nach dem *Stripping* und nochmaliger Blockierung wurde die Western Blot Membran über Nacht mit einem vsv Antikörper inkubiert. Die Entwicklung am nächsten Tag zeigte wie im Blot mit p85 α Antikörper ein deutlich stärkeres Signal des p76 α als des p85 α . In den p110 α und H1047R Kontrollproben war kein vsv Signal zu erkennen.

7.2.2 Transformierendes Potential von p76 α und p85 α Protein

Nach erfolgter Transfektion von p76 α und p85 α jeweils in RCAS A und B sowie p110 α und H1047R p110 α Mutante, wurden die Zellen mit einem speziellen Agarmedium überschichtet. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen gefüttert, indem eine weitere Schicht Agarmedium auf die alte Schicht gegossen wurde. Nach 9 Tagen wurde der Agar vorsichtig entfernt und die Zellen mit dem Farbstoff Crystalviolett gefärbt. Nachdem die 10 cm Schalen getrocknet waren, wurde ein Photo der gefärbten Zellen angefertigt (Abbildung 25).

Die p110 α H1047R Mutante ist bekannt für ihr transformierendes Potential. Dies äußert sich im Focus Assay durch die Bildung von Mikrotumoren, die in der Crystalviolett färbung als kleine dunkle Spots (Foci) auf dem Boden der Schale zu erkennen sind. Im Gegensatz dazu hat der p110 α Wildtyp keine transformierenden Eigenschaften und dient als Negativkontrolle der Focusbildung.

Sowohl p85 α in RCAS A und B als auch p76 α in RCAS A und B zeigten im Vergleich zu den Kontrollen keine Focusbildung, sondern lediglich die normale Hintergrundfärbung, die auch in der p110 α Kontrolle zu erkennen war.

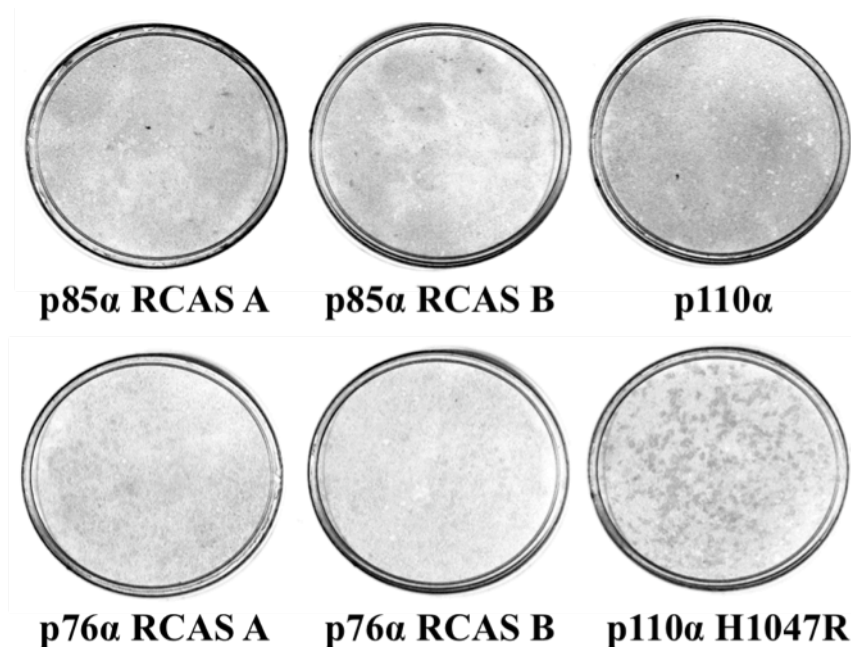


Abbildung 25. Focus Assay von p76 α und p85 α . Die Zellen wurden nach 9 Tagen Kultur mit Crystallviolett gefärbt.

7.2.3 Expression der Mutationen R340E und K379E in p76 α und p85 α in CEF

Mittels Mutagenese wurde in das vsv markierte p76 α und p85 α der Aminosäureaustausch R340E und K379E eingeführt. Es wurden sowohl einfache als auch Doppel-Mutanten hergestellt. Nach erfolgter Transduktion von CEF Zellen wurden die Zellen mindestens dreimal gesplittet und danach Proteinlysate hergestellt. Zur Kontrolle der Transduktion und Aktivierung des PI3-Kinase Signalwegs wurde wieder p110 α und die transformierende Mutante p110 α H1047R verwendet. Nach der Polyacrylamidgelelektrophorese und dem anschließenden Western Blot, wurde die Membran mit p110 α , vsv, p-Akt und β -Aktin Antikörper inkubiert und entwickelt (Abbildung 26).

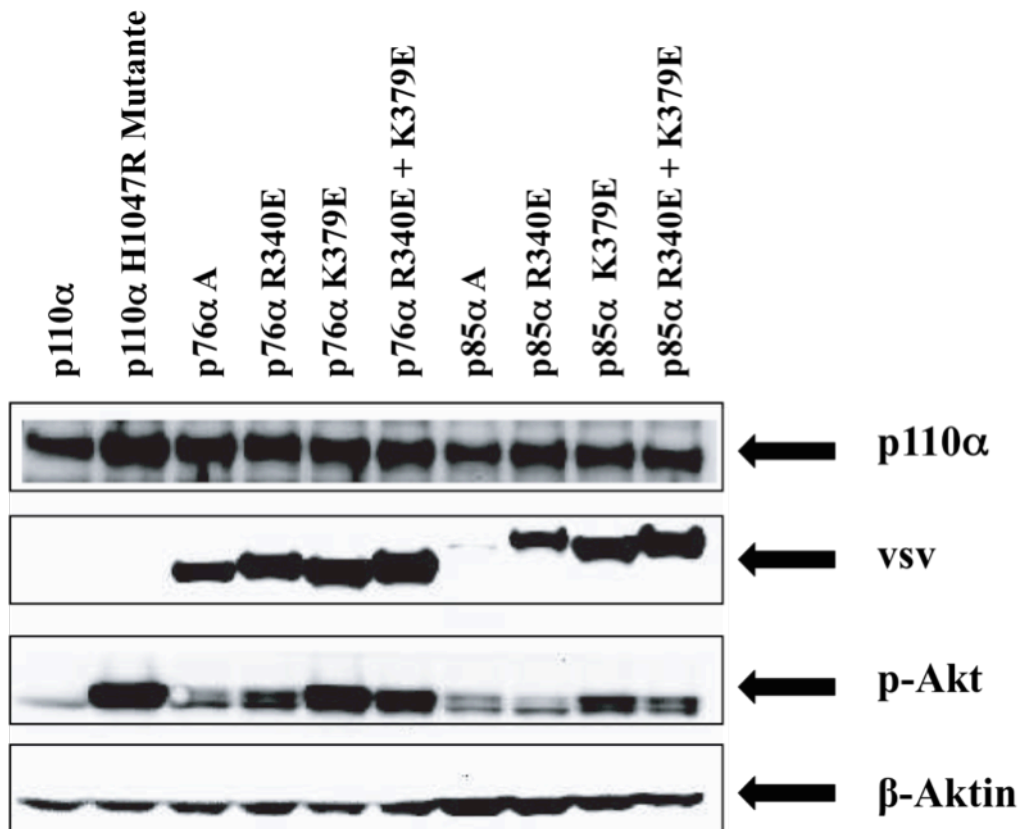


Abbildung 26. Western Blot der p76 α und p85 α R340E, K379E und R340E + K379E Mutationen.

Der vsv Antikörper zeigte bei der p110 α und p110 α H1047R Mutante keine Reaktion. Bis auf das vsv markierte p85 α , das ein sehr schwaches Signal zeigte, hatten alle anderen p76 α und p85 α Mutationen ein sehr starkes Signal im Western Blot. Der p110 α Antikörper war gegen das endogene p110 α der Hühnchenzellen gerichtet und zeigte in alle Proben ein gleichmäßig starkes Signal.

Um die Aktivierung des Signalwegs durch die PI3-Kinase zu beurteilen, wurde ein p-Akt Antikörper benutzt. Ein sehr starkes Signal zeigte p76 α K379E, das vergleichbar mit dem Signal der H1047R Mutation war. Ein starkes Signal war bei p76 α R340E, p76 α R340E + K379E und bei p85 α K379E zu erkennen. p76 α , p85 α , p85 α R340E und p85 α R340E + K379E zeigten das gleich basale Signal wie die p110 α Kontrolle. Der β -Aktin Antikörper diente als Ladungskontrolle.

7.2.4 Transformierendes Potential der R340E und K379E Mutationen

CEF Zellen wurden mit p76 α und p85 α sowie in Kombination mit der Mutation

R340E, K379E und R340E + K379E transfiziert und ein Focus Assay durchgeführt. Dazu dienten p110 α und p110 α H1047R als Kontrolle der Transfektion und der Transformation. Die Zellen wurden für 14 Tage mit Agarmedium kultiviert und danach mit Crystalviolett gefärbt (Abbildung 27).

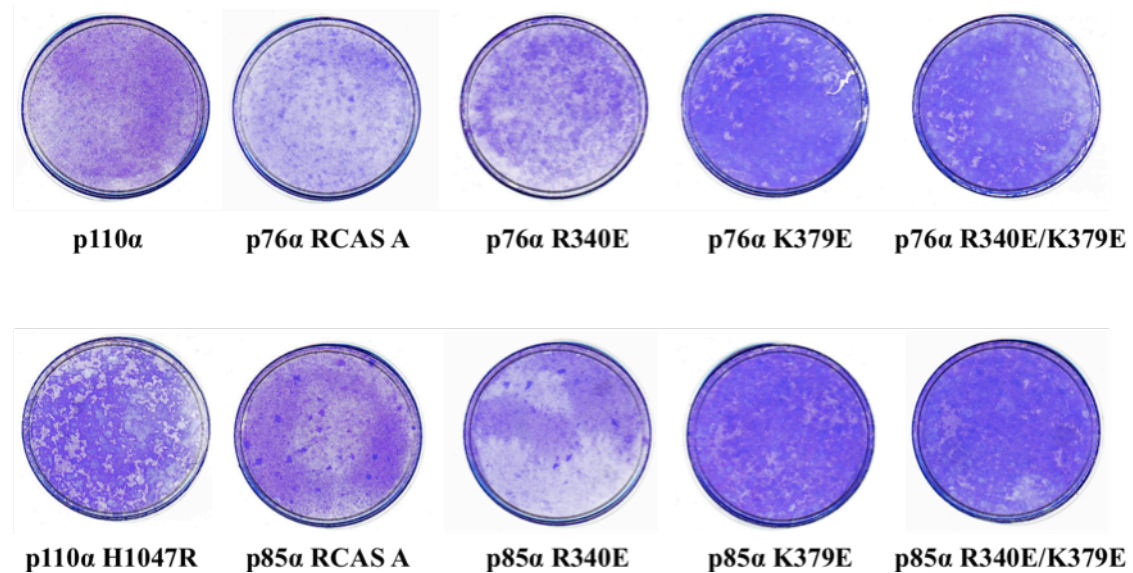


Abbildung 27. Focus Assay der R340E und K379E Mutationen in p76 α und p85 α .

CEF Zellen wurden nach 14 Tagen mit Crystalviolett gefärbt.

p110 α zeigte die normale Hintergrundfärbung und p110 α H1047R zeigte starke Focusbildung. Es waren keine einzelnen Foci mehr sichtbar, vielmehr wuchsen die Foci bereits konfluierend und einzelne Areale untransformierter Zellen waren etwas heller angefärbt zu erkennen. p76 α und p85 α und p85 R340E zeigten keine Focusbildung. Ein leichter transformierender Effekt war bei p76 α R340E zu erkennen. Sowohl p76 α und p85 α K379E sowie p76 α und p85 α K379E + R340E zeigten einen äußerst starken Effekt in der Focusbildung. Es waren fast keine Areale mit untransformierten Zellen zu erkennen. Um den überaus starken transformierenden Effekt besser beurteilen zu können wurde mit den beiden stärksten Mutanten und einer Kontrolle noch ein weiterer Focus Assay durchgeführt. Dazu wurden CEF Zellen mit p76 α K379E und p85 α K379E sowie mit p110 α H1047R transfiziert. Von diesen Plasmiden wurden 0,1 μ g, 0,25 μ g und 0,5 μ g je 10cm Schale eingesetzt. Die Färbung erfolgte nach 9 Tagen Kultivierung der Zellen (Abbildung 28).

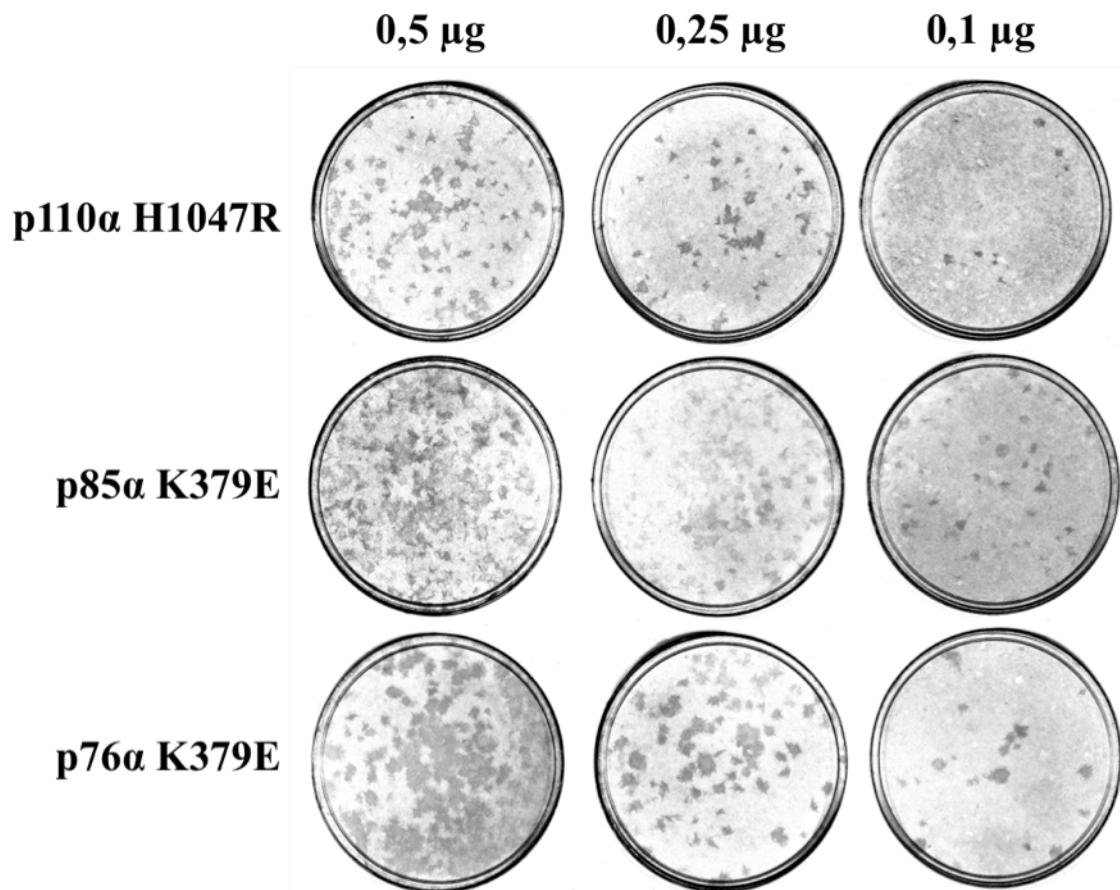


Abbildung 28. Focus Assay der K379E Mutation in p76α und p85α mit verschiedenen Konzentrationen des RCAS Plasmids.

Sowohl p76α als auch p85α K379E zeigten mindestens genauso viele Foci wie p110α H1047R. Bei Einsatz von 0,1μg RCAS-Plasmid zeigten sich vereinzelte Mikrotumore. Die Foci bei Einsatz von 0,5μg Plasmid waren so zahlreich, dass sie zum Teil konfluierend wuchsen. Auffallend war, dass die Foci der p76α K379E auch bei nachfolgenden Wiederholungen des Experiments immer etwas schneller wuchsen und größer waren als die Foci von p110α H1047R.

8 Diskussion

8.1 Regulation von Wildtyp p85 α in CO-Zellen

CO Leukämie Zellen exprimieren eine mutierte Form der p85 α Untereinheit der PI3-Kinase. Diese Mutation ist die Ursache für ein vorzeitiges Stopcodon und generiert eine c-terminal trunke Form des p85 α , das als p76 α bezeichnet wird. Das Wildtyp p85 α ist in diesen Zellen nicht nachweisbar. Dies ist sehr ungewöhnlich, da in frühen Arbeiten ein Gen mit einer Wildtyp Kopie in CO-Zellen gefunden wurde (Jücker *et al.*, 2002).

Deshalb wurde mRNA von CO-Zellen analysiert. Dabei zeigte sich im Kern eine annähernd gleiche Verteilung von Wildtyp (47%) und mutierter (53%) p85 α -mRNA. Diese Verteilung der mRNA lässt vermuten, dass Wildtyp und mutiertes Allel einer ähnlichen Transkription im Zellkern unterliegen. Durch diesen Nachweis ist die Abwesenheit des p85 α Proteins wahrscheinlich nicht auf eine Regulation der Transkription zurückzuführen.

Weiterhin ist von einem hinreichenden Kernexport auszugehen, da Wildtyp und mutierte mRNA auch im Zytoplasma nachweisbar waren. Obwohl hier ein Verhältnis von 22% zu 78% zugunsten der mutierten mRNA gefunden wurde, erklärt dies nicht die Abwesenheit des p85 α Proteins, da p85 α auch in Verdünnungen von 1:10 (10%) noch eindeutig im Western Blot zu detektieren war. Vielmehr kann dieses Verhältnis einen Hinweis auf unterschiedlichen Abbau mit Präferenz der Degradation von Wildtyp mRNA sein. Möglich wäre auch, dass ein struktureller Unterschied zwischen Wildtyp und mutierter mRNA, der mutierten p85 α -mRNA eine bessere Stabilität verleiht und so deren Abbau verzögert.

Im nächsten Schritt wurden Polysomen isoliert. Sie bestehen aus mehreren Ribosomen, die während der Translation von Proteinen mit der mRNA verbunden sind. Die Polysomen wurden mit Hilfe eines Sucrosegradienten in einzelne Fraktionen getrennt. Insgesamt 6 Fraktionen wurden analysiert. Dabei enthielt Fraktion 1 keine und Fraktion 6 die größte Anzahl an Ribosomen pro mRNA. In diesen Fraktionen wurde nun untersucht, in welchem Verhältnis Wildtyp und mutierte p85 α -mRNA mit Ribosomen assoziiert sind. Minimal 24% und maximal 60% der assoziierten p85 α -mRNA war Wildtyp mRNA. Entsprechend lag der Anteil von mutierter mRNA zwischen 40% und 76%. Da auch die absolute Mengenverteilung

der mRNA je Gradientenfraction in Betracht gezogen werden musste, wurde mittels RT-PCR ein absolutes Mengenverhältnis zwischen den einzelnen Fraktionen ermittelt. Im folgenden Diagramm sind sowohl qualitative als auch quantitative Informationen der Gradientenfraktionen zusammengestellt:

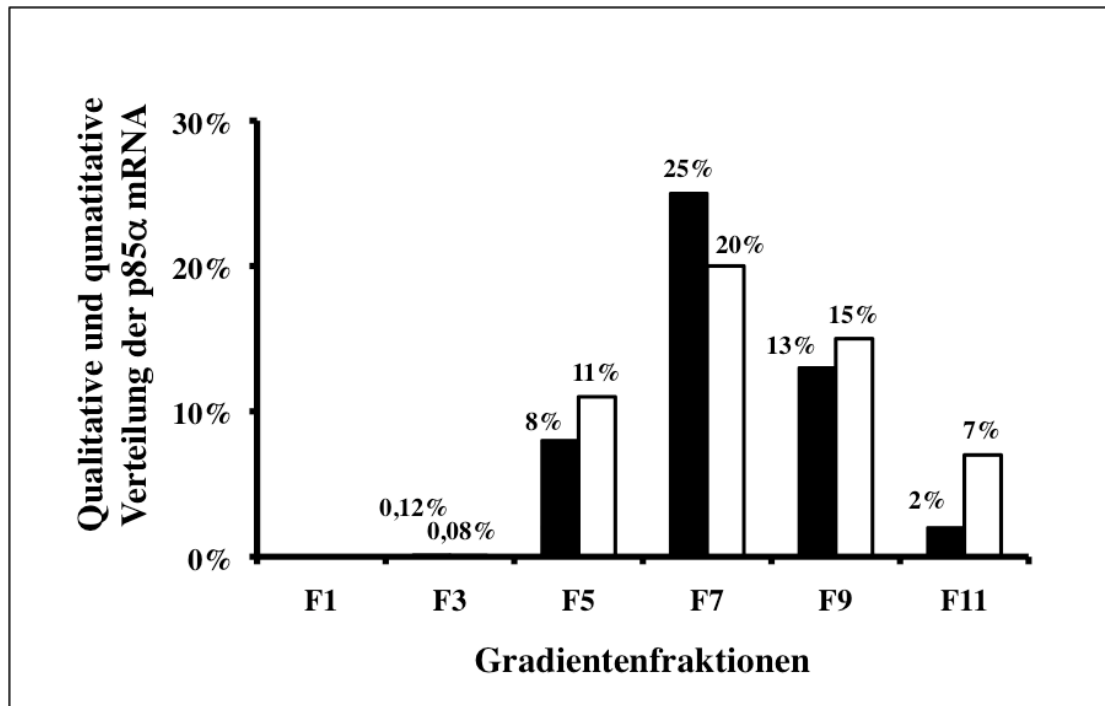


Abbildung 29. Qualitative und quantitative Verteilung der p85α-mRNA in den Fraktionen des Sucrosegradienten. Schwarze Balken Wildtyp p85α-mRNA, weiße Balken mutierte p85α-mRNA.

Da sowohl mutierte als auch Wildtyp p85α-mRNA in den einzelnen Fraktionen nachweisbar waren, kann man davon ausgehen, dass die Wildtyp p85α-mRNA mit Ribosomen assoziiert ist und entweder einer Art Translationsstop unterworfen ist oder p85α-Wildtyp-Protein translatiert und danach so schnell abgebaut wird, dass das Protein im Western Blot nicht mehr nachweisbar ist. Der Abbau von Proteinen im Proteasom ist ein wichtiger Regulationsmechanismus der Zelle. Dabei wird ein Polyubiquitylierungssignal erkannt und durch eine Vielzahl von Proteasen wird das Zielprotein im Inneren des Proteasoms degradiert. Deshalb wurde untersucht, ob das Wildtyp p85α Protein einer solchen Regulation unterliegt. Durch die Hemmung des proteasomalen Abbaus mit MG-132 wurden ubiquitylierte Proteine angereichert. p85α-Wildtyp-Protein konnte im Western Blot jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch in Untersuchungen aus Vorarbeiten konnte weder durch den Sumoylierungsgrad

noch mit Hilfe verschiedener Lysemethoden das fehlende p85 α -Wildtyp-Protein detektiert werden.

Bisher ist im mRNA Metabolismus bekannt, dass häufig Sequenzen im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA für die Kontrolle der Translation verantwortlich sind (Shyu *et al.*, 2008).

Da zur Regulation der mRNA Translation alle nicht kodierenden Bereiche der mRNA eine Rolle spielen können, wurde der 5'- und der 3'- untranslatierte Bereich der mutierten und der Wildtyp p85 α -mRNA sequenziert.

Im 5'- untranslatierten Bereich und im *open reading frame* gab es, bis auf die bekannte Mutationsstelle, keine Unterschiede zwischen mutierter und Wildtyp p85 α -mRNA Sequenz. Der 3'- untranslatierte Bereich konnte bis zur Base 5881 sequenziert werden. An Position 5548 wurde ein Unterschied in der Basensequenz gefunden. Die mutierte p85 α -mRNA kodierte ein Adenin und die Wildtyp mRNA ein Guanin. Dieser Basenunterschied könnte eine mögliche Ursache für die fehlende Translation des Wildtyp p85 α Proteins sein, wobei die Regulation von mRNA durch einen einzigen Basenunterschied bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Außerdem ist zu bemerken, dass im zusätzlichen Vergleich zur p85 α Sequenz der NCBI Datenbank nicht die Wildtyp mRNA sondern die mutierte mRNA den Basenunterschied trägt.

Auch wäre eine Regulation der Translation durch *micro* RNA denkbar. *Micro* RNA binden an korrespondierende Sequenzen des 3'- untranslatierten Bereichs und können dadurch Translation blockieren oder die mRNA Degradation einleiten (Shyu *et al.*, 2008). Durch eine zusätzliche Mutation im 3'- untranslatierten Bereich der mutierten p85 α -mRNA könnte eine spezielle Bindung einer *micro* RNA blockiert sein. Diese *micro* RNA würde dann nur die Wildtyp nicht aber die mutierte mRNA regulieren.

Die Kontrolle der Genexpression auf der Ebene der Translation ist prinzipiell nicht ungewöhnlich. So wird beispielsweise der Translationsstart von Globin, durch Häm in roten Blutzellen reguliert. Bei Häm-Mangel, phosphoryliert die HRI-Kinase (*heme regulated inhibitor*) den eukariotischen Initiationsfaktor 2 α (eIF2 α) und unterdrückt dadurch die Translation der mRNA des Globins (Furuyama *et al.*, 2007).

Aber nicht nur die Unterdrückung des Translationsstarts, sondern auch die temporäre Speicherung von mRNA in subzellulären Kompartments, die *RNA granules* genannt werden, ist ein Mechanismus, der mRNA vom Ort der aktiven Translation fernhält (Anderson & Kedersha, 2008).

Die Inhibition des Translationsstarts oder die Speicherung von mRNA in RNA *granules* sind jedoch wahrscheinlich nicht die Ursachen des fehlenden Wildtyp-Proteins, da die Wildtyp mRNA klar mit Ribosomen assoziiert ist und für diese beiden Möglichkeiten keine ribosomale Interaktion beschrieben ist.

Eine translationale Hemmung von Ribosomen besetzter mRNA konnte bisher im Wurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben werden. So liegt die *lin-14* mRNA des Wurms an Ribosomen gebunden vor, obwohl die Translation durch die *lin-4 regulatory* RNA inhibiert wird (Olsen & Ambros, 1999). Andere Beispiele bei denen ohne begleitende Proteintranslation Ribosomen an mRNA gebunden vorliegen, ist die Interleukin-1 β mRNA in menschlichen Monozyten (Kaspar & Gehrke, 1994), sind Nanos (Clark *et al.*, 2000) und Oskar-mRNA (Braat *et al.*, 2004) in *Drosophila* Oozyten, *heat shock protein 70* in Hühnchen Retikulozyten (Theodorakis *et al.*, 1988) und Thymidin-Kinase in nicht-replizierenden Muskelzellen (Gross & Merrill, 1989). Im größeren Stil wird auch während der Mitose die globale Translation inhibiert, die durch eine Anreicherung des phosphorylierten eIF2 (*eucariotic elongation factor 2*) und dessen verminderter Assoziation zu Ribosomen vermittelt wird. Dabei verbleibt die mRNA mit Ribosomen assoziiert und die Translation ist im Stadium der Elongation blockiert (Sivan *et al.*, 2007).

So konnte in vorausgegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass die Überexpression von p85 α mittels eines retroviralen Expressionsvektors in CO-Zellen nicht möglich war. Da der Vektor nur den *open reading frame* enthielt, kann die Ursache der verhinderten p85 α Protein-Synthese wahrscheinlich im *open reading frame* gesucht werden. Interessant ist auch, dass diese Überexpression auch in einer Reihe anderer Leukämiezellen nicht möglich ist und somit nicht auf CO-Zellen beschränkt bleibt.

Deswegen haben Leukämiezellen möglicherweise eine Strategie entwickelt, um die Synthese von p85 α zu regulieren, nachdem die Bindung zur katalytischen Untereinheit p110 α gesättigt wurde (Geering *et al.*, 2007). Jegliche Synthese von p85 α darüber hinaus ist inhibiert. Offensichtlich passiert dies, während die mRNA mit Ribosomen assoziiert ist. Der zugrundeliegende Mechanismus ist gegenwärtig unbekannt und Gegenstand weiterer Untersuchungen. Auch ist es Spekulation, ob die Verhinderung der Translation durch Degradation des Proteins während der Translation vermittelt wird (Wilhelm & Smibert, 2005). Aus Gründen, die noch erforscht werden müssen, entzieht sich die mutierte p85 α -mRNA dieser Regulation. Eine mögliche Erklärung ist die unterschiedliche Aminosäuresequenz am c-Terminus

von p85 α and p76 α . Darüber hinaus ist p76 α fähig die katalytischen Untereinheit p110 der PI3-Kinase zu binden. Genügend hohe Level an p76 α Protein würden zur Inhibition der Translation der p85 α Wildtyp mRNA führen und so den Mangel an p85 α Protein erklären. Interessanterweise wurde erst kürzlich gezeigt, dass ein veränderter mRNA Metabolismus eine wichtige Rolle während der Blastenkrise in chronisch myeloischer Leukämie spielt (Perrotti & Neviani, 2007). Das dort beschriebene Phänomen könnte eine weitere Strategie von Krebszellen sein, um die strenge Kontrolle der Zellteilung durch die Regulation der Translation von wichtigen Signalmolekülen zu umgehen.

Abbildung 30 zeigt eine Übersicht bisher diskutierter Regulationsmechanismen, die die Abwesenheit des p85 α -Wildtyp-Proteins erklären könnten. Da bisher kein einzelner Regulationsmechanismus verantwortlich gemacht werden konnte, wird die Lösung wahrscheinlich in einem Zusammenspiel verschiedener Aspekte bestehen, deren Zusammenwirken Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte.

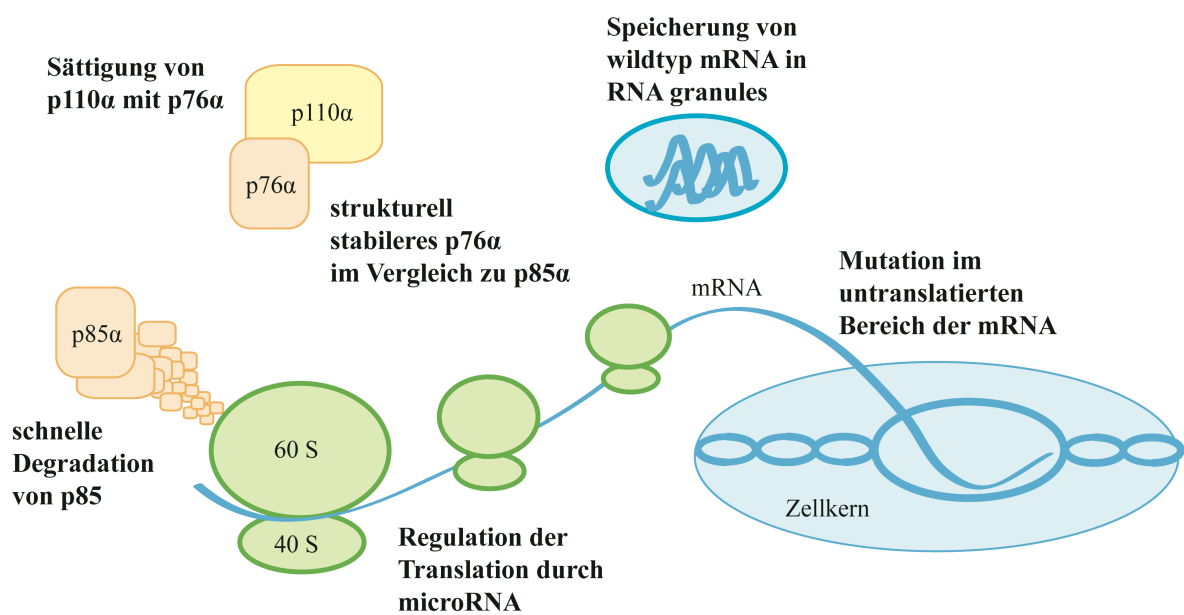


Abbildung 30. Möglichkeiten von Regulationsmechanismen des Wildtyp p85 α .

8.2 Onkogene Aktivität von p76 α und anderen p85 α Mutanten

Die onkogene Aktivität von p76 α und p85 α wurde mit Hilfe eines retroviralen Vektors untersucht, der sowohl Wildtyp als auch mutierte Sequenz stabil ins Genom integrierte. Der Erfolg der Transfektion und Translation wurde im Western Blot kontrolliert. Im Focus Assay zeigten sich im Vergleich zur p110 α Kontrolle, einer stark Focus bildenden Mutante, keine signifikante Mikrotumorbildung von p76 α oder dem Wildtyp p85 α Protein. Eine Ursache könnte in der Interaktion von humanem p76 α mit dem endogenen (Hühnchen) p110 α der CEF Zellen gesucht werden. Möglicherweise wäre eine Focusbildung durch p76 α in einem humanen Expressionssystem erreichbar. Auch mag eine Rolle spielen, dass p76 α zusätzlich zu endogen vorhandenem Hühnchen p85 α und nicht wie in CO-Zellen der Fall ohne p85 α exprimiert wird. Dagegen spricht allerdings, dass in der Untersuchung des nachfolgenden Signalwegs keine Aktivierung von p-Akt im Western Blot nachweisbar war. Deswegen ist wahrscheinlicher anzunehmen, dass der trunkeerte c-terminale Teil der p76 α Mutante keine direkte onkogene Wirkung besitzt. Ein ähnliches Ergebnis zum transformierenden Potential von p76 α wurde auch in Untersuchungen in Mauslymphomzellen gefunden (Horn *et al.*, 2008).

Da der c-terminale Anteil von p85 α sowohl eine Rolle in der Aktivierung des Signalwegs spielt als auch zur strukturellen Integrität und Stabilität des Proteins beiträgt, wurde das trunkeerte p76 α Protein mit zwei künstlich generierten p85 α Mutanten kombiniert, um die jeweils einzelne und ggf. gemeinsame Wirkung auf eine onkogene Transformation zu untersuchen.

Es konnte eine schwache Focusbildung bei der R340E p85 α Mutante gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte K379E p85 α eine sehr starke Focusbildung. Die Kombination aus Punktmutation und der trunkeerten Version (p76 α) von p85 α zeigte sowohl bei der R340E als auch bei K379E eine stärkere Fokusbildung als die jeweilige Mutation im p85 α -Wildtyp-Protein. Die Fokusbildung zeigte im Vergleich größere Foci. Daher hat der c-terminale Anteil von p85 α wahrscheinlich einen stabilisierenden bzw. inhibitorischen Effekt auf die Größe der Focusbildung.

In der nachfolgenden Untersuchung des Signalwegs konnte eine Aktivierung von p-Akt detektiert werden. Das p-Akt Signal war bei R340E p85 α im Vergleich zum

Wildtyp p85 α nicht signifikant erhöht. Eine vergleichbare mittlere p-Akt Aktivierung zeigten K379E p85 α und R340E p76 α . Die stärkste Aktivierung zeigte K379E p76 α . Insgesamt zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Stärke des p-Akt Signals und der Stärke der Focusbildung im Focus Assay und bekräftigt daher nochmals die Bedeutung des c-terminalen Anteils von p85 α .

Da es noch keine Kristallstrukturdaten, wohl aber errechnete Modelle der Lage des c-SH2 Domäne der p85 α Untereinheit gibt, lässt sich vermuten, dass die c-SH2 Domäne in direkter Nähe zur Kinaseaktivität regulierenden n-SH2 Domäne liegt. Aus den unterschiedlichen Ergebnissen der Focusbildung kann von einer indirekten, die Kinaseaktivität stabilisierenden Funktion auf p110 α ausgegangen werden, die über die Regulation der n-SH2 Domäne vermittelt wird. So könnte möglicherweise die c-SH2 Domäne die Lage der regulatorischen Residuen der n-SH2 Domäne stabilisieren. Deshalb sollte in weiterführenden Experimenten die Dysregulation der PI3-Kinase Aktivität durch p85 α Mutanten, sowie der Einfluss von p85 α Mutanten hinsichtlich der p110 α -unabhängigen p85 α Funktionen (Garcia *et al.*, 2006; Taniguchi *et al.*, 2006) untersucht werden. Außerdem sollte die Rolle anderer p85 α Mutanten, sowie die Aktivität von p85 α /p110 α Doppelmutanten untersucht werden.

So weisen Glioblastome nicht nur häufig p110 α Mutationen (Bader *et al.*, 2005), sondern auch p85 α Mutationen auf (Jaiswal *et al.*, 2009). Möglicherweise spielen diese p85 α Mutationen auch eine große Rolle bei der Aktivierung des PI3-Kinase Signalwegs, so wie es beispielsweise für PTEN Inaktivierungen beschrieben wurde (Parsons *et al.*, 2008; TCGA, 2008; Yin & Shen, 2008).

Die onkogene Relevanz des p85 α Genlokus PIK3R1 konnte auch in einem genetischen Screening von Kolontumoren gezeigt werden. Dabei konnte PIK3R1 als häufige Insertionsstelle von Transposons in mehreren unabhängigen Zelllinien identifiziert werden (Starr *et al.*, 2009). So können in Zukunft, mit der Identifizierung von PIK3R1 Mutationen und dem Verständnis ihrer Funktionen, p85 α Mutationen möglicherweise später als Biomarker für p110 α abhängige Tumoren benutzt werden und diese Tumoren mit Hemmstoffen des PI3-Kinase Signalwegs therapiert werden.

9 Zusammenfassung

PI3-Kinasen sind wichtige Regulatoren zellulärer Aktivität. Die Hodgkin-Lymphom-Zelllinie (CO) besitzt eine veränderte Form der PI3-Kinase-Untereinheit p85 α . Obwohl CO-Zellen ein Wildtyp und ein mutiertes p85 α -Allel besitzen, ist das Wildtyp-Protein in CO-Zellen nicht nachweisbar.

Um die Abwesenheit des Wildtyp-Proteins zu untersuchen, wurden Zellkerne isoliert und die Transkription der p85 α -mRNA analysiert. Das Verhältnis von 47% Wildtyp zu 53% mutierter p85 α -mRNA deutet auf eine ähnliche Transkriptionsrate beider Allele hin. Im Zytoplasma ergab die mRNA-Untersuchung 22% Wildtyp und 78% mutierte mRNA. Der Unterschied der mRNA-Anteile im Zytoplasma spricht entweder für einen erhöhten Abbau der Wildtyp oder für eine Stabilisierung der mutierten mRNA. Auch könnte dies ein Hinweis auf die Speicherung von Wildtyp mRNA in RNA *granules* oder anderen zellulären Kompartimenten sein, die in der Zytoplasmafraktion nicht enthalten waren. Da jedoch auch 22% Wildtyp mRNA ausreichen sollten, um p85 α Protein zu translatieren, wurde die Translation der mRNA untersucht. Mit Hilfe eines Sucrosegradienten wurde mit Ribosomen assoziierte p85 α -mRNA isoliert und 45% Wildtyp und 55% mutierte p85 α -mRNA an Ribosomen gebunden nachgewiesen. Da dieser minimale Unterscheid kein Grund für die Abwesenheit des p85 α Proteins darstellte, ist eine Regulation während oder nach der Translation wahrscheinlich. Da die Regulation der Translation oft über die 3'- und 5'- untranslatierten Bereiche der mRNA vermittelt wird, wurden diese Bereiche der Wildtyp und der mutierten p85 α -mRNA sequenziert. Dabei konnte der 5'-untranslatierte und der 3'-untranslatierte Bereich, bis auf 10% vor dem poly-A-Ende, sequenziert werden. Lediglich ein Basenunterschied an Position 5548 der mRNA wurde ermittelt. Dabei wich nicht die Wildtyp, sondern die mutierte p85 α -mRNA von der p85 α Gensequenz der NCBI Datenbank ab. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass dieser Basenunterschied im 3'-untranslatierten Bereich der mutierten p85 α -mRNA die Ursache für die fehlende Translation der Wildtyp p85 α -mRNA ist. Da an Ribosomen assoziierte mRNA normalerweise translatiert wird, wurde eine mögliche schnelle posttranslationale Degradation des p85 α -Wildtyp-Proteins im Proteasom untersucht. Dazu wurde die Degradation von ubiquitinylierten Proteinen im Proteasom mit MG-132 gehemmt. Im nachfolgenden Western Blot konnte allerdings kein Signal des

p85 α -Wildtyp-Proteins nachgewiesen werden. Eine Degradation nach Translation ist deshalb nicht anzunehmen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Abwesenheit des Wildtyp-p85 α -Proteins sehr wahrscheinlich durch eine posttranskriptionelle Regulation während der Initiation der Translation des Proteins verursacht wird, wobei der entsprechende Regulationsmechanismus in zukünftigen Experimenten erforscht werden sollte.

Da p85 α sowohl in vitro eine wichtige Rolle bei der onkogenen Signaltransduktion des PI3-Kinase-Signalwegs spielt, als auch Mutationen in verschiedenen Patiententumoren nachgewiesen werden konnten, wurde deshalb das transformierende Potential von p76 α , einem mutierten p85 α Protein aus CO-Zellen untersucht. Diese Untersuchungen sollten außerdem zum besseren Verständnis der funktionellen Rolle von p85 α Mutationen für die Interaktion mit der katalytischen Untereinheit der PI3-Kinase beitragen.

p76 α zeigte im Vergleich zum Wildtyp-p85 α keine Mikrotumorbildung im Focus Assay. Da jedoch aus funktionellen und strukturellen Analysen bekannt ist, dass die c-terminal truncierte Domäne von p76 α an der Regulation der PI3-Kinase beteiligt sein muss, konnte angenommen werden, dass p76 α vielleicht in Kombination mit einer anderen bekannten Mutation einen onkogenen Effekt zeigen würde. Deshalb wurden eine mögliche transformierende Aktivität von p76 α in Kombination mit der K379E und R340E Mutation von p85 α untersucht. Der Vergleich zwischen der K379E und R340E im Wildtyp-p85 α und im p76 α zeigte einen deutlichen Unterschied in der Stärke der Mikrotumorbildung. Die K379E p76 α Mutante zeigte eine stärkere Transformation als K379E in p85 α . Auch R340E p76 α zeigte eine stärkere Mikrotumorbildung als R340E p85 α , wenn auch die transformierende Potenz deutlich schwächer war, als die der K379E Mutation. Auch die Aktivierung des nachgeschalteten Signalwegs konnte mittels der p-Akt Aktivierung im Western Blot nachgewiesen werden. Dabei entsprach eine starke Mikrotumorbildung im Focus Assay einem starken p-Akt Signal und eine schwache Mikrotumorbildung einem schwachen p-Akt Signal. Zusammenfassend lässt sich aus den gewonnenen Daten eine hemmende Funktion der c-terminalen SH2 Domäne von p85 α ableiten. Da in p76 α diese SH2 Domäne fehlt und in Kombination mit den Mutationen sowohl eine starke Transformation als auch Aktivierung des Signalwegs nachzuweisen war, ist die c-SH2

Domäne höchst wahrscheinlich für den Effekt der weniger starken Transformation und weniger starken Aktivierung des Signalwegs in p85 α verantwortlich.

Um das Verständnis der PI3-Kinase-vermittelten Tumorentstehung und die dadurch mögliche onkologische Therapie weiterentwickeln zu können, wird auch in Zukunft die molekularbiologische Forschung in diesem Bereich große Chancen bieten.

10 Literaturverzeichnis

Anderson P, Kedersha N (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci* **33**(3): 141-150

Aoki M, Blazek E, Vogt PK (2001) A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 136-141

Bader A, Kang S, Zhao L, Vogt P (2005) Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* **5**(12): 921-929

Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK (2005) Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* **5**(12): 921-929

Barthel A, Schmol D, Unterman TG (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **16**(4): 183-189

Braat AK, Yan N, Arn E, Harrison D, Macdonald PM (2004) Localization-dependent oskar protein accumulation; control after the initiation of translation. *Dev Cell* **7**(1): 125-131

Burgering BM, Medema RH (2003) Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* **73**(6): 689-701

Byfield MP, Murray JT, Backer JM (2005) hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem* **280**(38): 33076-33082

Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**(5573): 1655-1657

Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell* **64**(2): 281-302

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**(5392): 1318-1321

Chan TO, Rodeck U, Chan AM, Kimmelman AC, Rittenhouse SE, Panayotou G, Tsichlis PN (2002) Small GTPases and tyrosine kinases coregulate a molecular switch in the phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit. *Cancer Cell* **1**(2): 181-191

Chang HW, Aoki M, Fruman D, Auger KR, Bellacosa A, Tsichlis PN, Cantley LC, Roberts TM, Vogt PK (1997) Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science* **276**(5320): 1848-1850

Chen D, Mauvais-Jarvis F, Bluher M, Fisher SJ, Jozsi A, Goodyear LJ, Ueki K, Kahn CR (2004) p50alpha/p55alpha phosphoinositide 3-kinase knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity. *Mol Cell Biol* **24**(1): 320-329

Clark IE, Wyckoff D, Gavis ER (2000) Synthesis of the posterior determinant Nanos is spatially restricted by a novel cotranslational regulatory mechanism. *Curr Biol* **10**(20): 1311-1314

Cohen P, Frame S (2001) The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(10): 769-776

Corvera S, Czech MP (1998) Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends Cell Biol* **8**(11): 442-446

Dahia PL (2000) PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocr Relat Cancer* **7**(2): 115-129

Deane JA, Fruman DA (2004) Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* **22**: 563-598

del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**(5338): 687-689

Dever TE (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**(4): 545-556

Dhand R, Hiles I, Panayotou G, Roche S, Fry MJ, Gout I, Totty NF, Truong O, Vicendo P, Yonezawa K, et al. (1994) PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J* **13**(3): 522-533

Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* **7**(8): 606-619

Falk MH, Tesch H, Stein H, Diehl V, Jones DB, Fonatsch C, Bornkamm GW (1987) Phenotype versus immunoglobulin and T-cell receptor genotype of Hodgkin-derived cell lines: activation of immature lymphoid cells in Hodgkin's disease. *Int J Cancer* **40**(2): 262-269

Fan QW, Knight ZA, Goldenberg DD, Yu W, Mostov KE, Stokoe D, Shokat KM, Weiss WA (2006) A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell* **9**(5): 341-349

Fersht AR, Daggett V (2002) Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell* **108**(4): 573-582

Foukas LC, Beeton CA, Jensen J, Phillips WA, Shepherd PR (2004) Regulation of phosphoinositide 3-kinase by its intrinsic serine kinase activity in vivo. *Mol Cell Biol* **24**(3): 966-975

- Fruman DA, Cantley LC, Carpenter CL (1996) Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics* **37**(1): 113-121
- Fruman DA, Mauvais-Jarvis F, Pollard DA, Yballe CM, Brazil D, Bronson RT, Kahn CR, Cantley LC (2000) Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nat Genet* **26**(3): 379-382
- Furuyama K, Kaneko K, Vargas PD (2007) Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J Exp Med* **213**(1): 1-16
- Garcia Z, Silio V, Marques M, Cortes I, Kumar A, Hernandez C, Checa AI, Serrano A, Carrera AC (2006) A PI3K activity-independent function of p85 regulatory subunit in control of mammalian cytokinesis. *EMBO J* **25**(20): 4740-4751
- Geering B, Cutillas PR, Nock G, Gharbi SI, Vanhaesebroeck B (2007) Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(19): 7809-7814
- Gross MK, Merrill GF (1989) Thymidine kinase synthesis is repressed in nonreplicating muscle cells by a translational mechanism that does not affect the polysomal distribution of thymidine kinase mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(13): 4987-4991
- Hayakawa M, Kaizawa H, Moritomo H, Koizumi T, Ohishi T, Okada M, Ohta M, Tsukamoto S, Parker P, Workman P, Waterfield M (2006) Synthesis and biological evaluation of 4-morpholino-2-phenylquinazolines and related derivatives as novel PI3 kinase p110alpha inhibitors. *Bioorg Med Chem* **14**(20): 6847-6858
- Hennessey BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **4**(12): 988-1004
- Horn S, Bergholz U, Jucker M, McCubrey JA, Trumper L, Stocking C, Basecke J (2008) Mutations in the catalytic subunit of class IA PI3K confer leukemogenic potential to hematopoietic cells. *Oncogene* **27**(29): 4096-4106
- Huang CH, Mandelker D, Gabelli SB, Amzel LM (2008) Insights into the oncogenic effects of PIK3CA mutations from the structure of p110alpha/p85alpha. *Cell Cycle* **7**(9): 1151-1156
- Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Gabelli SB, Amzel LM (2007) The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science* **318**(5857): 1744-1748
- Hughes SH, Greenhouse JJ, Petropoulos CJ, Suttrave P (1987) Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors. *J Virol* **61**(10): 3004-3012

Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stern HM, Wang W, Kan Z, Dbouk HA, Peters BA, Waring P, Dela Vega T, Kenski DM, Bowman KK, Lorenzo M, Li H, Wu J, Modrusan Z, Stinson J, Eby M, Yue P, Kaminker JS, de Sauvage FJ, Backer JM, Seshagiri S (2009) Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. *Cancer Cell* **16**(6): 463-474

Jimenez C, Jones DR, Rodriguez-Viciana P, Gonzalez-Garcia A, Leonardo E, Wennstrom S, von Kobbe C, Toran JL, L RB, Calvo V, Copin SG, Albar JP, Gaspar ML, Diez E, Marcos MA, Downward J, Martinez AC, Merida I, Carrera AC (1998) Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J* **17**(3): 743-753

Jones DB, Scott CS, Wright DH, Stein H, Beverley PC, Payne SV, Crawford DH (1985) Phenotypic analysis of an established cell line derived from a patient with Hodgkin's disease (HD). *Hematol Oncol* **3**(2): 133-145

Jucker M, Schaadt M, Diehl V, Poppema S, Jones D, Tesch H (1990) Heterogeneous expression of proto-oncogenes in Hodgkin's disease derived cell lines. *Hematol Oncol* **8**(4): 191-204

Jucker M, Sudel K, Horn S, Sickel M, Wegner W, Fiedler W, Feldman RA (2002) Expression of a mutated form of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in a Hodgkin's lymphoma-derived cell line (CO). *Leukemia* **16**(5): 894-901

Jücker M, Südel K, Horn S, Sickel M, Wegner W, Fiedler W, Feldman RA (2002) Expression of a mutated form of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in a Hodgkin's lymphoma-derived cell line (CO). *Leukemia* **16**(5): 894-901

Kang S, Bader AG, Vogt PK (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 802-807

Kaspar RL, Gehrke L (1994) Peripheral blood mononuclear cells stimulated with C5a or lipopolysaccharide to synthesize equivalent levels of IL-1 beta mRNA show unequal IL-1 beta protein accumulation but similar polyribosome profiles. *J Immunol* **153**(1): 277-286

Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 615-675

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**(5308): 1943-1947

Maehama T, Dixon JE (1999) PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* **9**(4): 125-128

- Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N (2006) mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* **25**(48): 6416-6422
- Maruyama N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Monden M, Noguchi S (2007) Clinicopathologic Analysis of Breast Cancers with PIK3CA Mutations in Japanese Women. *Clin Cancer Res*
- Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, Schneidman-Duhovny D, Wolfson HJ, Backer JM, Williams RL (2007) Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* **317**(5835): 239-242
- Mizoguchi M, Nutt CL, Mohapatra G, Louis DN (2004) Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol* **14**(4): 372-377
- Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkuis FJ, Thomas G (2005) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(40): 14238-14243
- Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B (2001) New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha. *Sci STKE* **2001**(65): PE1
- Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B (2003) PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* **3**(4): 317-330
- Olsen PH, Ambros V (1999) The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* **216**(2): 671-680
- Orphanides G, Reinberg D (2002) A unified theory of gene expression. *Cell* **108**(4): 439-451
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**(5897): 1807-1812
- Parsons R (2004) Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway. *Semin Cell Dev Biol* **15**(2): 171-176
- Perrotti D, Neviani P (2007) From mRNA metabolism to cancer therapy: chronic myelogenous leukemia shows the way. *Clin Cancer Res* **13**(6): 1638-1642
- Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, Thomas RJ, Phillips WA (2001) The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res* **61**(20): 7426-7429

- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**(4): 501-512
- Ramakrishnan V (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**(4): 557-572
- Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, Sellers WR (1999) Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2110-2115
- Reed R, Hurt E (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* **108**(4): 523-531
- Richardson CJ, Schalm SS, Blenis J (2004) PI3-kinase and TOR: PIKTORing cell growth. *Semin Cell Dev Biol* **15**(2): 147-159
- Romashkova JA, Makarov SS (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**(6748): 86-90
- Rordorf-Nikolic T, Van Horn DJ, Chen D, White MF, Backer JM (1995) Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit. *J Biol Chem* **270**(8): 3662-3666
- Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmstrom PO, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R (2005) PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* **65**(7): 2554-2559
- Samuels Y, Velculescu VE (2004) Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* **3**(10): 1221-1224
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**(5670): 554
- Sansal I, Sellers WR (2004) The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* **22**(14): 2954-2963
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**(5712): 1098-1101
- Shi BH, Nashimoto T, Andoh R, Konishi H, Kobayashi M, Xu Q, Ihara S, Fukui Y (2006) Mutation of the PI3' kinase gene in a human colon carcinoma cell line, HCC2998. *DNA Cell Biol* **25**(7): 399-405
- Shyu AB, Wilkinson MF, van Hoof A (2008) Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J* **27**(3): 471-481

Siegel G, Davis B, Kristensen SM, Sankar A, Linacre J, Stein RC, Panayotou G, Waterfield MD, Driscoll PC (1998) Solution structure of the C-terminal SH2 domain of the p85 alpha regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Mol Biol* **276**(2): 461-478

Sivan G, Kedersha N, Elroy-Stein O (2007) Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division. *Mol Cell Biol* **27**(19): 6639-6646

Starr TK, Allaei R, Silverstein KA, Staggs RA, Sarver AL, Bergemann TL, Gupta M, O'Sullivan MG, Matisse I, Dupuy AJ, Collier LS, Powers S, Oberg AL, Asmann YW, Thibodeau SN, Tessarollo L, Copeland NG, Jenkins NA, Cormier RT, Largaespada DA (2009) A transposon-based genetic screen in mice identifies genes altered in colorectal cancer. *Science* **323**(5922): 1747-1750

Stephens LR, Jackson TR, Hawkins PT (1993) Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim Biophys Acta* **1179**(1): 27-75

Taniguchi CM, Tran TT, Kondo T, Luo J, Ueki K, Cantley LC, Kahn CR (2006) Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha suppresses insulin action via positive regulation of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(32): 12093-12097

TCGA (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**(7216): 1061-1068

Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, Inukai K, Asano T, Kaburagi Y, Ueki K, Nakajima H, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Sekihara H, Yin Y, Barrett JC, Oda H, Ishikawa T, Akanuma Y, Komuro I, Suzuki M, Yamamura K, Kodama T, Suzuki H, Koyasu S, Aizawa S, Tobe K, Fukui Y, Yazaki Y, Kadowaki T (1999) Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet* **21**(2): 230-235

Theodorakis NG, Banerji SS, Morimoto RI (1988) HSP70 mRNA translation in chicken reticulocytes is regulated at the level of elongation. *J Biol Chem* **263**(28): 14579-14585

Thong FS, Dugani CB, Klip A (2005) Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology (Bethesda)* **20**: 271-284

Tupler R, Perini G, Green MR (2001) Expressing the human genome. *Nature* **409**(6822): 832-833

Uptain SM, Kane CM, Chamberlin MJ (1997) Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu Rev Biochem* **66**: 117-172

Van Haastert PJ, Devreotes PN (2004) Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(8): 626-634

Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* **346 Pt 3**: 561-576

- Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC (2005) Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* **30**(4): 194-204
- Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* **253**(1): 239-254
- Velho S, Oliveira C, Ferreira A, Ferreira AC, Suriano G, Schwartz S, Jr., Duval A, Carneiro F, Machado JC, Hamelin R, Seruca R (2005) The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer* **41**(11): 1649-1654
- Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**(7): 489-501
- Vogt PK, Kang S, Elsliger MA, Gymnopoulos M (2007) Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. *Trends Biochem Sci* **32**(7): 342-349
- Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L, Williams RL (1999) Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* **402**(6759): 313-320
- Wetzker R, Rommel C (2004) Phosphoinositide 3-kinases as targets for therapeutic intervention. *Curr Pharm Des* **10**(16): 1915-1922
- Wilhelm JE, Smibert CA (2005) Mechanisms of translational regulation in Drosophila. *Biol Cell* **97**(4): 235-252
- Wishart MJ, Dixon JE (2002) PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. *Trends Cell Biol* **12**(12): 579-585
- Wu ZX, Song TB, Li DM, Zhang XT, Wu XL (2007) Overexpression of PTEN suppresses growth and induces apoptosis by inhibiting the expression of survivin in bladder cancer cells. *Tumour Biol* **28**(1): 9-15
- Wymann MP, Marone R (2005) Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr Opin Cell Biol* **17**(2): 141-149
- Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M (2003) Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol Sci* **24**(7): 366-376
- Yin Y, Shen WH (2008) PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene* **27**(41): 5443-5453
- Yu J, Wjasow C, Backer JM (1998) Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem* **273**(46): 30199-30203

11 Danksagung

Meinen Eltern und Großeltern, meiner Familie.

Manfred Jücker, Evita Mohr, Peter Vogt, Wiebke Wegner, Marina Lewinski, Nicole Grabinski, Clarissa Precht, Jonathan Hart, Marco Gymnopoulos, Alexander Flach Nitsch.

Ich danke euch für eure Unterstützung und Hilfe, für Aufmunterung und liebe Worte, für gute Zusammenarbeit und fruchtbare Ideen, fürs Zuhören und rege Auseinandersetzung.

Vielen Dank.

12 Lebenslauf

13 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.



Unterschrift: