(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 34 113 T2** 2007.10.31

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 590 126 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 34 113.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB93/00761**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 908 028.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1993/021328**
(86) PCT-Anmeldetag: **13.04.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **28.10.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.04.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **21.02.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.10.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/54*** (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12P 9/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
9208135 13.04.1992 GB

(73) Patentinhaber:
Ludwig Institute for Cancer Research, New York, N.Y., US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:
HILES, Ian D., London W1P 8BT, GB; FRY, Michael J., London W1P 8BT, GB; DHAND, Ritu, London W1P 8BT, GB; WATERFIELD, Michael D., London W1P 8BT, GB; PARKER, Peter J., London WC2A 3PX, GB; OTSU, Masayuki, London W1P 8BT, GB; PANAYOTOU, George, London W1P 8BT, GB; VOLINIA, Stefano, London W1P 8BT, GB; GOUT, Ivan, London W1P 8BT, GB

(54) Bezeichnung: **POLYPEPTIDE MIT KINASEAKTIVITÄT, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft neue Polypeptide, die eine Kinaseaktivität zeigen. Genauer gesagt betrifft die Erfindung Polypeptide, die Phosphoinositid-3-Kinaseaktivität aufweisen (hiernach wird Phosphoinositid „PI" genannt), insbesondere Moleküle, die in jene Stoffwechselwege involviert sind, die für das zelluläre Wachstum und die Zelldifferenzierung verantwortlich sind.

[0002] Es gab große Fortschritte bezüglich des Wissens über die Struktur und die Funktion der signaltransduzierenden Moleküle und der zweiten Messengersysteme, die an Zelloberflächenrezeptoren gebunden sind. Daher gehört eine Untergruppe der Polypeptid-Wachstumsfaktor-Rezeptoren zu der Familie der Protein-Tyrosin-Kinasen (hiernach „PKT" genannt), und die Aktivierung dieser Rezeptoren nach der Ligandbindung involviert eine Autophosphorylierung des Rezeptors sowie eine Phosphorylierung einer Reihe intrazellulärer Substratproteine (beschrieben in A. Ullrich et al. (1990)). Die Bedeutung der Rezeptor-Autophosphorylierung war bis vor kurzem noch unklar, als Beweise aus mehreren Laboratorien darauf hindeuteten, dass dieses Vorkommnis die Bildung von Komplexen zwischen Rezeptorproteinen und mutmaßlichen Wachstumsregulationsproteinen vermitteln könnte, wie z.B. Phospholipase-Cγ (PLCγ) (Meisenhelder et al. (1989)), Phosphatidylinosit-PI3-Kinase (S.R. Coughlin et al. (1989)), GTPase-aktivierendes Protein (GAP) (Kaplan et al. (1990)), das Serin/Theonin-Kinase-Raf (Morrison et al. (1989)) sowie Mitglieder der src-Familie der Protein-Tyrosin-Kinasen (R.M. Kypta et al. (1990)) (beschrieben in L.C. Cantley et al. (1991)).

[0003] Die Assoziation der P1-Kinaseaktivität mit aktivierten Rezeptoren ist von besonderem Interesse, da ein erhöhter Umsatz an PI und seinen phosphorylierten Derivaten mit der Wirkung der Hormone, Wachstumsfaktoren und der Transformation von Zellen durch DNA- und RNA-Viren in Zusammenhang gebracht wurde (beschrieben in M. Whitman et al. (1988); Cantley et al. (1991)). Die Existenz mehrerer Spezies der PI-Kinase ist bekannt, bis jetzt wurde jedoch keines dieser Enzyme durch Klonieren und Expression sowie durch die Demonstration der PI-Kinase-Aktivität charakterisiert. Fibroblasten enthalten zumindest zwei PI-Kinaseaktivitäten, die aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber Detergens und ihrer kinetischen Eigenschaften zu unterscheiden sind (M. Whitman et al. (1987)). Diese beiden Aktivitäten wurden als Typ I (durch nicht ionische Detergenzien inhibiert) und als Typ II (durch nicht ionische Detergenzien stimuliert und durch Adenosin inhibiert) klassifiziert. Eine dritte unterschiedliche Spezies (Typ III) wurde im Gehirn von Rindern identifiziert, wurde jedoch erst in sehr geringem Ausmaß charakterisiert (G. Enderman et al. (1987)). Eine Spezies der PI-Kinaseaktivität erweckte bei der Suche nach zweiten Messengersystemen, die an Protein-Tyrosin-Kinasen gebunden sind, besonders großes Interesse, da von dieser Aktivität gezeigt wurde, dass sie mit aktivierten, aus Blutplättchen gewonnenen Wachstumsfaktor- (PDGF-) Rezeptoren (D.R. Kaplan et al. (1987); S.R. Coughlin et al. (1989)) und mit dem mittleren Polyoma-T-Antigen/pp60$^{c\text{-}src}$ - (mT:pp60$^{c\text{-}src}$-) Komplex coimmunpräzipitierte (M. Whitman et al. (1985)). Es wurde gezeigt, dass diese Aktivität auf eine Typ-I-PI-Kinase zurückzuführen ist, die neue Inositlipide produziert, die an der D-3-Position des Inositrings phosphoryliert sind (M. Whitman et al. (1988)). Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass dieses Enzym auch mit dem CSF-1-Rezeptor (L. Varticovski et al. (1989)) -Set (Lev et al. (1991)), dem epidermalen Wachstumsfaktor- (EGF-) Rezeptor (Bjorge et al. (1990)), dem PDGF-α-Rezeptor (Yu et al. (1991)), dem Insulin-Rezeptor (Ruderman et al. (1990)), dem Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor, Met (Graziani et al. (1991)), sowie mit aktivierten Nicht-rezeptorprotein-Tyrosin-Kinasen (Fukui & Hanafusa (1989); Chan et al. (1990); Varticovski et al. (1991)) assoziierte.

[0004] Die PI3-Kinase-Aktivität wurde in diesen Immunpräzipitaten eng mit der Gegenwart von 81/85-kD-Proteinen in Verbindung gebracht, die durch die assoziierte Protein-Tyrosin-Kinase sowohl in vitro als auch in vivo an Tyrosin-Resten phosphoryliert werden kann (D.R. Kaplan et al. (1987); S.A. Courtneidge et al. (1987); Cohen et al. (1990)). Vor kurzem wurde eine 650fache Reinigung der PI3-Kinase aus dem Gehirn von Rindern beschrieben, die, unter den anderen im reinsten Präparat vorhandenen Proteinen, ein 85-kD-Protein enthielt, von dem gezeigt wurde, dass es als In-vitro-Substrat für die PDGF- und die EGF-Rezeptoren diente (S.J. Morgan et al. (1990)). Unter Verwendung von Sequenzinformationen von tryptischen Peptiden, die von diesem Protein abstammen, wurden vor kurzem zwei homologe p85-Rinderproteine, genannt p85α und p85β (M. Otsu et al. (1991)), kloniert. Zwei andere Gruppen klonierten unabhängig davon unter Verwendung anderer Strategien murine und menschliche p85α-Homologe (J.A. Escobedo et al. (1991 b); E.Y. Skolnik et al. (1991)). Bei beiden dieser p85-Proteine kann demonstriert werden, dass sie in vitro direkt an den phosphorylierten PDGF-Rezeptor binden (M. Otsu et al. (1991), J.A. Escobedo et al. (1991 b)). Diese Proteine können als die rezeptorbindenden Untereinheiten der PI3-Kinase fungieren, da von keinem der beiden gezeigt werden kann, dass es bei Expression in einer Reihe an Zellsystemen für die intrinsische PI3-Kinase-Aktivität kodiert (M. Otsu et al. (1991), J.A. Escobedo et al. (1991b)). Die Immunpräzipitation von ^{125}I-markierter PI3-Rinderhirn-Kinase mit Antikörpern, die gegen p85-Proteine erzeugt wurden, präzipitiert jedoch ein 85-kD-Protein zusammen mit einem zweiten Protein mit einem Molekulargewicht von 110 kD (M. Otsu et al. (1991)).

[0005] PI3-Kinase ist eines einer wachsenden Anzahl potentieller Signalproteine, die mit Protein-Tyrosin-Kinasen assoziieren, die entweder durch Ligandenstimulierung oder als Konsequenz der Zelltransformation aktiviert werden. Ein gemeinsames Merkmal all dieser Protein (mit Ausnahme von Raf) ist, dass sie eine oder mehrere SH2-Domänen enthalten (src-Homologie) (C.A. Koch et al. (1991)). Sowohl p85α- als auch p85β-Proteine enthalten zwei SH2-Domänen. Experimente einer Reihe an Laboratorien deuteten darauf hin, dass diese Domänen durch die Bindung an Peptidsequenzen funktionieren könnten, die normalerweise an Tyrosin-Resten phosphoryliert sind, wodurch sie die Komplexbildung vermitteln, die auf die Aktivierung der Protein-Tyrosin-Kinasen folgt (Anderson et al. (1990); Meyer & Hanafusa (1990); Moran et al. (1990); Matsuda et al. (1991); Meyer et al. (1991); beschrieben in C.A. Koch et al. (1991)). Zur Unterstützung dieses Ansatzes deuten einige Studien darauf hin, dass die Tyrosinphosphorylierung des PDGF-Rezeptors oder des Polyoma-mT essentiell für seine Assoziation mit Proteinen, wie z.B. der PI3-Kinase (A. Kazlauskas et al. (1989); D.A. Talmage et al. (1989)), GAP (Kaplan et al. (1990); A. Kazlauskas et al. (1990)) und PLCγ ist (Anderson et al. (1990); Margolis et al. (1990)), ist. Der für die Bindung der PI3-Kinase-Aktivität (und eines 85-kD-Phosphoproteins) an den menschlichen PDGF-Rezeptor erforderliche genaue Tyrosin-Rest wurde an Tyrosin 751 kartiert, das in der Kinase-Insertregion der Protein-Tyrosin-Kinase-Domäne zu finden ist (Kazlauskas & Cooper (1989, 1990); Kazlauskas et al. (1991)). Die Bindungsstellen für andere Proteine an diesen Rezeptor (z.B. PLCγ, GAP und Kinasen der src-Familie) müssen erst kartiert werden, diese Proteine können jedoch über andere phosphorylierte Tyrosin-Reste assoziieren.

[0006] Diese Erfindung wurde durch die Erkenntnis erleichtert, dass gewisse synthetisierte Peptide aus dem menschlichen PDGF-β-Rezeptor, nämlich Peptide, die von der Sequenz um Tyrosin 751 des PDGF-Rezeptors abstammen, verwendet werden können, um Rinderhirn-PI3-Kinase zu binden und zu isolieren, was eine weitere Reinigung von partiell gereinigter Rinderhirn-PI3-Kinase auf offensichtliche Homogenität (wie von Morgan et al. (1990) beschrieben) sowie den Erhalt von in vernünftigem Ausmaß gereinigtem p110-Protein ermöglicht. Wie im Folgenden hierin beschrieben wird, erfordert die PI3-Kinase eine Phosphopeptid-Säule, die ein YXXM-Motiv für seine Isolierung mittels eines solchen Verfahrens enthält, wobei das Tyrosin phosphoryliert wird. Nur falls eine Säule dieses Typs verwendet wird, sind sowohl die 85-kD- als auch die 110-kD-Proteine gesichert, wohingegen die 85-kD-Untereinheit an alle getesteten Phosphopeptid-Affinitätssäulen bindet und nur nicht-phosphorylierte Peptide nicht bindet. Weiters ergibt die relativ kleine Größe der Phosphopeptide, die für solche Säulen verwendet werden, eine gute Spezifität und eine hohe Dichte der Affinitätsgruppen pro Volumeneinheit der Säule.

[0007] Diese Reinigung ermöglichte die Bereitstellung von Aminosäuresequenzinformation sowie die Durchführung des cDNA-Klonierens. Dieses Klonieren ergab einige interessante Fakten. Daher ist p110 ein 1068-Aminosäure-Protein mit einem unerwartet hohen (im Vergleich zu den SDS-PAGE-Figuren) berechneten Molekulargewicht von etwa 124 kD (124247). Das Protein ist mit Vps34p verwandt, einem Saccharomycescerevisiae-Protein, das in das Sortieren von Proteinen in die Vakuole involviert ist. Überraschenderweise war p110, als es in COS-1-Zellen exprimiert wurde, inaktiv, und die Aktivität war nur zu sehen, wenn es mit p85 komplexiert wurde. Als es jedoch in Insektenzellen exprimiert wurde, konnte gezeigt werden, dass p110 eine intrinsische Kinase-Aktivität besaß. Das neue p110-Polypeptid kann mit p85α zu einem aktiven p85α/p110-Komplex assoziiert werden, der den aktivierten Rezeptor des koloniestimulierenden Faktors 1 bindet. Die Erfindung basiert auch auf diesen Entdeckungen und unvorhersehbaren Erkenntnissen.

[0008] Daher stellt die vorliegende Erfindung in einem Aspekt ein isoliertes Polypeptid mit einem berechneten Molekulargewicht von etwa 124 kD bereit, das PI3-Kinase-Aktivität besitzt, wenn es mittels rekombinanter Produktion in Insektenzellen produziert wird, oder ein Polypeptid, das davon abstammen kann und eine PI3-Kinase-Aktivität aufweist und bei Assoziation mit einer p85-Säugetier-PI3-Kinase-Untereinheit an ein Phosphopeptid bindet, das das YXXM-Motiv umfasst, wobei das Tyrosin phosphoryliert ist. Solche Polypeptide sind vorzugsweise jene, die in der Lage sind, mit p85-Untereinheiten von Säugetier-PI3-Kinasen zu assoziieren, um aktive p85/p110-Komplexe zu bilden. Die Polypeptide besitzen vorzugsweise entweder die Aminosäuresequenz aus **Fig. 9** hierin oder weisen eine signifikante Sequenzhomologie damit auf. Es werden Polypeptide bevorzugt, die zumindest die Aminosäuren 272 bis 1068 der Sequenz aus **Fig. 9** hierin aufweisen.

[0009] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff „PI3-Kinase-Aktivität" eine Phosphoinositid-3-Kinase-Aktivität.

[0010] Die Erfindung umfasst Polypeptide, wie sie definiert wurden, die eine Sequenzhomologie mit einer beliebigen ausgewählten Säugetierspezies der PI3-Kinase aufweisen. Eine menschliche Sequenz wird in **Fig. 16** hierin angeführt. Die Aminosäuren 37 (tyr) bis 834 (Stoppcodon) (siehe **Fig. 16**) sind > 99 % mit der p110-Rinder-cDNA-Sequenz konserviert und entsprechen den Aminosäuren 272–1069 (Stoppcodon) der Sequenz aus

Fig. 9. Stromauf der Aminosäure 37 (menschliche Sequenz) gibt es keine Sequenzähnlichkeit zwischen den p110-cDNA-Sequenzen aus den zwei Spezies.

[0011] Die Erfindung umfasst, monoklonale oder andere, Antikörper gegen die Polypeptide der Erfindung.

[0012] In einem anderen Aspekt umfasst die Erfindung eine DNA-Sequenz, die entweder (a) eine Sequenz, die in Fig. 9 hierin dargestellt ist; (b) eine beliebige der Subsequenzen A bis N aus Fig. 9 hierin; (c) die von den Basen 816 bis 3204 aus Fig. 9 hierin repräsentierte Sequenz; (d) eine Sequenz, die in Fig. 16 hierin dargelegt ist; oder (e) eine an (a), (b), (c) oder (d) hybridisierbare DNA-Sequenz umfasst; wobei die Sequenz (a), (b), (c), (d) oder (e) für ein Polypeptid kodiert, das bei Expression in Insektenzellen eine PI3-Kinase-Aktivität aufweist oder mit einer p85-Säugetier-PI3-Kinase-Untereinheit komplexieren kann, um solch eine Aktivität zu erzeugen. Die oben erwähnten Subsequenzen A bis N sind selbst Teil der vorliegenden Erfindung.

[0013] Hybridisierungsbedingungen, die verwendet werden können, um aktive Sequenzen zu finden, können Folgendes umfassen, sind jedoch nicht darauf eingeschränkt: 1 M NaCl/10 × Denhardt-Lösung/50 mM Tri-HCl (pH 7,4)/10 mM EDTA/0,1 % SDS/100 µg/ml bei 65 °C 16 Stunden lang denaturierte Heringspermien-DNA (Sigma), und zwar mit den folgenden Waschbedingungen, d.h. 2 × SSC/0,1 % SDS, 42 °C ----> 0,5 × SSC/0,1 % SDS, 50 °C ----> 0,1 × SSC/0,1 % SDS, 65 °C----> 0,1 × SSC/0,1 % SDS, 68 °C.

[0014] Die Erfindung stellt weiters ein DNA-Konstrukt bereit, umfassend eine DNA-Sequenz, wie sie oben definiert wurde, unter der Kontrolle einer Kontrollsequenz sowie im korrekten Leseraster in einem Expressionsvektor.

[0015] Die Kontrollsequenz kann einen regulierbaren Promotor (z.B. Trp) umfassen. Ausgewählte Wirtszellen, die genetisch verändert wurden, um eine Expression des kodierten Polypeptids durch die Inkorporation eines solchen Konstrukts zu erlauben, sind ein weiterer Aspekt der Erfindung, und die Erfindung umfasst sowohl ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Polypeptids durch das Züchten solcher Wirtszellen als auch natürlich die resultierenden Polypeptide.

[0016] Im Allgemeinen können neue Polypeptide der Erfindung verwendet werden, um PI3-Kinaseaktivität zu verwenden, und zwar entweder direkt oder nach dem Komplexieren mit einer Säugetier-p85-Untereinheit. Enzymatisch aktive Komplexe, die die oben definierten Polypeptide involvieren, sind Teil der Erfindung.

[0017] Die Erfindung zieht ein prophylaktisches oder therapeutisches Verfahren in Betracht, das die Förderung oder die Hemmung der Zellproliferation durch die Wirkung eines Agonisten bzw. Antagonisten für die PI3-Kinaseaktivität eines Polypeptids der Erfindung oder eines Komplexes, der dieses inkludiert, involviert, worin die Zellproliferation durch einen Zelloberflächenrezeptor vermittelt wird, der mit der Aktivität wechselwirkt. Die vorliegende Erfindung eröffnet durch das Bereitstellen des gereinigten sequenzierten aktiven Proteins zum ersten Mal die Möglichkeit, (unter Verwendung von Standardverfahren) auf solche Agonisten oder Antagonisten zu screenen.

[0018] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine pharmazeutische oder veterinärmedizinische Formulierung, die einen Agonisten oder Antagonisten wie oben definiert umfasst, der für die pharmazeutische bzw. veterinärmedizinische Verwendung formuliert wurde, gegebenenfalls zusammen mit einem annehmbaren Verdünnungsmittel, Träger oder Exzipienten und/oder in Einheitsdosierungsform. Herkömmliche pharmazeutische oder veterinärmedizinische Verfahren können zur Anwendung kommen, um geeignete Formulierungen oder Zusammensetzungen bereitzustellen.

[0019] Daher können die Formulierungen dieser Erfindung zur parenteralen Verabreichung verwendet werden, z.B. zur intravenösen, subkutanen, intramuskulären, intraorbitalen, ophthalmischen, intraventrikulären, intrakranialen, intrakapsulären, intraspinalen, intrazisternalen, intraperitonealen, topischen, intranasalen, Aerosol-Verabreichung, zur Skarifikation sowie auch zur oralen, buccalen, rektalen oder vaginalen Verabreichung.

[0020] Parenterale Formulierungen können die Form von flüssigen Lösungen oder Suspensionen aufweisen; zur oralen Verabreichung können Formulierungen in der Form von Tabletten oder Kapseln sein sowie für intranasale Formulierungen in der Form von Pulvern, Nasentropfen oder Aerosolen.

[0021] Verfahren, die nach dem Stand der Technik zur Herstellung von Formulierungen wohlbekannt sind, sind z.B. in Remington's Pharmaceutical Sciences zu finden. Formulierungen zur parenteralen Verabreichung können z.B. als Exzipienten steriles Wasser oder Salzlösung, Polyalkylenglykole, wie z.B. Polyethylenglykol,

Öle pflanzlichen Ursprungs oder hydrierte Naphthaline enthalten. Biokompatible, biologisch abbaubare Lactidpolymere, Lactid/Glykolid-Copolymere oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Copolymere können verwendet werden, um die Freisetzung der vorliegenden Faktoren zu kontrollieren. Andere potentiell nützliche parenterale Abgabesysteme für die Faktoren umfassen Ethylen-Vinylacetat-Copolymerpartikel, osmotische Pumpen, implantierbare Infusionssysteme sowie Liposomen. Formulierungen zur Inhalation können als Exzipienten z.B. Lactose enthalten, oder es kann sich um wässrige Lösungen handeln, die z.B. Lactose enthalten, oder aber um wässrige Lösungen, die z.B. Polyoxyethylen-9-laurylether, Glykocholat und Desoxycholat enthalten, oder es kann sich um ölige Lösungen zur Verabreichung in der Form von Nasentropfen oder um ein intranasal anzuwendendes Gel handeln. Formulierungen zur parenteralen Verabreichung können auch Glykocholat zur buccalen Verabreichung, Methoxysalicylat zur rektalen Verabreichung oder Zitronensäure zur vaginalen Verabreichung umfassen.

[0022] Die Konzentration des PI3-Kinase-Agonisten oder -Antagonisten in den Formulierungen der Erfindung variiert in Abhängigkeit von zahlreichen Faktoren, unter anderem von der zu verabreichenden Dosierung und dem Verabreichungsweg.

[0023] Allgemein gesagt können solche Agonisten oder Antagonisten in einer wässrigen physiologischen Pufferlösung bereitgestellt werden, die etwa 0,1 bis 10 % (Gew./Vol.) Verbindung zur parenteralen Verabreichung enthält. Allgemeine Dosierungsbereiche liegen bei von etwa 1 µg/kg bis etwa 1 g/kg Körpergewicht pro Tag; ein bevorzugter Dosierungsbereich liegt bei von etwa 0,01 mg/kg bis 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Die bevorzugte zu verabreichende Dosierung hängt mit großer Wahrscheinlichkeit von der Art und dem Ausmaß der Fortgeschrittenheit der behandelten Krankheit, vom allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten, vom Aufbau der Formulierung sowie vom Verabreichungsweg ab.

[0024] Die Erfindung umfasst auch die Verwendung eines Polypeptids der Erfindung oder eines aktiven Komplexes, der dieses enthält, oder eines Agonisten oder Antagonisten davon bezüglich der Beeinflussung des Ausmaßes der Stimulierung der Plättchen oder der Neutrophilen oder bezüglich der Regulierung der Blutglukosespiegel (die Wirkung von Insulin kann durch die PI3-Kinaseaktivität vermittelt werden), und diese Verwendung wird bei der Anwendung für prophylaktische oder therapeutische Zwecke in Betracht gezogen.

[0025] Die Polypeptide der Erfindung (oder die Komplexe, die diese enthalten) besitzen einen besonderen Nutzen in der enzymatischen In-vitro-Produktion von 3-phosphorylierten Phosphoinositiden, z.B. PI(3)P, PI(3,4)P2, PI(3,4,5)P3. Diese Materialien sind von beachtlichem biochemischem Interesse und sind oftmals durch herkömmliche chemische Verfahren sehr schwer zu synthetisieren. Diese Erfindung stellt zum ersten Mal nennenswerte Mengen an gereinigter und verlässlicher enzymatischer Aktivität für eine solche In-vitro-Synthese bereit.

[0026] Im Allgemeinen umfasste der erste Schritt bei der Reinigung und dem Klonieren, auf dem die Erfindung basiert, die partielle Reinigung von PI3-Kinase aus dem Gehirn von Rindern, wie sie zuvor beschrieben wurde (Morgan et al. (1990)), gefolgt von einer weiteren Reinigung mittels Affinitätschromatographie auf einem immobilisierten 17-Aminosäure-Phosphotyrosinpeptid, dessen Sequenz auf jener des umgebenden Tyrosins 751 des menschlichen PDGF-β-Rezeptors basiert. Gefolgt von dieser finalen Reinigung wurden p110 und p85 aus dem Harz mit SDS-hältigen Puffern eluiert. Das p85/p110-Gemisch wurde entweder direkt mit Lysylendopeptidase verdaut, oder p110 wurde weiter mittels SDS-Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (siehe unten) und nach der Elution aus dem Gel verdaut. Die Peptide wurden mittels Umkehrphasen-HPLC getrennt und unter Verwendung eines modifizierten Applied-Biosystems-477A-Sequenzierungsautomaten sequenziert. Die Aminosäuresequenzanalyse von 14 Peptiden (A bis N, **Fig. 9**) ergab 235 Reste, die mit Gewissheit zugewiesen werden konnten (siehe **Fig. 9**, Anhang).

[0027] Es ist wichtig, anzumerken, dass die erfolgreiche Produktion von Sequenzinformationen hierin von einem neuen SDS-Agarose-Gelelektrophoreseverfahren abhängig war. Obwohl SDS-PAGE für Proteintrennungen mit hoher Auflösung häufig verwendet wird und es sich dabei um ein Verfahren handelt, das Komponenten primär durch ihr unterschiedliches Molekulargewicht auflöst, da die Polyacrylamidmatrix nicht leicht aufzuschließen ist, erfordert die Proteingewinnung nach SDS-PAGE im Allgemeinen Verfahren, die die Elektroelution von Gel-Scheiben, das Elektroblotten oder die passive Diffusion umfassen. Die Elution von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen, die zuvor unter Verwendung empfindlicher Reagenzien (wie z.B. Coomassie-Blau) gefärbt wurden, ist langsam, und die gewonnenen Materialien sind häufig gering. Weiters können diese Verfahren Verunreinigungen, die in der Polyacrylamidmatrix und in den relativ großen Puffervolumen, die für die Elution erforderlich sind, vorhanden sind, konzentrieren. Präparative SDS-PAGE-Systeme, die eine kontinuierliche Durchflusssammlung verwenden, wurden auch entwickelt, diese zeigen jedoch häufig eine herabgesetzte Auf-

lösung sowie eine niedrige Gewinnung.

[0028] Das neue, hierin verwendete Verfahren verwendet eine SDS-Agarose-Gelelektrophorese (SDS-AGE) und ermöglicht eine Kombination der hochauflösenden Fähigkeit der Plattengelelektrophorese und der Detektion von Proteinen unter Verwendung von empfindlichen Färbungen mit einem schnellen Gewinnungsverfahren, das Proteine in hoher Ausbeute sowie in geringen Mengen isoliert. Das gewonnene Protein ist hochgradig gereinigt und besitzt eine Form, die entweder leicht präzipitiert werden kann oder direkt in SDS-hältigen Puffern verdaut werden kann. Durch dieses Verfahren hergestellte Peptide können mittels HPLC fraktioniert werden und anschließend mittels automatisierter Aminosäuresequenzierung analysiert werden. Die Gewinnung von langen, hydrophoben Peptiden ist unter Verwendung dieser Verdau-Bedingungen besonders wirksam. Die folgenden Arbeitsvorschriften dienen dem Fachmann als Anleitung.

ARBEITSVORSCHRIFTEN

Materialien

[0029] Alle Chemikalien sollten den für die Analyse erforderlichen Reinheitsgrad oder höhere Reinheitsgrade aufweisen. Guanidiniumhydrochlorid entsprach der Aristar-Güte (BDH, UK). FMC-Prosieve wurde von Flowgen (UK) zugekauft, und die ultrareine Agarose stammte von BRL (USA). Andere Elektrophorese-Reagenzien stammten von Biorad (UK, Elektrophorese-Güte). Die Proteine mit Standardmolekulargewicht stammten von Bio-Rad (UK) und Amersham International (UK). Sequenziergrad-Trypsin (vom Schwein, EC 3.4.21.4) stammte von Boehringer Mannheim (UK), und Lysylendopeptidase (Achromobacter lyticus, EC 3.4.21.50) stammte von Wako Chemicals GmbH (Deutschland). Die Glaskapillaren waren jene, die von Applied Biosystems Inc. (USA) zur Verwendung am 430A-HPEC-System geliefert wurden, wurden jedoch durch Abrasion mit einer wässrigen Karborundum-Suspension (C150-Grad) und einer Eisenstange mattiert. Mattierte Plattengel-Platten wurden von Hoefer (UK) erhalten.

Platten-SDS-AGE

[0030] Prosieve-Platten-Auflösungsgele mit einer Dicke von 0,75 oder 1,5 mm wurden im Wesentlichen wie vom Hersteller beschrieben unter Verwendung von Paaren an Glasplatten mit einer Größe von 16 × 18 cm gegossen, wobei eine von diesen mattiert war, um das Gel daran zu hindern, aus der Elektrophorese-Anordnung auszutreten. Es ist wichtig, sicherzustellen, dass die Gelplatten vor dem Ausgießen des Auflösungsgels gründlich auf 60 °C erhitzt sind. Die Unfähigkeit, die Gelplatten vor dem Ausgießen eines Agarose-Sammelgels zu erwärmen, die Insertion des Kamms in ein schnell abkühlendes Gel und die Entfernung des Kamms aus dem brüchigen Agarose-Sammelgel führten anfänglich zu schweren Problemen. Um diese Schwierigkeiten zu entfernen, wurde in späteren Präparaten ein 5-%-T-, 2,6-%-C-Polyacrylamid-Sammelgel anstelle von Agarose verwendet.

[0031] Proben wurden bei 100 °C in Probenpuffer denaturiert (190 mM Tris/HCl, pH 6,8, 6 % (Gew./Vol.) SDS, 30 Vol.-% Glycerin, 10 mM DTT, 0,01 % (Gew./Vol.) Bromphenol-Blau), und die Gele wurden unter Verwendung des Laemmli-Kathodenpuffers (0,192 M Glycin, 0,025 M Tris, 0,1 % (Gew./Vol.) SDS) mit einem modifizierten Anodenpuffer (1 M Tris/HCl, pH 8,3) bei 200 V (etwa 50 mA für 1,5-mm- und 25 mA für 0,75-mm-Gele) etwa 4 Stunden lang unter Verwendung einer SE400-Gel-Vorrichtung (Hoefer, USA) laufen gelassen. Die Gele wurden unter Verwendung von entweder Coomassie-Blau G-250 (Bio-Rad, UK) mit schneller Entfärbung oder 4 M Ammoniumacetatlösung gefärbt. In letzterem Fall wurden die Proteine innerhalb von ein paar Minuten durch optischen Kontrast unter Verwendung der Reflexion des einfallenden Lichts identifiziert, wobei diese gegen einen dunklen Hintergrund beobachtet wurde. Die Proteinbanden wurden sofort ausgeschnitten, und Gel-Scheiben wurden bei –20 °C gelagert.

HPEC-Elektroelution

[0032] Gel-Scheiben wurden aufgetaut und zwei Mal in 1 ml 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8, für je 5 Minuten bei 20 °C gewaschen. Scheiben, die Coomassie-Blau enthielten, wurden mit 1 ml 50 Vol.-% Methanol, 5 Vol.-% Essigsäure 5 Minuten lang bei 20 °C vorgewaschen.

[0033] Das Volumen der Gel-Scheibe wurde. geschätzt, anschließend wurden 10 % SDS und 20 % DTT zu Endkonzentrationen von 2 % bzw. 0,2 % (Gew./Vol.) hinzugefügt. Die Gel-Scheibe wurde geschmolzen und durch Immersion in siedendes Wasser 5 Minuten lang unter gelegentlichem Mischen homogenisiert. Danach wurde die Probenmenge gemessen und bis zu der erforderlichen Menge (siehe unten stehende Tabelle 1) mit

vorgewärmtem 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8, ergänzt. Die verdünnte Probe wurde weitere 5 Minuten lang erhitzt und in eine vorgewärmte Glas-HPEC-Kapillare geladen. Es war von Bedeutung, in diesem Stadium 90 % des Kapillarvolumens nicht zu überschreiten. Die Kapillare wurde bei 4 °C zumindest 10 Minuten lang inkubiert, um es dem Probengel zu ermöglichen, sich zu verfestigen, und zwar vor der langsamen Zugabe von 0,8 % Agarose, 1 M Tris/HCl, pH 8,8, um die Kapillare zu überfüllen. Nach weiteren 10 Minuten bei 4 °C wurden die Enden des Gels fluchtend getrimmt, mit Zytex-Scheiben versiegelt und anschließend auf ein Applied-Biosystems-230A-HPEC-System aufgebracht. Es wurde eine Elektroelution unter Verwendung eines Elutionspufferdrucks von 2,5 psi (erzeugend eine Flussgeschwindigkeit von etwa 1 µl/min), eines Pufferdrucks des oberen Reservoirs von 3,5 psi sowie eines Pufferdrucks des unteren Reservoirs von 0,9 psi durchgeführt. Diese Einstellungen wurden von den Empfehlungen des Herstellers abgeändert, um während des Laufenlassens ein Kollabieren des Gels nach oben zu verhindern. Die momentanen Einstellungen entsprachen den im Text beschriebenen, und es wurden während der Beobachtung des Eluats bei 280 nm 3-Minuten-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionssammler-Halterung wurde auf 4 °C abgekühlt, und das Gel-Kompartiment wurde auf 10 °C abgekühlt.

Tabelle 1

HPEC-Elutionsgel-Parameter

Kapillargröße (mm)		Gelvolumen (µl)[a]			Strom (mA)
Länge	ID[a]	Gesamt	Probe	Fokussierung	
50	2,5	245	220	25	1,0-1,5
50	3,5	480	432	48	1,5
100	2,5	491	441	49	2,0-2,5
100	3,5	960	864	96	2,5

[a] Diese Werte werden aufgrund einer variablen Steigerung im internen Durchmesser der Kapillaren, das durch das Verfahren des Mattierens hervorgerufen wird ist, unterschätzt.

Die Herstellung von Proteinen zur Sequenzanalyse

[0034] Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt und die Reinheit getestet, und zwar entweder durch das Beobachten der Radioaktivität oder mittels SDS-PAGE und Silberfärbung. Proben, die für den Trypsin- oder Lysylendopeptidase-Verdau sowie eine Subsequenz-Sequenzanalyse erforderlich sind, wurden mit Coomassieblau mittels sequenzieller Präzipitation auf Eis unter Verwendung von 10 % (Gew./Vol.) TCA und anschließend von 20 % TCA mit zehnminütiger Zentrifugierung bei 4 °C getrennt. Die Pellets wurden mit 1 ml Aceton bei –20 °C über Nacht gewaschen und anschließend erneut kurz gewaschen, um die Spurenkontamination durch TCA und SDS vor dem Luftrocknen und der Zugabe des erforderlichen Verdau-Puffers zu entfernen. Es wurden tryptische Verdaue in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, bei 37 °C sowie Lysylendopeptidase-Verdaue in 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, enthaltend 0,1 % (Gew./Vol.) SDS, bei 30 °C durchgeführt. Festes Guanidiniumhydrochlorid wurde zu tryptischen Verdauen (6 M Endkonzentration) hinzugefügt und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Die Produkte wurden unter Verwendung eines Hewlett-Packard-1090M-Systems direkt auf HPLC-Säulen aufgebracht, und der Abfluss wurde mit einem 79880A-Diodenanordnungsdetektor beobachtet. Trypsin-Verdaue wurden unter Verwendung einer Applied-Biosystems-RP-300-Säule (2,1 × 100 mm) fraktioniert, während Lysylendopeptidase-Produkte eine Applied-Biosystems-AX-300- (2,1 × 30 mm) und eine OD-300-Säule (2,1 × 100 mm) erforderten, die, wie im Wesentlichen von Kawasaki und Suzuki (1990) beschrieben, in Serie verbunden waren.

[0035] Die folgenden Beispiele dienen zur Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung, ohne diese einzuschränken. Die Beispiele beziehen sich auf die begleitenden Zeichnungen.

[0036] In den begleitenden Zeichnungen:

[0037] **Fig.** 1 bis **Fig. 9** betreffen Beispiel 1, Abschnitte A und B.

Fig. 1. Phosphorylierung und Reinigung von Y751-Phosphopeptid.

Feld A. HPLC-Profil für die Trennung des phosphorylierten vom nicht phosphorylierten Y751-Peptid auf einer C_{18}-Umkehrphasen-Säule. Die Spur zeigt die Spektren, die bei 214 nm im Verlauf der Elution gemessen wurden. Die Peaks, die dem phosphorylierten und dem nicht phosphorylierten Peptid entsprechen, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die beobachteten kleinen Peaks stammen von den A431-Membranen.
Feld B. Spektralanalyse der gereinigten phosphorylierten und nicht phosphorylierten Y751-Peptide zwischen 240 und 300 nm, wie sie vom Diodenanordnungsdetektor gemessen wurden. Beim Absorptionsmaximum für das Peptid wird nach der Tyrosin-Phosphorylierung eine Verschiebung hin zu einer kürzeren Wellenlänge beobachtet.
Feld C. Phosphoaminosäure-Analyse des Y751-Peptids, phosphoryliert durch entweder den gereinigten EGF-Rezeptor (linkes Feld) oder A431-Zellmembranen (rechtes Feld). Nach der Phosphorylierungsreaktion wurde das Phosphopeptid mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Das Peptid wurde einer Säurehydrolyse unterzogen, und die Phosphoaminosäuren wurden mittels zweidimensionaler Dünnschichtelektrophorese getrennt. Interne Standards wurden mit Ninhydrin gefärbt, und die ^{32}P-markierten Phosphoaminosäuren wurden mittels Autoradiographie detektiert. Die Positionen von anorganischen Phosphaten (P_i) und Phosphoserin- (S-), Phosphothreonin- (T-) und Phosphotyrosin- (Y-) Standards sind angegeben.

Fig. 2. Reinigung des PI-3-Kinase-Komplexes auf einer Y751-Phosphopeptid-Affinitätssäule.

Feld A. Peak 1 (P1) und Peak 2 (P2) der PI3-Kinase-Fraktionen aus dem zweiten MonoQ-Schritt wurden auf einem 7,5-%-SDS-PAGE-Gel analysiert. Die Proteine in diesen zwei Peak-Fraktionen wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Migrationspositionen der Molekulargewicht-Marker werden angegeben.
Feld B. Affinitätsreinigung der Peak-1- (P1-) und der Peak-2- (P2-) PI3-Kinase unter Verwendung der Y751-Phosphopeptidsäule. Eine Silberfärbung eines 7,5-%-SDS-PAGE-Gels, das PI3-Kinase zeigte, assoziierte Proteine aus MonoQ-P1 und -P2, die mit 0,1 % SDS-hältigem Phosphatpuffer bei 80 °C an die Y751-Phosphopeptidsäule banden und aus dieser eluiert wurden. Die Spuren 1, 2 und 3 für sowohl das P1- als auch das P2-Material deuten auf die durch die folgenden 50-µl-Elutionen eluierten Proteine hin.

Fig. 3. Charakterisierung der Bindung der PI3-Kinaseaktivität an von Y751 abstammende Peptidsäulen.

[0038] Ein Mikrogramm partiell gereinigter Peak-1-PI3-Kinase aus dem Gehirn von Rindern wurde auf 10 µl der von Y751 abstammenden Peptid-Harze in 100 µl Bindungspuffer aufgebracht. Die gebundenen Proteine wurden auf PI3-Kinaseaktivität getestet. Bei Spur 1 band die PI3-Kinaseaktivität an die nicht phosphorylierte Y751-Säule. Bei Spur 2 band die PI3-Kinaseaktivität an die phosphorylierte Y751-Säule. Bei Spur 3 wurde die PI3-Kinaseaktivität aus dem Überstand der Säule in Spur 2 mittels einer frischen phosphorylierten Y751-Säule entfernt. Bei Spur 4 blieb die PI3-Kinaseaktivität mit der Säule aus Spur 2 nach der Entfernung des gebundenen Materials unter Verwendung von 0,1 % SDS bei 80 °C assoziiert. Bei Spur 5 band die PI3-Kinaseaktivität nach der Addition eines frischen aliquoten Teils an PI3-Kinase aus dem Gehirn von Rindern in Bindungspuffer an eine wieder verwertete phosphorylierte Y751-Säule, wie sie in Spur 2 verwendet wurde. Bei Spur 6 wird die äquivalente Menge der löslichen Peak-1-PI3-Kinaseaktivität aus dem Gehirn von Rindern dargestellt, wie sie auf die Säulen in Spur 2 oder Spur 5 aufgebracht wird.

Fig. 4. Identifikation von p85-Spezies in Peak-1- und Peak-2-Werten des PI3-Rinderhirn-Kinase-Präparats.

[0039] Proteinproben wurden auf 7,5-%-SDS-PAGE-Gelen getrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Blots wurden anschließend mit gegen die COOH-terminalen Peptidsequenzen von p85α oder p85β gezüchteten Antisera sondiert.

Feld A. Western-Blot, sondiert mit COOH-terminalen Anti-p85α-Antisera.
Spur 1, Peak-1-PI3-Rinderhin-Kinase; Spur 2, Peak-2-PI3-Rinderhirn-Kinase; Spur 3, Cos-1-Zelllysat aus nur mit pMT2-Vektor transfizierten Zellen; Spur 4, Cos-1-Zelllysat aus pMT2p85α-transfizierten Zellen; Spur 5, Cos-1-Zelllysat aus pMT2p85β-transfizierten Zellen; Spur 6, Sf9-Zelllysat, enthaltend p85α; Spur 7, Sf9-Zelllysat, enthaltend p85β.
Feld B. Western-Blot, sondiert mit COOH-terminalen Anti-p85β-Antisera.
Die Spuren sind die für Feld A beschriebenen.
Feld C. Konkurrenz von Peptiden mit Antikörpern in Western-Blots.
Die Proben in den Spuren 1 und 2 wurden mit einem p85α-spezifischen Antiserum sondiert, während die Proben in den Spuren 3 und 4 mit dem p85β-spezifischen Antiserum sondiert wurden. Spuren 1 und 2,

Sf9-Zelllysat, enthaltend baculovirusexprimiertes p85α. Spuren 3 und 4, Sf9-Zelllysat, enthaltend baculovirusexprimiertes p85β. In den ungeradzahligen Spuren wurde die Nitrocellulose nur mit spezifischem Antiserum sondiert. In den geradzahligen Spuren wurde das Antiserum 100 µg/ml p85α-spezifischen (Spur 2) bzw. p85β-spezifischen (Spur 4) C-terminalen Peptiden gegenübergestellt.

Feld D. Anti-p85α-Western-Blot mit gebundenem und löslichem PI3-Kinase-Material nach der Chromatographie unter Verwendung der Y751-Phosphopeptid-Säule.

Die Peak-1- (P1-) und Peak-2- (P2-) Werte von PI3-Rinderhirn-Kinase wurden auf der Y751-Phosphopeptid-Säule immobilisiert. Das ungebundene Material wurde gesammelt, und das Harz wurde anschließend ausgiebig gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden aus der Säule mit einem SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert. Die gebundenen und ungebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE auf einem 7,5-%-Gel getrennt und anschließend auf Nitrocellulose transferiert. Der Filter wurde anschließend mit COOH-terminalen Anti-p85α-Antisera sondiert und mit ^{123}I-Protein-A-Sepharose sichtbar gemacht. Spur 1, gebundenes P1-Material; Spur 2, Peak-1-Material, das nicht an die Säule band; Spur 3, gebundenes Peak-2-Material; Spur 4, Peak-2-Material, das nicht an die Säule band.

Fig. 5. Spezifität der Bindung des PI3-Kinase-Komplexes an die Y751-Peptid-Säule: Vergleich mit Y857-Phosphopeptiden.

[0040] Sf9-Zelllysaten, enthaltend p85α-Proteine oder ein Mikrogramm an partiell gereinigter PI3-Rinderhirn-Kinase (P1- und P2-MonoQ), wurde es ermöglicht, wie beschrieben 4 Stunden lang bei 4 °C an die Säulen zu binden. Die Säulen wurden anschließend wiederholt mit Bindungspuffer gewaschen, die gebundenen Proteine wurden mit SDS-hältigen Puffern eluiert und anschließend mittels Elektrophorese auf 7,5-%-SDS-PAGE-Gelen analysiert. Die gebundenen Proteine wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Feld A. Proteine, gebunden an eine Y751-Phosphopeptid-Säule. Feld B. Proteine, gebunden an eine Y857-Phosphopeptid-Säule. Die Migrationsposition der Molekulargewicht-Marker sind angegeben.

Fig. 6. Bindung rekombinanter baculovirusexprimierter p85-Proteine an eine Gruppe von Phosphopeptid-Säulen.

[0041] p85-Proteine in SF9-Zelllysaten wurden auf ihre Fähigkeit getestet, an die verschiedenen Peptidsäulen zu binden. Nach ausgiebigem Waschen wurden die gebundenen Proteine aus den Säulen eluiert, auf 7,5-%-SDS-PAGE-Gelen getrennt und danach durch Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht. Feld A, gebundenes p85α. Feld B, gebundenes p85β. CON, nicht phosphorylierte 17-Aminosäure-Y751-Säule; Y751, 17-Aminosäure-Phosphopeptid aus der Kinase-Insert-Region des PDGF-β-Rezeptors; Y751.S, 11-Aminosäure-Version des Y751-Phosphopeptids; Y857, 17-Aminosäure-Phosphopeptid, das von der Sequenz um die zweite Haupt-Tyrosin-Phosphorylierungsstelle im PDGF-β-Rezeptor abstammt; pGAT-, Poly-Glu:Ala:Tyr-Phosphopeptid; Y416 und Y527, 13- und 16-Aminosäure-Phosphopeptide, die jeweils von den zwei Haupt-Tyrosin-Phosphorylierungsstellen von pp60$^{c\text{-}src}$ abstammen.

Fig. 7. Der p85/100-Komplex und die PI3-Kinaseaktivität zeigen im Bereich der Phosphopeptide, an die sie binden, Spezifität.

[0042] Einem Mikrogramm partiell gereinigter PI3-Rinderhirn-Kinase (P1-MonoQ) wurde es ermöglicht, wie beschrieben 4 Stunden lang bei 4 °C an Peptid-Affinitätssäulen zu binden. Die Säulen wurden anschließend wiederholt mit Bindungspuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden danach entweder mit SDS-hältigen Puffern eluiert und anschließend mittels Elektrophorese auf 7,5-%-SDS-PAGE-Gelen analysiert oder auf an die Säule gebundene PI3-Kinaseaktivität getestet.

Feld A. Die gebundenen Proteine wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Migration der Molekulargewicht-Marker ist angegeben.

Feld B. PI3-Kinaseaktivität, gebunden an verschiedene Phosphopeptid-Säulen. Die ^{32}P-markierten Lipidprodukte wurden mittels DC getrennt und anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht. PI3P gibt die Migrationsposition eines PI3P-Standards an. Ori gibt den Ursprung der DC-Platte an.

Fig. 8. Bindung der PI3-Kinaseaktivität von Phosphopeptiden, die das YXXM-Motiv enthalten.

Feld A. Ein Mikrogramm an partiell gereinigter Peak-1-PI3-Rinderhirn-Kinase wurde an 10 µl der angegebenen Peptid-Säulen gebunden. Nach ausgiebigem Waschen wurden die Säulen auf die gebundene PI3-Kinaseaktivität getestet. Spur 1, PI3-Kinaseaktivität, gebunden an die nicht phosphorylierte Y751-Säule; Spur 2, PI3-Kinaseaktivität, gebunden an die phosphorylierte Y751-Säule; Spur 3, PI3-Kinaseaktivität, gebunden an die phosphorylierte Y751.S-Säule; Spur 4, PI3-Kinaseaktivität, gebunden an die phosphory-

lierte Y857-Säule; Spur 5, PI3-Kinaseaktivität, gebunden an die phosphorylierte Y740-Säule; Spur 6, PI3-Kinaseaktivität, gebunden an die phosphorylierte Met-Y1313-Säule. PIP zeigt die Migrationsposition eines P14P-Standards an. Ori gibt den Ursprung der DC-Platte an.
Feld B. Vergleich der identifizierten PI3-Kinase-Bindungsstellen in den getesteten Peptiden. Die vorgeschlagene Consensus-Sequenz für die Bindung ist auch zum Vergleich dargestellt (Cantley et al. (1991)).

[0043] Die Fig. 9 bis Fig. 15 betreffen Beispiel 1, Abschnitte C und D, und die Fig. 16 bis 25 betreffen Beispiel 2.

Fig. 9. Nucleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von p110.

[0044] (Oberes Feld) Es werden die Nucleotidsequenz der kodierenden Region und die abgeleitete Aminosäuresequenz in Einbuchstabencode dargestellt. Die Peptidsequenzen (von A–N benannt), die durch die Proteinsequenzierung erhalten wurden, sind hervorgehoben.

[0045] (Unteres Feld) Schematische Darstellung der p110-cDNA. Die fettgedruckte Linie gibt die kodierende Sequenz an. (p2.1): Ausmaß des Klons p2.1, (Race-Produkt): durch RACE-PCR amplifizierte Region, (a): Sonde, die bei der Southern-Blot-Analyse verwendet wird, (b): Sonde, die bei der Northern-Blot-Analyse verwendet wird, (S): Sau3AI-Stelle, für die Expression in Sf9-Zellen auf die BamHI-Stelle geändert.

Fig. 10. Vergleich der p110- und der Vps34p-Proteinsequenzen.

(A) Dot-Plot-Vergleich von Vps34p (875 Aminosäuren: horizontale Achse) und p110 (1068 Aminosäuren: vertikale Achse) unter Verwendung des Vergleichsprogramms (UWGCG-Paket; Devereux et al. (1984)).
(B) Optimale Anordnung von p110 (obere Sequenz) und Vps34p (untere Sequenz) über der Homologieregion unter Verwendung des Gap-Programms (UWGCG-Paket; Devereux et al. (1984)). Identische Reste sind durch (I) gekennzeichnet, konservierte Reste sind durch (:) gekennzeichnet. Reste, bei denen eine Involvierung in die ATP-Bindung vorgeschlagen wurde, sind mit (*) gekennzeichnet.

Fig. 11. Genomische Southern-Analyse von p110.

[0046] Aus Rindern (Spuren 1, 2, 3), Menschen (Spuren 4, 5, 6) und Ratten (Spuren 7, 8, 9) stammende DNAs mit hohem Molekulargewicht (3 µg) wurden mit EcoRI (Spuren 1, 4, 7), BamHI (Spuren 2, 5, 8) von HindIII (Spuren 3, 6, 9) verdaut, durch ein 0,5-%-Agarose-Gel fraktioniert und, wie in Beispiel 1 beschrieben, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Filter wurde mit einem ^{32}P-markierten XbaI-PstI-Fragment sondiert (Sonde a in Fig. 9, unteres Feld). Der Filter wurde in 0,5 × SSC, 0,1 % SDS bei 50 °C gewaschen und über Nacht ausgesetzt (Feld A). Anschließend wurde der Filter in 0,1 × SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C gewaschen und sieben Tage lang ausgesetzt (Feld B). Die Markerbahn zeigt die Positionen von λ-HindIII-Markern.

Fig. 12. Analyse der Gewebsverteilung der p110-Nachricht

(A) Northern-Blot-Analyse von p110
5 µg Poly(A)$^+$-RNA, isoliert aus dem Gesamt-Rindergehirn (Spur 1) oder aus der SGBAF-1-Zelllinie (Spur 2), wurden auf einem 0,9-%-Agarose-Gel fraktioniert und, wie in Beispiel 1 beschrieben, auf Membranen immobilisiert. Der Filter wurde mit einer ^{32}P-markierten Antisense-RNA-Sonde sondiert (Sonde b aus Fig. 9, unteres Feld). Nach dem Waschen in 0,1 × SSC, 0,1 % SDS bei 60 °C wurde der Filter mit 1 µg ml^{-1} RNAase A behandelt und über Nacht einer Autoradiographie unterzogen.
(B) PCR-Analyse zur Detektion von p110-Transkripten
Poly(A)$^+$-RNA wurde aus verschiedenen Quellen isoliert, und es wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, eine PCR durchgeführt. Banden von 218 bp und 212 bp zeigen die spezifische Amplifikation der menschlichen bzw. Rinder-Transkripte an. Spur 1, menschliche T-Zellblasten, Spur 2, akute menschliche lymphozytische Leukämiezellen aus peripherem Blut, Spur 3, A431-Zellen (menschlich), Spur 4, COS-1-Zellen (Affen), Spur 5, Rindergehirn, Spur 6, SGBAF-1-Zellen (Rinder), Spur 7, ZNR-Zellen (Schweine).
(C) PCR-Analyse zur Detektion von p85α-Transkripten
Poly(A)$^+$-RNA wurde aus verschiedenen Quellen isoliert, und es wurde eine PCR durchgeführt. Die spezifische Amplifikation einer p85α-Nachricht ergibt eine Bande von 190 bp. Die Spuren sind dieselben, wie sie für (B) angegeben wurden.

Fig. 13. Expression von p85α und p110 in Sf9-Zellen unter Verwendung von Baculovirus-Vektoren.

(A) Sf9-Zellen wurden mit einem Wildtyp-Baculovirus infiziert (Spuren 1 und 2) oder mit Baculoviren, die p85α (Spur 3), p110 (Spur 4) oder p85α und p110 (Spuren 5 und 6) exprimieren. Immunpräzipitate wurden mit entweder Anti-p85α (Spuren 1, 3 und 5) oder mit Anti-p110-Antisera (Spuren 2, 4 und 6) hergestellt, die Proben wurden auf einem 7,5-%-SDS-PAGE-Gel fraktioniert und durch Färbung mittels Coomassie-Blau sichtbar gemacht.
(B) PI3-Kinase-Tests wurden auf Immunpräzipitaten von p85α und p110, exprimiert in Sf9-Zellen, durchgeführt. Spuren 1–6 waren dieselben wie in Feld (A); Spur 7: pI3-Kinaseaktivität aus 1 µl des partiell gereinigten PI3-Rinderhirn-Kinase-Präparats.

Fig. 14. In-vitro-Assoziation der PI3-Kinaseaktivität mit dem CSF-1-Rezeptor.

[0047] Ein In-vitro-PI3-Kinase-Test wurde auf Anti-CSF-1-Rezeptor-Immunkomplexen durchgeführt, die aus Sf9-Zellen hergestellt wurden, die mit einem den CSF-1-Rezeptor exprimierenden Baculovirus infiziert waren, und wie folgt behandelt wurden; Spur 1: Anti-CSF-1-Rezeptor-Immunpräzipitate, unbehandelt; Spur 2: Anti-CSF-Rezeptor-Immunpräzipitat, vorbehandelt mit ATP und mit einem p85α/p110-hältigen Sf9-Zelllysat inkubiert; Spur 3: Anti-CSF-1-Rezeptor-Immunpräzipitat, bei Fehlen von ATP behandelt und mit einem p85α/p110-hältigen Sf9-Zelllysat inkubiert; Spur 4: Anti-CSF-Rezeptor-Immunpräzipitat, vorbehandelt mit ATP und mit einem p85α-hältigen Sf9-Zelllysat inkubiert; Spur 5: Anti-CSF-1-Rezeptor-Immunpräzipitat, vorbehandelt mit ATP und mit einem p110-hältigen Sf9-Zelllysat inkubiert.

Fig. 15. Expression von p85α und p110 in COS-1-Zellen.

[0048] COS-1-Zellen wurden mit 5 µg der jeweiligen DNAs transfiziert und 48 Sunden später geerntet. Transfizierte Zellen wurden während der letzten 4 Stunden dieser Zeitspanne mit 100 µCi ml^{-1} ^{35}S-Methionin markiert. Immunpräzipitationen wurden entweder mit einem polyklonalen p85α-Antiserum oder einem C-terminalen p110-Peptid-Antiserum durchgeführt. Nach dem Waschen wurde das Pellet in zwei Teile geteilt, und die eine Hälfte wurde auf einem 10-%-SDS-PAGE-Gel analysiert, während die andere Hälfte einem PI3-Kinase-Test unterzogen wurde.
(A) ^{35}S-markierte Proteine immunpräzipitiert mit Anti-p85α-Antiserum.
(B) Die PI3-Kinaseaktivität immunpräzipitiert mit Anti-p85α-Antiserum.
(C) ^{35}S-markierte Proteine immunpräzipitiert mit C-terminalem 110-Peptid-Antiserum.
(D) Die PI3-Kinaseaktivität immunpräzipitiert mit C-terminalem 110-Peptid-Antiserum.

[0049] Die Spuren enthalten Resultate aus COS-1-Zellen, die mit den folgenden DNAs transfiziert wurden; Spur 1: Vektor-DNA, Spur 2: pMT2-p85α; Spur 3: pSG5-p110, Spur 4: pMT2-p85α und pSG5-110, Spur 5 in den Feldern B und D zeigt die PI3-Kinaseaktivität, die mit den zwei Antisera aus 1 µl des partiell gereinigten p13-Rinderhirn-Kinase-Präparats immunpräzipitiert war. Die Aussetzungszeiten für die Felder A und C sowie B und D sind identisch.

Fig. 16. cDNA für menschliches p110.

[0050] Die Fig. zeigt die Sequenz von menschlicher p110-cDNA, zusammen mit der entsprechenden Aminosäuresequenz.

Fig. 17.

Ein Vergleich der menschlichen p110-Sequenz und der Rinder-p110-Sequenz auf DNA-Ebene.

Fig. 18.

Ein Vergleich der menschlichen p110-Sequenz und der Rinder-p110-Sequenz auf Protein-Ebene.

Fig. 19.

Die Protein-Sequenz des menschlichen p110.

Fig. 20.

Die Sequenz einer cDNA, die mit p110 verwandt ist, PITR-c.

Fig. 21.

Die Sequenz einer cDNA, die mit p110 verwandt ist, PITR-f.

Fig. 22.

Die Anordnung menschlicher p110, PITR-c, PITR-f und der PI3-Hefe-Kinase VPS34.

Fig. 23A.

SDS-PAGE-Analyse von Proteinen, die in der Lage sind, an verschiedene Domänen menschlicher p110 zu binden.

Fig. 23B.

Schematische Darstellung der Domänen von p110, die auf ihre Fähigkeit analysiert wurden, p85 zu binden.

Fig. 24.

Verschiedene Deletionsmutanten und PCR-Fragmente des p110-Fragments p110-N.

Fig. 25.

Die Fähigkeit der verschiedenen Deletionsmutanten und PCR-Fragmente von p110-N, die p85-Untereinheiten zu binden.

Beispiel 1

PROTEINREINIGUNG

A. Verfahren und Materialien

Zellen

[0051] A431-Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium, enthaltend 10 % fötales Kälberserum, gehalten. Der Erhalt der Insektenzellkultur und die Infektion von Spodoptera-frugiperda- (Sf9-) Zellen wurden wie in Summers und Smith (1987) beschrieben durchgeführt.

Herstellung von A431-Membranen

[0052] Diese Herstellung wurde im Vergleich zu der von Thom et al. (1977) beschriebenen modifiziert. Die Erntelösung (0,05 M Borsäure (pH 7,2), 0,15 M NaCl), die Extraktionslösung (0,02 M Borsäure (pH 10,2), 0,2 mM EDTA) und die Boratlösung (0,5 M Borsäure (pH 10,2)) wurden alle frisch hergestellt. Die Zellen wurden einmal mit eiskalter Erntelösung gewaschen und anschließend in frische Erntelösung geschabt. Die Zellen wurden mittels niedertouriger Zentrifugation bei 200 g pelletiert und danach durch Pipettieren in 2 Pelletvolumeneinheiten der Erntelösung resuspendiert. Dies wurde langsam und unter Rühren zu 100 Pelletvolumeneinheiten der Extraktionslösung hinzugefügt. Nach 10 Minuten wurden 8 Pelletvolumeneinheiten Boratlösung hinzugefügt, und das Rühren wurde weitere 5 Minuten fortgesetzt. Diese Lösung wurde durch Nylon-Gaze (durchschnittliche Maschenweite 900 µm) filtriert und bei 500 g 10 Minuten lang bei 2 °C zentrifugiert, um etwaige Zellkerne/ganze Zellen zu pelletieren. Schlussendlich wurde der Überstand bei 12.000 g in einem Ultrazentrifugen-SW28-Rotor 30 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert. Das Membranpellet wurde in einer Minimalmenge von 50 mM Hepes (pH 7,5) resuspendiert und bei –70 °C gelagert.

Synthese von Peptiden

[0053] Die unten stehend in Tabelle 2 beschriebenen Peptide wurden auf einem Applied-Biosys-

tems-430A-Peptid-Synthesegerät unter Verwendung der FMOC-Chemie und eines geeigneten Aminosäure-Additionsprogramms gemäß den Empfehlungen von ABI synthetisiert. Anschließend wurden die Peptide durch eine präparative Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Die Zusammensetzung der Peptide wurde mittels analytischer HPLC, Aminosäure-Analyse und Proteinsequenzierung auf einem automatisierten 477A-Puls-Flüssigkeits-Sequenziergerät kontrolliert.

Tabelle 2

Peptid	Sequenz
Y740	G E S D G G Y M D M S K
Y751	D M S K D E S V D Y V P M L D M K
Y751.S	C D E S V D Y V P M L
Y857	A R D I M R D S N Y I S K G S T F
Y1313	E F C P D P L Y E V M L K
Y527	R R F T S T E P Q Y Q P G E N L
Y416[a]	R R L I E D N E Y T A R G

[a] Dieses Peptid wurde von Sigma Chemical Co. Ltd. zugekauft anstatt synthetisiert.

Phosphorylierung von Peptiden

[0054] Die Peptide wurden bis zur Trockenheit lyophilisiert, um etwaige von der Synthese/Reinigung übergebliebene verunreinigende Chemikalien zu entfernen, und schließlich in Wasser in HPLC-Qualität in einer Konzentration von ~ 4 mg/ml aufgelöst.

[0055] Zur Phosphorylierung in kleinem Ausmaß: 20 µg Peptid, 10 µl 5x-Kinase-Puffer (250 mM Hepes (pH 7,4), 750 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, 10 nM $MnCl_2$, 60 mM $MgCl_2$, 50 % Glycerin, 500 mM Natriumorthovanadat), 5 µl A431-Membran-Präparat und ATP/[γ-^{32}P]ATP (die relativen Mengen hängen vom Ziel der Phosphorylierung ab). Wasser wurde hinzugefügt, um das Volumen auf 50 µl anzupassen.

[0056] Für die präparative Phosphorylierung wurden 2–3 mg Peptid in 1,5 ml Wasser aufgelöst und zu 450 µl 5x-Kinase-Puffer hinzugefügt. Der pH wurde auf 7,0 eingestellt. 250 µl 0,1 M ATP und 500 µl A431-Plasmamembranen (~ 2 mg/ml) wurden hinzugefügt, und anschließend wurde unter kontinuierlichem Mischen ein Fortschreiten der Reaktion 18 Stunden lang bei Raumtemperatur ermöglicht.

Isolierung phosphorylierter Peptide durch Umkehrphasen-HPLC

[0057] Ein Milliliter Puffer A (Puffer A: 0,08 % Trifluoressigsäure, 1 % Acetonitril in Wasser; Puffer B: 0,08 % Trifluoressigsäure, 90 % Acetonitril) wurde zu der Kinasereaktion hinzugefügt und gemischt. Diese Lösung wurde anschließend 20 Minuten lang bei 10.000 g zentrifugiert, um die Membranen zu pelletisieren. Der das Phosphopeptid enthaltende Überstand wurde danach auf eine Sep-Pak-Säule (C_{18}) geladen, die mit Puffer A äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 20 ml Puffer A gewaschen, um ATP zu eluieren, und anschließend wurde das Peptid mit 3 × 1 ml 40 % Puffer B eluiert. Die OD der Fraktionen wurde bei 268 nm beobachtet, und die das Peptid enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und danach bis zur Trockenheit lyophilisiert (es ist anzumerken, dass das phosphorylierte Y751-Peptid im Wesentlichen keine Absorption bei 280 nm aufweist). Das Phosphopeptid wurde anschließend vom nicht phosphorylierten Peptid unter Verwendung eines 1090-HPLC-Systems getrennt. Für die präparative Trennung wurde eine C_{18}-Säule (Aquapore OD-300, 250 × 7 mm), äquilibriert mit 100 % Puffer A (214 nm (Sen. 50 mV)/280 nm (Sen. 200 mV)), mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min verwendet. Das Peptid wurde in 200 µl Wasser in HPLC-Qualität aufgelöst und anschließend durch eine 500-µl-Schleife geladen. Danach wurde die Säule 10 Minuten lang mit 100 % Puffer A gewaschen, bevor das Peptid und das Phosphopeptid mit einem 30-min-Lineargradienten von 0 bis 45 % Puffer B eluiert wird, gefolgt von einem 5-min-Lineargradienten auf 100 % Puffer B. Peak-Fraktionen wurden händisch gesammelt. Die Poolfraktionen wurden mit Wasser verdünnt, lyophilisiert und anschließend bei –20 °C gelagert.

Phosphoaminosäure-Analyse von phosphorylierten Peptiden

[0058] Peptide, die in Gegenwart von [γ-^{32}P]ATP phosphoryliert wurden, entweder unter Verwendung von gereinigten EGF-Rezeptoren oder A431-Zellmembranen, wurden, wie oben beschrieben, mittels einer C_{18}-Sep-Pak-Säule und HPLC gereinigt. Dieses Material wurde anschließend bei 110 °C 1 Stunde lang in 1 ml 6 M HCl hydrolysiert. Ein Milliliter Wasser in HPLC-Qualität wurde hinzugefügt, und die Probe wurde bei 10.000 g 10 Minuten lang zentrifugiert, um Trümmer zu entfernen. Der verbleibende Überstand wurde gefroren und bis zur Trockenheit lyophilisiert. Das Pellet wurde in 2 ml Wasser resuspendiert, gefroren und dann erneut lyophilisiert. Dieses Material wurde mittels zweidimensionaler Dünnschichtelektrophorese analysiert (im Wesentlichen wie von Cooper et al. (1983) beschrieben).

Kupplung von Peptiden an Actigel-Harze

[0059] Peptide wurden im Wesentlichen wie von den Herstellern beschrieben an die Matrix gekuppelt. Kurz gesagt, wurden 500 µl (gepacktes Volumen) Actigel-ALD-Superflow-Harz (Sterogene, CA, USA) fünf Mal mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,8) (Kupplungspuffer) gewaschen. Phosphoryliertes oder nicht phosphoryliertes Peptid (1 mg) wurde in 200 µl Kupplungspuffer aufgelöst und zu dem Harz hinzugefügt. $NaCNBH_3$ (Kupplungslösung) wurde bis zu einer Endkonzentration von 100 mM hinzugefügt, und das Gemisch wurde anschließend 6 Stunden lang bei 4 °C gemischt. Das Harz wurde mit 10 Säulenvolumeneinheiten von 500 mM NaCl gewaschen und anschließend mit 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 Stunde lang in Gegenwart der Kupplungslösung inkubiert, um alle etwaigen Stellen auf dem Harz zu blockieren, die keine Reaktion eingegangen sind. Das Harz wurde mit 500 mM NaC und schließlich mit Kupplungspuffer plus 500 µM Vanadat und 0,02 % NaN_3 gewaschen und danach bei 4 °C gelagert. An die Actigel-Matrix gebundene Phosphopeptide waren unter diesen Bedingungen einige Monate lang stabil.

Bindung von Proteinen an die Phosphopeptid-Säulen

[0060] Die Proteine wurden in Bindungspuffer verdünnt (50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2), 150 mM NaCl, 0,02 % Triton X-100, 2 mM EDTA und 200 µM Natriumorthovanadat), mit dem geeigneten Peptid-Affinitätsharz gemischt, und anschließend wurden sie 2 Stunden lang bei 4 °C mit Rotation binden gelassen. Das Säulenmaterial wurde wiederholt (> 6 ×) mit 50 Säulenvolumeneinheiten desselben Puffers und schließlich mit verschiedenen Elutionspuffern, enthaltend NaCl, Harnstoff oder Detergenzien, gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden entweder auf die PI3-Kinaseaktivität getestet oder durch Sieden in SDS-PAGE-Probenpuffer von der Säule entfernt und schließlich mittels SDS-PAGE analysiert.

PI3-Kinase-Test

[0061] PI3-Kinase-Tests wurden im Wesentlichen wie in Whitman et al. (1987) beschrieben in 50 µl durchgeführt, enthaltend 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 100 µM ATP (plus 0,5 µCi [γ-^{32}P]ATP/Test), 1 mM PI plus lösliche oder säulenimmobilisierte PI3-Rinderhirn-Kinase. Die Inkubation wurde 5 Minuten lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl 0,1 N HCl und 200 µl Chloroform:Methanol (1:1) beendet. Das Gemisch wurde verwirbelt und schließlich zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die obere Phase wurde verworfen, und die untere organische Phase wurde mit 80 µl Methanol:1 N HCl (1:1) gewaschen. Nach der Zentrifugierung wurde die obere Phase erneut verworfen, und die untere Phase wurde bis zur Trockenheit eingedampft. Die Reaktionsprodukte wurden auf dünnschichtigen Silika-Gel-60-Platten (vorbehandelt mit 1 % Oxalsäure, 1 mM EDTA in Wasser:Methanol (6:4)) ausfindig gemacht und in Chloroform:Methanol:4 N Ammoniak (9:7:4) entwickelt.

[0062] Herstellung C-terminaler spezifischer Antisera für p85α und p85β C-terminale Peptid-Antisera wurden gegen die C-terminalen Rindersequenzen hergestellt, die durch die cDNA-Klonierung bestimmt wurden (Otsu et al. (1991)). Die Peptide TLAYPVYAQQRR für p85α und TLAHPVRAPGPGPPAAR für p85β wurden mittels FMOC-Chemie synthetisiert und durch HPLC gereinigt. Die Peptide wurden unter Verwendung von Gluteraldehyd an KLH gekuppelt und anschließend unter Verwendung der in Kypta et al. (1988) beschriebenen Verfahren in die Lymphknoten von Kaninchen injiziert. Positive Antisera, wie sie durch den enzymgekuppelten Immuntest bestimmt wurden, wurden auf spezifischen Peptid-Actigel-Affinitätssäulen affinitätsgereinigt.

B. Verfahren und Resultate der Reinigung

Herstellung einer Y751-Phosphopeptid-Säule

[0063] Ein 17-Aminosäure-Peptid, das Y751 des menschlichen PDGF-β-Rezeptors enthält, wurde in einem Versuch, alle notwendigen Sequenzdeterminanten zu inkludieren, nach einer Untersuchung der bekannten Bindungsstellen für die PI3-Kinase für die Synthese ausgewählt (siehe Tabelle 2 oben; beschrieben in Cantley et al. (1991)). Zusätzlich zu dem Peptid-Kontext von Y751 des PDGF-β-Rezeptors wurden auch die Sequenzen um Y315 des mittleren Polyoma-T (Talmage et al. (1989)) und Y721 des menschlichen CSF-1-Rezeptors (Shurtleff et al. (1990)) in Betracht gezogen. Unter Verwendung der oben beschriebenen Phosphorylierungsarbeitsvorschriften wurde eine Phosphorylierung von mehr als 50 % des Y751-Peptids unter Verwendung entweder des gereinigten menschlichen EGF-Rezeptors oder der A431-Membranen als Quelle der Protein-Tyrosin-Kinase erreicht. Das phosphorylierte Y751-Peptid konnte während der Umkehrphasen-HPLC-Analyse klar identifiziert werden, wo es etwa 1 Minute früher eluierte als das nicht phosphorylierte Peptid, da es eine starke Extinktion von 214 nm produzierte, jedoch nur ein geringes oder kein 280-nm-Signal (**Fig.** 1, Feld A). Eine Analyse der Absorptionseigenschaften zeigte, dass die Phosphorylierung des Y751-Peptids zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 280 zu 267 nm führte (**Fig.** 1, Feld B). Für Phosphorylierungen in großem Maßstab waren A431-Membranen die bevorzugte Quelle der Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität, da sie leichter herzustellen waren. Da jedoch das Y751-Peptid zwei Serine enthält sowie einen einzelnen Tyrosin-Rest, wurde es als wichtig angesehen, zu zeigen, dass das Peptid nur am Tyrosin-Rest phosphoryliert war. Dies wurde mittels zwei separater Methodologien erreicht; mittels Analyse des HPLC-gereinigten Phosphopeptids durch Phosphoaminosäure-Analyse oder durch Protein-Mikrosequenzierung.

[0064] Die Phosphoaminosäure-Analyse des Y751-Peptids, entweder durch den gereinigten EGF-Rezeptor oder A431-Membranen phosphoryliert, zeigte, dass die Phosphorylierung des Y751-Peptids ausschließlich am Tyrosin-Rest auftrat (**Fig.** 1, Feld C). Die Sequenzanalyse der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptide bestätigte ebenfalls, dass diese beiden Peptide 17 Aminosäuren lang waren und dass ihre Sequenzen identisch waren, außer an Zyklus 10, wo, wie erwartet, aufgrund seiner Modifikation kein Phenylthiohydantoin-Tyr-Derivat beim phosphorylierten Peptid beobachtet wurde.

Erweiterte Reinigung der PI3-Kinase aus dem Gehirn von Rindern unter Verwendung einer Y751-Phosphopeptid-Aftinitätssäule

[0065] Eine 650fache Reinigung der PI3-Kinase aus dem Gehirn von Rindern wurde vor kurzem beschrieben (Morgan et al. (1990)), und es wurde dasselbe Verfahren verwendet, mit der Ausnahme, dass der Gradient für die zweite Mono-Q-Säule erweitert wurde, um zwei unterschiedliche Peaks zu ergeben, die eine PI3-Kinaseaktivität enthielten (Fig. 2, Feld A). Beide dieser Peak-Werte (hierin weiters als Peak 1 (P1) und Peak 2 (P2) bezeichnet) enthielten keine andere PI-Kinaseaktivität als die durch die HPLC-Analyse deacylierter Produktlipide bestimmte PI3-Kinaseaktivität (Daten nicht dargestellt). Beide dieser Fraktionen enthielten jedoch noch immer mehr als 20 Peptide, die nach einer SDS-PAGE-Gelanalyse durch Silberfärbung detektierbar waren (Fig. 2, Feld A). Die genaue Zusammensetzung der Untereinheit des aktiven PI3-Kinasekomplexes war immer noch ein Streitpunkt, also wurde ein Versuch unternommen, diese Frage mittels Affinitätsreinigung der PI3-Kinaseaktivität aus diesen beiden Mono-Q-Pools anzusprechen. Das PI3-Rinderhirn-Kinasepräparat wurde 10fach in Bindungspuffer verdünnt, und es wurde ihm ermöglicht, chargenweise 4 Stunden lang bei 4 °C an das Y751-Phosphopeptid-Affinitätsharz zu binden. Nach ausgiebigem Waschen der Säule mit Bindungspuffer wurden jene Proteine, die gebunden blieben, mit SDS-hältigen Puffern eluiert und mittels SDS-PAGE untersucht. Zwei Hauptpolypeptidarten mit einem ähnlichen Molekulargewicht von 85 und 110 kD, die spezifisch an die Phosphopeptidsäule banden, jedoch nicht an eine identische Säule, die mit unphosphoryliertem Y751-Peptid hergestellt wurde, wurden in beiden Mono-Q-Peaks identifiziert, und es wurde bei ihnen eine quantitative Verarmung an PI3-Rinderhirn-Kinase-Präparat festgestellt (Fig. 2, Feld B). Nach dem Testen des gebundenen Materials schien die Gegenwart dieser beiden Proteine auszureichen, um eine vollständige PI3-Kinaseaktivität zu erzeugen (Fig. 3, Spur 2). Mit frischen Präparaten der PI3-Rinderhirn-Kinase entfernte diese Säule nach einer einzigen Inkubation routinemäßig > 90 % der PI3-Kinaseaktivität, die in den Mono-Q-Peaks 1 oder 2 vorhanden waren (vgl. Fig. 3, Spuren 2 und 3). Weder die 85- und 110-kD-Proteine noch die PI3-Kinaseaktivität band an eine Säule mit einer äquivalenten Konzentration des nicht phosphorylierten Y751-Peptids (Fig. 3, Spur 1) oder an eine Säule, die mit Phosphotyramin, einem Phosphotyrosin-Analogon, hergestellt wurde (Daten nicht dargestellt). Es ist weiters anzumerken, dass die Bindung des PI3-Kinasekomplexes an die Phosphopeptidsäule nicht zu einem scheinbaren Anstieg der vorhandenen Gesamt-Enzymaktivität führte (Fig. 3, vgl. Spuren 2 und 6). Tatsächlich wurde oftmals ein leichter Rückgang der Aktivität beobachtet, dies wurde jedoch auf die instabile Natur des hochgradig gereinigten Enzyms zurückgeführt, von dem herausgefunden wurde,

dass es durch Spuren von Metallionen inhibiert wurde und durch Oxidierung reversibel inhibiert wurde. Schätzungen zufolge führt dieser Affinitätsreinigungsschritt zu einer 7-8.000fachen Reinigung der PI3-Kinase aus dem Gehirn von Rindern im Vergleich zu DEAE-Beladung (die erreichte Gesamtreinigung aus Gewebe ist tatsächlich um ein Vielfaches größer).

Elution der p85-, p110- und PI3-Kinaseaktivität aus der Phosphopeptidsäule

[0066] Die Elution des oben genannten PI3-Kinasekomplexes aus der Phosphopeptidsäule erwies sich aufgrund der hohen Affinität der Wechselwirkung als schwierig zu erzielen. Kazlauskas und Cooper (1990) wiesen bereits zuvor darauf hin, dass die Bindung zellulärer p85-Proteine an den phosphorylierten PDGF-Rezeptor bei der Behandlung mit Lösungen, die ionische Detergenzien, 2 M NaCl, 1 M Harnstoff oder 0,2 % SDS enthielten, stabil war. Von den p85-Untereinheiten und dem PI3-Kinasekomplex wurde weiters herausgefunden, dass sie eng an die Y751-Phosphopeptidmatrix banden, und sie wurden auch unter keiner der oben genannten Bedingungen eluiert. Bei 20 °C blieben die 85- und 110-kD-Proteine in Gegenwart von entweder 2 M NaCl plus 0,5 % Triton-X-100, 5 M NaCl, 6 M Harnstoff, 50 mM Phosphotyrosin oder bis zu 1 mg/ml freiem Y751-Phosphopeptid gebunden. Mehrere alternative Elutionsarbeitsvorschriften wurden ohne Erfolg untersucht. Ein Elutionsmedium, das mit dem Actigel-Harz versorgt wurde, war in der Lage, beide Proteine zu entfernen, führte jedoch zu einem vollständigen Verlust der Aktivität. Interessanterweise konnten keine geeigneten Bedingungen festgestellt werden, wonach die 110-kD-, jedoch nicht die 85-kD-Untereinheit aus der Säule freigesetzt wurde, was darauf hindeutet, dass die Wechselwirkung zwischen den 110- und den 85-kD-Untereinheiten von hochgradiger Affinität ist. Die Elution der gebundenen Proteine wurde routinemäßig durch Erhitzen des Harzes auf 80 °C für eine Zeitspanne von 3 Minuten in Gegenwart von 5 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), 0,1 % SDS, 0,1 mM DTT, 10 % Glycerin durchgeführt. Die Phosphopeptidsäule konnte einfach nach der Elution durch ausgiebiges Waschen in Bindungspuffer (**Fig. 3**, Spuren 4 und 5) regeneriert werden und konnte zumindest zehn Mal erfolgreich verwendet werden, bevor eine Verschlechterung der Bindung beobachtet wurde.

Analyse der p85- und 110-kD-Proteine, die an die Phosphopeptidsäule gebunder sind

[0067] Die Beziehung der 85-kD-Proteine, bei denen eine Bindung an die Y751-Phosphopeptidsäule beobachtet wurde, zu den erst vor kurzem klonierten p85α- und p85β-Proteinen wurde unter Verwendung der gegen die prognostizierten C-terminalen 12 und 18 Aminosäuren von p85α bzw. p85β erzeugten polyklonalen Antisera untersucht. Trotz des hohen Ausmaßes der allgemeinen Sequenzähnlichkeit zwischen p85α und p85β unterscheidet sich die Aminosäuresequenz dieses Segments signifikant, und daher wurde die Produktion von p85α- und p85β-spezifischen Antisera erwartet. Weiters ist die mit diesem Peptid in p85α korrespondierende Aminosäuresequenz zwischen menschlichen, Rinder- und murinen cDNAs vollständig konserviert, was darauf hindeutet, dass gegen diese Sequenz erzeugte Antikörper zum Studium der Expression verschiedener p85-Proteine in anderen Spezies als Rindern von Nutzen sein könnten (Escobedo et al. (1991 b); Otsu et al. (1991); Skolnik et al. (1991)). Die korrespondierende Region von p85β in anderen Spezies als Rindern ist im Moment unbekannt.

[0068] Die gegen diese Peptide erzeugten p85-Antisera konnten die geeigneten Spezies des exprimierten rekombinanten p85 von entweder COS-1- oder Sf9-Zellen spezifisch immunpräzipitieren, waren jedoch nicht sehr wirksam bei der Immunpräzipitation der PI3-Kinaseaktivität weder von Zelllinien noch von partiell gereinigtem PI3-Rinderhirn-Kinase-Präparat. Von diesen Antisera wurde jedoch herausgefunden, dass sie in Western-Blots gut funktionierten. Die in **Fig. 4** dargestellten Daten zeigen, dass diese beiden Antisera spezifisch exprimierte p85-Proteine erkannten, die entweder in COS-Zellen oder in Sf9-Zellen vorhanden waren. Ein längeres Aussetzen zeigte auch das/die endogene(n) COS-p85-Protein(e), es wurden jedoch mit diesen Antisera keine solchen Proteine in Sf9-Zellen detektiert. Es wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet, sogar bei hohen Konzentrationen der rekombinanten Proteine, was darauf hindeutet, dass sie für p85α (**Fig. 4**, Feld A) bzw. p85β (**Fig. 4**, Feld B) spezifisch sind. Von der Fähigkeit dieser Antisera, mit den geeigneten p85-Spezies wechselzuwirken, wurde gezeigt, dass sie in Gegenwart des geeigneten Peptids, das zur Erzeugung der Antisera verwendet wurde, vollständig blockiert wurde (**Fig. 4**, Feld C). Von der p85-Spezies in den beiden Peaks der PI3-Rinderhirn-Kinaseaktivität, die an die Y751-Phosphopeptidsäule band, wurde herausgefunden, dass sie ausschließlich mit den anti-C-terminalen Antisera reagierte, die gegen die p85α-spezifische Sequenz erzeugt wurden (**Fig. 4**, Feld A). Nach der Immobilisierung des PI3-Rinderhirn-Kinase-Materials auf der Y751-Phosphopeptidsäule wurde das gesamte immunreaktive p85α-Material an die Säule gebunden, wobei davon nichts weder durch Silberfärbung noch durch Western-Blot-Analyse im Überstand detektierbar war (**Fig. 4**, Feld D).

[0069] Zur Sequenzanalyse des PI3-Kinasekomplexes wurden die 110- und 85-kD-Untereinheiten nach ausgiebigem, stringentem Waschen durch kurzes Sieden des Harzes in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), 0,1 %

SDS, 0,1 mM DTT, 10 % Glycerin aus der Säule eluiert. Die Herstellung sowohl der 85- als auch der 110-kD-Proteine zum Verdau mit Lysylendopeptidase und die darauf folgende Sequenzanalyse wurden gemäß den zuvor hierin beschriebenen Arbeitsvorschriften durchgeführt. Die Aminosäuresequenzanalyse eines Lysylendopeptidase-C-Verdaus des p85-Proteins, das an die Y751-Phosphopeptidsäule gebunden war, bestätigte, dass das sowohl in Peak 1 als auch in Peak 2 der Mono-Q-Säule vorhandene p85-Protein identisch mit dem zuvor klonierten p85α war (Otsu et al. (1991)). In keinem der beiden Peaks wurden Peptide gefunden, die mit p85β korrespondierten. Umfassendes Sequenzieren des 110-kD-Proteins, das sowohl aus Mono-Q-Peak-1- als auch aus -Peak-2-Material affinitätsgereinigt wurde, ermöglichte die Isolierung einer neuen cDNA (siehe unten).

Spezifität der Bindung der gereinigten PI3-Rinderhirn-Kinase

[0070] Um die Spezifität der Y751-Phosphopeptidsäule zur Reinigung der PI3-Kinase zu evaluieren, wurden andere Phosphopeptidsäulen unter Verwendung von Peptiden hergestellt, die auf den Aminosäuresequenzen basierten, die bekannte Protein-Tyrosin-Kinase-Phosphorylierungsstellen umgeben. Tyrosin 857 ist die andere Haupt-Autophosphorylierungsstelle im menschlichen PDGF-β-Rezeptor, und es wurde gezeigt, dass sie für die Bindung von GAP, jedoch nicht für die Assoziierung mit der PI3-Kinase, erforderlich ist (Kazlauskas & Cooper (1989, 1990); Kazlauskas et al. (1991)). Für einen direkten Vergleich mit dem Y751-Peptid wurde ein 17-Aminosäure-Peptid, das um Tyrosin-Rest 857 herum angeordnet war, synthetisiert (siehe Tabelle 2, oben). Ein Vergleich der Proteine aus Baculovirus, das p85α-Sf9-Zelllysat exprimiert, und aus PI3-Rinderhirn-Kinase-Fraktionen aus Mono-Q-Peak-1 (P1) und -Peak-2 (P2), die entweder an Y751- (Feld A) oder an Y587-Phosphopeptidsäulen (Feld B) binden, ist in **Fig. 5** dargestellt. Obwohl bei baculovirusexprimiertem p85α eine Bindung beider Säulen in einem ähnlichen Ausmaß beobachtet wurde, wurde bei den 85- und 110-kD-Proteinen beider Aktivitäts-Peaks nur eine Bindung an die Y751-Phosphopeptidsäule festgestellt. Auf ähnliche Art und Weise wird die PI3-Kinaseaktivität nur in Assoziation mit der Y751-Phosphopeptidsäule angetroffen (**Fig. 7**, Feld B).

[0071] Um zu bestimmen, ob diese Bindungsspezifität erweitert werden konnte, wurden mehrere andere Peptide basierend auf bekannten Tyrosin-Autophosphorylierungsstellen synthetisiert (siehe Tabelle 2, oben). Eine kürzere 11-Aminosäure-Version des Y751-Peptids, genannt Y751S, wurde auch in einem Versuch, die erforderliche minimale SH2-Erkennungsdomäne weiterzuentwickeln, synthetisiert. Zwei andere Peptide, die das YXXM-Motiv enthielten, wurden hergestellt, eines basierend auf der Sequenz um Tyrosin 740 des PDGF-β-Rezeptors, einem zweiten Rest innerhalb des PDGF-Rezeptor-Kinase-Inserts, das eine Rolle in der PI3-Kinase-Bindung spielen könnte (Escobedo et al. (1991a), und das andere basierend um Tyrosin Y1313 von Met, dem Hepatozyten-Wächstumsfaktor-Rezeptor. Um eine vollständig nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Sequenz einzuführen, wurde das synthetische Peptid Poly-Glu:Ala:Tyr (6:3:1) auch phosphoryliert und an die Actigel-Matrix gekuppelt. Schließlich wurden die Peptide, welche die zwei Haupt-Phosphorylierungsstellen von $pp60^{c\text{-}src}$, Y416 und Y527, umgaben, erworben bzw. synthetisiert. Alle Peptide wurden wirksam spezifisch auf Tyrosin-Resten unter Verwendung des EGF-Rezeptors phosphoryliert und anschließend, wie oben für das Y751-Phosphopeptid beschrieben, mittels HPLC gereinigt.

[0072] Baculovirusexprimiertes Rinder-p85α und -p85β wurde zum Testen dieser Säulen ausgewählt (Otsu et al. (1991)). Die Bindungsanalyse wurde unter Bedingungen durchgeführt, die mit jenen, die zuvor für die Y751-Phosphopeptidsäule festgesetzt wurden, identisch waren. Etwas unerwartet exprimierte das Baculovirus p85-Untereinheiten, die an alle getesteten Phosphopeptidsäulen banden (siehe **Fig. 7**, Felder A und B). Sie banden jedoch nicht an identische Säulen, die nicht-phosphorylierte Peptide enthielten (**Fig. 6**, Felder A und B, Spur 1 sowie nicht dargestellte Daten). Als jedoch partiell gereinigte PI3-Rinderhirn-Kinase auf diese Säulen aufgebracht wurde, fand man heraus, dass sie ausschließlich an die Phosphopeptidsäulen banden, die ein YXXM-Motiv enthielten (siehe **Fig. 7** und **Fig. 8**, Feld A).

[0073] Die Tatsache, dass die Y751S-Phosphopeptidsäule bei der Bindung des aktiven PI3-Kinase-Komplexes so wirksam zu sein scheint wie die längere Y751-Phosphopeptidsäule, deutet darauf hin, dass die Consensussequenz, die vor kurzem von Cantley et al. (1991) vorgeschlagen wurde, tatsächlich alle für die korrekte Erkennung durch die PI3-Kinase-SH2-Domäne erforderlichen Sequenzdaten enthält (**Fig. 8**, Feld B).

KLONIEREN VON P110

C. Experimentelle Verfahren

Materialien

[0074] Restriktionsenzyme und DNA-Modifikationsenzyme wurden aus im Handel erhältlichen Standard-Quellen erhalten und gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Oligonucleotide wurden auf einem Applied-Biosystems-380B-DNA-Synthesegerät synthetisiert und in den folgenden Verfahren direkt verwendet.

Zellen

[0075] Die SGBAF-1-Zelllinie wurde, wie zuvor für andere Zelltypen beschrieben, mittels Transfektion von Zona-Faciculata-Zellen der Nebennierenrinde von Rindern mit pSV3neo erzeugt (Whitley et al. (1987)). SGBAF-1-Zellen und COS-1-Zellen wurden in Dulbeccos Modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), enthaltend 10 % fötales Kälberserum (FCS), gehalten. Der Erhalt von Spodoptera-frugiperda- (Sf9-) Zellen wurde wie von Summers und Smith (1987) beschrieben durchgeführt.

Proteinreinigung und Aminosäure-Sequenzbestimmung

[0076] Die Reinigung der p85α- und p110-Proteine mittels Chromatographie auf einer Peptid-Affinitätssäule, die den Aminosäuren 742–758 der Kinase-Insert-Region des menschlichen PDGF-β-Rezeptors entspricht, wurde oben stehend beschrieben. Das für die Endreinigung von p110 für die Aminosäure-Sequenzanalyse verwendete Verfahren entsprach den hierin zuvor beschriebenen Arbeitsvorschriften. Dieses Verfahren wurde bei drei separaten PI3-Kinase-Präparaten durchgeführt. Ein viertes Präparat wurde wie zuvor aus der Matrix eluiert und 5 Minuten lang gesiedet. Nach dem Abkühlen wurde die Probe mit 25 mM Tris-HCl, pH 8,8, verdünnt und direkt mit Lysylendopeptidase 72 Stunden lang bei 30 °C verdaut. Die Peptide wurden wie oben getrennt. Die Peptidsequenzen wurden unter Verwendung eines modifizierten, automatisierten Applied-Biosystems-477A-Puls-Flüssigkeitssequenzierungsgeräts bestimmt.

mRNA-Isolierung und cDNA-Klonierung

[0077] Die gesamte RNA wurde aus SGBAF-1 durch das Verfahren von Chirgwin et al. (1979) isoliert, und Poly(A)$^+$-mRNA wurde mittels Chromatographie auf Oligo-dT-Cellulose ausgewählt (Maniatis et al. (1982)). Eine Oligo-dT-geprimte cDNA-Bibliothek mit 5×10^6 primären Rekombinanten wurde in λ-Uni-Zap (Stratagene) aus 5 µg dieser mRNA unter Verwendung des Stratagene-Uni-Zap-cDNA-Klonierungssystems konstruiert. Die Konstruktion der vollständigen Rinderhirn-cDNA-Bibliothek in λ-Uni-Zap wurde zuvor bereits beschrieben (Otsu et al. (1991)).

Bibliotheksscreening und Hybridisierungen

[0078] Die nicht amplifizierte SGBAF-1-cDNA-Bibliothek (10^6 Rekombinanten) wurde auf E. coli K12 PLK-F' (Stratagene) bei einer Dichte von 10^5 Plaques pro 15-cm-Schale ausplattiert, und es wurden Lifts im Duplikat auf Nitrocellulosemembranen (Millipore) durchgeführt. Für das Screening wurden die Filter für zumindest 1 Stunde bei 42 °C in 6 × SSPE, 0,5 % SDS, 10 × Denhardt-Lösung, 100 µg ml^{-1} denaturierter beschallter Hering-Spermien-DNA (Sigma) vorhybrisiert. Die Hybridisierung wurde in derselben Lösung durchgeführt, enthaltend 10 ng ml^{-1} radiomarkiertes Oligonucleotid. Verwendete Oligonucleotide waren: Peptid N (MDWIFHT) 5'-AA(G/A)ATGGA(T/C)TGGAT(C/T/A)TT(T/C)CA(T/C)AC-3'); Peptid J(D D G Q L F H I D F G H F) 5'-GATGATGGCCA(G/A)CTGTT(T/C)CA(T/C)AT(T/A)GA(T/C)TTTGGCCA(T/C)TT. Oligonucleotide wurden mit ^{32}P am 5'-Ende in einer 20-µl-Reaktion, enthaltend 100 ng Oligonucleotid, 1 × Kinasepuffer (Promega), 0,1 mM Spermidin, 5 mM Dithiothreit, 100 µCi [γ-^{32}P]ATP (5000 Ci mmol^{-1}, Amersham) und 2 µl (20 U) T4-Polynucleotidkinase (Amersham), markiert. Die Filter wurden in 6 × SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend unter Verwendung eines Kodak-XAR-Films einer Autoradiographie unterzogen. Hybridisierende Klone wurden plaque-gereinigt und als Plasmide gemäß den Anweisungen des Herstellers gewonnen.

Charakterisierung von cDNA-Klonen

[0079] Die Sequenzierung wurde unter Verwendung des Sequenaee-Systems mit dem Kettenabbruch-Verfahren durchgeführt (United States Biochemicals). Klone für das Sequenzieren wurden durch das gerichtete

Klonieren von Restriktionsfragmenten in M13-, mp18- und mp19-Vektoren erhalten (Yanisch-Perron et al. (1985)) und durch Herstellen einer Reihe an Exonuclease-III-vermittelten Deletionen (Henikoff (1984); Pharmacia-Exonuclease-III-Deletionsset). DNA-Sequenzen wurden auf einem MicroVAX-Computer unter Verwendung des Wisconsin-Sequenzanalyse-Pakets (UWGCG: Devereux et al. (1984)) analysiert.

RACE-PCR

[0080] Die RACE-PCR wurde im Wesentlichen wie zuvor bereits veröffentlicht durchgeführt (Frohman et al. (1988); Harvey und Garlison (1991)). Kurz gesagt, wurde die Erststrang-cDNA, geprimt mit zufällig ausgewählten Hexameren (Amersham), unter Verwendung des Erststrang-cDNA-Synthesis-Sets von Stratagene aus 1 µg der SGBAF-1-Zell-mRNA synthetisiert. Die Erststrang-cDNA wurde mittels Isopropanolpräzipitation isoliert und unter Verwendung terminaler Desoxynucleotidyltransferase (BRL) mit Oligo-dA am Ende versehen. Die PCR wurde unter Verwendung von Oligo 2224 (5'-AATTCACACACTGGCATGCCGAT) und Adaptor-dT (5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT) als Primer unter Verwendung eines Perkin-Elmer/Cetus-Tap-Polymerase-PCR-Sets (Bedingungen: 94 °C 1 Minute, 35 °C 1 Minute, 72 °C 2 Minuten, 30 Zyklen) durchgeführt. Die Produkte wurden auf einem 1,5-%-Agarosegel mit niedrigem Schmelzpunkt fraktioniert und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das Gel wurde in 6 Banden geschnitten (Größenbereich 150–2000 bp), und die DNA wurde aus jeder Gel-Scheibe isoliert. Eine weitere PCR-Runde wurde auf dieser DNA durchgeführt, unter Verwendung des Oligonucleotids 2280 (5'-TTTAAGCTTAGGCATTCTAAAGTCACTATCATCCC) und des Adaptors (5'-GACTCGAGTCGACATCGA) als Primer (Bedingungen: 94 °C 1 Minute, 56 °C 1 Minute, 72 °C 2 Minuten, 35 Zyklen). Die Produkte wurden auf einem Agarosegel fraktioniert und durch Färben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Es wurde eine Bande erwartet, die 250 bp kürzer war als die Größe der DNA in der Gel-Scheibe, die für die PCR verwendet wurde. Eine intensiv färbende Bande mit 350 bp, erhalten aus der ~ 600-bp-Gel-Scheibe, wurde ausgeschnitten, mit HindIII und SalI verdaut und in Bluescript-KS ligiert – verdaut mit HindIII und XhoI, um das Plasmid pBS/race zu ergeben. Zwei unabhängige Inserts wurden vollständig sequenziert.

Southern-Transfer-Hybridisierungen

[0081] DNAs mit hohem Molekulargewicht wurden aus Zelllinien mittels Standardverfahren isoliert (Maniatis et al. (1982)). Die DNAs wurden mit Restriktionsendonucleasen verdaut, durch 0,5-%-Agarosegele fraktioniert und auf Nitrocellulose (BA85, Schleicher und Schuell) transferiert, wie in Maniatis et al. (1982) beschrieben. Die Vorhybridisierung wurde in 1 M NaCl, 10 × Denhardt-Lösung, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM EDTA, 0,1 % SDS und 100 µg ml^{-1} denaturierter beschallter Hering-Spermien-DNA bei 65 °C durchgeführt. Die Hybridisierung wurde über Nacht in derselben Lösung durchgeführt, enthaltend 20 ng ml^{-1} radiomarkiertes Sondenfragment (0,88 kb XbaI-PstI-Fragment: Sonde a, **Fig. 9**, unteres Feld) mit spezifischer Aktivität > 10^8 dpm $µg^{-1}$. Sondenfragmente wurden aus den Agarosegelen mittels Elektroelution isoliert (Maniatis et al. (1982)) und unter Verwendung von [α-^{32}P]-dATP (> 3000 Ci $mmol^{-1}$, Amersham) mittels Nick-Translation markiert (Rigby et al. (1977)). Die Membranen wurden ausgiebig in 0,1 × SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C oder bei 50 °C in 0,5 × SSC, 0,1 % SDS gewaschen, um verwandte Sequenzen zu detektieren, anschließend wurden sie einer Autoradiographie mit einem Kodak-XAR-Film unterzogen.

Northern-Transfer-Hybridisierungen

[0082] Poly(A)$^+$-RNA aus Gesamtrinderhirn oder der SGBAF-1-Zelllinie wurde mit DMSO und Glyoxal modifiziert und auf einem 0,9-%-Agarosegel fraktioniert, das in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) laufen gelassen wurde (Maniatis et al. (1982)). Die Nucleinsäure wurde auf eine Nylonmembran transferiert (Hybond-N, Amersham), und die Filter wurden trocken gebacken. Die Vorhybridisierung wurde bei 60 °C in 50 % Formamid, 5 × SSPE, 5 × Denhardt-Lösung, 0,2 % SDS, 200 µg ml^{-1} denaturierter beschallter Hering-Spermien-DNA und 200 µg ml^{-1} Hefe-RNA durchgeführt. Die Hybridisierung wurde in derselben Lösung durchgeführt, enthaltend 1 × 10^7 cpm ml^{-1} Antisense-RNA-Sonde. Die Sonde wurde durch die In-vitro-Transkription eines 2-kb-Fragments hergestellt (Nucleotide 598–2608; Sonde b, **Fig. 9**, unteres Feld), das in pSPT19 subkloniert wurde (Boehringer), und zwar unter Verwendung einer SP6-RNA-Polymerase (Amersham) und [α^{32}-P]-UTP (Amersham) sowie gemäß den Bedingungen des Herstellers. Die Membranen wurden in 0,1 × SSC, 0,1 % SDS bei 60 °C gewaschen. Die Filter wurden mit 1 µg ml^{-1} RNAase A (Sigma) in 2 × SSC 15 Minuten lang bei Raumtemperatur behandelt, und der Filter wurde anschließend bei 50 °C in 0,1 × SSC gespült. Anschließend wurden die Filter einer Autoradiographie gegen einen Kodak-XAR-Film bei –70 °C unterzogen.

PCR-Bestimmung von p85α- und p110-mRNA

[0083] Für p85α wurden 125 ng Poly(A)$^+$-RNA mit 2,5 Einheiten rTth-DNA-Polymerase (Perkin-Elmer-Cetus) bei 70 °C 10 Minuten lang umkehrtranskribiert, und zwar in einer 10-µl-Reaktion, die 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 90 mM KCl, 1 mM MnCl, 0,5 mM dNPT-Gemisch und 1,2 µM Antisense-Primer (5'-CAGGCCTGGCTTCCTGT) enthielt. Für die DNA-Polymerisierung wurde das Reaktionsvolumen durch Hinzufügen eines einzigen Gemisches auf 50 µl angepasst, wobei die folgenden Endkonzentrationen erhalten wurden: 5 Vol.-% Glycerin, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM KCl, 0,75 mM EGTA, 0,05 Vol.-% Tween 20, 2 mM $MgCl_2$, 0,24 µM Sense-Primer (5'-AACCAGGCTCAACTGTT). Anschließend wurde die PCR unter den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 92 °C 1 Minute, 58 °C 1 Minute, 72 °C 1 Minute, 25 Zyklen lang auf einem Perkin-Elmer-Cetus-DNA-Thermal-Cycler.

[0084] Die Bedingungen für p110 waren ähnlich, außer dass die Konzentration des Antisense-Primers (5'-TGCTGTAAATTCTAATGCTG) während des Schritts der Umkehr-Transkription auf 4,8 µM angehoben wurde. Die DNA-Polymerisierungsbedingungen waren dieselben, außer dass die $MgCl_2$-Endkonzentration auf 2,5 mM angehoben wurde und dass beide Primer (Sense-Primer = 5'-GTATTTCATGAAACAAATGA) in einer Endkonzentration von 0,96 µM vorhanden waren. Taq-DNA-Polymerase (Promega) wurde auch mit 0,03 U $µl^{-1}$ hinzugefügt. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt: 92 °C 30 Sekunden, 54 °C 5 Sekunden, 72 °C 30 Sekunden, 35 Zyklen lang. 20 µl einer jeden Reaktion wurden auf einem 3-%-Agarosegel laufen gelassen (Maniatis et al. (1982)) und mittels Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Antikörper und Immunpräzipitationen

[0085] Für die Herstellung des anti-C-terminalen p110-Antiserums wurde das Peptid CKMDWIFHTIKQHALN mittels FMOC-Chemie synthetisiert und mittels HPLC gereinigt. Anschließend wurde es unter Verwendung von Glutaraldehyd an KLH gekuppelt und unter Verwendung der in R.M. Kypta et al., Cell 62, 481–492 (1990), beschriebenen Verfahren in die Lymphknoten von Kaninchen injiziert. Positive Antisera, wie sie durch den enzymgekuppelten Immuntest bestimmt wurden, wurden auf spezifischen Peptid-Actigel-Affinitätssäulen affinitätsgereinigt. Anti-p85α- (Otsu et al. (1991)) und Anti-CSF-1-Rezeptor-Antisera (Ashmun et al. (1989)) wurden bereits zuvor beschrieben. Die Immunpräzipitationen wurden wie in Otsu et al. (1991) beschrieben durchgeführt.

PI3-Kinase-Test

[0086] Der Test für die PI3-Kinaseaktivität wurde wie von Whitman et al. (1985) beschrieben durchgeführt.

Expression von p110 in Sf9-Zellen

[0087] Um die kodierende Region von p110 in den Baculovirus-Transfervektor p36C zu klonieren (Page (1989)), wurde eine Sau-3A1-Stelle (GGATCA), die 10 Nucleotide stromauf vom Initiationscodon vorhanden ist (siehe **Fig. 9**), auf eine BamHI abgeändert (GGATCC-Stelle durch PCR-vermittelte Mutagenese). Kurz gesagt, wurde ein Sense-Oligonucleotid, das A durch C an Position 6 der Sau3A1-Stelle ersetzt, in einer PCR-Reaktion mit einem Antisense-Primer verwendet, der die Nucleotide (102–124) der p110-Sequenz umfasst (siehe **Fig. 9**), und zwar unter Verwendung einer Vent-Polymerase (New England Biolabs). Bei der Matrizen-DNA handelte es sich um eine zufallsgeprimte Erststrang-cDNA, die, wie oben beschrieben, aus SG-BAF-1-Zellen-mRNA hergestellt wurde; PCR-Bedingungen: 94 °C 1 Minute, 50 °C 1 Minute, 72 °C 2 Minuten, 35 Zyklen. Das PCR-Produkt wurde mit BamHI-EcoNI verdaut, und ein 118-bp-Fragment wurde aus einem Agarosegel mit einem niedrigen Schmelzpunkt isoliert. Dieses BamHI-EcoNI-Fragment wurde in p110/2.2 kloniert, mit BamHI (vorhanden in Vektorsequenzen) und EcoNI (Nucleotid = 108) verdaut, ergebend das Plasmid p110/(BamHI). Das BamHI-EcoNI-Fragment von p110/(BamHI) wurde sequenziert, und man fand heraus, dass es mit dem zuvor bestimmten übereinstimmte. Ein 3,4-kb-BamHI-KpnI-Fragment (KpnI-Stelle im Vektor vorhanden) wurde aus p110/(BamHI) isoliert und in den p36C-Baculovirus-Transfervektor ligiert (Page (1989)), der zuvor mit denselben Enzymen verdaut worden war. Rekombinante Viren wurden wie in Summers und Smith (1987) beschrieben erhalten. Sf9-Zellen wurden mit einer Infektionsmultiplizität von 10 mit rekombinanten Viren in IPL-41-Medien, ergänzt mit 10 % FCS, infiziert. Die Zellen wurden geerntet und 2 Tage nach der Infektion in EB-Lysepuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 NP40, 1 mM EDTA, 500 µM Natriumorthovanadat, 2 mM PMSF, 100 Kallikrein-Inhibitoreinheiten von Aprotinin ml^{-1}) lysiert (Kazlauskas und Cooper (1989)), und die Lysate wurden mittels Immunpräzipitation analysiert.

Assoziation von p110 und p85α mit CSF-1-Rezeptor

[0088] Dieser Test wurde im Wesentlichen wie von Kazlauskas und Cooper (1990) beschrieben durchgeführt. Sf9-Zellen wurden, wie bereits beschrieben, infiziert und 48 Stunden nach der Infektion in EB-Lysepuffer lysiert. Der CSF-1-Rezeptor wurde aus Sf9-Zellen immunpräzipitiert und auf Protein-A-Sepharose-Perlen gesammelt. Der Immunkomplex wurde anschließend ausgiebigem Waschen unterzogen (3-mal mit EB-Lysepuffer, zwei Mal mit Kinasepuffer; 50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,02 % Triton-X-100, 12 mM $MgCl_2$, 2 mM $MnCl_2$, 10 % Glycerin, 500 µM Natriumorthovanadat), und der Rezeptor wurde 15 Minuten lang bei 20 °C mit ATP phosphoryliert. Die Präzipitate wurden anschließend erneut gewaschen, um freies ATP zu entfernen, und 2 Stunden bei 4 °C mit Zelllysaten inkubiert, die aus Sf9-Zellen hergestellt wurden, die mit Viren infiziert waren, die (i) p85α, (ii) p110 exprimierten, oder (iii) mit Viren co-infiziert waren, die p85α und p110 exprimierten. Die Immunkomplexe wurden anschließend gewaschen und auf die assoziierte PI3-Kinaseaktivität getestet.

Expression von p85α und p110 in COS-1-Zellen

[0089] Für die vorübergehende Expression von p85α in COS-1-Zellen wurde die kodierende Region von p85α in den auf dem späten Adenovirus-Promotor basierenden Expressionsvektor pMT2 kloniert (Kaufman et al. (1989)), und zwar wie zuvor beschrieben (Otsu et al. (1991)). Für die Expression des p110-cDNA-Plasmids wurde pSG5-p110 wie folgt konstruiert. Das 3,4-kb-BamHI-HindIII-Fragment aus cDNA p2.1 wurde in pSG5 (Stratagene) ligiert, mit BamHI und BglII geschnitten, und die HindIII- und BglII-Überhänge von p2.1 bzw. pSG5 wurden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Dies ergab das Konstrukt pSG5.2. Das Plasmid pBS/race (oben) wurde mit EcoRI und HindIII verdaut, die 350-bp-Bande wurde mittels Elektroelution gelgereinigt (Maniatis et al. (1982)) und weiter mit Sau3AI und BsmI verdaut. Dieses Gemisch wurde anschließend zu dem gelgereinigten BsmI-BstMI-Fragment von p2.1 hinzugefügt und in einer Drei-Fragment-Ligation zu pSG5.2 ligiert, verdaut mit BamHI und BstXI. 5 µg jeder DNA wurden in 10-cm-Schalen mit 80 % konfluenten COS-1-Zellen transfiziert, und zwar unter Verwendung von Lipofectin (BRL) unter Bedingungen, wie sie von den Herstellern vorgeschlagen wurden. Die Lysate wurden mittels Immunpräzipitation mit polyklonalem Anti-p85α-Antiserum oder mit C-terminalem Anti-p110-Peptid-Antiserum analysiert. Die auf Protein-A-Sepharose-Perlen gesammelten Immunkomplexe wurden entweder auf 10-%-SDS-PAGE-Gelen analysiert, gefolgt von einer Autoradiographie, oder, wie beschrieben, In-vitro-PI3-Kinase-Tests unterzogen.

D. Resultate des Klonierens

cDNA-Klonieren und die abgeleitete Aminosäuresequenz von p110

[0090] Anfänglich wurde eine Oligo(dT)-geprimte Rinderhirn-cDNA-Bibliothek (Otsu et al. (1991)) mit Oligonucleotidsonden gescreent, die gegen die Peptide J und N hergestellt wurden (siehe **Fig. 9**). Es wurden keine hybridisierenden Klone detektiert. Daher wurde eine neue cDNA-Bibliothek mit 5×10^6 primären Rekombinanten aus mRNA konstruiert, die aus einer pSV3neo-transfizierten Zona-Fasciculata-Zelllinie der Nebennierenrinde von Rindern (SGBAF-1) isoliert wurde, von der bekannt war, dass sie PI3-Kinaseaktivität enthält (Otsu et al. (1991)). Das Screening von 1 × 10 primären Rekombinanten aus dieser Bibliothek mit denselben Oligonucleotiden führte zu der Detektion von 66 Klonen, die bei beiden Sonden positiv waren. Zwanzig überlappende Klone wurden charakterisiert, und es wurde herausgefunden, dass sie Inserts von 1–4 kb besaßen. Der Klon mit dem längsten Insert, das die kodierende Sequenz repräsentierte (Klon p110/2.1), wurde vollständig sequenziert. Dies zeigte einen potentiellen offenen Leseraster (ORF) von 1053 Aminosäuren mit einem prognostizierten Molekulargewicht von 123 kD. Der ORF enthielt alle sequenzierten Peptide, ihm gingen jedoch keine Stopp-Codons im Raster voraus. Da die prognostizierte Größe des p110-Proteins aus SDS-Gelen bei 110 kD liegt, war es möglich, dass das Protein von einem internen Methionin innerhalb dieses ORF beginnen konnte.

[0091] In COS-1-Zellen durchgeführte Expressionsstudien, die die Methionine 16, 30, 123 und 130 als potentielle Startcodons verwendeten (eine Initiation bei Met 123 würde ein Protein mit 110 kD ergeben), führten nicht zu den Synthesen eines Proteins, das p110 entsprach, oder zu einer beliebigen Zunahme der PI3-Kinaseaktivität in diesen Zellen. Dieses deutete darauf hin, dass p110/2.1 die 5'-kodierende-Sequenz fehlt und dass entweder das p110-Protein abnormal auf SDS-PAGE-Gelen läuft oder dass es als Teil eines größeren Vorläufermoleküls synthetisiert wird. Die Charakterisierung der verbleibenden 46 positiven Klone, die anfänglich isoliert wurden, zeigte, dass alle kürzere Inserts hatten als sie bei Klon p110/2.1 vorhanden waren. Um die p110/2.1-cDNA weiter in die 5'-Richtung auszudehnen, wurde eine RACE- (Rapid-Amplification-of-cDNA-Ends-) Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Frohman et al. (1988); Harvey und Garlison (1991)). Zwei unabhängige Produkte, welche die bekannte Nucleotidsequenz ausdehnten, wurden charakterisiert (siehe **Fig. 9**, unteres Feld). Das Nucleotid und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen für die kodierende Region

der zusammengesetzten cDNA werden in Fig. 9 dargestellt. Dem mutmaßlichen Initiationscodon geht ein Stoppcodon im Raster voraus, und es tritt in einer Kozak-Consensus-Sequenz (Kozak (1987)) für die Initiation der Translation auf (Daten nicht dargestellt). Die abgeleitete Aminosäuresequenz kodiert für ein Protein mit 1068 Aminosäuren mit einem berechneten relativen Molekulargewicht von 124.247.

Analyse des p110-Nucleotids und der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen

[0092] Die kodierende Region der cDNA für p110 ist besonders A+T-reich (G+C-Gehalt = 39,3 %), was sich in der Unfähigkeit der Verwendung der Codons TCG (Serin) und GTC (Valin) widerspiegelt. Wurde die p110-Aminosäuresequenz mit Sequenzen in den Swissprot- und NBRF-Protein-Datenbanken verglichen, so wurde eine signifikante Homologie nur zu einem Protein gefunden, Vps34p (**Fig.** 10). Dies ist ein rares 100-kD-Protein aus Saccharomyces cerevisiae, das in das Sortieren der Proteine in die Hefe-Vakuole und in die Vakuolen-Morphogenese während der Knospung involviert ist (Herman und Emr (1990)). Eine Suche in der p110-Sequenz nach Aminosäuren, die in den aktiven Stellen der Kinasen konserviert sind, zeigt G_{842}, K_{863}, D_{916}, N_{921} und das DFG-Triplett an den Resten 933–935 (diese Reste sind in **Fig.** 2B markiert), die homolog zu G_{52}, K_{72}, D_{166}, N_{171} und dem DFG-Triplett an den Resten 184–186 in der cAMP-abhängigen Protein-Kinase sein könnten (Knighton et al. (1991a, b)). Äquivalente Reste sind in Vps34p vorhanden und sind auch in Fig. X markiert. Die glycinreiche P-Schleife (Saraste et al. (1990)), die in vielen Kinasen zu finden ist (Hanks et al. (1988)), scheint weder in p110 noch in Vps34p vorhanden zu sein.

Genomische Southern-Blot-Analyse von p110-Genen

[0093] Angesichts des Auftretens von zumindest zwei Formen von p85 (Otsu et al. (1991)) wurde die Southern-Blot-Analyse verwendet, um die Anzahl der p110-verwandten Gene zu analysieren, die in genomischer DNA vorkommen, die aus Rindern, menschlichen Quellen und Ratten isoliert wurde. Die Analyse erbrachte klare Beweise für ein zweites, eng verwandtes Gen in genomischer Ratten- und menschlicher DNA (z.B. vergleiche **Fig.** 11A, Spuren 4 und 9, mit Fig. 11B, Spuren 4 und 9). Bei der Rinder-DNA scheinen durch Waschen bei höherer Stringenz keine Hybridisierungssignale entfernt worden zu sein (vergleiche **Fig.** 11A, Spuren 1, 2 und 3, mit Fig. 11B Spuren 1, 2 und 3). Es ist jedoch möglich, dass ein verwandtes Gen in Rinder-DNA existiert, dass es jedoch entweder unter den verwendeten Bedingungen nicht kreuzhybridisiert oder dass es bezüglich der Sequenz zu ähnlich ist, um es durch differentielles Waschen zu detektieren.

Expression von p110-Zellen und -Geweben

[0094] Eine Northern-Blot-Analyse, durchgeführt auf mRNA, die aus der SGBAF-1-Zelllinie und aus Gesamt-Rinderhirn isoliert wurde, wird in **Fig.** 12A dargestellt. Beide mRNA-Proben enthalten bedeutende p110-spezifische Transkripte von 4,8 kb und 9 kb, obwohl wesentlich mehr der p110-Nachricht in mRNA vorhanden ist, die aus SGBAF-1-Zellen (**Fig.** 12A, Spur 2) isoliert wurde, als aus dem Gesamt-Rindergehirn isoliert wurde (**Fig.** 12A, Spur 1). Eine PCR-basierte Studie wurde durchgeführt, um die Verteilung und die Konservierung von p110-mRNA in Zelllinien und Gewebe verschiedener Spezies zu untersuchen. Eine Amplifikation eines p110-spezifischen Fragments wurde für drei menschliche mRNAs (218 bp; **Fig.** 12B, Spuren 1, 2 und 3) sowie zwei Rinder-mRNAs festgestellt (212 bp; **Fig.** 12B, Spuren 5 und 6). Fragmente mit ähnlicher Größe werden aus Zelllinien amplifiziert, die von Affen oder Schweinen stammen (**Fig.** 12B, Spuren 4 bzw. 7), was auf die Existenz eines p110-Homologs in diesen Spezies hindeutet. Eine zusätzliche Bande von 300 bp wird aus RinderhirnmRNA amplifiziert (**Fig.** 12B, Spur 5), und ihre Identität wird im Moment untersucht. Da die PI3-Kinaseaktivität in einem p85α/p110-Komplex zu finden sein kann (Carpenter et al. (1990); Otsu et al. (1991); Shibasaki et al. (1991)), wurden einige dieser Zelllinien untersucht, um herauszufinden, ob Nachrichten für p85α und p110 coexprimiert werden. Die Amplifikation eines p85α-spezifischen 190-bp-Fragments wurde für die drei menschlichen Auslassungs-Zelllinien (**Fig.** 12C, Spuren 1, 2 und 3) und eine Affen-Zelllinie (**Fig.** 12C, Spur 4) analysiert. Daher werden zumindest in diesen vier Zelllinien die Nachrichten für p85α und p110 coexprimiert.

p110-cDNA kodiert für ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 110 kD, das PI3-Kinaseaktivität besitzt.

[0095] Um zu zeigen, dass die p110-cDNA für die 110-kD-Untereinheit der PI3-Kinase kodiert, wurde sie im Baculovirus-Expressionssystem exprimiert (Summers und Smith (1987)). Eine Immunpräzipitation mit einem Anti-p110-Antiserum aus Spodopterafrugiperda- (Sf9-) Zellen, die mit dem p36C-p110-Virus infiziert waren, zeigte ein neues Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 110 kD (**Fig.** 13A, Spur 4), das mit der p110-PI3-Kinase-Untereinheit, die aus dem Gehirn von Rindern gereinigt wurde, comigrierte. In Anti-p110-Im-

munpräzipitaten, die aus Zellen hergestellt wurden, die mit einem Kontroll-Wildtyp-Virus infiziert waren, wurde kein solches Protein gefunden (**Fig.** 13A, Spur 2). Dieses baculovirusexprimierte p110 wurde verwendet, um zu untersuchen, ob p110 alleine eine katalytische Aktivität besitzt oder ob ein p85α/p110-Komplex erforderlich ist. Bei Tests wurde herausgefunden, dass p110-hältige Immunpräzipitate signifikante Mengen an PI3-Kinaseaktivität besaßen (**Fig.** 13B, Spur 4), wobei die Identität des Lipidprodukts als PI(3)P durch HPLC-Analyse bestätigt wurde. Keine Aktivität wurde in Anti-p110-Immunpräzipitaten detektiert, die aus infizierten Kontrollzellen hergestellt wurden (**Fig.** 13B, Spur 2). Diese Resultate zeigen klar und deutlich, dass die p110-Untereinheit der PI3-Kinase für die katalytische Aktivität ausreicht.

In Insektenzellen exprimiertes p110 bildet einen stabilen Komplex mit p85α

[0096] Da aus dem Gehirn von Rindern gereinigte PI3-Kinase ein Komplex aus p85α und p110 ist, wurde die Fähigkeit von p85α und p110, exprimiert in Insektenzellen, erneut einen aktiven p85α/p110-Komplex zu bilden, untersucht. Baculoviren, die entweder p85α (pAcC4-p85α; Otsu et al. (1991)) oder p110 (p36C-p110) exprimierten, wurden getrennt oder zusammen in Sf9-Zellen infiziert und exprimierten Proteine, die, wie in experimentellen Verfahren beschrieben wurde, analysiert wurden. Die Immunpräzipitate von p85α alleine (**Fig.** 13A, Spur 3) waren in einem PI3-Kinasetest inaktiv (**Fig.** 13B, Spur 3), wie bereits zuvor gezeigt wurde (Otsu et al. (1991)). In doppelten Infektionsexperimenten wurden sowohl p85α als auch p110 in entweder Anti-p85α- (**Fig.** 13A, Spur 5) oder Anti-p110-Immunpräzipitaten (**Fig.** 13A, Spur 6) detektiert. Da keines der untereinheitspezifischen Antisera die andere Untereinheit erkennt (siehe **Fig.** 15A, Spur 3; **Fig.** 15C, Spur 2), ist die einfachste Interpretation dieser Daten jene, wonach p110 und p85α (**Fig.** 13B, Spur 5) oder die Anti-p110-Antisera (**Fig.** 13B, Spur 6) bei Expression in Sf9-Zellen beide aktiv waren. Keines der Antisera immunpräzipitierte die endogene PI3-Kinaseaktivität aus Sf9-Zellen, die mit einem Wildtyp-Virus infiziert waren (**Fig.** 13B, Spuren 1 und 2).

In Sf9-Zellen exprimierte PI3-Kinase-Aktivität kann mit dem aktivierten CSF-1-Rezeptor assoziieren.

[0097] Von der PI3-Kinaseaktivität wurde gezeigt, dass sie mit vielen aktivierten PTK-Rezeptoren assoziiert, besonders gut untersucht wurden jedoch jene Rezeptor-PTKs, die eine Kinase-Insertregion besitzen, z.B. PDGF-β-Rezeptor (S.R. Coughlin et al., Science 243, 1191–1193 (1989)) und der CSF-1-Rezeptor (Varticovski et al. (1989); Shurtleff et al. (1990)). Ein In-vitro-Assoziationstest (Kazlauskas und Cooper (1990)) wurde verwendet, um die Assoziation der PI3-Kinaseaktivität, die in Insektenzellen exprimiert wurde, mit dem aktivierten CSF-1-Rezeptor zu untersuchen. **Fig. 14** zeigt, dass die baculovirusexprimierte PI3-Kinaseaktivität mit dem CSF-1-Rezeptor assoziieren kann, jedoch nur aus einem Sf9-Zelllysat, das sowohl p85α als auch p110 enthält (**Fig. 14**, Spur 2), und nur, wenn der Rezeptor vor der Inkubation mit Sf9-Zelllysat phosphoryliert wurde (vergleiche **Fig. 14**, Spuren 2 (+ ATP) und 3 (-ATP)). Keine PI3-Kinase-Aktivität assoziierte mit CSF-1-Rezeptoren, die mit Sf9-Zelllysaten inkubiert wurden, die nur p85α enthielten (**Fig. 14**, Spur 4) oder nur p110 (**Fig. 14**, Spur 5). Keine Aktivität wurde als mit dem aus Sf9-Zellen immunpräzipitierten CSF-1-Rezeptor assoziiert gefunden (**Fig. 14**, Spur 1). Daher können PI3-Kinase-Untereinheiten, die in Insektenzellen exprimiert werden, verwendet werden, um erneut einen aktiven p85α/p110-Komplex zu bilden, der an einen phosphorylierten PTK-Rezeptor bindet.

Expression von PI3-Kinase in COS-1-Zellen

[0098] Die oben angeführten Resultate stammen alle aus Expressionsstudien, die in Insektenzellen durchgeführt wurden. Um p110 und seine Wechselwirkung mit p85α in einem Säugetierzellsystem zu untersuchen, wurden vorübergehende Coexpressionsstudien in COS-1-Zellen durchgeführt. Die p110-cDNA wurde in den SV40-basierten Expressionsvektor pSG5 kloniert (wodurch das Plasmid pSF5-p110 erhalten wird) und entweder alleine oder zusammen mit einem p85α-Expressionskonstrukt, pMT2-p85α (Otsu et al. (1991)), in COS-1-Zellen transfiziert. Um ein leichteres Sichtbarmachen der Proteine zu ermöglichen, wurden transfizierte COS-1-Zellen vor der Lyse 3–4 Stunden lang metabolisch mit ^{35}S-Methionin markiert. Eine Radiomarkierung zu dieser Zeit führt zu einer bevorzugten Markierung von Proteinen, die aus transfizierten Konstrukten synthetisiert werden. Die Zelllysate wurden entweder mit Anti-p85α- (**Fig. 15**, Felder A und B) oder mit Anti-p110-Antisera (**Fig. 15**, Felder C und D) immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden entweder mittels Autoradiographie nach der Fraktionierung auf SDS-PAGE-Gelen sichtbar gemacht (**Fig. 15**, Felder A und C) oder einem In-vitro-PI3-Kinase-Test unterzogen (**Fig. 15**, Felder B und D).

[0099] Die Transfektion von pMT2-p85α führte aufgrund von endogenem Affen-p85α zu einem signifikanten Anstieg an p85α im Vergleich zum Hintergrund-Wert – vergleiche **Fig.** 15A, Spuren 2 und 4, mit **Fig.** 15A, Spur 1. In p85α/p110-Co-Transfektanten coimmunpräzipitiert das Anti-p85α-Antiserum p85α und p110 (**Fig.** 15A,

Spur 4), was die Existenz eines p85α/p110-Komplexes demonstriert. Als Tests bezüglich der PI3-Kinaseaktivität auf den Anti-p85α-Immunpräzipitaten durchgeführt wurden, wurde eine verstärkte Aktivität (10fach höher als der Hintergrund-Wert aufgrund der endogenen Affen-PI3-Kinase) nur bei Immunpräzipitaten detektiert, die sowohl p85α als auch p110 enthielten (vergleiche **Fig.** 15B, Spur 4, mit **Fig.** 15B, Spuren 1, 2 und 3). Diese Resultate zeigen, dass sowohl in COS-1-Zellen als auch in Sf9-Zellen die p110-cDNA die Synthese eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 110 kD steuert, das mit p85α assoziiert, um einen p85α/p110-Komplex zu bilden, der PI3-Kinaseaktivität besitzt.

[0100] Wurden Proteine jedoch aus denselben Lysaten mit dem Anti-p110-Antiserum immunpräzipitiert und PI3-Kinase-Tests durchgeführt, so stellten die Ergebnisse eine Überraschung dar. Wie erwartet immunpräzipitierte das Anti-p110-Antiserum p110 aus Zellen, die mit pSG5-p110 transfiziert warem (**Fig.** 15C, Spur 3). Zusätzlich immunpräzipitierte es jedoch nur freies p110 aus Lysaten, die aus Zellen hergestellt wurden, die mit p85α und p110 cotransfiziert waren (**Fig.** 15C, Spur 4), obwohl der p85α/p110-Komplex in diesen Lysaten vorhanden war. (**Fig.** 15A, Spur 4). Beim Testen auf die PI3-Kinaseaktivität war in p110-hältigen Immunpräzipitaten, die entweder aus p110-transfizierten (**Fig.** 15D, Spur 3) oder aus p85α- und p110-cotransfizierten Zellen (**Fig.** 15D, Spur 4) hergestellt wurden, keine Aktivität über jener vorhanden, die in Kontroll-Immunpräzipitaten (**Fig.** 15D, Spuren 1 und 2) anzutreffen war. Daher ist das Anti-p110-Antiserum in der Lage, p110 aus Zelllysaten sowohl infizierter Sf9-Zellen (**Fig.** 13A, Spur 4) als auch transfizierter COS-1-Zellen (**Fig.** 15C, Spur 3) immunzupräzipitieren, jedoch nur die aus Sf9-Zelllysaten hergestellten Immunpräzipitate besitzen erhöhte Werte der PI3-Kinaseaktivität (vergleiche **Fig.** 13B, Spur 4, und **Fig.** 15D, Spur 3). Das Anti-p110-Antiserum immunpräzipitiert auch den p85α/p110-Komplex, wenn dieser in Sf9-Zellen exprimiert wird, jedoch nicht bei Expression in COS-1-Zellen.

[0101] Wie oben angegeben, zeigt eine Analyse der klonierten p110-cDNA, dass diese für ein Protein mit 1068 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 124 kD kodiert. Der Grund für den Unterschied in der Größe zwischen dem Wert des berechneten (124 kD) und des beobachteten Molekulargewichts von 110 kD ist unklar, es ist jedoch bekannt, dass viele Proteine auf SDS-PAGE-Gelen anormal migrieren. Die Expression des von diesem ORF kodierten Proteins in Sf9-Zellen, COS-1-Zellen, Reticulozyten-Lysat und E. coli führt zu der Produktion eines Proteins mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 110 kD.

[0102] Die abgeleitete Aminosäuresequenz von p110 enthält alle Peptidsequenzen, die durch Proteinsequenzanalyse bestimmt wurden. Da die Peptide aus einem Lysylendopeptidase-Verdau erhalten wurden, wird davon ausgegangen, dass ihnen allen ein Arginin-Rest vorausgehen sollte. Dies trifft in jedem Fall zu, außer bei Peptid A, dem ein Arginin-Rest vorausgeht (Arg 162). Nucleotidsequenzdaten, die aus einem anderen cDNA-Klon erhalten wurden, der diese Region abdeckt, bestätigen die Gegenwart eines Arginin-Rests an dieser Position. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass eine Spaltung an dieser Stelle durch Lysylendopeptidase das Resultat eines Sequenz-Polymorphismus ist.

[0103] Als eine Datenbank-Suche bezüglich der p110-Sequenz durchgeführt wurde, wurde keine signifikante Homologie mit etwaigen Proteinen detektiert, von denen eine Verwicklung in den Inosit-Lipid-Stoffwechsel bekannt war. Wie jedoch angegeben wurde, zeigte p110 jedoch eine signifikante Homologie über die C-terminale Hälfte hinweg zu dem Saccharomyces-cerevisiae-Protein Vps34p. Die Möglichkeit, dass Vps34p eine Hefe-PI-Kinase ist, wird im Moment untersucht. Falls p110 und Vps34p homologe Protein sind, so sind Spekulationen, dass p110 auch in das Abzielen auf Proteine und/oder in den vesikulären Transport involviert sein könnte, von Interesse. Die PI3-Kinaseaktivität wurde zuvor bereits mit vesikelvermittelten Reaktionen in höheren Eukaryoten in Verbindung gebracht. Daher wird nach der Stimulierung der Plättchen mit Thrombin (Kucera und Rittenhouse (1990)) und der Neutrophilen mit f-Met-Leu-Phe (Traynor-Kaplan et al. (1988)) ein Anstieg der PI3-Kinaseaktivität festgestellt. In beiden Fällen fördert die Ligandstimulierung die Fusion der vesikulären Strukturen, die für die biologische Reaktion notwendig sind. Es wurde nach der Aktivierung der PTKs auch eine Rolle der PI3-Kinase in intrazellulären Vesikeln vorgeschlagen (Cantley et al. (1991); Kelly et al. (1992)).

[0104] Daten aus Southern-Blot-Tests deuten darauf hin, dass es zwei Gene für die PI3-Kinase in Ratten und Menschen geben könnte. Beweise für die Existenz eines zweiten Gens in Ratten-DNA werden auch durch die Resultate von Carpenter et al. (1990) bereitgestellt, der zwei Formen von p110 in ihrem gereinigten PI3-Kinase-Präparat identifizierten. Die In-situ-Hybridisierung bestätigt die Gegenwart zweier eng verwandter Sequenzen in der menschlichen DNA, obwohl eine davon ein Pseudogen sein könnte. Zwei Formen von p85 (p85α und p85β) wurden charakterisiert (Otsu et al. (1991)), obwohl nur p85α in Assoziation mit p110 in PI3-Kinase aus dem Gehirn von Rindern gefunden wurde. Es ist möglich, zu spekulieren, dass p85β mit einer zweiten Form von p110 assoziiert.

[0105] Obwohl im Moment die Funktion der durch PI3-Kinase produzierten 3-phosphorylierten Phosphoinositide unklar ist, so hilft das Vorhandensein von Expressionssystemen, die ihre Erzeugung ermöglichen, bei der Bestimmung ihrer Funktion.

Beispiel 2

[0106] Unter Verwendung der Rinder-cDNA-Sonde, die aus dem XbaI-PstI-Fragment der Sequenz aus Fig. 9 (Sonde a, unteres Feld) und genomischen DNAs aus mehreren Spezies besteht, erweisen sich die Southern-Blot-Analysen in den folgenden Spezies als positiv gegen die Rinder-Sonde: – Rinder (Kalbsthymus), Menschen (HeLa-Zellen), Ratten (Leber), Affen (COS-Zellen), Schweine (ZNR-Zellen), Hühner (von Promega) und Xenopus (Leber).

[0107] Die menschliche cDNA wurde aus einer cDNA-Bibliothek isoliert, die aus mRNA hergestellt wurde, die aus der menschlichen Zelllinie KG1a isoliert wurde, unter Verwendung von Standardverfahren. Die Sonde bestand aus einer partiellen cDNA aus der zweiten Hälfte der p110-Rinder-cDNA. Die Sonde wurde mit ^{32}P markiert und über Nacht bei 65 °C in 1 M NaPi, 7 % SDS-Puffer an die Bibliotheksfilter hybridisiert. Die Filter wurden in 2 × SSC bei 50 °C gewaschen und bei –70 °C gegenüber einem Röntgenfilm ausgesetzt. Die Nucleotidsequenz wird in Fig. 16 zusammen mit der korrespondierenden Aminosäuresequenz gezeigt. Die menschliche p110-Sequenz besitzt eine Homologie von 95 % mit der Rinder-p110-Sequenz auf DNA-Ebene und ist zu 98 % identisch auf Protein-Ebene (Fig. 17 und Fig. 18). Die Proteinsequenz wird in Fig. 19 gezeigt. Die Primer (357) AAG GAT CAG AAC AAT GCC T und (416) AGG CTT TCT TTA GCC ATC A wurden unter Verwendung der RT-PCR (94 °C 30 Sekunden, 50 °C 30 Sekunden, 72 °C 60 Sekunden; 35 Zyklen lang) zur Amplifikation der partiellen Sequenz eines hochgradig verwandten p110-Gens (p110-11) verwendet. P110-11 besitzt eine Nucleotidhomologie von 96 % mit p110 (Sequenz nicht dargestellt).

[0108] Zwei neue cDNAs, die mit p110 verwandt sind, wurden kloniert. Es wurden degenerierte Primer zu den konservierten Sequenzen zwischen menschlichem p110 und dem verwandten Hefe-Gen VPS34 entworfen (Sense (GDDLRQD) 5'-GGN GAT/C GAT/C T/C TA/G CGN CAA/G GA-3', Antisense (FHIDFGHF) 5'-A/GAA A/GTG ICC A/GAA A/GTC A/G/TAT A/GTG A/GAA-3). Diese wurden in RT-PCR-Reaktionen unter Verwendung von mRNA aus den menschlichen Zelllinien MOLT4 und U937 verwendet (94 °C 30 Sekunden, 50 °C 30 Sekunden, 72 °C 30 Sekunden; 35 Zyklen lang). Zwei neue cDNAs, PITR-c und PITR-f, verwandt mit p110, wurden isoliert. Die PITR-c-Nucleotidsequenz wird in Fig. 20 dargestellt. Dieses Gen ist hochgradig mit dem Hefe-Gen VPS34 verwandt, das VPS34-Protein ist in das Protein-Sortieren von Golgi zu der Vakuole involviert und besitzt eine intrinsische PI3-Kinaseaktivität. Die PITR-f-Nucleotidsequenz wird in Fig. 21 gezeigt und besitzt eine größere Ähnlichkeit mit p110 als PITR-c und besitzt wahrscheinlich auch PI3-Kinaseaktivität. Die Angleichung von menschlichem p110, den menschlichen PI3-Kinase-verwandten Genen PITR-c und PITR-f und der Hefe-PI3-Kinase VPS34 ist in Fig. 22 dargestellt. Die Aminosäuren, die in 3 oder mehr der Proteine konserviert sind, sind im oberen Fall gezeigt.

[0109] Die Wechselwirkung der p85- und p110-Untereinheiten der PI3-Kinase wird für die Aktivität der Kinase in Säugetierzellen als erforderlich angesehen. Daher könnte eine Inhibierung der Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten ein Mittel zur Inhibierung der Aktivität dieses Signalübertragungswegs bereitstellen. Um Reagenzien für p110 zu entwerfen, welche die Wechselwirkung blockieren, ist es von Nutzen, die Region von p110 zu definieren, die an die p85-Untereinheiten bindet. Um dies zu tun, wurde eine Serie an Mutanten konstruiert, die verschiedene Domänen des p110-Proteins exprimieren (Fig. 23B). Diese Fragmente wurden als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert. Die Proteine wurden anschließend gemäß den Anweisungen des Herstellers an eine Glutathion-Sepharose-Säule (Pharmacia) gebunden (G. Panayotou et al., Embo J. 11, 4261–4272 (1992)). Die Fähigkeit dieser Proteinfragmente, die p85-Untereinheiten zu binden, wurde durch die Fähigkeit der Säule getestet, p85-Untereinheiten spezifisch zurückzubehalten, die aus Baculovirus gereinigt wurden (Otsu et al., Cell 65, 91–104 (1991)). Wie in Fig. 23A gezeigt wird, war nur p110-N (αα1–128) in der Lage, die p85α- und -β-Untereinheiten zu binden. Um die Bindungsdomäne weiter zu charakterisieren, wurden, wie in Fig. 24 dargestellt, Deletionsmutanten und PCR-Fragmente aus dem p110-N-Fragment hergestellt. Die Resultate in **Fig.** 25 demonstrieren, dass eine Domäne, welche die Aminosäuren 19–110 des menschlichen p110 enthält, ausreicht, um mit den p85-Untereinheiten zu assoziieren. Die Entfernung weiterer 20 Aminosäuren aus entweder den Amino- oder den Carboxy-Termini führte zu einem Verlust an Bindungsaktivität. Nun, da diese Domäne identifiziert wurde, ermöglicht sie das Entwerten spezifischer Peptide, Antikörper oder kleiner Moleküle, welche die Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten inhibieren können.

[0110] Die Erfindung umfasst eine menschliche PI3-Kinase-p110-Untereinheit-Sequenz, umfassend die Aminosäuren 19 bis 110 des menschlichen p110, oder ein aminoterminal trunkiertes oder carboxyterminal trunkier-

tes Derivat davon mit weniger als 20 Aminosäuren, die aus dem aminoterminalen bzw. dem carboxyterminalen Ende deletiert wurden, das jedoch in der Lage ist, an eine PI3-Kinase-p85-Untereinheit zu binden; es ist weiters ein Verfahren zur Inhibierung der p85- und p110-Säugetier-PI3-Kinase-Untereinheit-Wechselwirkung umfasst, das die Verwendung eines Moleküls umfasst, das die Bindungsdomäne blockiert, die sich zwischen den Aminosäuren 19 und 110 des menschlichen p110 befindet.

[0111] Die Erfindung stellt weiters die Verwendung einer/eines wie oben stehend definierten Sequenz oder eines Derivats zum Screening auf ein therapeutisches oder prophylaktisches Mittel bereit, das durch Inhibieren der Wechselwirkung zwischen p85- und p110-Säugetier-PI3-Kinase-Untereinheiten wirkt.

Literaturverweise

Anderson, D et al., (1990), Science 250, 979–982.
Ashmum, R A et al., (1989), Blood 73, 827–837.
Auger, K R et al., (1989), J. Biol. Chem. 264, 20181–20184.
Auger, K R et al., (1991), Cancer Cells 3, 263–270.
Berridge, M J et al., (1989), Nature 341, 197–205.
Bjorge, J D et al., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87,, 3816–3820.
Cantley, L C et al., (1991), Cell 64, 281–302.
Carpenter, C L et al., (1990), Biochemistry 29, 11147–11156.
Carpenter, C L et al., (1990), J. Biol. Chem. 265, 19704–19711.
Chan, T O et al., (1990), Mol. Cell. Biol. 10, 3280–3283.
Chirgwin, J M et al., (1979), Biochemistry 18, 294–299.
Cohen, B et al., (1990), Mol. Cell. Biol. 10, 2909–2915.
Cooper, J A et al., (1983), Methods Enzymol. 99, 387–402.
Coughlin, S R et al., (1989), Science 243, 1191–1194.
Courtneidge, S A et al., (1987), Cell 50, 1031–1037.
Devereux, J et al., (1984), Nucleic Acids Res. 12, 387–395.
Downes, C P et al., (1990), Eur. J. Biochem. 193, 1–18.
Downes, C P et al., (1991), Cellular Signalling 3, 501–513.
Enderman, G et al., (1987), Biochemistry 26, 6845–6852.
Escobedo, J A et al., (1988), Nature 335, 85–87.
Escobedo, J A et al., (1991a), Mol. Cell. Biol. 11, 1125–1132.
Escobedo, J A et al., (1991b), Cell 65, 75–82.
Frohman, M A et al., (1988), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85, 8998–9002.
Fukui, Y et al., (1989), Mol. Cell. Biol. 9, 1651–1658.
Graziani, A et al., (1991), J. Biol. Chem. 266, 22087–22090.
Hanks, S K et al., (1988), Science 241, 42–52.
Hanks, S K (1991), Current Opinion in structural Biology 1, 369–383.
Harvey, R J et al., (1991), Nuc. Acids. Res. 19, 4002.
Henikoff, S (1984), Gene 28, 351–359.
Herman, P K et al., (1990), Mol. Cell. Biol. 10, 6742–6754.
Hu, P et al., (1992), Mol. Cell. Biol. 12, 981–990.
Kaplan, D R et al., (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3624–3628.
Kaplan, D R et al., (1987), Cell 50, 1021–1029.
Kaplan, D R et al., (1990), Cell 61, 125–133.
Kaufman, R J et al., (1989), Mol. Cell. Biol. 9, 946–958.
Kawasaki, H et al., (1990), Anal. Biochem. 186, 264–268.
Kazlauskas, A et al., (1989), Cell 58, 1121–1133.
Kazlauskas, A et al., (1990), EMBO J. 9, 3279–3286.
Kazlauskas, A et al., (1990), Science 247, 1578–1581.
Kazlauskas, A et al., (1991), Cell Regulation 2, 413–425.
Kelly, K L et al., (1992), J. Biol. Chem. 267, 3423–3428.
Kemp, B E et al., (1990), TIBS 15, 342–346.
Knighton, D R et al., (1991a), Science 253, 407–414.
Knighton, D R et al., (1991b), Science 253, 414–420.
Koch, C A et al., (1991), Science 252, 668–674.
Kozak, M (1987), Nucl. Acids Res. 15, 8125–8148.
Kucera, G L et al., (1990), J. Biol. Chem. 265, 5345–5348.
Kypta, R M et al., (1988), EMBO J. 7, 3837–3844.

Kypta, R M et al., (1990), Cell 62, 481–492.
Lev, S et al., (1991), EMBO J. 10, 647–654.
Lips, D L (1989), J. Biol. Chem. 264, 8759–8763.
Majerus, P W et al., (1990), Cell 63, 459–465.
Maniatis, T et al., (1982) Molecular Cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory).
Margolis, B et al., (1990), EMBO J. 9, 4375–4380.
Matsuda, M et al., (1991), Mol. Cell. Biol. 11, 1607–1613.
Mayer, B J et al., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2638–2642.
Mayer, H J et al., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 627–631.
Meisenhelder, J et al., (1989), Cell 57, 1109–1122.
McGlade, C J et al., (1992), Mol. Cell. Biol. 12, 991–997.
Moran, M F et al., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8622–8626.
Morgan, S J et al., (1990), Eur. J. Biochem. 191, 761–767.
Morrison, D K et al., (1989), Cell 59, 649–657.
OtSU, M et al., (1991), Cell 65, 91–104.
Page, M J (1989), Nucl. Acids Res. 17, 454.
Pendergast, A M et al., (1991), Cell 66, 161–171.
Rhee, S G (1991), Trends Biochem. Sci. 16, 297–301.
Rigby, P W J et al., (1977), I. J. Mol. Biol. 113, 237–251.
Robinson, J S et al., (1988), Mol. Cell. Biol. 8, 4936–4948.
Ruderman, N B et al., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1411–1415.
Saraste, M et al., (1990), Trends Biochem. Sci. 15, 430–434.
Serunian, L A et al., (1989), J. Biol. Chem. 264, 17809–17815.
Shurtleff, S A et al., (1990), EMBO J. 9, 2415–2421.
Shibasaki, F et al., (1991), J. Biol. Chem. 266, 8108–8114.
Skolnik, E Y et al., (1991), Cell 65, 83–90.
Shurtleff, S A et al., (1990), EMBO J. 9, 2415–2421.
Stephens, L R et al., (1991), Nature 351, 33–39.
Summers, M D et al., (1987), A Manual of Methods for Baculovirus Insect Vectors and Insect Cell Culture Procedures; Texas Agri. Exp. Station Bull. No 1555.
Talmage, D A et al., (1989), Cell 59, 55–65.
Thom D, et al.; (1977), Biochem. J. 168, 187–194.
Traynor-Kaplan, A E et al., (1988), Nature 334, 353–356
Ullrich, A et al., (1990), Cell 61, 203–212.
Ulug, E T et al., (1990), J. Virol. 64, 3895–3904.
Varticovski, L et al., (1989), Nature 342, 699–702.
Varticovski, L et al., (1991), Mol. Cell. Biol. 11, 1107–1113.
Whitley, G S J et al., (1987), Mol. Cell. Endocrinol. 52, 279–284.
Whitman, M et al., (1985), Nature 315, 239–242.
Whitman, M et al., (1987), Biochem. J. 247, 165–174.
Whitman, M et al., (1988), Biochem. Biophys. Acta. 948, 327–344.
Whitman, M et al., (1988), Nature 332, 644–646.
Woodgett, J R (1989), Anal. Biochem. 180, 237–241.
Yanisch-Perron, C et al., (1985), Gene 33, 103–119.
Yu, J C et al., (1991), Mol. Cell. Biol. 11, 3780–3785.

Patentansprüche

1. Isolierte DNA-Sequenz, umfassend die in **Fig. 16** dargestellte Sequenz oder einen Teil davon, wobei deren Expressionsprodukt durch Expression in Insektenzellen erhältlich ist und PI3-Kinaseaktivität aufweist, wenn es so exprimiert wird.

2. Teil von isolierter DNA nach Anspruch 1, wobei der Teil eine Sequenz umfasst, die für die Aminosäurereste 272 bis 1068 aus **Fig. 16** kodiert.

3. Isolierte DNA-Sequenz, die an die DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 unter Bedingungen hybridisierbar ist, die 1 M NaCL/10 × Denhardt-Lösung/50 mM Tris-HCL (pH 7,4)/10 mM EDTA/0,1 % SDS/100 µg/ml denaturierte Heringsperma-DNA bei 65 °C 16 Stunden lang, gefolgt von Waschen bei 2 × SSC/0,1 % SDS bei 42 °C; dann 0,5 × SSC/0,1 % SDS bei 50 °C; dann 0,1 × SSC/0,1 % SDS bei 65 °C; dann 0,1 × SSC/0,1 % SDS bei 68 °C; umfassen, wobei deren Expressionsprodukt durch Expression in Insektenzellen er-

hältlich ist und PI3-Kinaseaktivität aufweist.

4. DNA-Konstrukt, umfassend eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 unter der Kontrolle einer Kontrollsequenz und in einem geeigneten Leseraster in einem Expressionsvektor, wobei die Kontrollsequenz gegebenenfalls einen regulierbaren Promotor einbindet.

5. Wirtszellen, die durch Einbindung eines Konstrukts nach Anspruch 4 so genetisch verändert worden sind, dass die Expression des kodierten Polypeptids ermöglicht wird.

6. Wirtszellen nach Anspruch 5, die Insektenzellen sind.

7. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, das PI3-Kinaseaktivität aufweist, wenn es in Insektenzellen exprimiert wird, oder in der Lage ist, mit einer p85-Säugetier-PI3-Kinaseuntereinheit einen Komplex zu bilden, um solche Aktivität zu erzeugen, wobei dieses Verfahren das Kultivieren von Wirtszellen nach Anspruch 5 oder 6 umfasst.

8. Isoliertes Polypeptid, umfassend die Sequenz nach **Fig. 16** oder einen Teil davon, der bei Expression in Insektenzellen PI3-Kinaseaktivität aufweist.

9. Teil eines isolierten Polypeptids nach Anspruch 8, der die Aminosäurereste 272 bis 1068 umfasst.

10. Isoliertes Polypeptid, das durch Expression einer DNA-Sequenz nach Anspruch 3 erhältlich ist.

11. Enzymatisch aktive Kinase, bestehend aus dem Polypeptid nach einem der Ansprüche 8, 9 und 10 entweder alleine oder nach Komplexierung mit einer Säugetier-p85-Untereinheit.

12. Verfahren zur Identifikation eines Agonisten oder Antagonisten für die PI3-Kinaseaktivität eines in Anspruch 8, 9 oder 10 definierten Polypeptids oder eines aktiven Komplexes, der selbiges enthält, umfassend das Screenen von Kandidatenmolekülen auf solche Aktivität unter Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 8, 9 oder 10.

13. Verfahren zur Identifikation von Molekülen, die sich spezifisch an ein Polypeptid nach Anspruch 8, 9 oder 10 binden, wobei das Verfahren die Verwendung eines solchen Polypeptids in einem Screening-Verfahren auf solche Bindung umfasst.

14. Polypeptid nach Anspruch 8, 9 oder 10 oder aktiver Komplex, der dieses Polypeptid enthält, zur Verwendung als Medikament.

15. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 8, 9 oder 10 oder eines aktiven Komplexes, der dieses Polypeptid enthält, bei der enzymatischen In-vitro-Produktion von 3-phosphorylierten Phosphoinositiden.

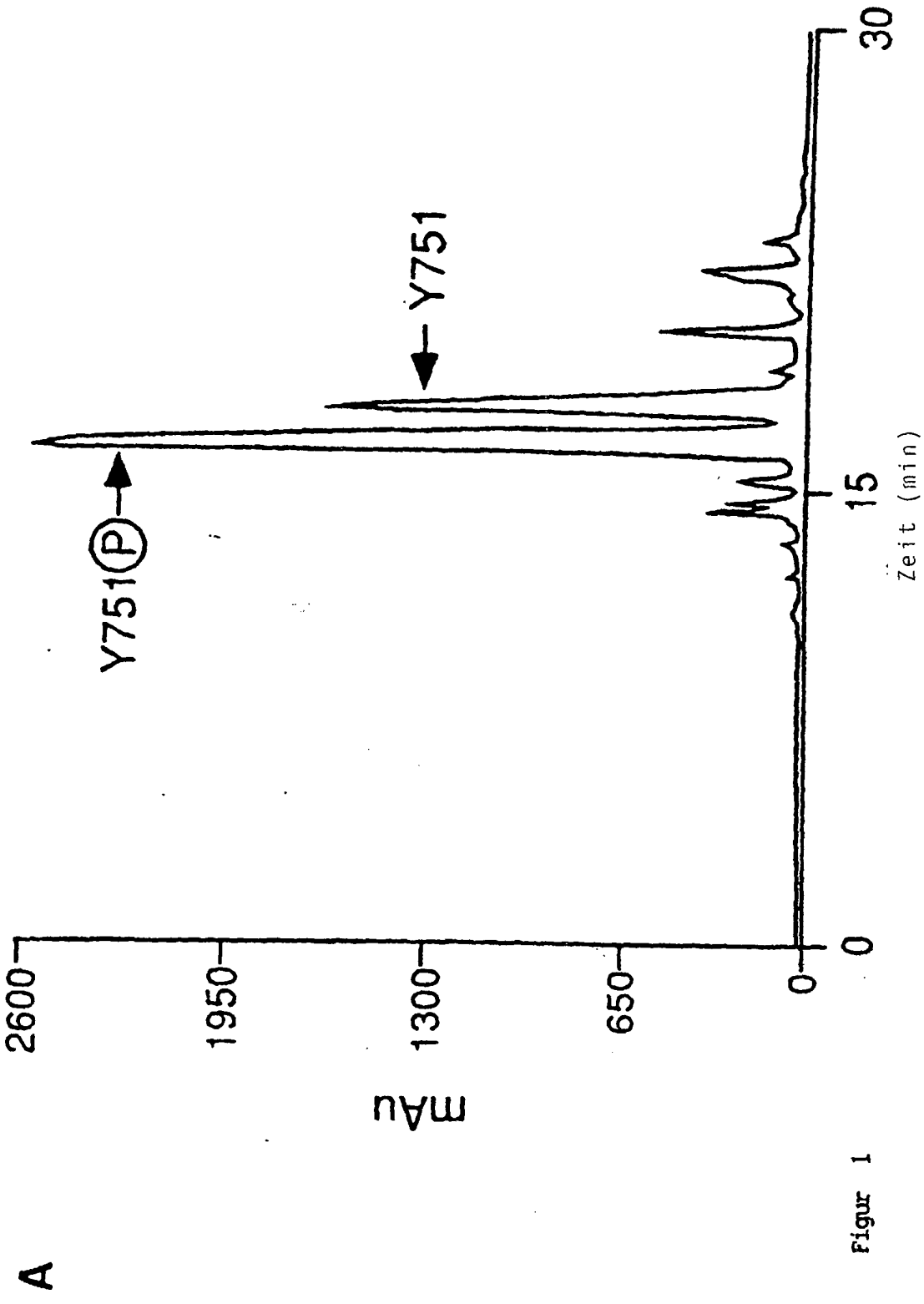
16. Sequenz der menschlichen Pi3-Kinase-p110-Untereinheit, umfassend die Aminosäuren 19–110 von menschlichem p110 aus Anspruch 8, oder am Aminoterminus oder am Carboxylterminus trunkiertes Derivat davon, in dem vom aminoterminalen bzw. carboxylterminalen Ende weg weniger als 20 Aminosäuren deletiert sind, das jedoch in der Lage ist, eine PI3-Kinase-p85-Untereinheit zu binden.

17. Verwendung einer Sequenz oder eines Derivats, wie in Anspruch 16 definiert, zum Screenen auf einen therapeutischen oder prophylaktischen Wirkstoff, der durch Hemmungswechselwirkung zwischen p85- und p110-Säugetier-PI3-Kinase-Untereinheiten wirkt.

18. Verwendung eines in Anspruch 8, 9 oder 10 definierten Polypeptids oder eines aktiven Komplexes, der das Polypeptid enthält, zur Herstellung eines Medikaments, worin dieses Medikament gegebenenfalls:
(a) ZelLvermehrung fördert oder schwächt, die durch einen Zelloberflächenrezeptor vermittelt wird, der mit der PI3-Kinaseaktivität wechselwirkt; oder
(b) das Stimulationsniveau von Blutplättchen oder Neutrophilen beeinflusst; oder
(c) Blutglucosewerte reguliert; oder
(c) die zwischen den Aminosäuren 19 und 110 von menschlichem p110 liegende Bindungsdomäne blockiert.

Es folgen 80 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1

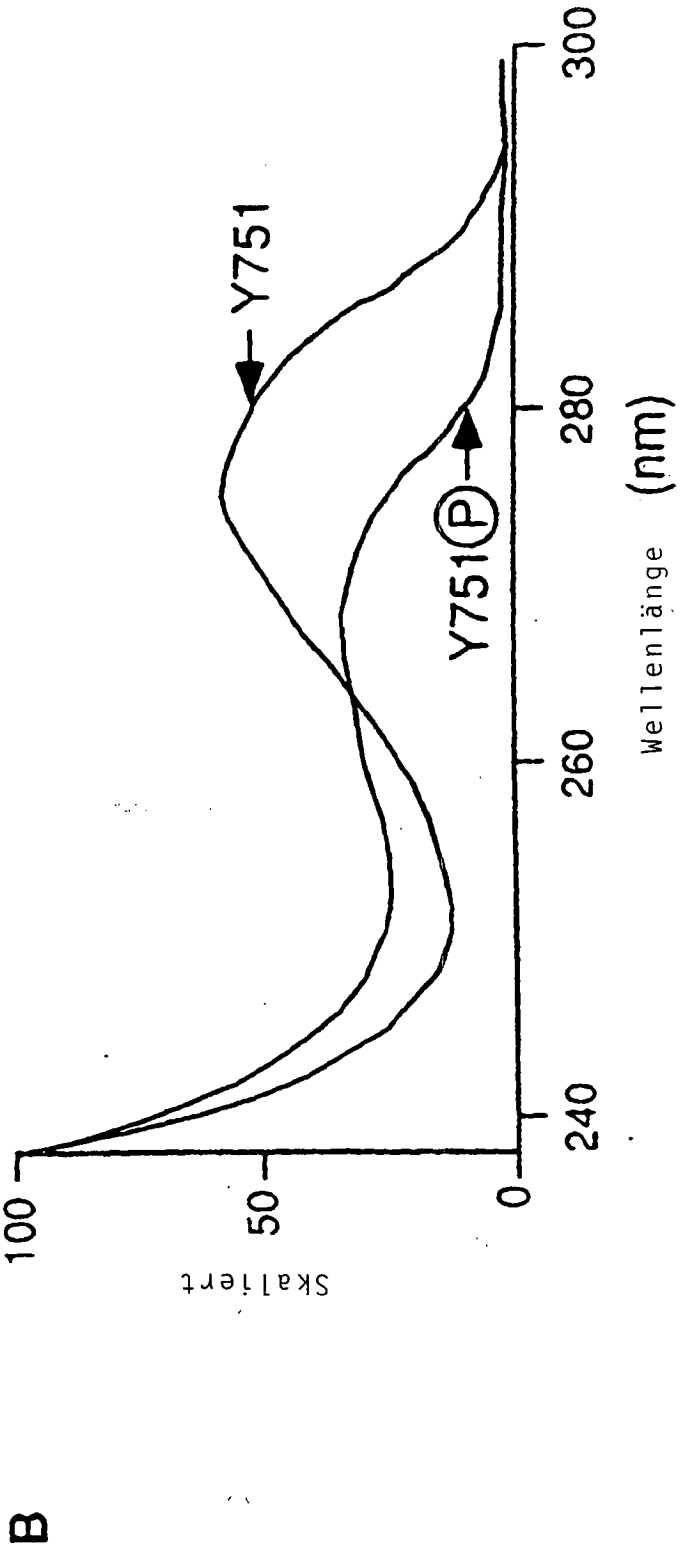
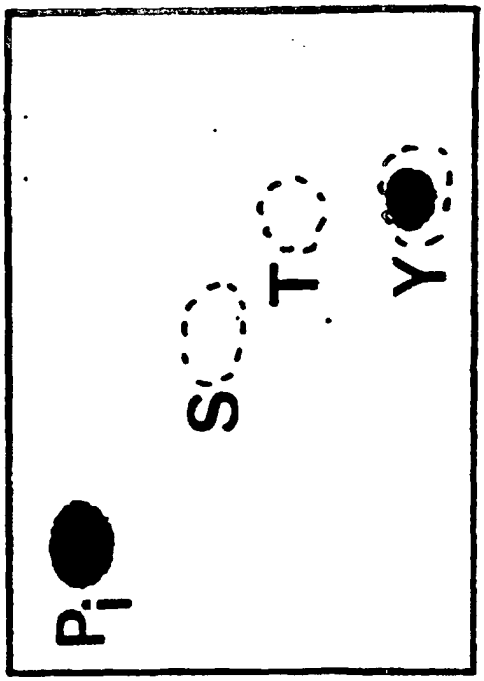
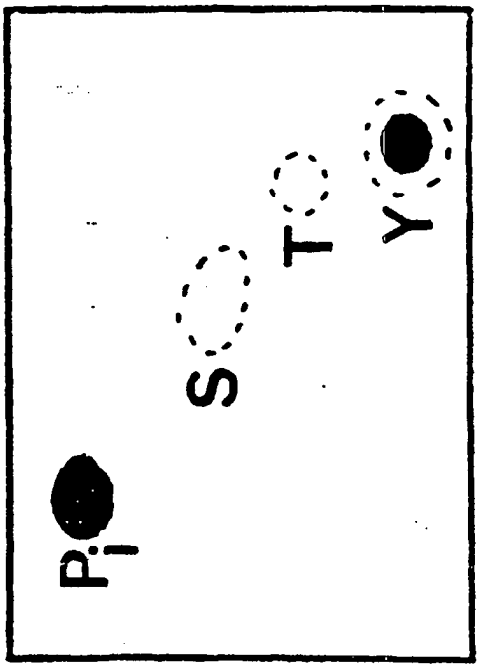


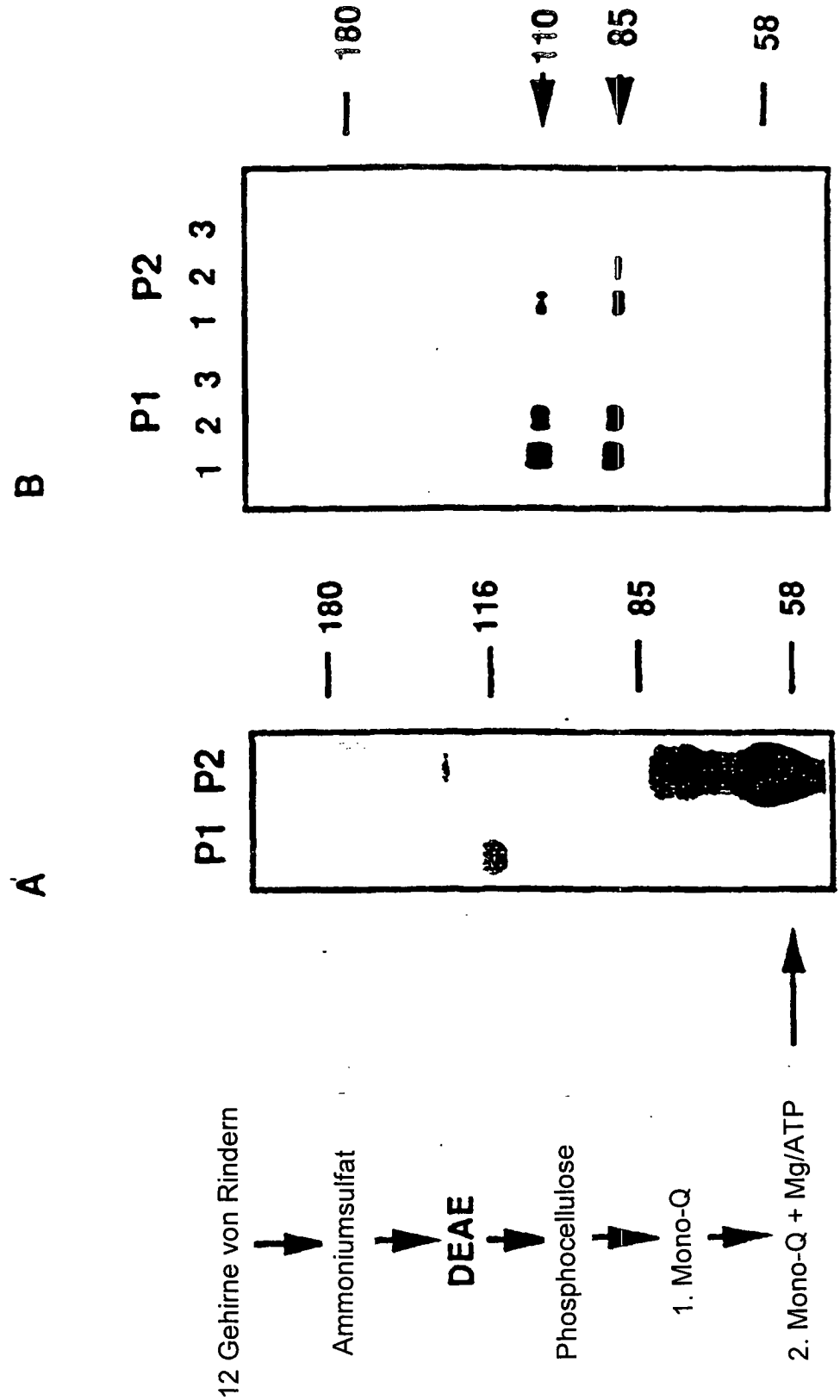
FIG.1 (Fortsetzung)



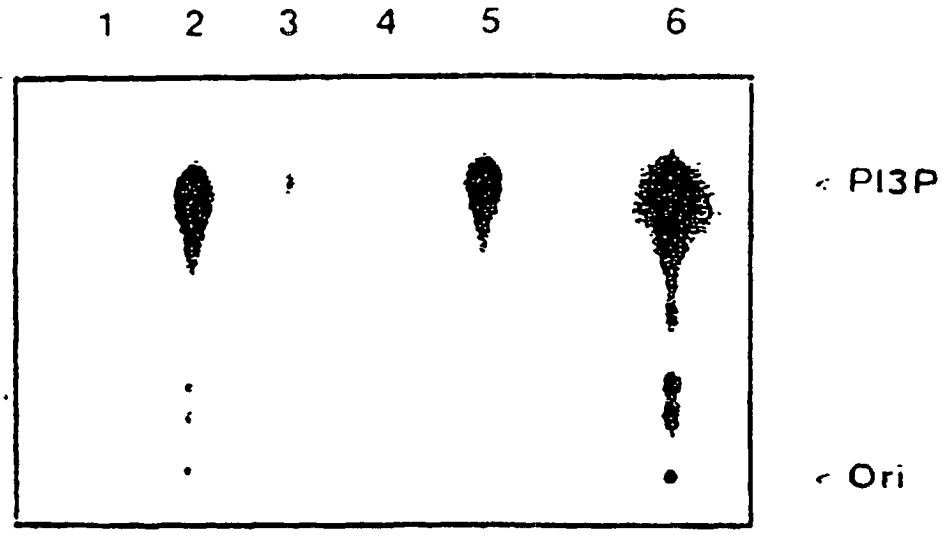


C

FIG. 1 (Fortsetzung)

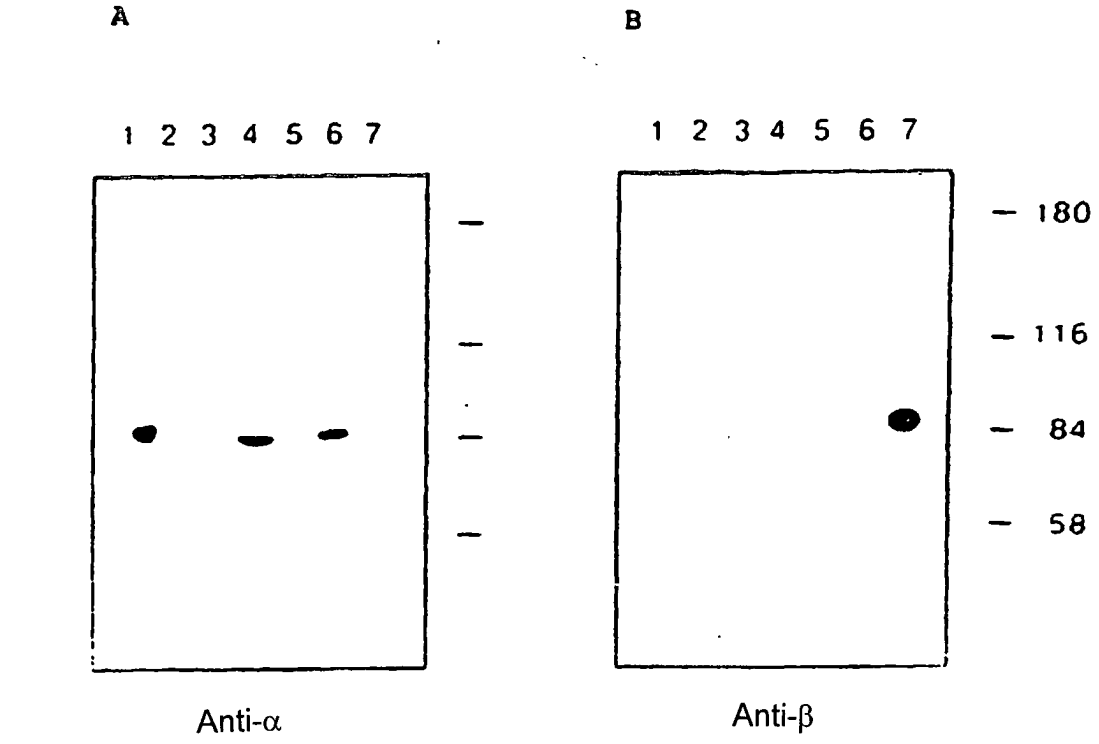

A
12 Gehirne von Rindern
Ammoniumsulfat
DEAE
Phosphocellulose
1. Mono-Q
2. Mono-Q + Mg/ATP
P1 P2
180
116
85
58
B
P1 P2
1 2 3 1 2 3
180
110
85
58

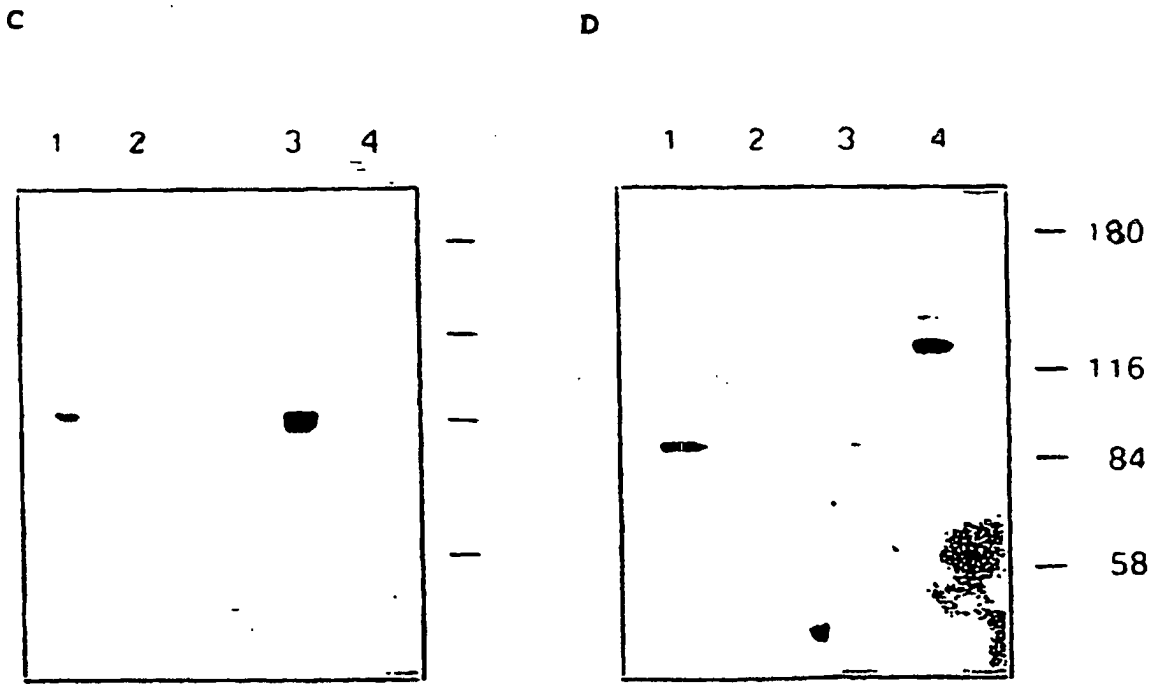
Figur 2

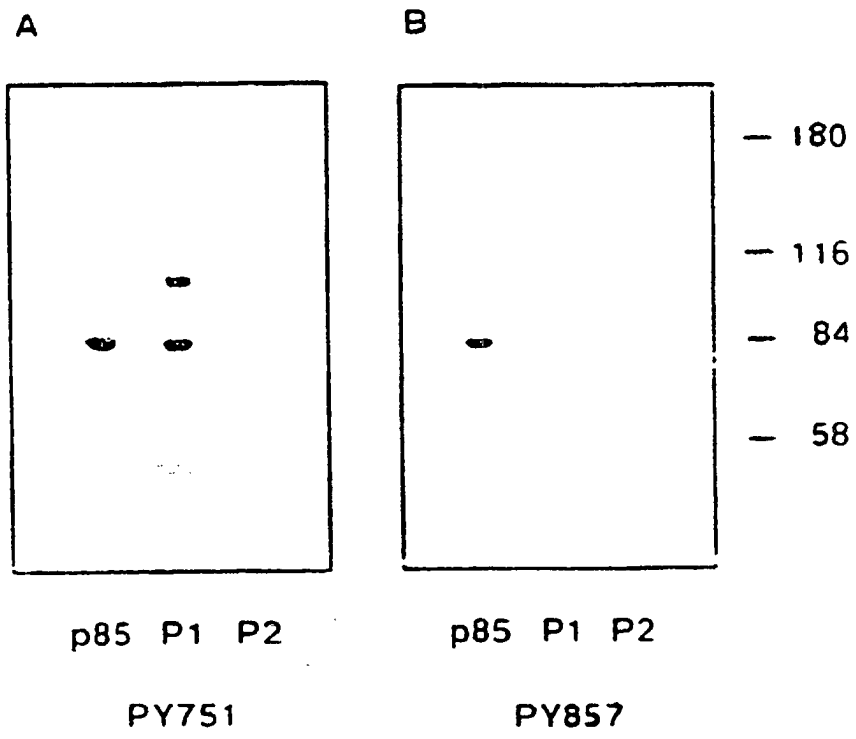


Figur 3

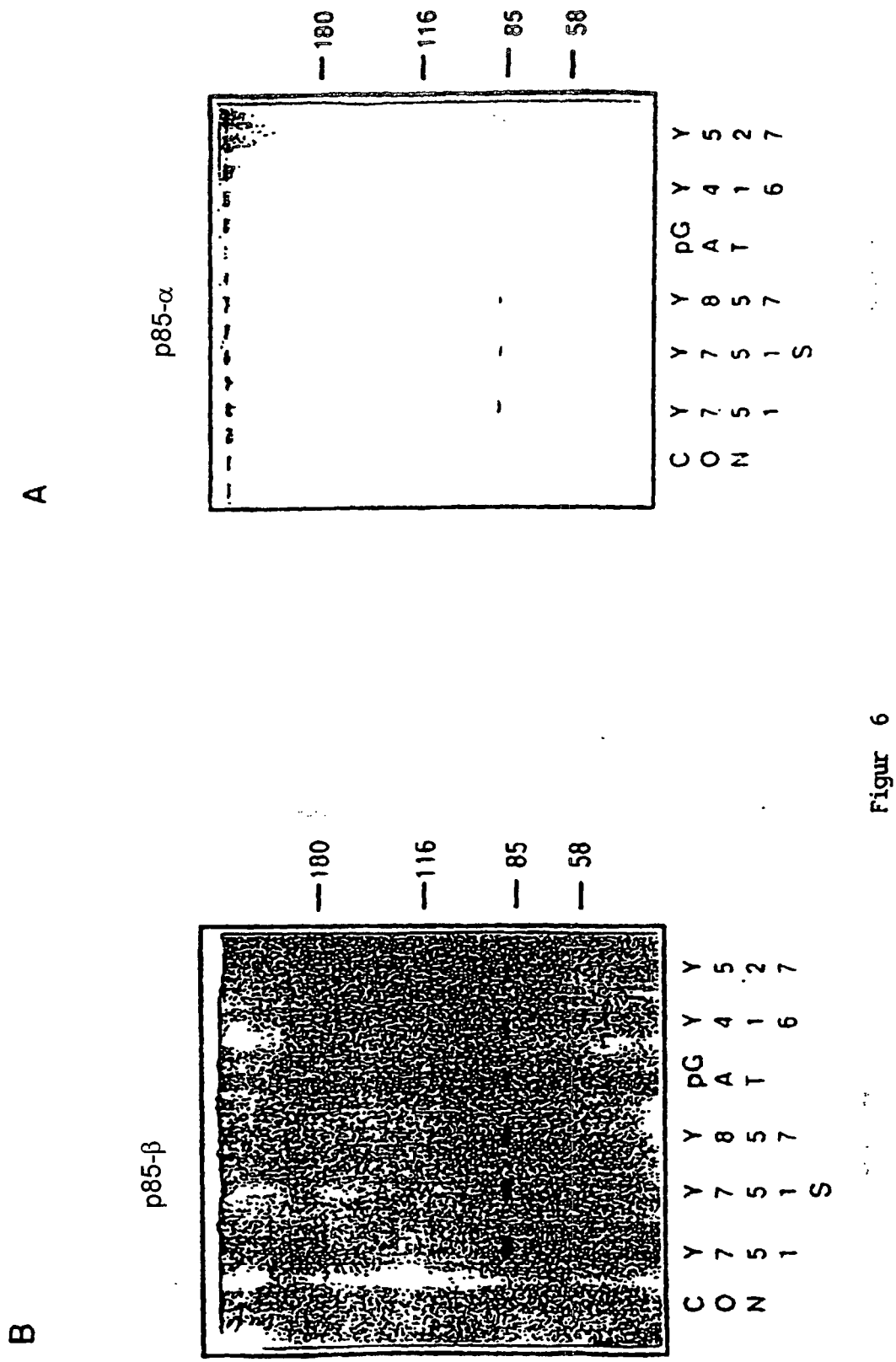
Figur 4


A
B
1 2 3 4 5 6 7
1 2 3 4 5 6 7
180
116
84
58
Anti-α
Anti-β


C
D
1 2 3 4
1 2 3 4
180
116
84
58



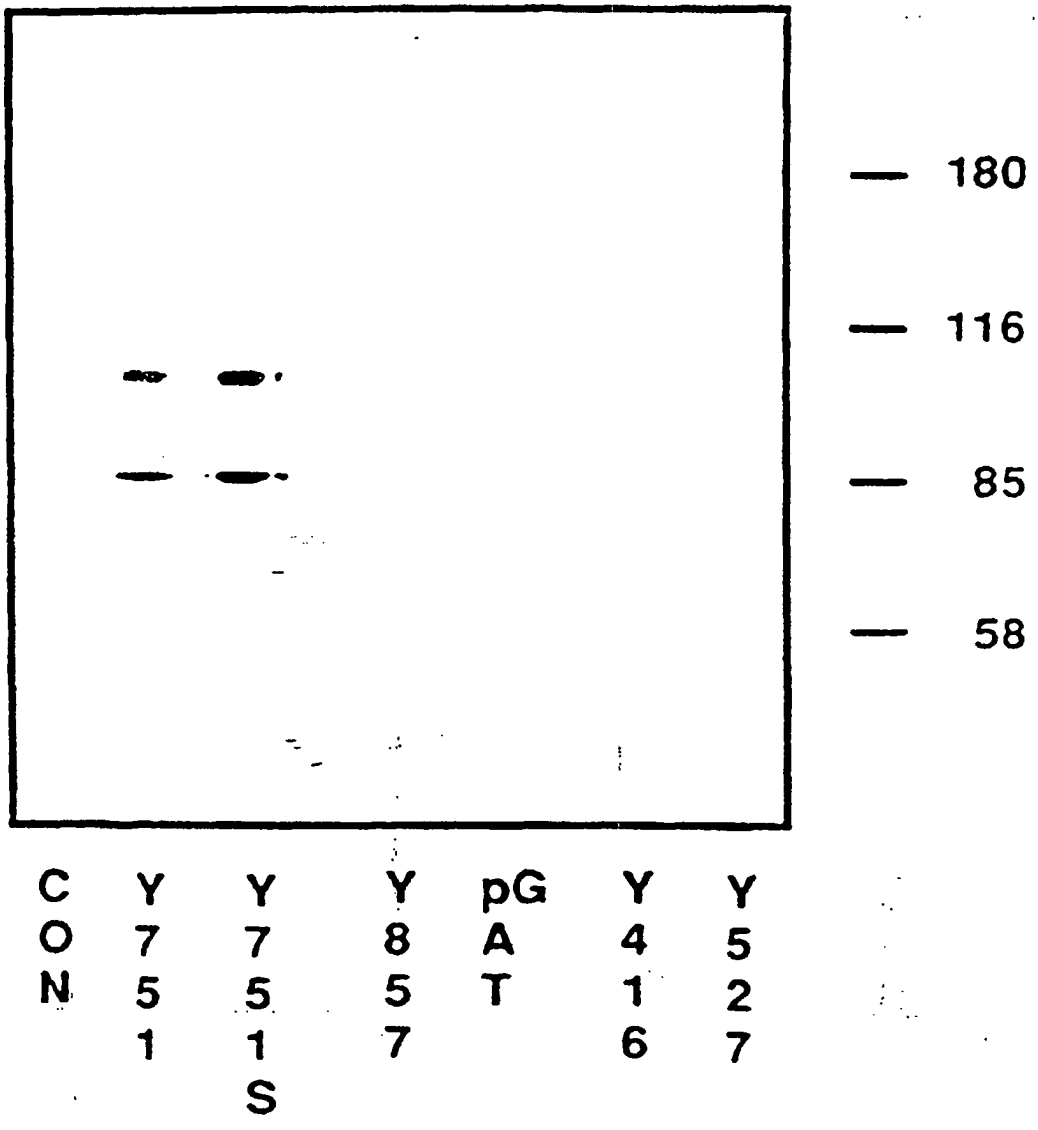
Figur 5


A
p85-α
180
116
85
58
CON
Y 7 5 1
Y 7 5 1
Y 8 5 7
pGAT
Y 4 1 6
Y 5 2 7
B
p85-β
180
116
85
58
CON
Y 7 5 1
Y 7 5 1
Y 8 5 7
pGAT
Y 4 1 6
Y 5 2 7

Figur 6

Figur 7

A



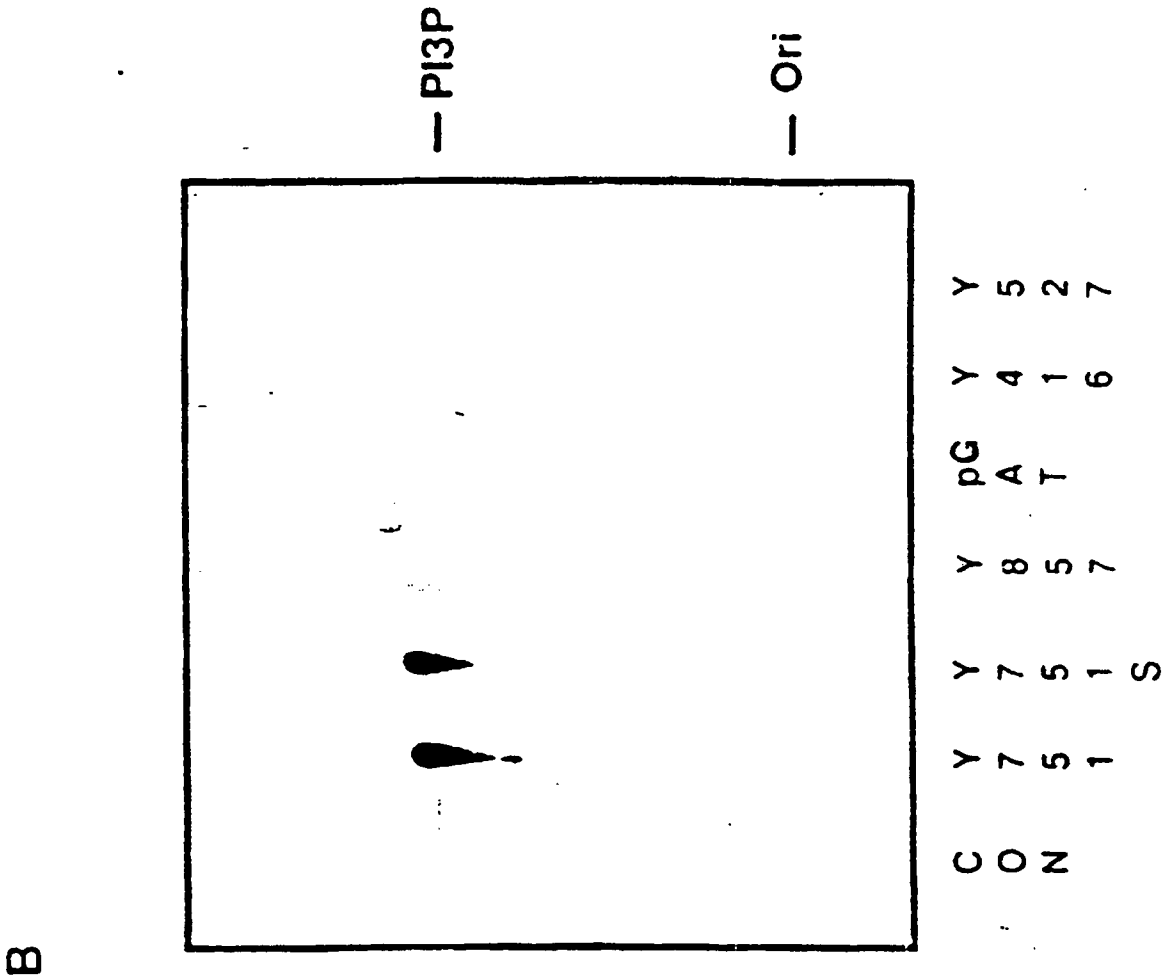
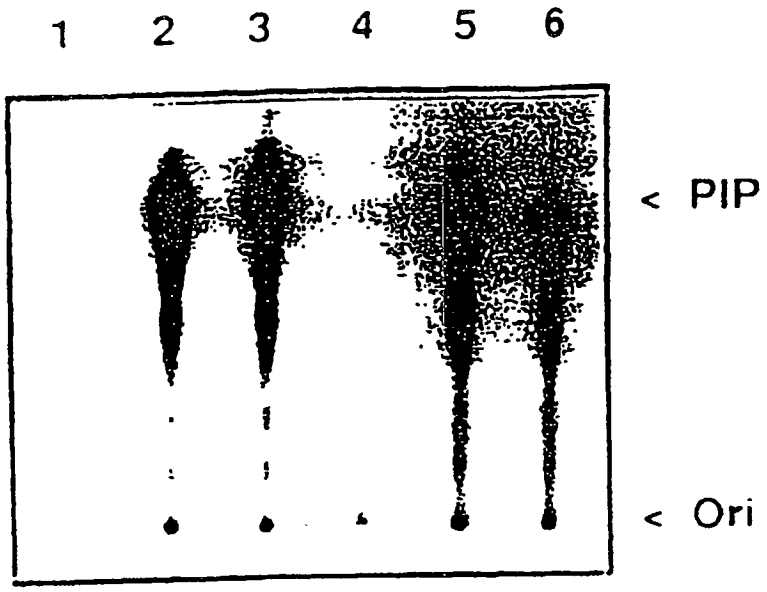


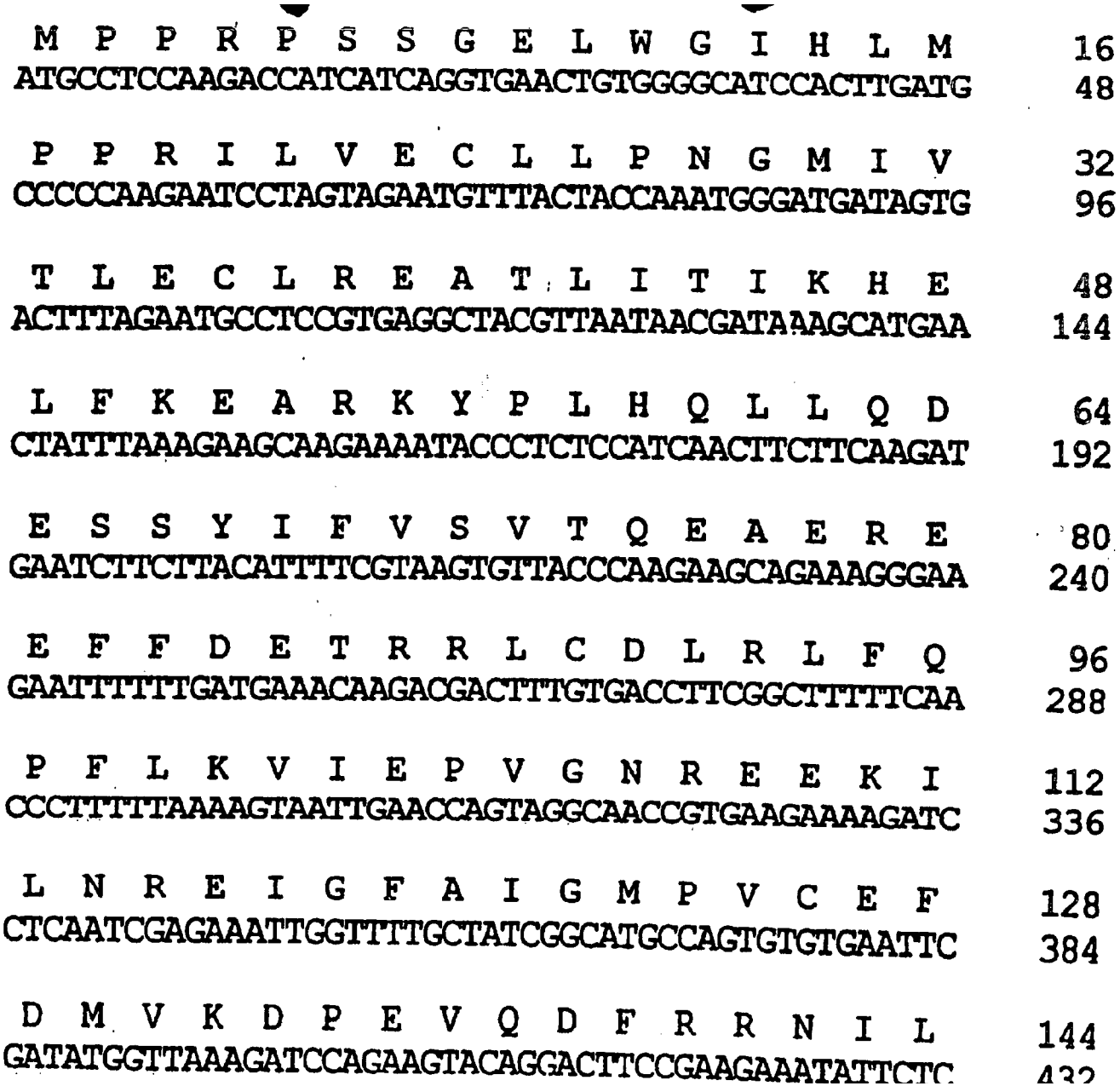
FIG. 7
(Fortsetzung)

Figur 8



751	D	M	S	K	D	E	S	V	D	Y	V	P	M	L	D	M	K
751 S				C	D	E	S	V	D	Y	V	P	M	L			
740				G	E	S	D	G	G	Y	M	D	M	S	K		
1313			E	F	C	P	D	P	L	Y	E	V	M	L	K		
Consensus					E	E	E	E	E	Y	M	P	M	X	X		
					D	D	D	D	D		V						

Figur 9



DE 693 34 113 T2 2007.10.31

FIG. 9
(Fortsetzung)

```
 N  V  C  K  E  A  V  D  L  R  D  L  N  S  P  H      160
AATGTTTGTAAAGAAGCTGTGGATCTTAGGGATCTTAATTCACCTCAT    480
                     A
 S  R  A  M  Y  V  Y  P  P  N  V  E  S  S  P  E      176
AGTAGAGCAATGTATGTTTATCCTCCAAATGTAGAATCTTCACCAGAA    528

 L  P  K  H  I  Y  N  K  L  D  K  G  Q  I  I  V      192
CTGCCAAAGCACATATATAATAAATTGGATAAAGGGCAAATAATAGTG    576

 V  I  W  V  I  V  S  P  N  N  D  K  Q  K  Y  T      208
GTGATTTGGGTAATAGTTTCTCCAAATAATGACAAACAGAAGTATACT    624

 L  K  I  N  H  D  C  V  P  E  Q  V  I  A  E  A      224
CTGAAAATCAACCATGACTGTGTGCCAGAACAAGTAATTGCTGAAGCA    672

 I  R  K  K  T  R  S  M  L  L  S  S  E  Q  L  K      240
ATCAGGAAAAAAACTCGAAGTATGTTGCTATCATCTGAACAACTAAAA    720

 L  C  V  L  E  Y  Q  G  K  Y  I  L  K  V  C  G      256
CTCTGTGTTTTAGAATATCAGGGCAAGTATATTTTAAAAGTGTGTGGA    768

 C  D  E  Y  F  L  E  K  Y  P  L  S  Q  Y  K  Y      272
TGTGATGAATACTTCCTAGAAAAATATCCTCTGAGTCAGTATAAGTAT    816

 I  R  S  C  I  M  L  G  R  M  P  N  L  M  L  M      288
ATAAGAAGCTGTATAATGCTTGGGAGGATGCCCAATTTGATGCTGATG    864
```


DE 693 34 113 T2 2007.10.31

FIG. 9
(Fortsetzung)

```
A  K  E  S  L  Y  S  Q  L  P  M  D  C  F  T  M      304
GCTAAAGAAAGCCTCTATTCTCAACTGCCAATGGACTGTTTTACAATG    912

P  S  Y  S  R  R  I  S  T  A  T  P  Y  M  N  G      320
CCATCATATTCCAGACGCATCTCCACAGCTACGCCATATATGAATGGA    960
                        B
E  T  S  T  K  S  L  W  V  I  N  S  A  L  R  I      336
GAAACATCTACAAAATCCCTTTGGGTTATAAATAGTGCACTCAGAATA    1008

K  I  L  C  A  T  Y  V  N  V  N  I  R  D  I  D      352
AAAATTCTTTGTGCAACCTATGTGAATGTAAATATTCGAGACATTGAC    1056

K  I  Y  V  R  T  G  I  Y  H  G  G  E  P  L  C      368
AAGATTTATGTTCGAACAGGTATCTACCATGGAGGAGAACCCTTATGT    1104

D  N  V  N  T  Q  R  V  P  C  S  N  P  R  W  N      384
GATAATGTGAACACTCAAAGAGTACCTTGTTCCAATCCCAGGTGGAAT    1152

E  W  L  N  Y  D  I  Y  I  P  D  L  P  R  A  A      400
GAATGGCTGAATTACGATATATACATTCCTGATCTTCCTCGTGCTGCT    1200

R  L  C  L  S  I  C  S  V  K  G  R  K  G  A  K      416
CGACTTTGCCTTTCCATTTGTTCTGTTAAAGGCCGAAAGGGTGCTAAA    1248

E  E  H  C  P  L  A  W  G  N  I  N  L  F  D  Y      432
GAGGAACACTGTCCATTGGCCTGGGGAAATATAAACTTGTTTGATTAC    1296
```


DE 693 34 113 T2 2007.10.31

FIG. 9
(Fortsetzung)

```
T D T L V S G K M A L N L W P V   448
ACAGATACTCTAGTATCTGGAAAAATGGCTTTGAATCTTTGGCCAGTA   1344
                C
P H G L E D L L N P I G V T G S   464
CCTCATGGACTAGAAGATTTGCTGAACCCTATTGGTGTTACTGGATCA   1392

N P N K E T P C L E L E F D W F   480
AATCCAAATAAAGAAACTCCATGTTTAGAGTTGGAGTTTGACTGGTTC   1440

S S V V K F P D M S V I E E H A   496
AGCAGTGTGGTAAAGTTTCCAGATATGTCAGTGATTGAAGAGCATGCC   1488

N W S V S R E A G F S Y S H A G   512
AATTGGTCTGTATCCCGTGAAGCAGGATTTAGTTATTCCCATGCAGGA   1536

L S N R L A R D N E L R E N D K   528
CTGAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTAAGAGAAAATGATAAA   1584

E Q L R A I C T R D P L S E I T   544
GAACAGCTCCGAGCAATTTGTACACGAGATCCTCTATCTGAAATCACT   1632

E Q E K D F L W S H R H Y C V T   560
GAGCAAGAGAAAGATTTTCTGTGGAGCCACAGACACTATTGTGTAACT   1680

I P E I L P K L L L S V K W N S   576
ATCCCCGAAATTCTACCCAAATTGCTTCTGTCTGTTAAATGGAACTCT   1728
```


DE 693 34 113 T2 2007.10.31

FIG.9
(Fortsetzung)

```
R  D  E  V  A  Q  M  Y  C  L  V  K  D  W  P  P      592
AGAGATGAAGTAGCTCAGATGTACTGCTTGGTAAAAGATTGGCCTCCA   1776

I  K  P  E  Q  A  M  E  L  L  D  C  N  Y  P  D      608
ATCAAGCCTGAACAGGCTATGGAGCTTCTGGACTGCAATTACCCAGAT   1824

P  M  V  R  G  F  A  V  R  C  L  E  K  Y  L  T      624
CCTATGGTTCGAGGTTTTGCTGTTCGGTGCTTAGAAAAATATTTAACA   1872
                                 D
D  D  K  L  S  Q  Y  L  I  Q  L  V  Q  V  L  K      640
GATGACAAACTTTCTCAGTACCTAATTCAGCTAGTACAGGTACTAAAA   1920

Y  E  Q  Y  L  D  N  L  L  V  R  F  L  L  K  K      656
TATGAACAGTATTTGGATAACCTGCTTGTGAGATTTTTACTCAAAAAA   1968
                              E
A  L  T  N  Q  R  I  G  H  F  F  F  W  H  L  K      672
GCGTTAACTAATCAAAGGATCGGTCACTTTTTCTTTTGGCATTTAAAA   2016
                                          F
S  E  M  H  N  K  T  V  S  Q  R  F  G  L  L  L      688
TCTGAGATGCACAATAAAACAGTTAGTCAGAGGTTTGGCCTGCTTTTG   2064

E  S  Y  C  R  A  C  G  M  Y  L  K  H  L  N  R      704
GAGTCCTATTGCCGTGCATGTGGGATGTATCTGAAGCACCTTAATAGG   2112
                                    G
Q  V  E  A  M  E  K  L  I  N  L  T  D  I  L  K      720
CAAGTTGAGGCTATGGAAAAGCTCATTAACTTGACTGACATTCTCAAA   2160
```


DE 693 34 113 T2 2007.10.31

Fig. 9
(Fortsetzung)

```
 Q  E  K  K  D  E  T  Q  K  V  Q  M  K  F  L  V    736
CAAGAGAAGAAGGATGAAACACAAAAGGTACAGATGAAGTTTTTAGTT  2208

 E  Q  M  R  R  P  D  F  M  D  A  L  Q  G  F  L    752
GAGCAAATGCGGCGACCAGATTTCATGGATGCTCTCCAGGGCTTTCTG  2256

 S  P  L  N  P  A  H  Q  L  G  N  L  R  L  E  E    768
TCTCCTCTAAACCCTGCTCATCAGCTGGGAAATCTCAGGCTTGAAGAG  2304

 C  R  I  M  S  S  A  K  R  P  L  W  L  N  W  E    784
TGTCGAATTATGTCTTCTGCAAAAAGGCCACTGTGGTTGAATTGGGAG  2352

 N  P  D  I  M  S  E  L  L  F  Q  N  N  E  I  I    800
AACCCAGACATCATGTCAGAATTACTCTTTCAGAACAATGAGATCATC  2400

 F  K  N  G  D  D  L  R  Q  D  M  L  T  L  Q  I    816
TTTAAAAATGGGGATGATTTACGGCAAGATATGCTAACCCTTCAGATT  2448

 I  R  I  M  E  N  I  W  Q  N  Q  G  L  D  L  R    832
ATTCGCATTATGGAAAATATCTGGCAAAATCAAGGTCTTGATCTTCGA  2496

 M  L  P  Y  G  C  L  S  I  G  D  C  V  G  L  I    848
ATGTTACCTTATGGATGTCTGTCAATCGGTGACTGTGTGGGACTTATC  2544

 E  V  V  R  N  S  H  T  I  M  Q  I  Q  C  K  G    864
GAGGTGGTGAGAAATTCTCACACTATAATGCAGATTCAGTGTAAAGGA  2592
```

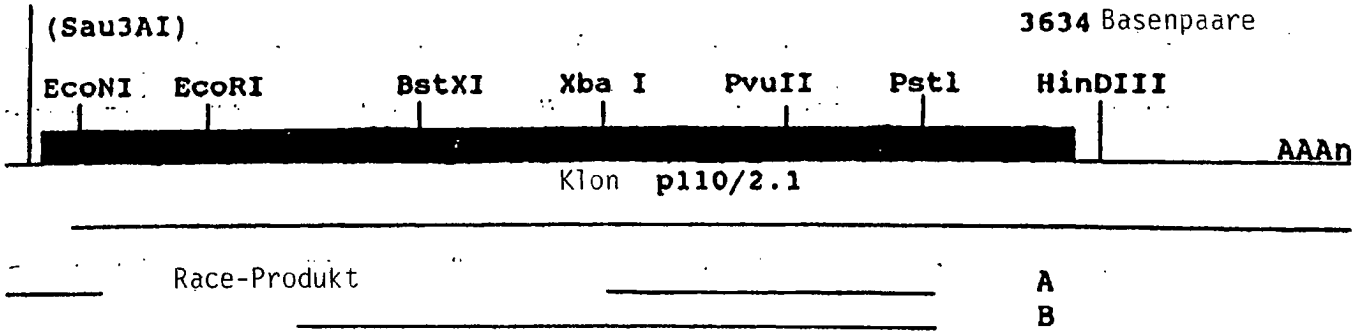

DE 693 34 113 T2 2007.10.31

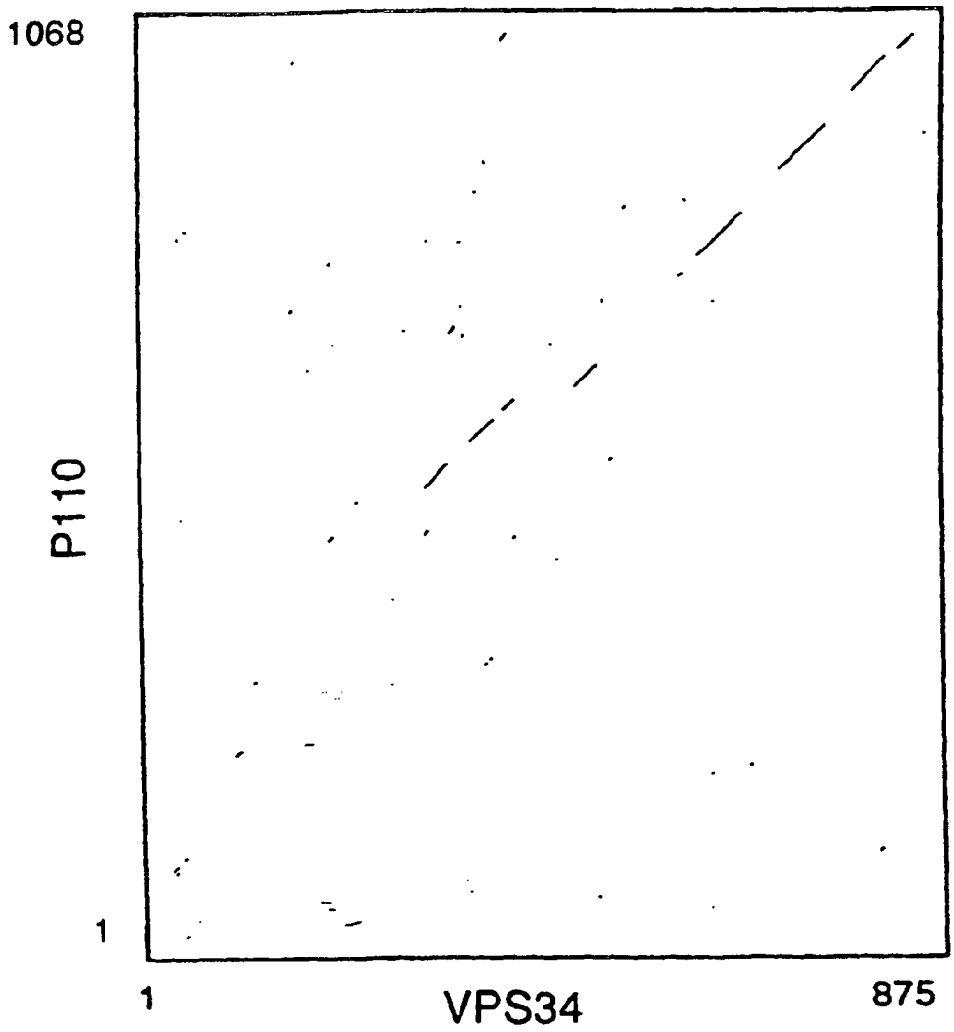
FIG. 9
(Fortsetzung)

```
                                                H
 G  L  K  G  A  L  Q  F  N  S  H  T  L  H  Q  W      880
GGCCTGAAAGGTGCACTGCAGTTTAACAGCCACACACTCCATCAGTGG     2640

 L  K  D  K  N  K  G  E  I  Y  D  A  A  I  D  L      896
CTCAAAGACAAGAACAAGGGGGAAATATATGATGCGGCCATCGATTTG     2688
                I
 F  T  R  S  C  A  G  Y  C  V  A  T  F  I  L  G      912
TTTACACGATCATGTGCTGGATATTGTGTTGCCACCTTCATTTTGGGA     2736

 I  G  D  R  H  N  S  N  I  M  V  K  D  D  G  Q      928
ATTGGAGATCGTCACAATAGTAATATCATGGTTAAAGATGATGGACAA     2784
                      J
 L  F  H  I  D  F  G  H  F  L  D  H  K  K  K  K      944
CTGTTTCATATAGATTTTGGACACTTTTTGGATCACAAGAAGAAAAAA     2832
                                   K
 F  G  Y  K  R  E  R  V  P  F  V  L  T  Q  D  F      960
TTTGGTTATAAACGAGAGCGCGTGCCGTTTGTTTTGACACAAGATTTC     2880

 L  I  V  I  S  K  G  A  Q  E  C  T  K  T  R  E      976
TTAATAGTGATTAGTAAAGGAGCCCAAGAATGCACAAAGACAAGAGAA     2928

 F  E  R  F  Q  E  M  C  Y  K  A  Y  L  A  I  R      992
TTTGAGAGGTTTCAGGAGATGTGTTACAAGGCTTATCTAGCTATTCGG     2976
```

FIG. 9
(Fortsetzung)

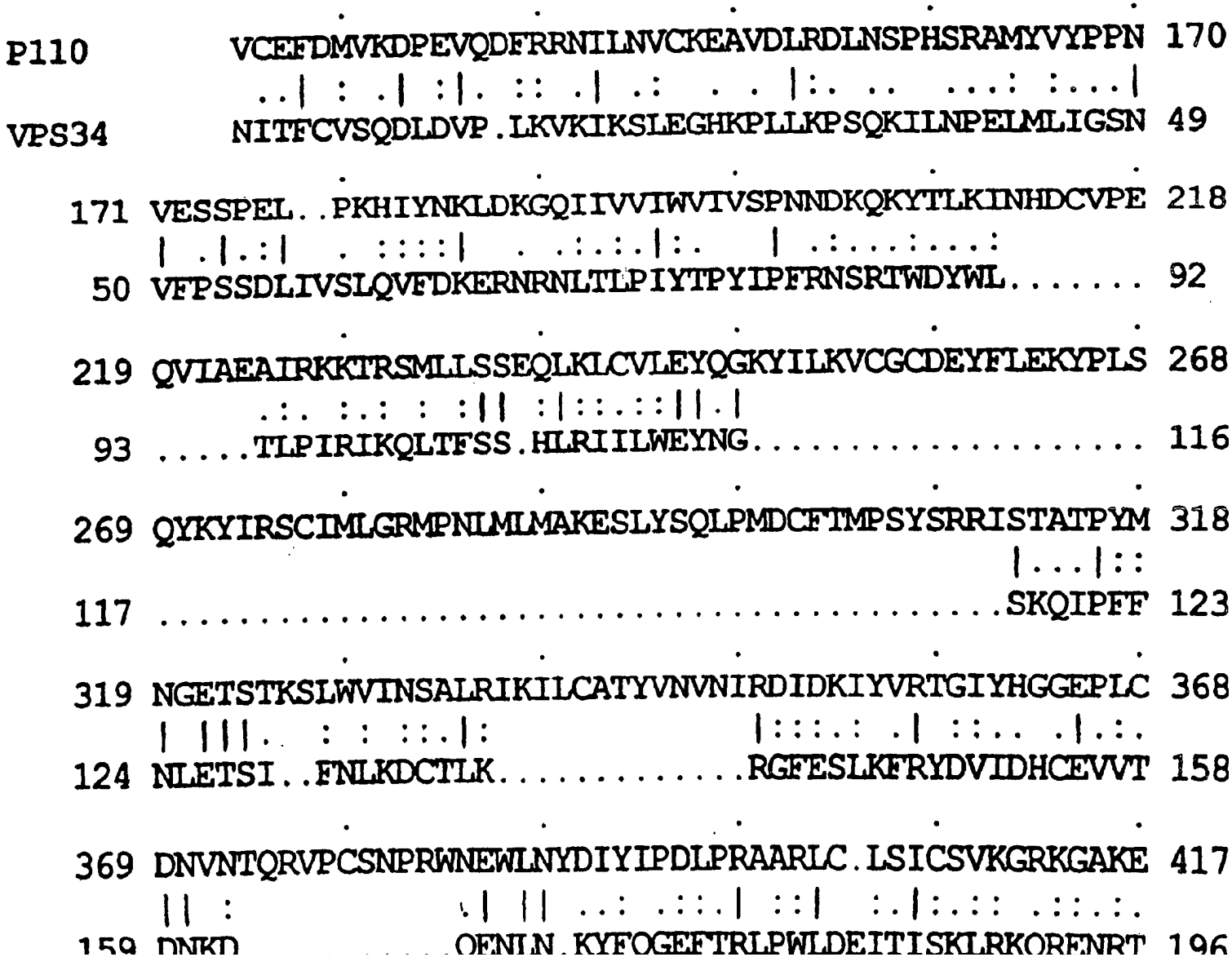
```
                                L
 Q  H  A  N  L  F  I  N  L  F  S  M  M  L  G  S     1008
CAGCATGCCAATCTCTTCATAAATCTTTTCTCAATGATGCTTGGCTCT    3024

 G  M  P  E  L  Q  S  F  D  D  I  A  Y  I  R  K     1024
GGAATGCCAGAACTGCAATCTTTTGATGATATTGCATACATTCGAAAG    3072
                                        M
 T  L  A  L  D  K  T  E  Q  E  A  L  E  Y  F  M     1040
ACCCTAGCTTTAGATAAAACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTTCATG    3120

 K  Q  M  N  D  A  H  H  G  G  W  T  T  K  M  D     1056
AAACAAATGAATGATGCACACCATGGTGGCTGGACAACAAAAATGGAT    3168
          N
 W  I  F  H  T  I  K  Q  H  A  L  N  *     1069
TGGATCTTCCACACAATTAAGCAGCATGCTTTGAACTGA    3207
```





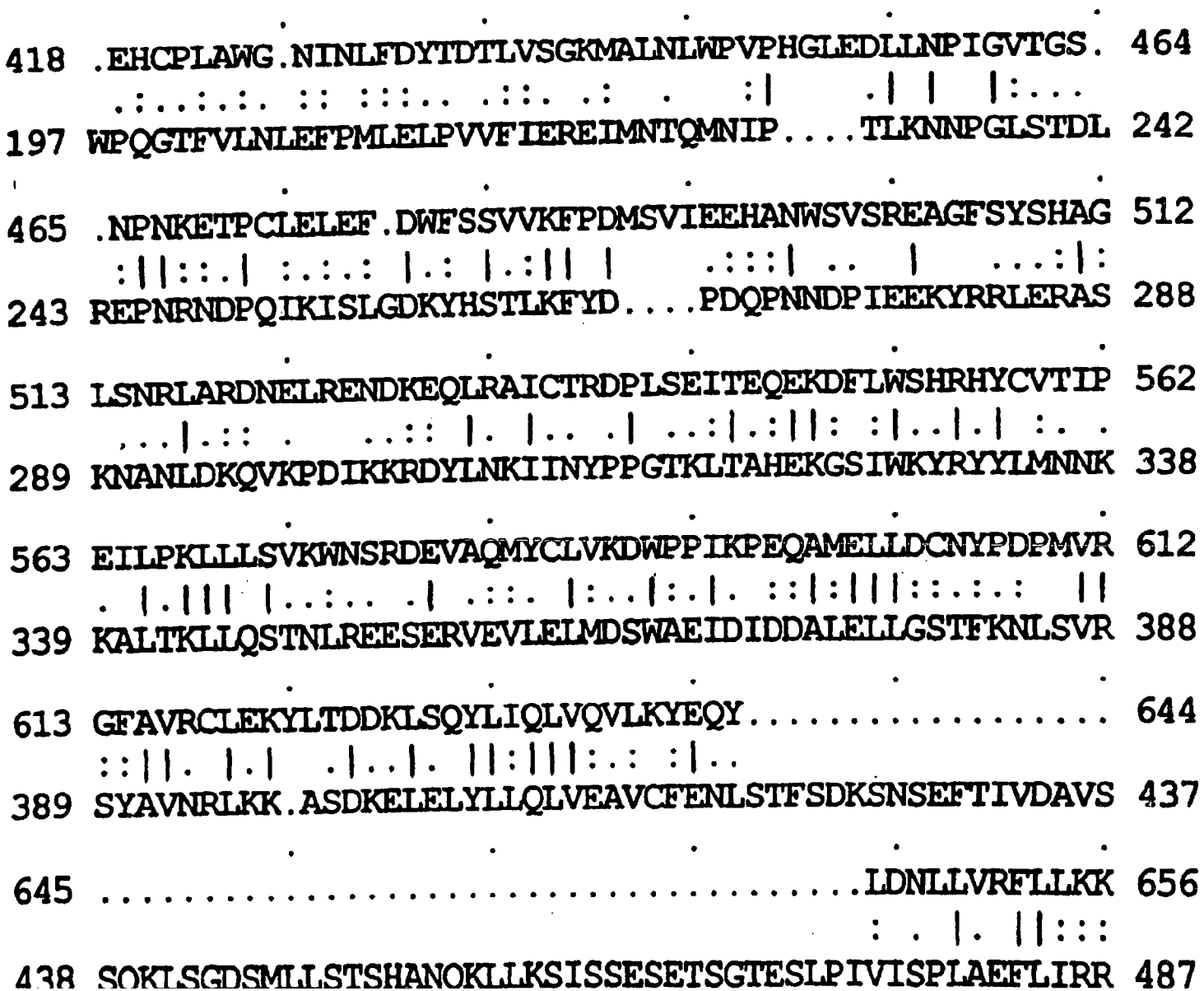
Figur 10 A

Figur 10 B



DE 693 34 113 T2 2007.10.31

Fig.10 B (Fortsetzung)



DE 693 34 113 T2 2007.10.31

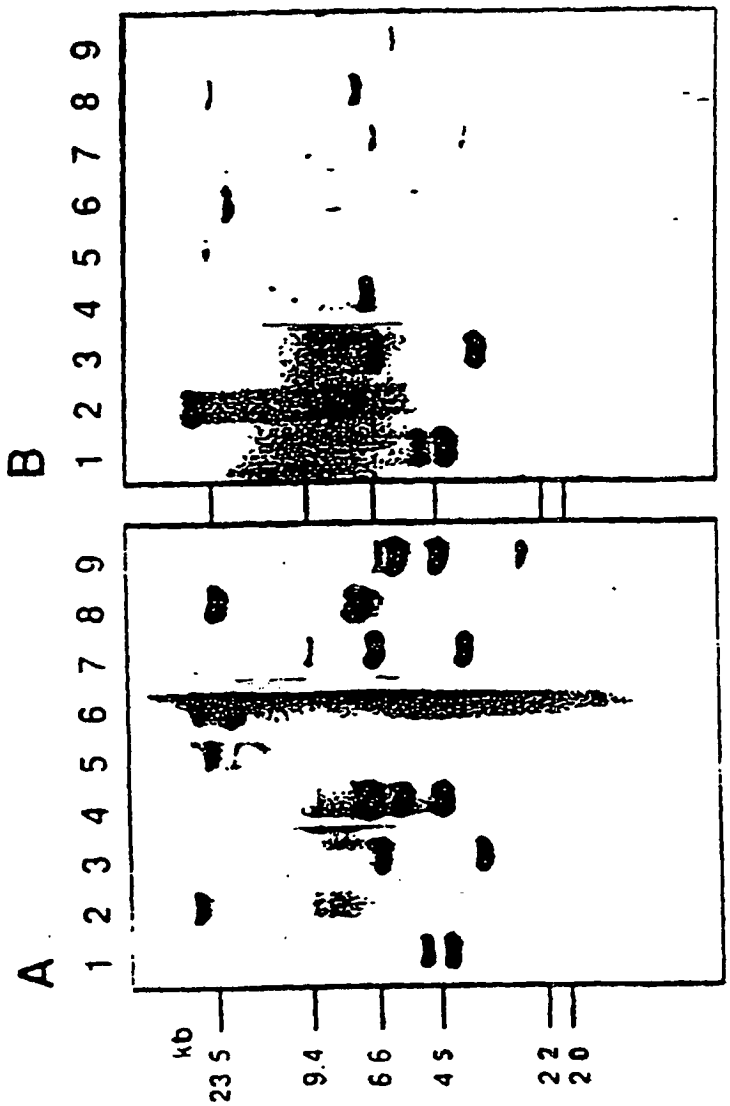
Fig. 10 B (Fortsetzung)

```
                .         .         .         .         .
657 ALTNQRIGHFFFWHLKSEMHNKTVSQRFGLLLESY.CRACGMYLKHLNRQ 705
    ||.|.|:| ||:|.|||| .:|.    :: :|.|: :|   .  . || |
488 ALVNPRLGSFFYWYLKSESEDKPY...LDQILSSFWSRLDKKSRNILNDQ 534

                .         .         .         .         .
706 VEAMEKLINLTDILKQEKKDETQKVQMKF.LVEQMRRPDFMDALQGFLSP 754
    |  :: | : .:.:|. |.....|::: . |:| . ||  :  :..:  |
535 VRLINVLRECCETIKRLKDTTAKKMELLVHLLETKVRP..LVKVRPIALP 582

                .         .         .         .         .
755 LNPAHQLGNLRLEECRIMSSAKRPLWLNWENPDIMSELLFQNNEIIFKNG 804
    |:|.  :.::  |.:::::.|. .||.:.:...      | |  .::|| |
583 LDPDVLICDVCPETSKVFKSSLSPLKITFKTT......LNQPYHLMFKVG 626
                .         .         .         *.         .
805 DDLRQDMLTLQIIRIMENIWQNQGLDLRMLPYGCLSIGDCVGLIEVVRNS 854
    |||||| |.:|||.:|::::.|:.:||:: || .|..|.  | ||.:.|
627 DDLRQDQLVVQIISLMNELLKNENVDLKLTPYKILATGPQEGAIEFIPN. 675
            *.         .         .         .         .
855 HTIMQIQCK.GGLKGALQFNSHTLHQWLKDKNKGEIYDAAIDLFTRSCAG 903
    .|:  | :|  |: | |.:      :: .:... :: : .:| |.:||||
676 DTLASILSKYHGILGYLKL......HYPDENATLGVQGWVLDNFVKSCAG 719
              . *    *  .         ***         .         .
904 YCVATFILGIGDRHNSNIMVKDDGQLFHIDFGHFLDHKKKKFGYKRERVP 953
    ||| |:|||:|||| .|::|..||::|| |||.:|::..|.|       |
720 YCVITYILGVGDRHLDNLLVTPDGHFFHADFGYILGQDPKPF.......P 762
```

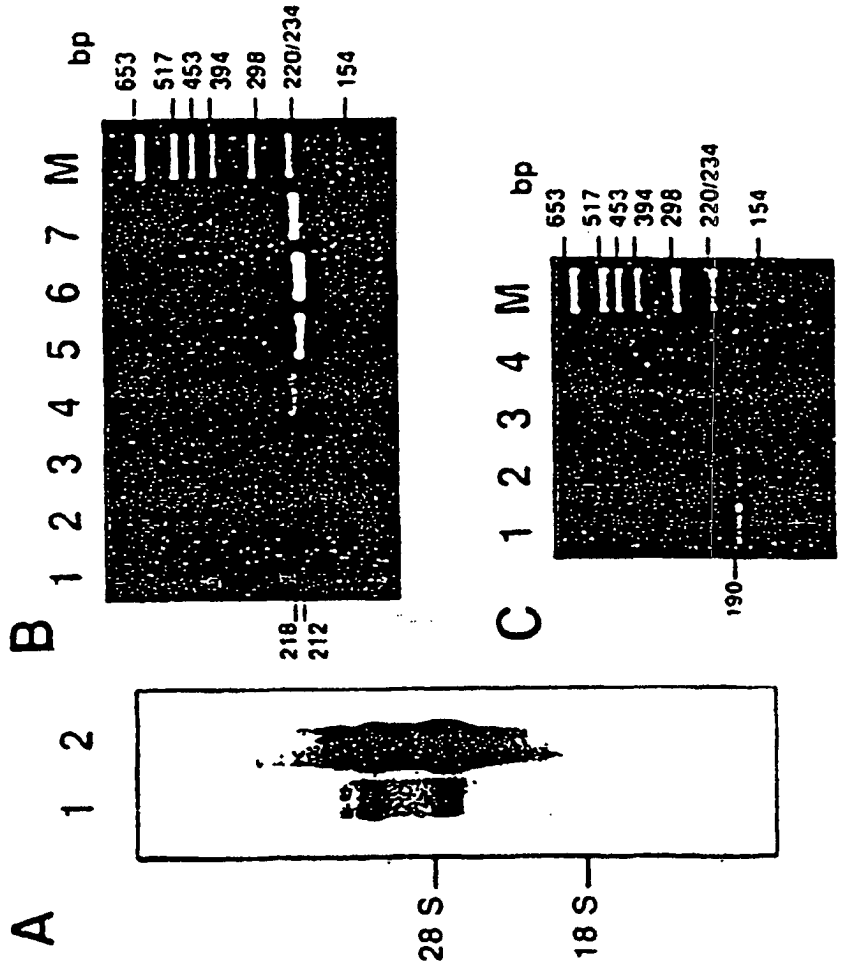
Fig. 10 B (Fortsetzung)

```
954 FVLTQDFLIVISKGAQECTKTREFERFQEMCYKAYLAIRQHANLFINLFS 1003
     ::. .  |: . |:.|:.   ::::|.. |: ||  :|.:|.|::|||.
763 PLMKLPPQIIEAFGGAESS...NYDKFRSYCFVAYSILRRNAGLILNLFE 809

1004 MMLGSGMPE..LQSFDDIAYIRKTLALDKTEQEALEYFMKQMNDAHHGGW 1051
     :| .|.:|:  ::. :.|  :|. :.|:..|::|  .| . :||. :: :
810 LMKTSNIPDIRIDPNGAILRVRERFNLNMSEEDATVHFQNLINDSVNALL 859

1052 TTKMDWIFHTIKQH 1065
     .. :|  :|.: |.
860 PIVIDH.LHNLAQY 872
```

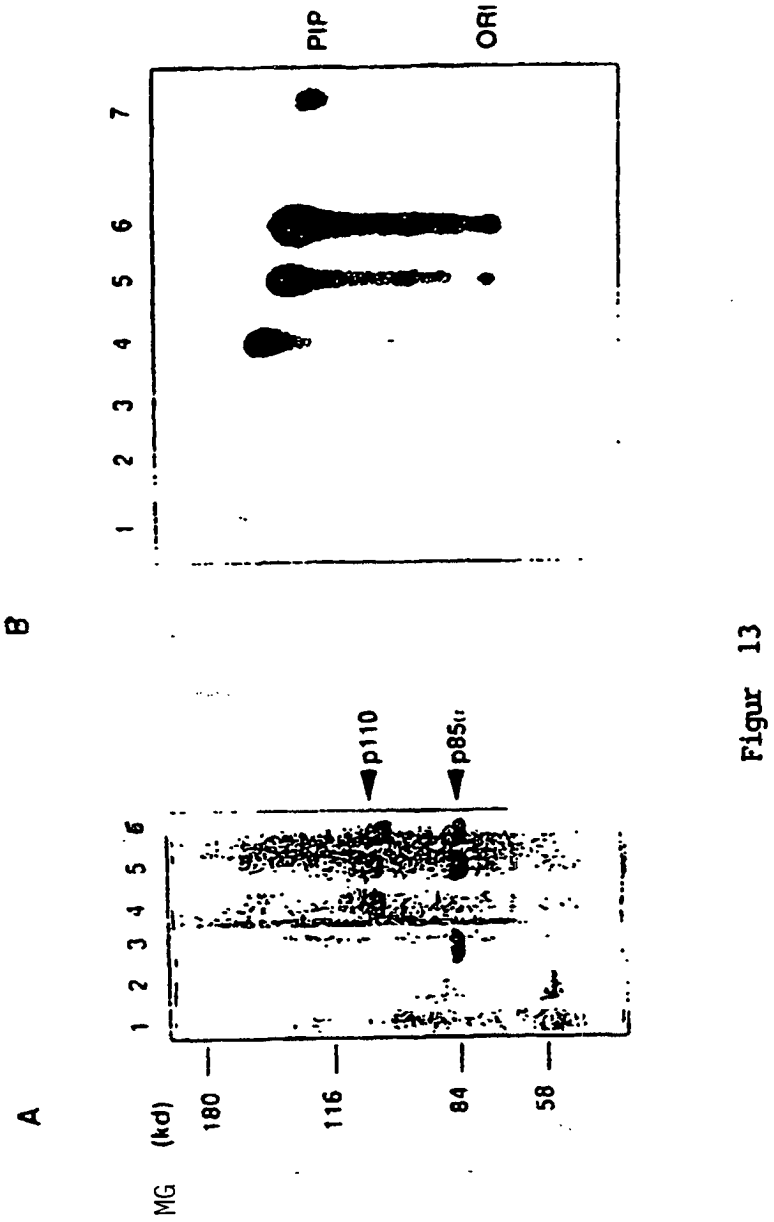

DE 693 34 113 T2 2007.10.31



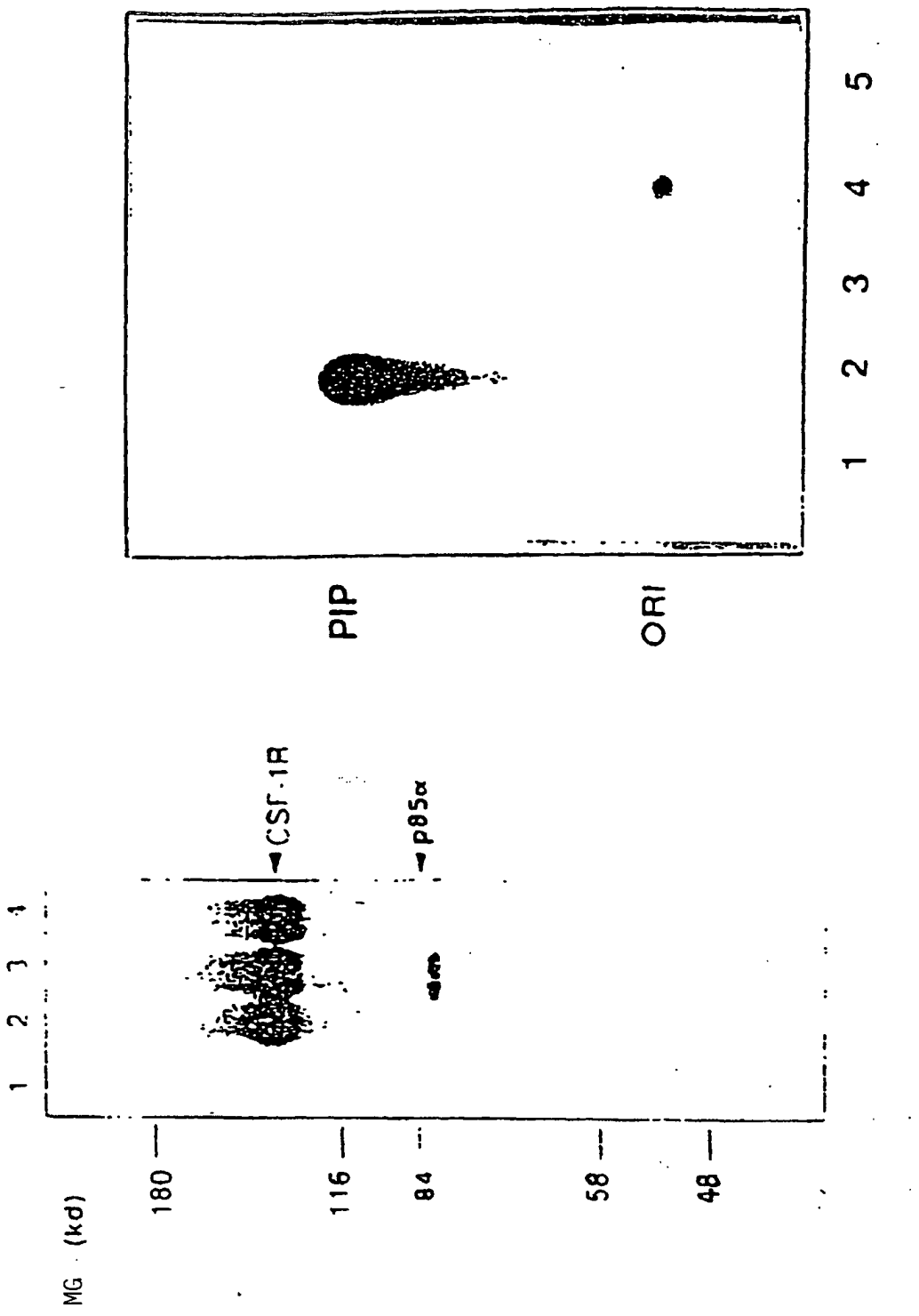
Figur 11


A
1 2
28 S
18 S
B
1 2 3 4 5 6 7 M
bp
653
517
453
394
298
220/234
154
218
212
C
1 2 3 4 M
bp
653
517
453
394
298
220/234
154
190

Figur 12

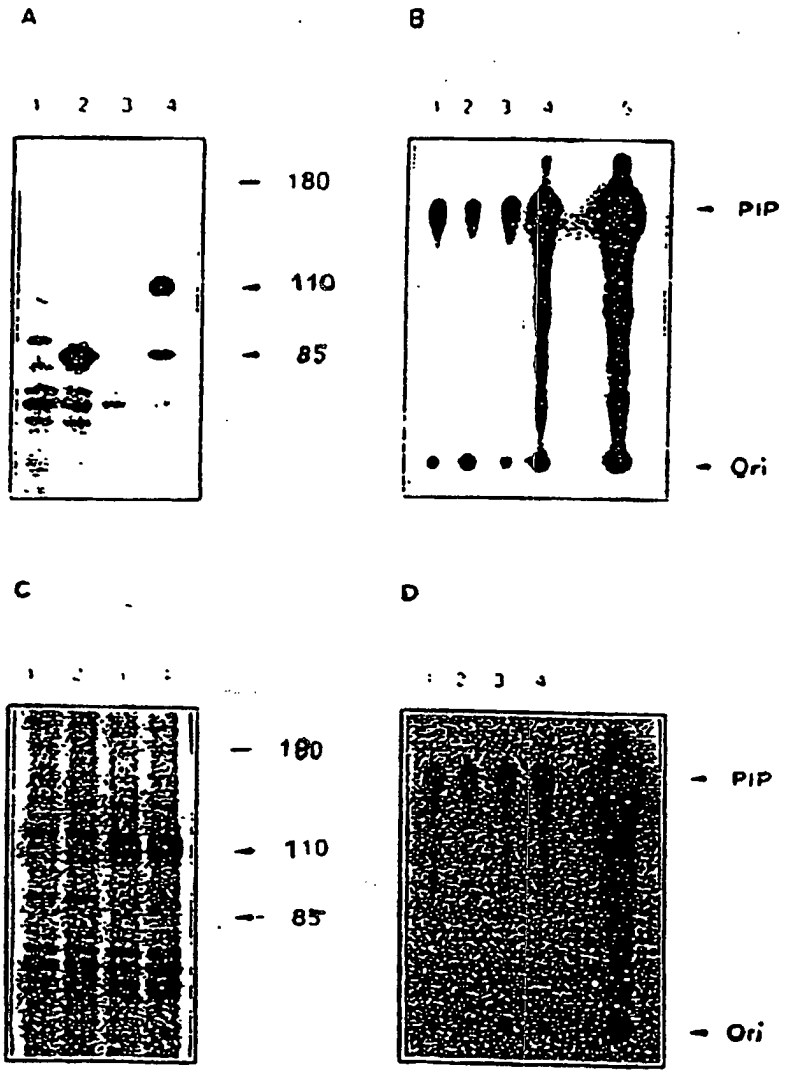


Figur 13

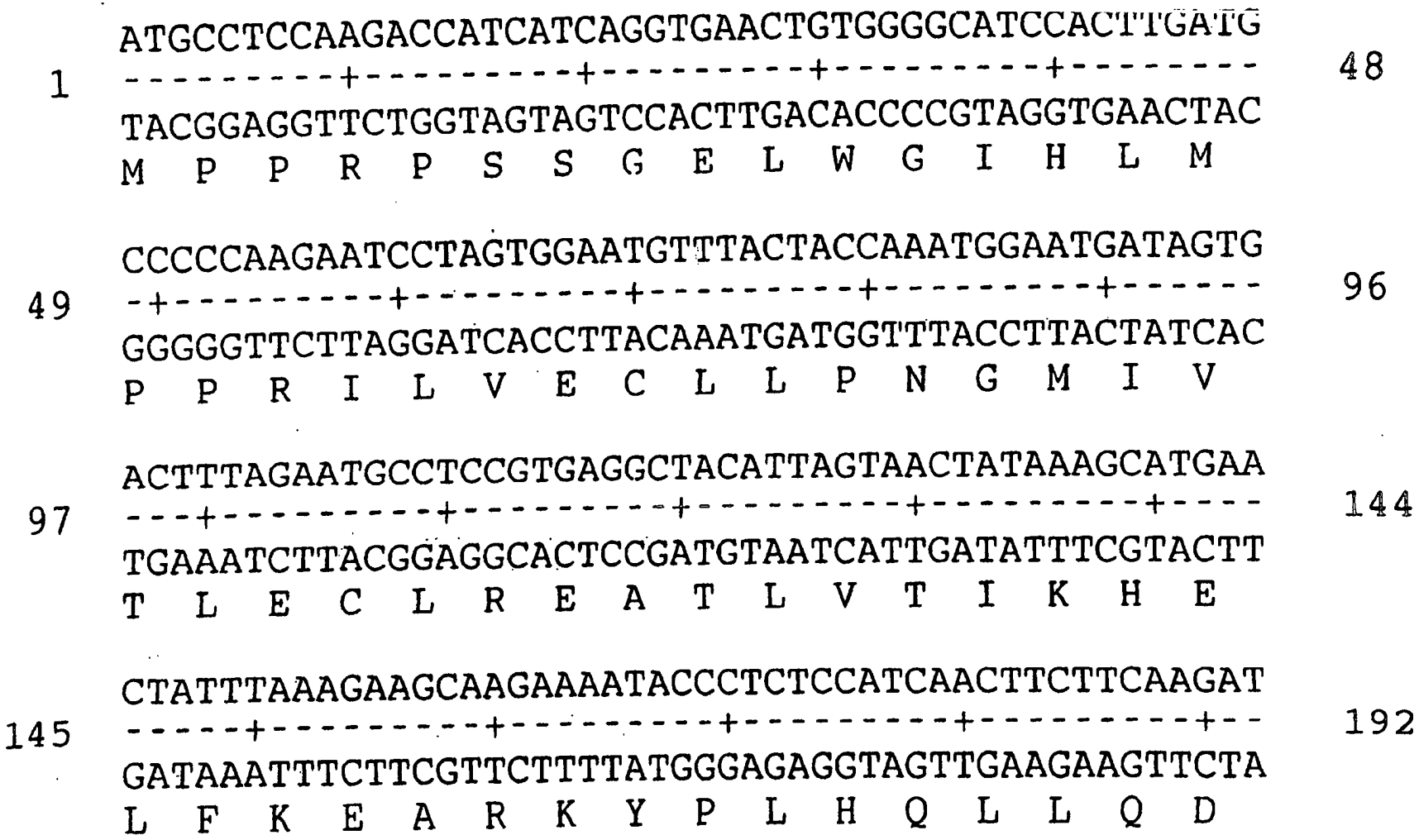


Figur 14

Figur 15



Das menschliche p110-cDNA-Nucleotid und die abgeleitete Aminosäuresequenz.



Figur 16

DE 693 34 113 T2 2007.10.31

```
      GAATCTTCTTACATTTTCGTAAGTGTTACCCAAGAAGCAGAAAGGGAA
193   -------+---------+---------+---------+---------+    240
      CTTAGAAGAATGTAAAAGCATTCACAATGGGTTCTTCGTCTTTCCCTT
      E  S  S  Y  I  F  V  S  V  T  Q  E  A  E  R  E

      GAATTTTTTGATGAAACAAGACGACTTTGTGATCTTCGGCTTTTTCAA
241   ---------+---------+---------+---------+---------    288
      CTTAAAAAACTACTTTGTTCTGCTGAAACACTAGAAGCCGAAAAAGTT
      E  F  F  D  E  T  R  R  L  C  D  L  R  L  F  Q

      CCATTTTTAAAAGTAATTGAACCAGTAGGCAACCGTGAAGAAAAGATC
289   -+---------+---------+---------+---------+------    336
      GGTAAAAATTTTCATTAACTTGGTCATCCGTTGGCACTTCTTTTCTAG
      P  F  L  K  V  I  E  P  V  G  N  R  E  E  K  I

      CTCAATCGAGAAATTGGTTTTGCTATCGGCATGCCAGTGTGCGAATTT
337   ---+---------+---------+---------+---------+----    384
      GAGTTAGCTCTTTAACCAAAACGATAGCCGTACGGTCACACGCTTAAA
      L  N  R  E  I  G  F  A  I  G  M  P  V  C  E  F
```

FIG. 16 (Fortsetzung)

```
      GATATGGTTAAAGATCCTGAAGTACAGGACTTCCGAAGAAATATTCTT
385   -----+---------+---------+---------+---------+---------+--   432
      CTATACCAATTTCTAGGACTTCATGTCCTGAAGGCTTCTTTATAAGAA
      D  M  V  K  D  P  E  V  Q  D  F  R  R  N  I  L

      AATGTTTGTAAAGAAGCTGTGGATCTTAGGGATCTTAATTCACCTCAT
433   -------+---------+---------+---------+---------+---------+   480
      TTACAAACATTTCTTCGACACCTAGAATCCCTAGAATTAAGTGGAGTA
      N  V  C  K  E  A  V  D  L  R  D  L  N  S  P  H

      AGTAGAGCAATGTATGTCTATCCGCCACATGTAGAATCTTCACCAGAG
481   ---------+---------+---------+---------+---------+--------   528
      TCATCTCGTTACATACAGATAGGCGGTGTACATCTTAGAAGTGGTCTC
      S  R  A  M  Y  V  Y  P  P  H  V  E  S  S  P  E

      CTGCCAAAGCACATATATAATAAATTGGATAGAGGCCAAATAATAGTG
529   -+---------+---------+---------+---------+---------+------   576
      GACGGTTTCGTGTATATATTATTTAACCTATCTCCGGTTTATTATCAC
      L  P  K  H  I  Y  N  K  L  D  R  G  Q  I  I  V
```

FIG. 16 (Fortsetzung)

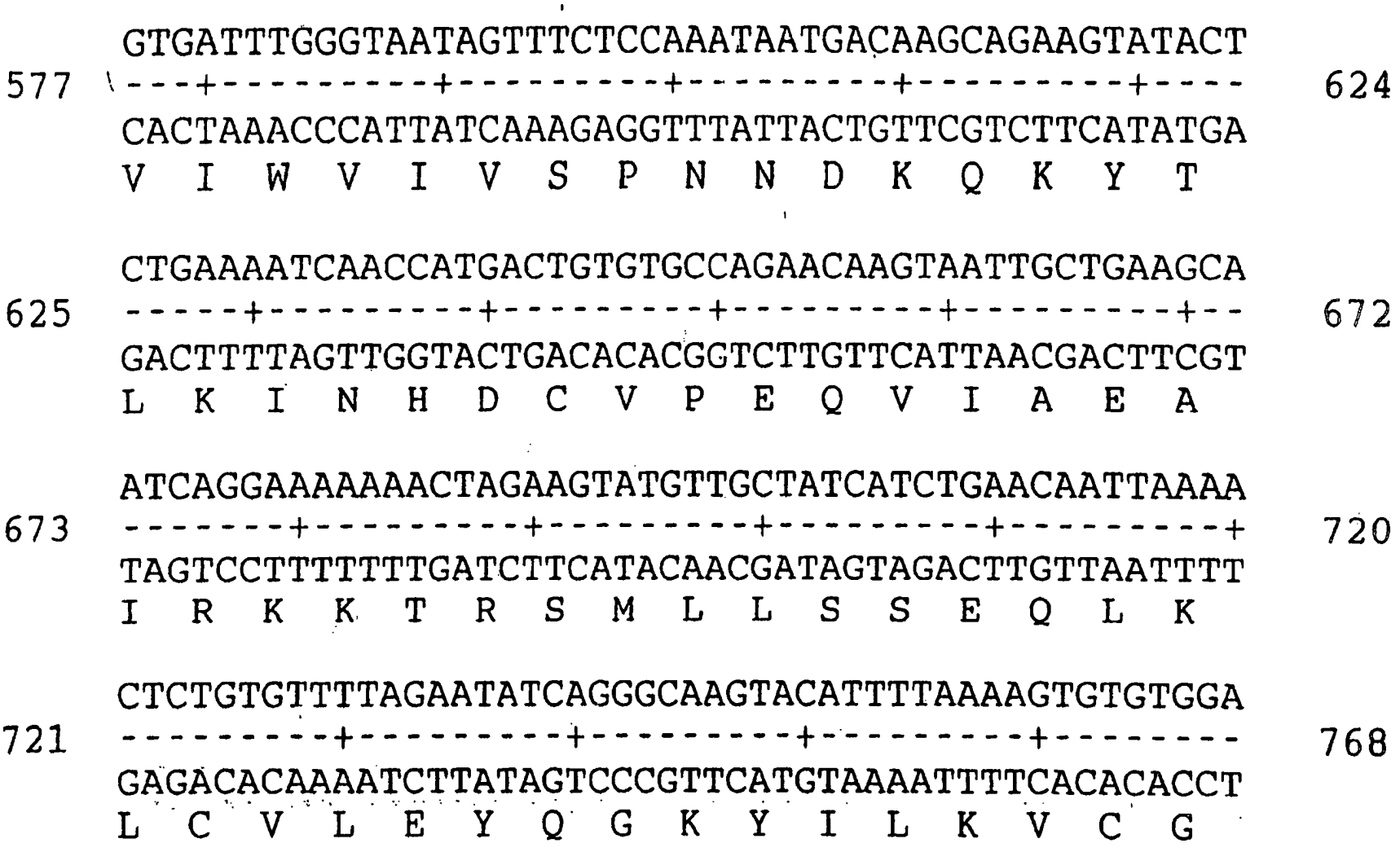


FIG.16 (Fortsetzung)

DE 693 34 113 T2 2007.10.31

```
      TGTGATGAATACTTCCTAGAAAAATATCCTCTGAGTCAGTATAAGTAT
769   -+---------+---------+---------+---------+------   816
      ACACTACTTATGAAGGATCTTTTTATAGGAGACTCAGTCATATTCATA
      C  D  E  Y  F  L  E  K  Y  P  L  S  Q  Y  K  Y

      ATAAGAAGCTGTATAATGCTTGGGAGGATGCCCAATTTGAAGATGATG
817   ---+---------+---------+---------+---------+----   864
      TATTCTTCGACATATTACGAACCCTCCTACGGGTTAAACTTCTACTAC
      I  R  S  C  I  M  L  G  R  M  P  N  L  K  M  M

      GCTAAAGAAAGCCTTTATTCTCAACTGCCAATGGACTGTTTTACAATG
865   -----+---------+---------+---------+---------+--   912
      CGATTTCTTTCGGAAATAAGAGTTGACGGTTACCTGACAAAATGTTAC
      A  K  E  S  L  Y  S  Q  L  P  M  D  C  F  T  M

      CCATCTTATTCCAGACGCATTTCCACAGCTACACCATATATGAATGGA
913   -------+---------+---------+---------+---------+   960
      GGTAGAATAAGGTCTGCGTAAAGGTGTCGATGTGGTATATACTTACCT
      P  S  Y  S  R  R  I  S  T  A  T  P  Y  M  N  G
```

FIG. 16 (Fortsetzung)

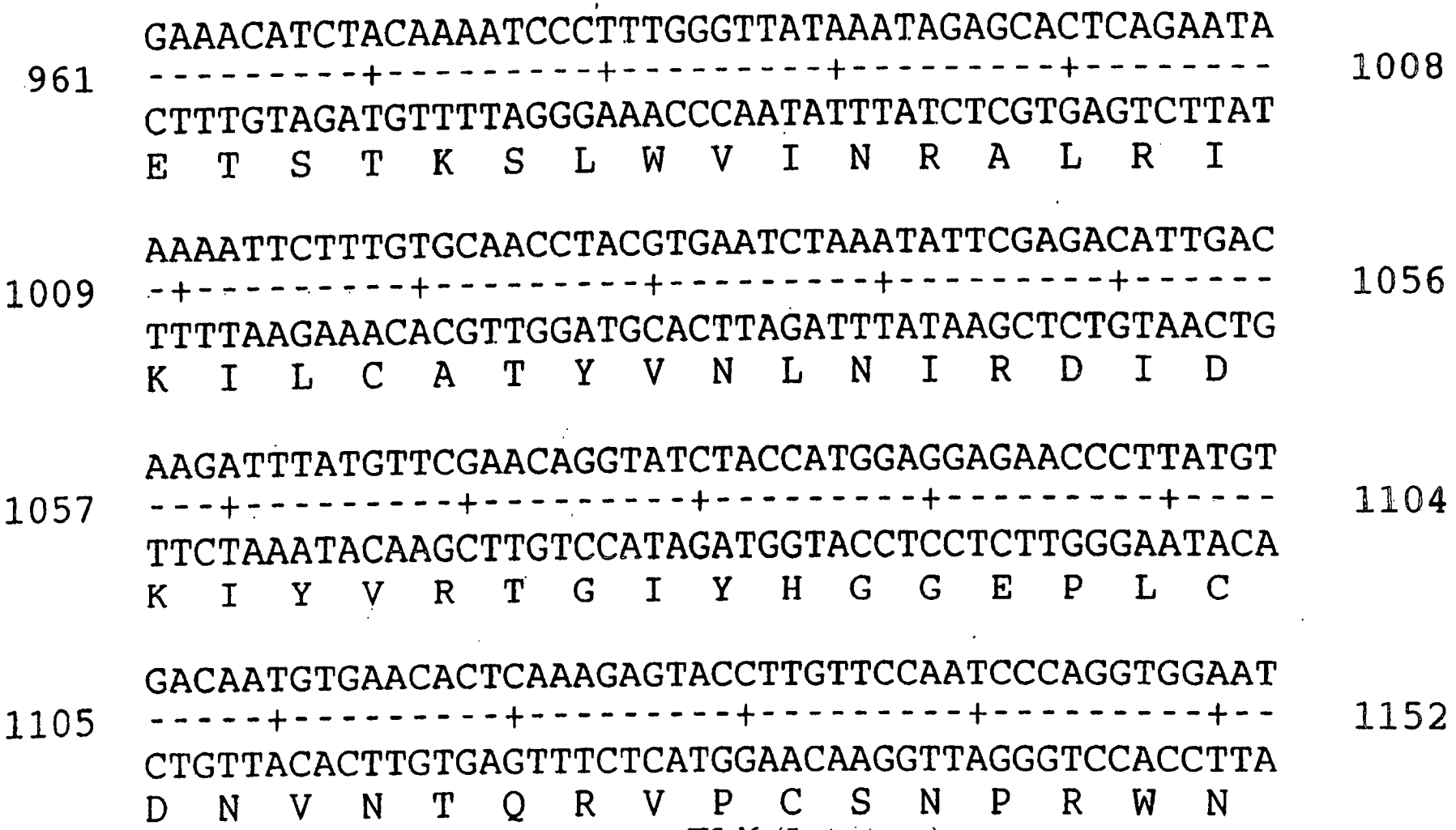


FIG. 16 (Fortsetzung)

```
          GAATGGCTGAATTATGATATATACATTCCTGATCTTCCTCGTGCTGCT
1153      -------+---------+---------+---------+---------+    1200
          CTTACCGACTTAATACTATATATGTAAGGACTAGAAGGAGCACGACGA
          E  W  L  N  Y  D  I  Y  I  P  D  L  P  R  A  A

          CGACTTTGCCTTTCCATTTGCTCTGTTAAAGGCCGAAAGGGTGCTAAA
1201      --------+---------+---------+---------+--------    1248
          GCTGAAACGGAAAGGTAAACGAGACAATTTCCGGCTTTCCCACGATTT
          R  L  C  L  S  I  C  S  V  K  G  R  K  G  A  K

          GAGGAACACTGTCCATTGGCATGGGGAAATATAAACTTGTTTGATTAC
1249      -+---------+---------+---------+---------+------    1296
          CTCCTTGTGACAGGTAACCGTACCCCTTTATATTTGAACAAACTAATG
          E  E  H  C  P  L  A  W  G  N  I  N  L  F  D  Y

          ACAGACACTCTAGTATCTGGAAAAATGGCTTTGAATCTTTGGCCAGTA
1297      ---+---------+---------+---------+---------+----    1344
          TGTCTGTGAGATCATAGACCTTTTTACCGAAACTTAGAAACCGGTCAT
          T  D  T  L  V  S  G  K  M  A  L  N  L  W  P  V
```

FIG. 16 (Fortsetzung)

```
      CCTCATGGATTAGAAGATTTGCTGAACCCTATTGGTGTTACTGGATCA
1345  -----+---------+---------+---------+---------+--  1392
      GGAGTACCTAATCTTCTAAACGACTTGGGATAACCACAATGACCTAGT
      P  H  G  L  E  D  L  L  N  P  I  G  V  T  G  S

      AATCCAAATAAAGAAACTCCATGCTTAGAGTTGGAGTTTGACTGGTTC
1393  -------+---------+---------+---------+---------+  1440
      TTAGGTTTATTTCTTTGAGGTACGAATCTCAACCTCAAACTGACCAAG
      N  P  N  K  E  T  P  C  L  E  L  E  F  D  W  F

      AGCAGTGTGGTAAAGTTCCCAGATATGTCAGTGATTGAAGAGCATGCC
1441  ---------+---------+---------+---------+--------  1488
      TCGTCACACCATTTCAAGGGTCTATACAGTCACTAACTTCTCGTACGG
      S  S  V  V  K  F  P  D  M  S  V  I  E  E  H  A

      AATTGGTCTGTATCCCGAGAAGCAGGATTTAGCTATTCCCACGCAGGA
1489  -+---------+---------+---------+---------+------  1536
      TTAACCAGACATAGGGCTCTTCGTCCTAAATCGATAAGGGTGCGTCCT
      N  W  S  V  S  R  E  A  G  F  S  Y  S  H  A  G
```

FIG. 16 (Fortsetzung)

```
      CTGAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAAATGACAAA
1537  ---+---------+---------+---------+---------+----  1584
      GACTCATTGTCTGATCGATCTCTGTTACTTAATTCCCTTTTACTGTTT
      L  S  N  R  L  A  R  D  N  E  L  R  E  N  D  K

      GAACAGCTCAAAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACT
1585  -----+---------+---------+---------+---------+--  1632
      CTTGTCGAGTTTCGTTAAAGATGTGCTCTAGGAGAGAGACTTTAGTGA
      E  Q  L  K  A  I  S  T  R  D  P  L  S  E  I  T

      GAGCAGGAGAAAGATTTTCTATGGAGTCACAGACACTATTGTGTAACT
1633  -------+---------+---------+---------+---------+  1680
      CTCGTCCTCTTTCTAAAAGATACCTCAGTGTCTGTGATAACACATTGA
      E  Q  E  K  D  F  L  W  S  H  R  H  Y  C  V  T

      ATCCCCGAAATTCTACCCAAATTGCTTCTGTCTGTTAAATGGAATTCT
1681  ---------+---------+---------+---------+--------  1728
      TAGGGGCTTTAAGATGGGTTTAACGAAGACAGACAATTTACCTTAAGA
      I  P  E  I  L  P  K  L  L  L  S  V  K  W  N  S
```

FIG. 16 (Fortsetzung)

```
                AGAGATGAAGTAGCCCAGATGTATTGCTTGGTAAAAGATTGGCCTCCA
1729            -+---------+---------+---------+---------+------    1776
                TCTCTACTTCATCGGGTCTACATAACGAACCATTTTCTAACCGGAGGT
                R  D  E  V  A  Q  M  Y  C  L  V  K  D  W  P  P

                ATCAAACCTGAACAGGCTATGGAACTTCTGGACTGTAATTACCCAGAT
1777            ---+---------+---------+---------+---------+----    1824
                TAGTTTGGACTTGTCCGATACCTTGAAGACCTGACATTAATGGGTCTA
                I  K  P  E  Q  A  M  E  L  L  D  C  N  Y  P  D

                CCTATGGTTCGAGGTTTTGCTGTTCGGTGCTTGGAAAAATATTTAACA
1825            -----+---------+---------+---------+---------+--    1872
                GGATACCAAGCTCCAAAACGACAAGCCACGAACCTTTTTATAAATTGT
                P  M  V  R  G  F  A  V  R  C  L  E  K  Y  L  T

                GATGACAAACTTTCTCAGTATTTAATTCAGCTAGTACAGGTCCTAAAA
1873            -------+---------+---------+---------+---------+    1920
                CTACTGTTTGAAAGAGTCATAAATTAAGTCGATCATGTCCAGGATTTT
                D  D  K  L  S  Q  Y  L  I  Q  L  V  Q  V  L  K
```

FIG. 16
(Fortsetzung)

```
      TATGAACAATATTTGGATAACTTGCTTGTGAGATTTTTACTGAAGAAA
1921  ---------+---------+---------+---------+--------  1968
      ATACTTGTTATAAACCTATTGAACGAACACTCTAAAAATGACTTCTTT
      Y  E  Q  Y  L  D  N  L  L  V  R  F  L  L  K  K

      GCATTGACTAATCAAAGGATTGGGCACTTTTTCTTTTGGCATTTAAAA
1969  -+---------+---------+---------+---------+------  2016
      CGTAACTGATTAGTTTCCTAACCCGTGAAAAAGAAAACCGTAAATTTT
      A  L  T  N  Q  R  I  G  H  F  F  F  W  H  L  K

      TCTGAGATGCACAATAAAACAGTTAGCCAGAGGTTTGGCCTGCTTTTG
2017  ---+---------+---------+---------+---------+----  2064
      AGACTCTACGTGTTATTTTGTCAATCGGTCTCCAAACCGGACGAAAAC
      S  E  M  H  N  K  T  V  S  Q  R  F  G  L  L  L

      GAGTCCTATTGTCGTGCATGTGGGATGTATTTGAAGCACCTGAATAGG
2065  -----+---------+---------+---------+---------+--  2112
      CTCAGGATAACAGCACGTACACCCTACATAAACTTCGTGGACTTATCC
      E  S  Y  C  R  A  C  G  M  Y  L  K  H  L  N  R
```

FIG. 16 (Fortsetzung)

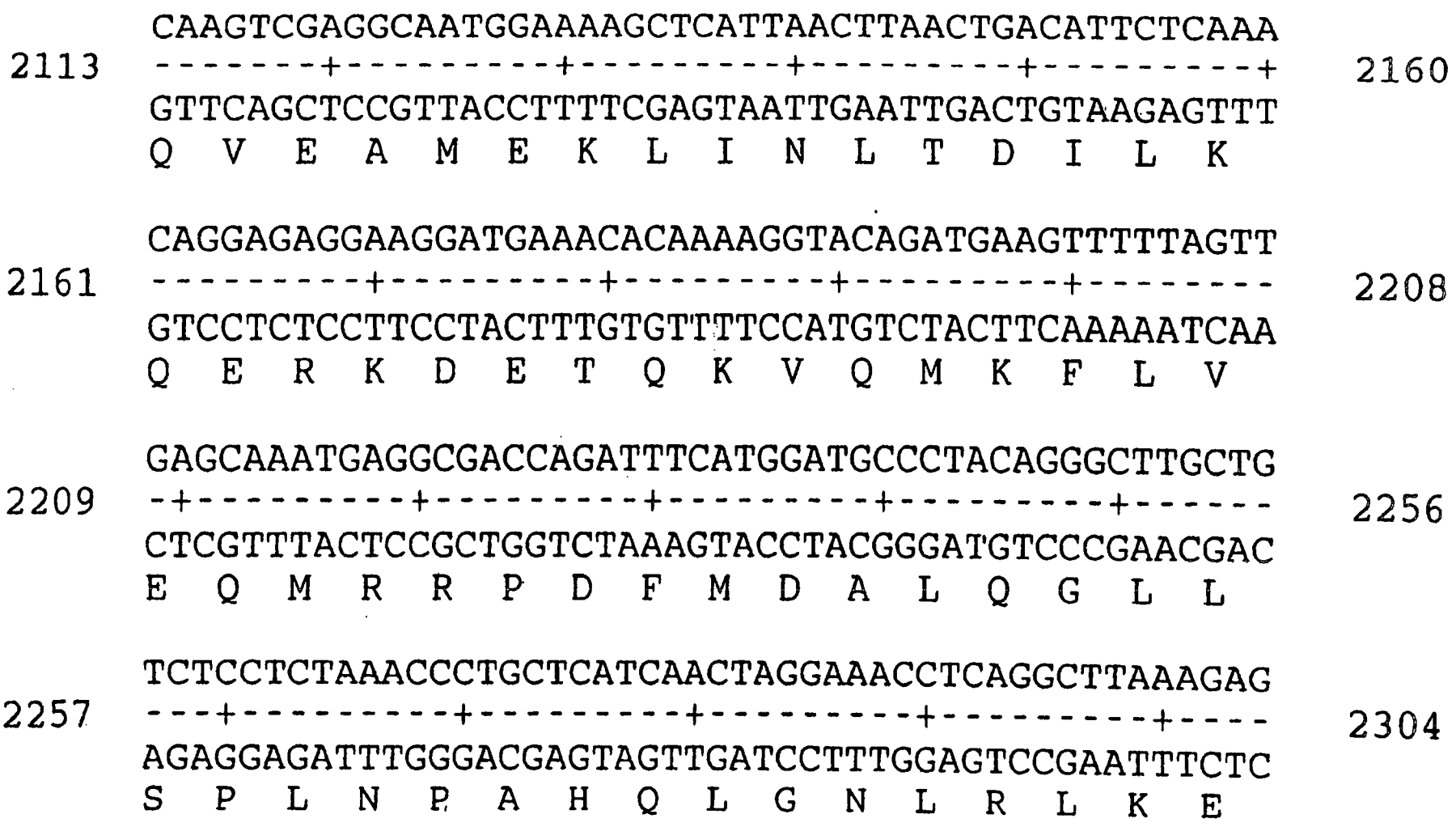


FIG. 16 (Fortsetzung)

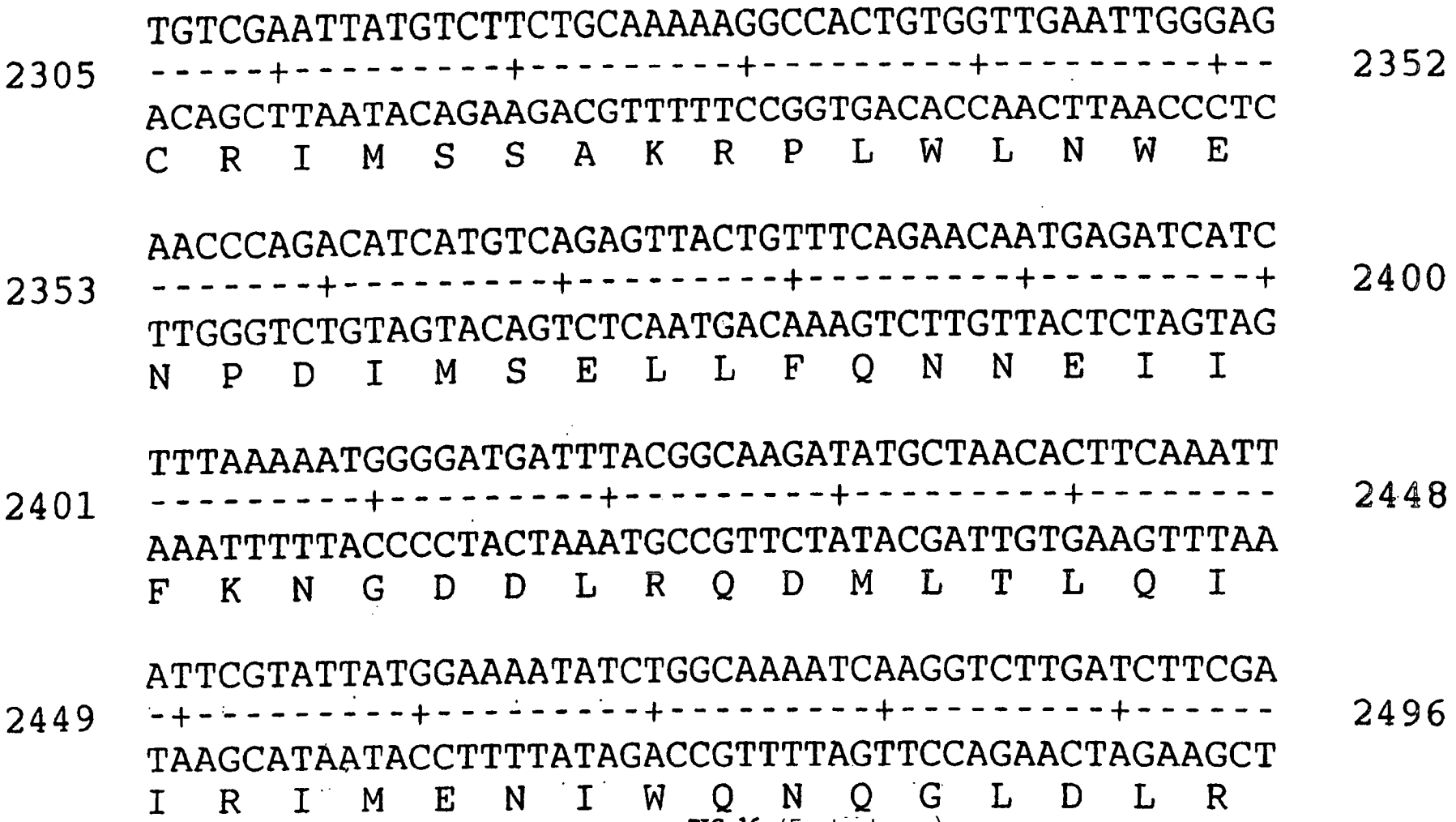


FIG. 16 (Fortsetzung)

```
          ATGTTACCTTATGGTTGTCTGTCAATCGGTGACTGTGTGGGACTTATT
2497      ---+---------+---------+---------+---------+---------+----   2544
          TACAATGGAATACCAACAGACAGTTAGCCACTGACACACCCTGAATAA
          M  L  P  Y  G  C  L  S  I  G  D  C  V  G  L  I

          GAGGTGGTGCGAAATTCTCACACTATTATGCAAATTCAGTGCAAAGGC
2545      -----+---------+---------+---------+---------+---------+--   2592
          CTCCACCACGCTTTAAGAGTGTGATAATACGTTTAAGTCACGTTTCCG
          E  V  V  R  N  S  H  T  I  M  Q  I  Q  C  K  G

          GGCTTGAAAGGTGCACTGCAGTTCAACAGCCACACACTACATCAGTGG
2593      -------+---------+---------+---------+---------+---------+   2640
          CCGAACTTTCCACGTGACGTCAAGTTGTCGGTGTGTGATGTAGTCACC
          G  L  K  G  A  L  Q  F  N  S  H  T  L  H  Q  W

          CTCAAAGACAAGAACAAAGGAGAAATATATGATGCAGCCATTGACCTG
2641      ---------+---------+---------+---------+---------+--------   2688
          GAGTTTCTGTTCTTGTTTCCTCTTTATATACTACGTCGGTAACTGGAC
          L  K  D  K  N  K  G  E  I  Y  D  A  A  I  D  L
```

FIG. 16 (Fortsetzung)

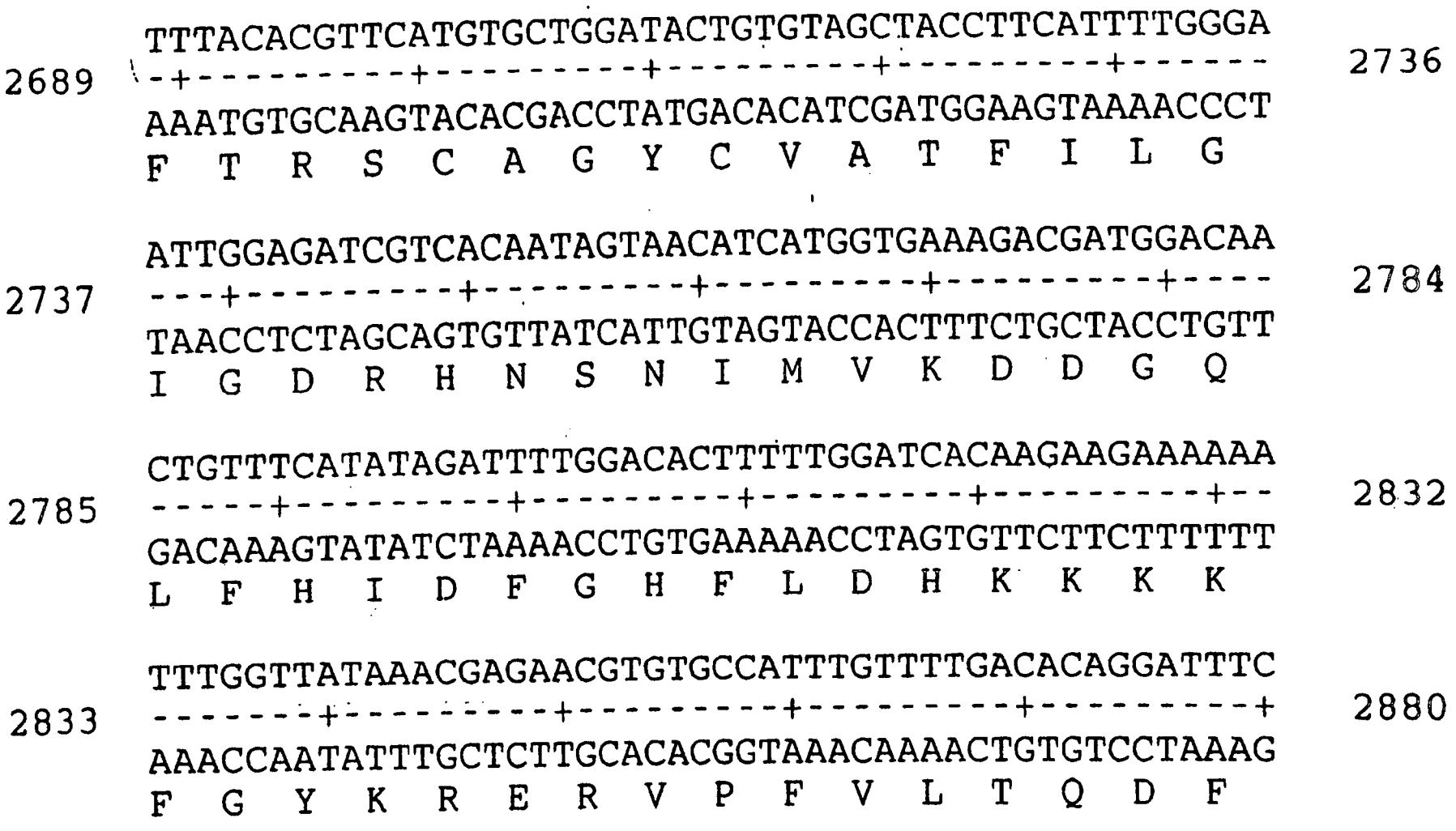


FIG. 16 (Fortsetzung)

```
      TTAATAGTGATTAGTAAAGGAGCCCAAGAATGCACAAAGACAAGAGAA
2881  ---------+---------+---------+---------+--------  2928
      AATTATCACTAATCATTTCCTCGGGTTCTTACGTGTTTCTGTTCTCTT
      L  I  V  I  S  K  G  A  Q  E  C  T  K  T  R  E

      TTTGAGAGGTTTCAGGAGATGTGTTACAAGGCTTATCTAGCTATTCGA
2929  -+---------+---------+---------+---------+------  2976
      AAACTCTCCAAAGTCCTCTACACAATGTTCCGAATAGATCGATAAGCT
      F  E  R  F  Q  E  M  C  Y  K  A  Y  L  A  I  R

      CAGCATGCCAATCTCTTCATAAATCTTTTCTCAATGATGCTTGGCTCT
2977  ---+---------+---------+---------+---------+----  3024
      GTCGTACGGTTAGAGAAGTATTTAGAAAAGAGTTACTACGAACCGAGA
      Q  H  A  N  L  F  I  N  L  F  S  M  M  L  G  S

      GGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGATGACATTGCATACATTCGAAAG
3025  -----+---------+---------+---------+---------+--  3072
      CCTTACGGTCTTGATGTTAGAAAACTACTGTAACGTATGTAAGCTTTC
      G  M  P  E  L  Q  S  F  D  D  I  A  Y  I  R  K
```

FIG. 16 (Fortsetzung)

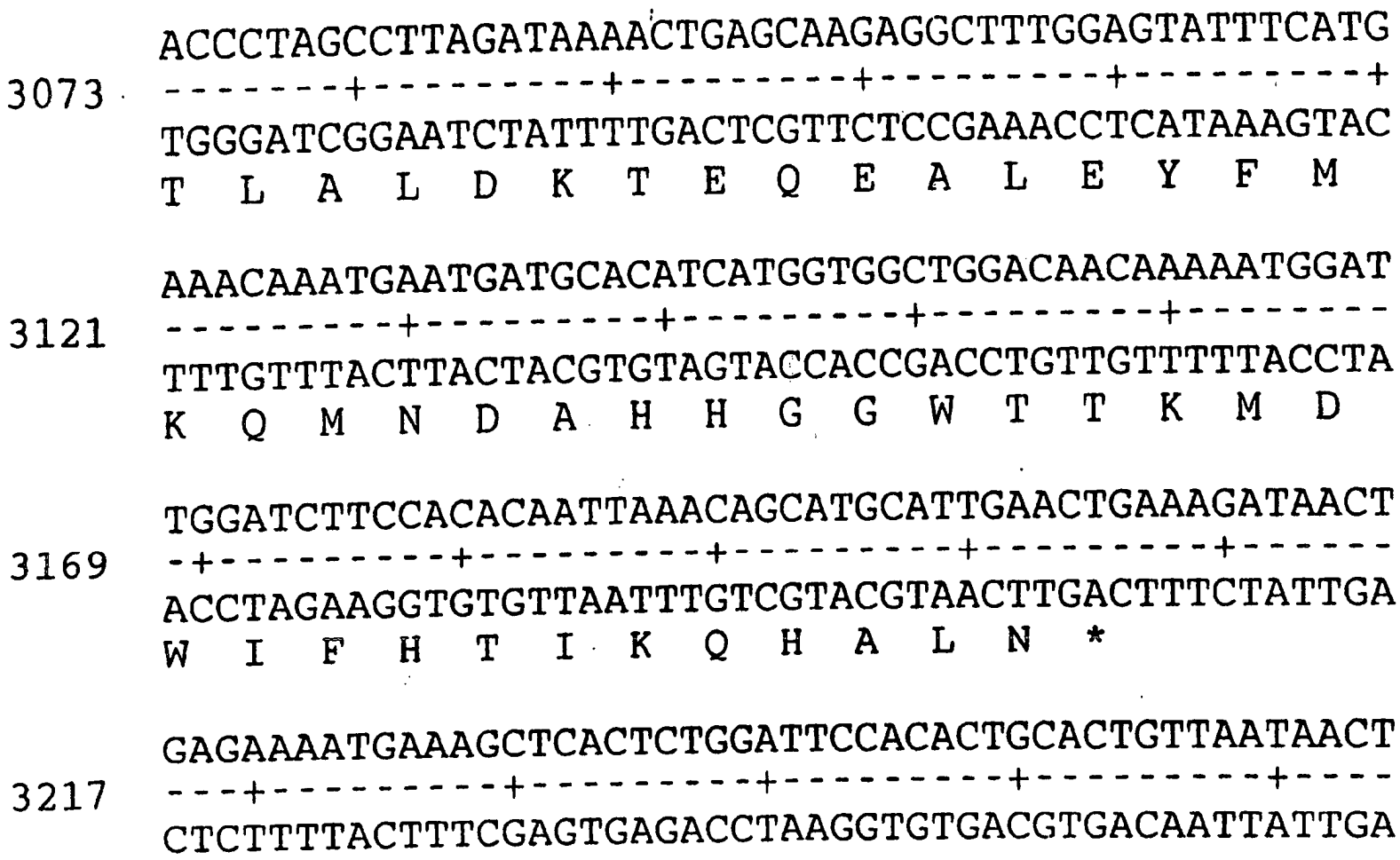


FIG. 16 (Fortsetzung)

```
                CTCAGCAGGCAAAGACCGATTGCATAGGAATTGCACAATCCATGAACA
3265  ----+----------+----------+----------+----------+----------+--  3312
                GAGTCGTCCGTTTCTGGCTAACGTATCCTTAACGTGTTAGGTACTTGT

                GCATTAGATTTACAGCAAGAACAGAAATAAAATACTATATAATTTAAA
3313  -------+---------+---------+---------+---------+----------+  3360
                CGTAATCTAAATGTCGTTCTTGTCTTTATTTTATGATATATTAAATTT

                TAATGTAAACGCAAACAGGGTTTGATAGCACTTAAACTAGTTCATTTC
3361  ---------+---------+---------+---------+---------+--------  3408
                ATTACATTTGCGTTTGTCCCAAACTATCGTGAATTTGATCAAGTAAAG

                AAAA
3409  -+--   3412
                TTTT
```

FIG. 16 (Fortsetzung)

Angleichung menschlicher und Rinder-p110-cDNA-Nucleotidsequenzen.

Nucleotid-Ähnlichkeit: 96 %



Figur 17

DE 693 34 113 T2 2007.10.31

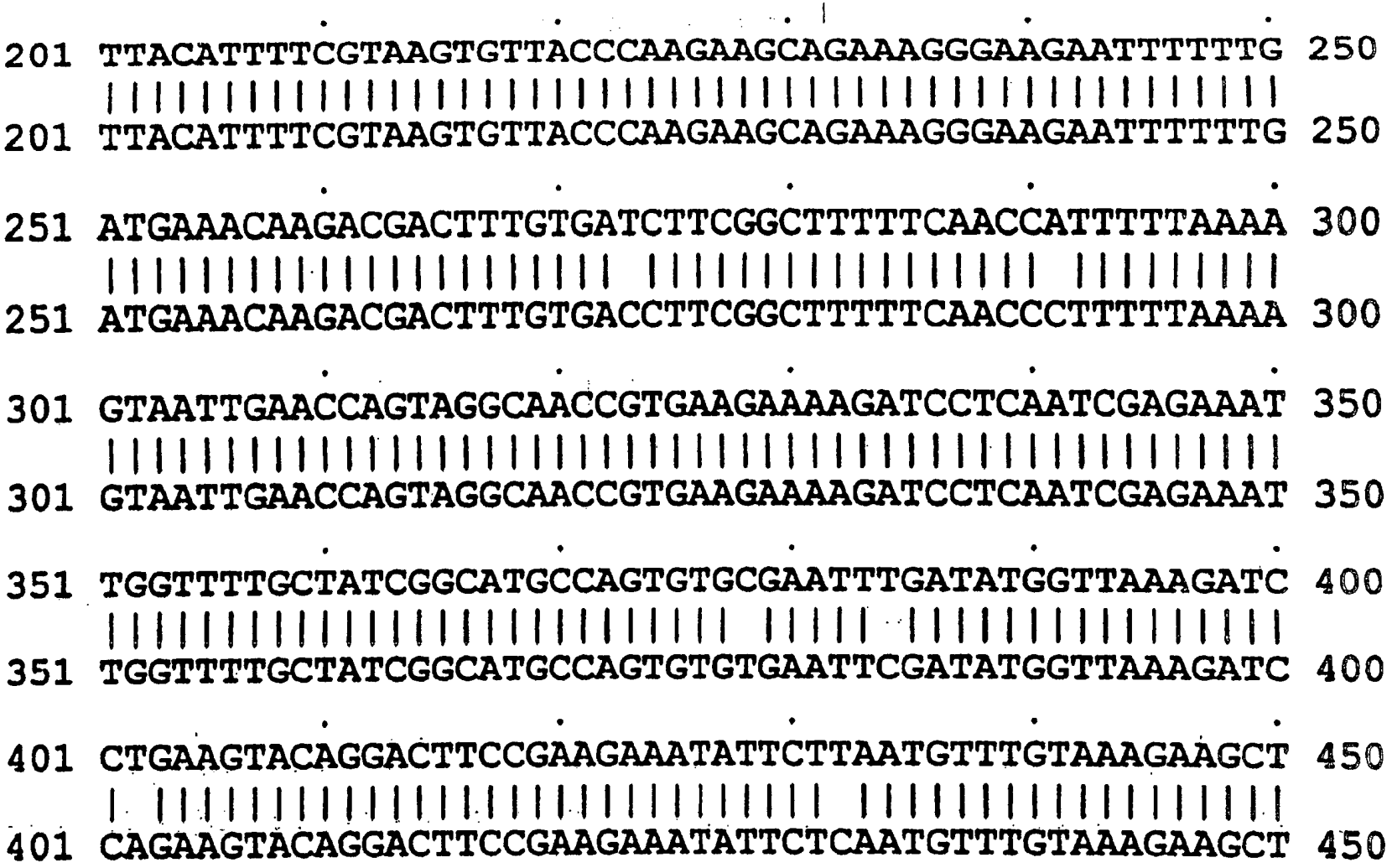


FIG. 17 (Fortsetzung)

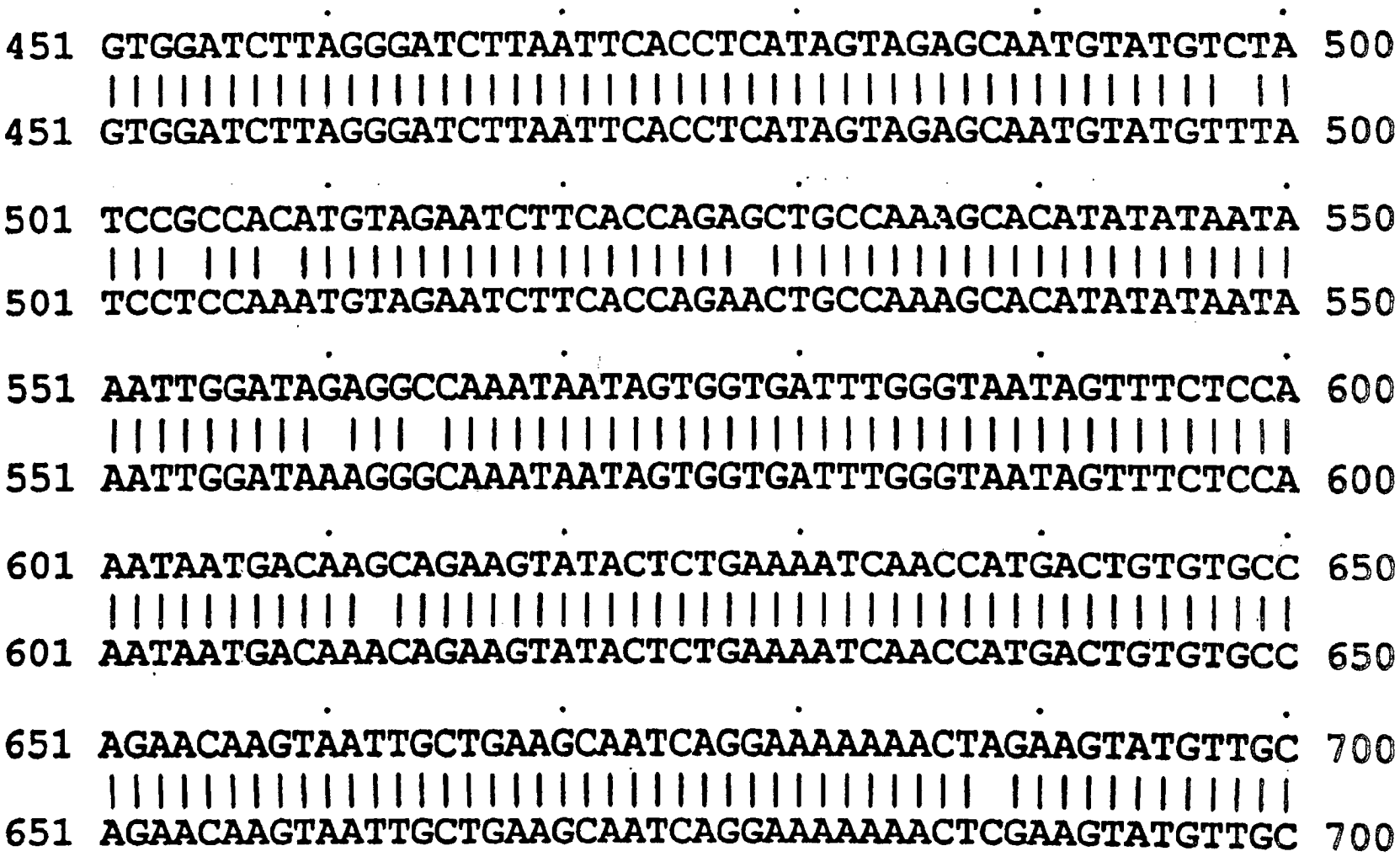


FIG. 17 (Fortsetzung)



FIG. 17 (Fortsetzung)



FIG. 17 (Fortsetzung)



FIG. 17 (Fortsetzung)

```
1451 TAAAGTTCCCAGATATGTCAGTGATTGAAGAGCATGCCAATTGGTCTGTA 1500
     ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1451 TAAAGTTTCCAGATATGTCAGTGATTGAAGAGCATGCCAATTGGTCTGTA 1500

1501 TCCCGAGAAGCAGGATTTAGCTATTCCCACGCAGGACTGAGTAACAGACT 1550
     ||||| |||||||||||||| |||||||| ||||||||||||||||||||
1501 TCCCGTGAAGCAGGATTTAGTTATTCCCATGCAGGACTGAGTAACAGACT 1550

1551 AGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAAATGACAAAGAACAGCTCAAAGCAA 1600
     |||||||||||||||||||| |||||||| |||||||||||  |||||
1551 AGCTAGAGACAATGAATTAAGAGAAAATGATAAAGAACAGCTCCGAGCAA 1600

1601 TTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGAAAGATTTT 1650
     ||| |||||||||||||| |||||||||||||||| ||||||||||||
1601 TTTGTACACGAGATCCTCTATCTGAAATCACTGAGCAAGAGAAAGATTTT 1650

1651 CTATGGAGTCACAGACACTATTGTGTAACTATCCCCGAAATTCTACCCAA 1700
     || ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1651 CTGTGGAGCCACAGACACTATTGTGTAACTATCCCCGAAATTCTACCCAA 1700
```

FIG. 17 (Fortsetzung)

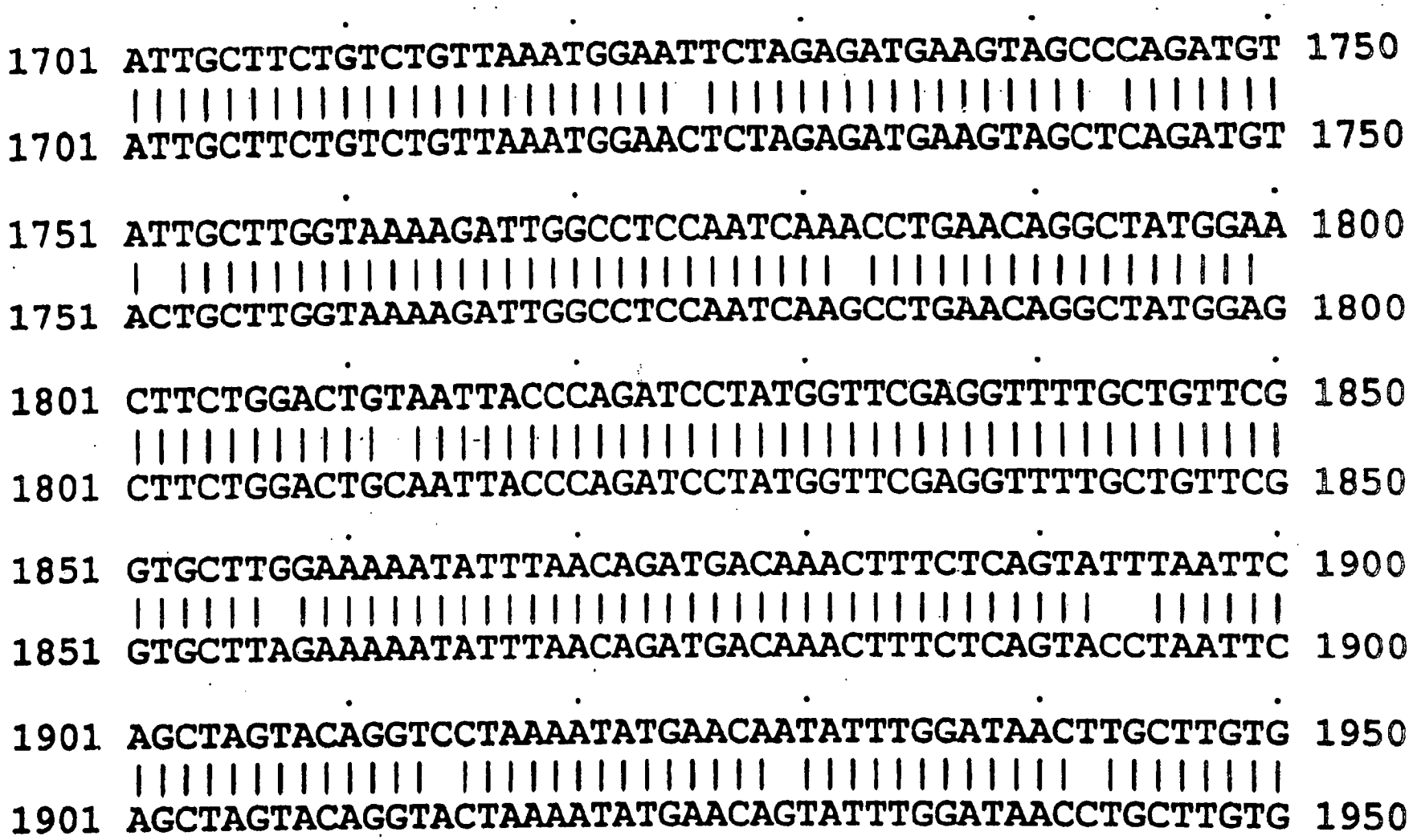


FIG.17 (Fortsetzung)

DE 693 34 113 T2 2007.10.31



FIG. 17 (Fortsetzung)



FIG. 17 (Fortsetzung)

DE 693 34 113 T2 2007.10.31

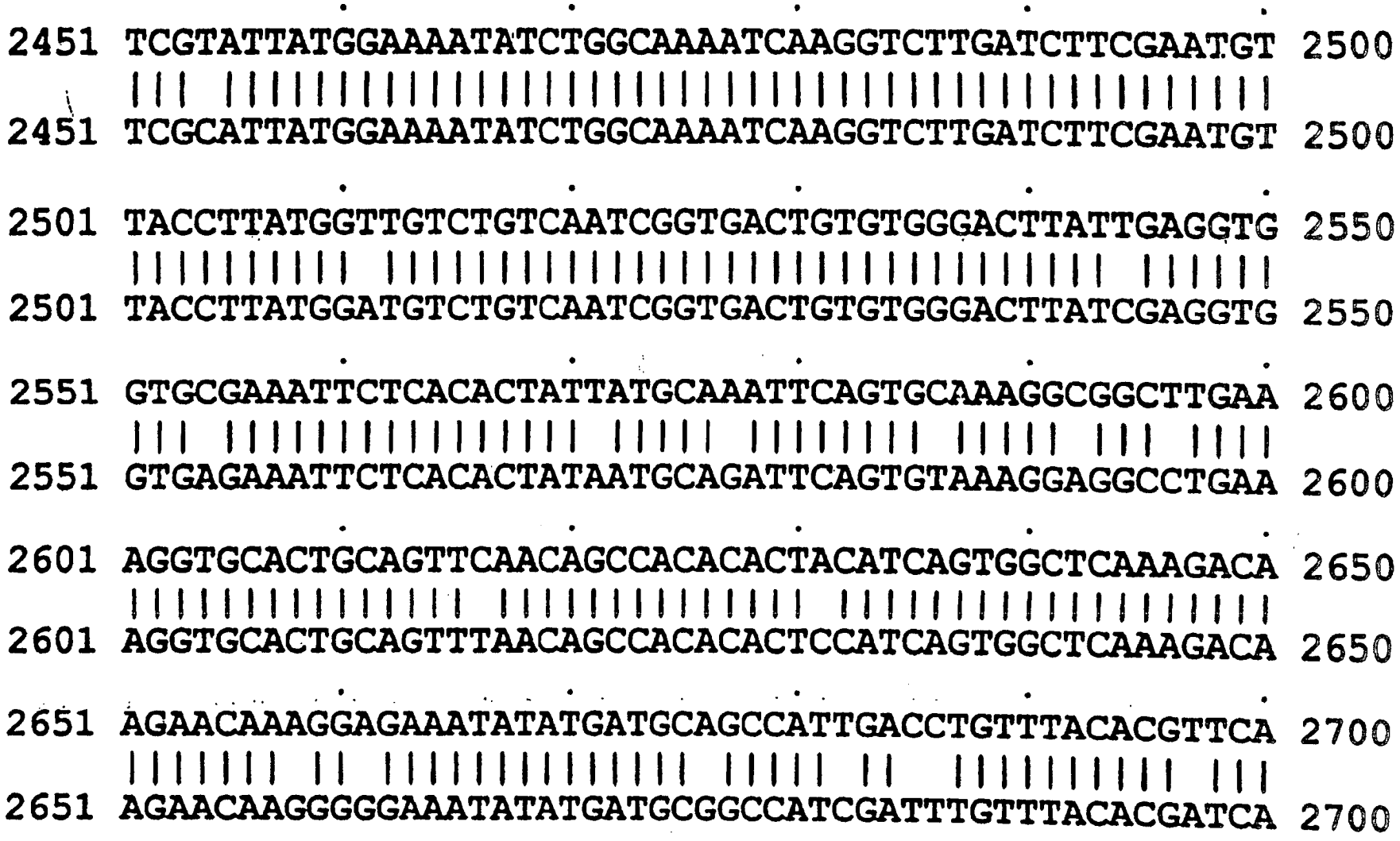


FIG.17 (Fortsetzung)

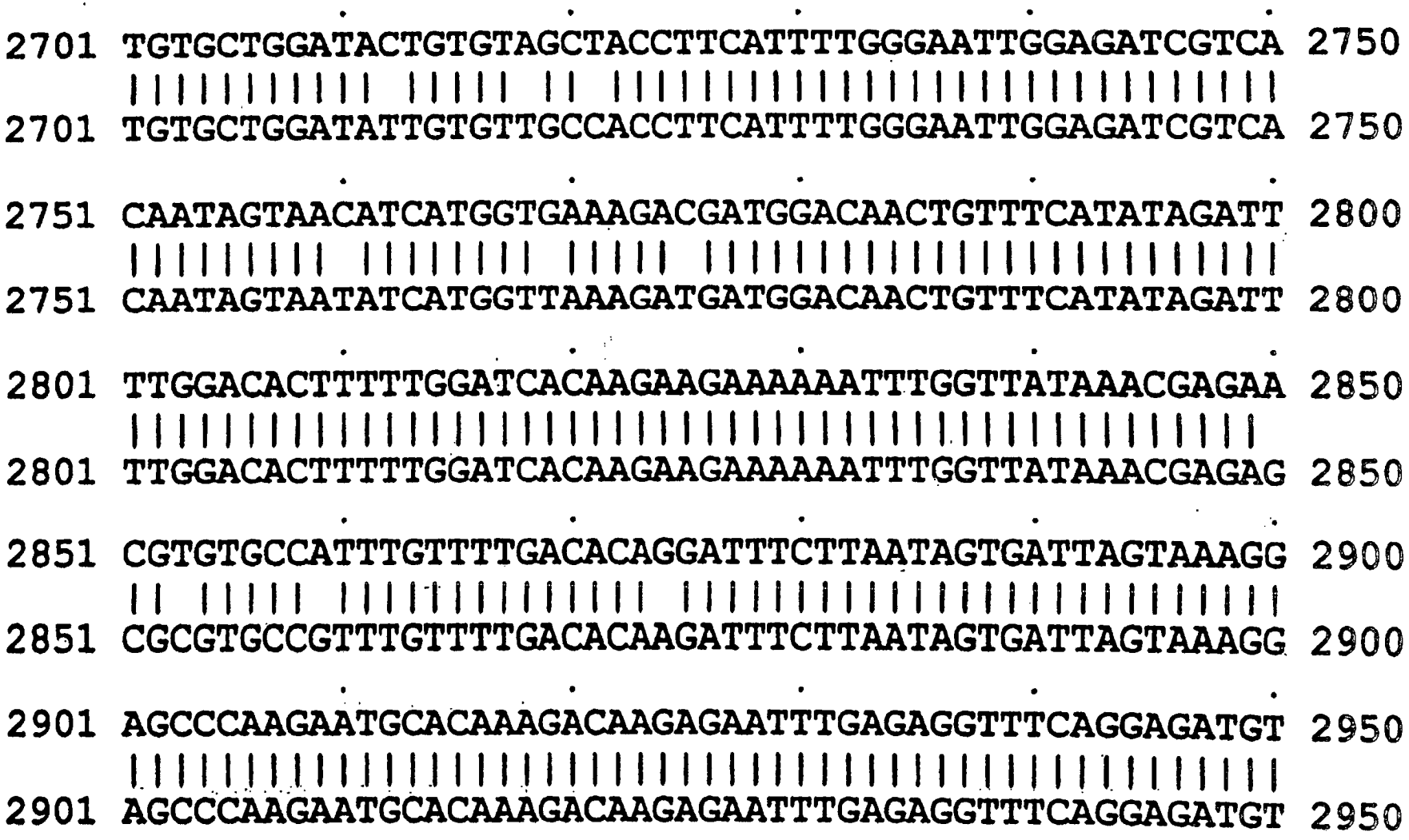


FIG.17 (Fortsetzung)



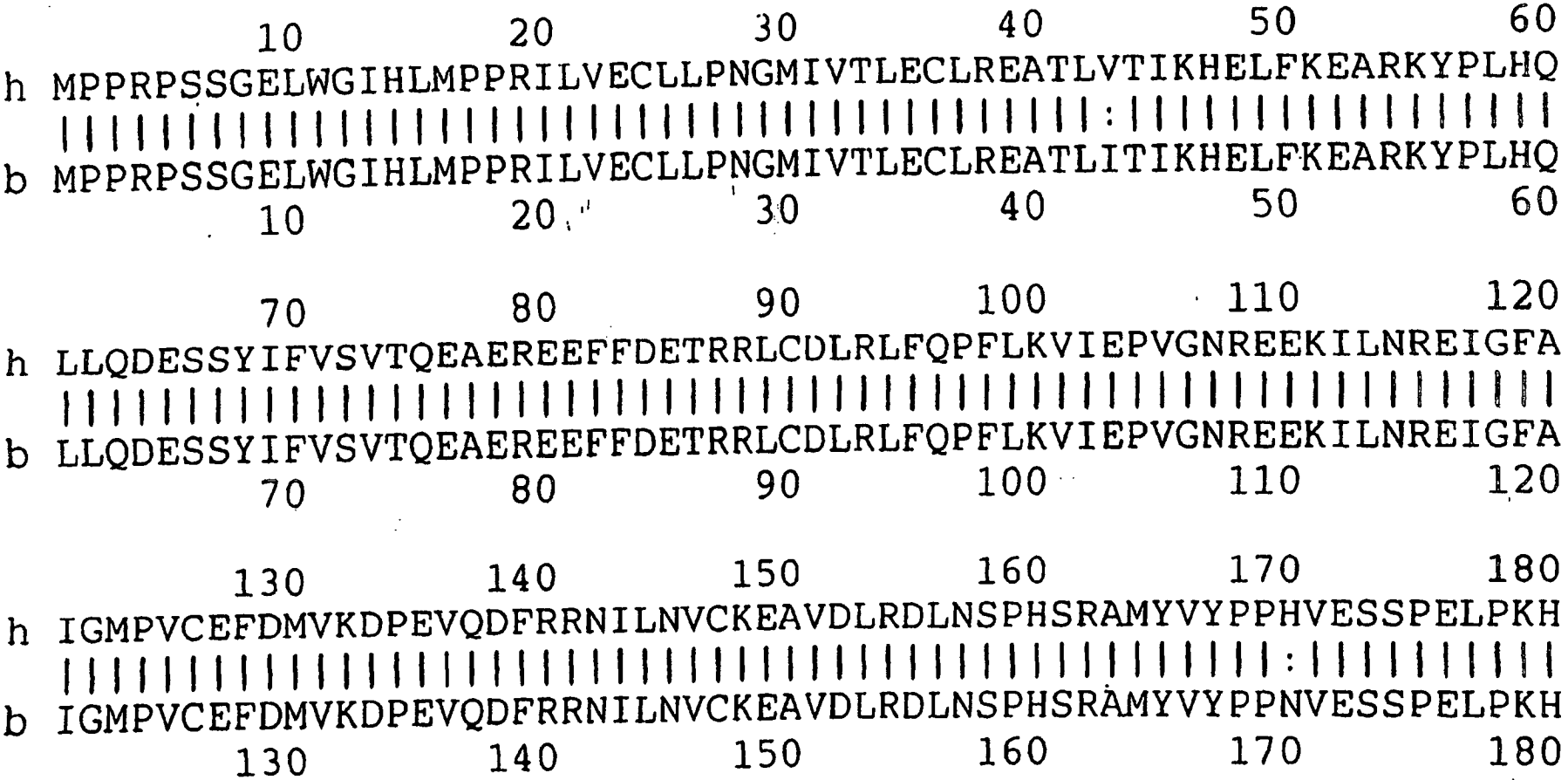
FIG.17 (Fortsetzung)

DE 693 34 113 T2 2007.10.31

```
3201 GAACTGAAAGATAACTGAGAAAATGAAAGCTCACTCTGGA
     |||||||
3201 GAACTGA.....................................
```

FIG.17 (Fortsetzung)

Die Angleichung zwischen menschlichen und Rinder-p110-Proteinen .



Figur 18

DE 693 34 113 T2 2007.10.31

```
          190        200        210        220        230        240
h IYNKLDRGQIIVVIWVIVSPNNDKQKYTLKINHDCVPEQVIAEAIRKKTRSMLLSSEQLK
  ||||||:|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
b IYNKLDKGQIIVVIWVIVSPNNDKQKYTLKINHDCVPEQVIAEAIRKKTRSMLLSSEQLK
          190        200        210        220        230        240

          250        260        270        280        290        300
h LCVLEYQGKYILKVCGCDEYFLEKYPLSQYKYIRSCIMLGRMPNLKMMAKESLYSQLPMD
  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||||||||||
b LCVLEYQGKYILKVCGCDEYFLEKYPLSQYKYIRSCIMLGRMPNLMLMAKESLYSQLPMD
          250        260        270        280        290        300

          310        320        330        340        350        360
h CFTMPSYSRRISTATPYMNGETSTKSLWVINRALRIKILCATYVNLNIRDIDKIYVRTGI
  |||||||||||||||||||||||||||||||:|||||||||||||:|||||||||||||||
b CFTMPSYSRRISTATPYMNGETSTKSLWVlNSALRIKILCATYVNVNIRDIDKIYVRTGI
          310        320        330        340        350        360
```

FIG. 18 (Fortsetzung)

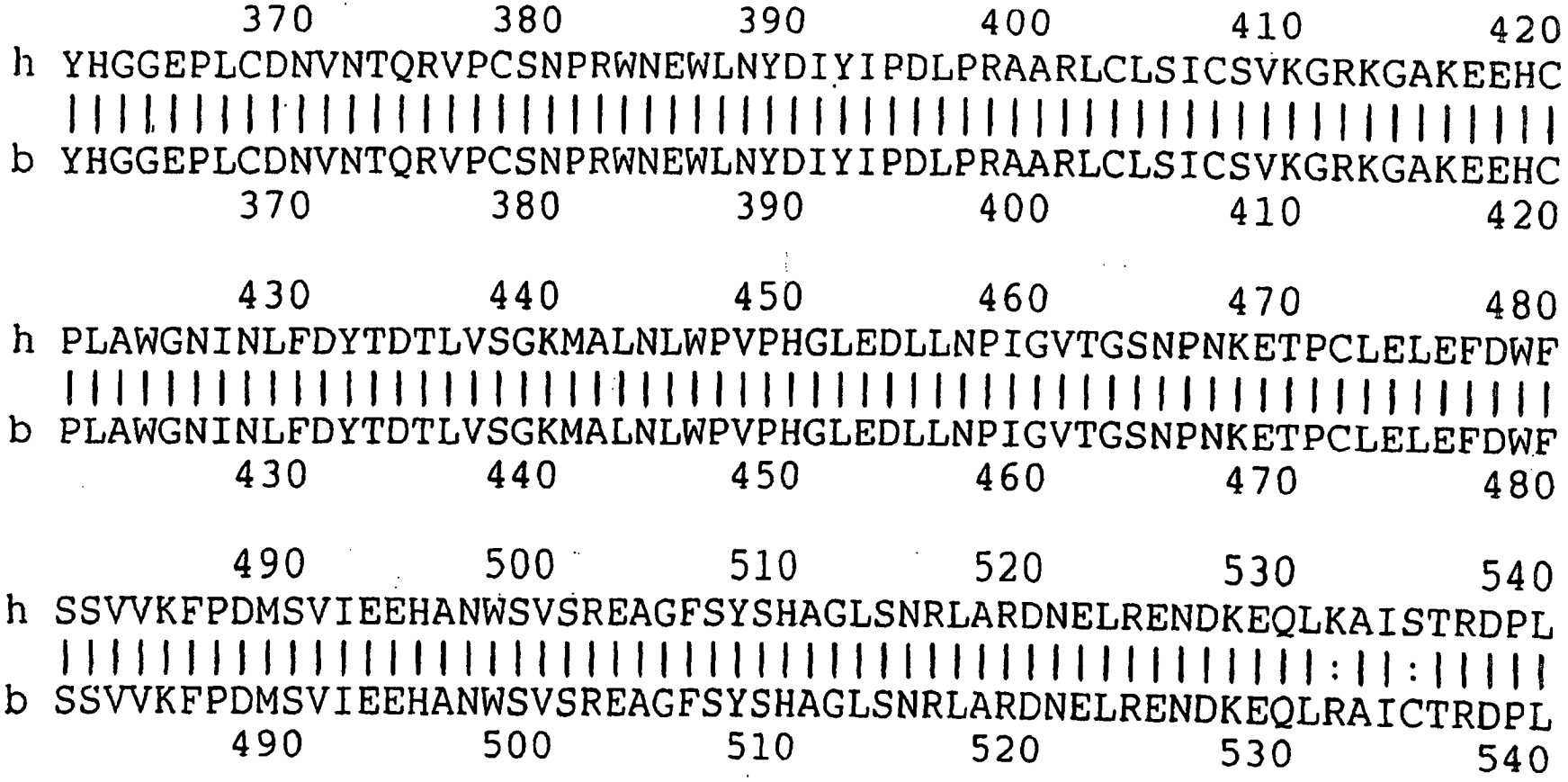


FIG. 18 (Fortsetzung)

DE 693 34 113 T2 2007.10.31

```
          550        560        570        580        590        600
h SEITEQEKDFLWSHRHYCVTIPEILPKLLLSVKWNSRDEVAQMYCLVKDWPPIKPEQAME
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
b SEITEQEKDFLWSHRHYCVTIPEILPKLLLSVKWNSRDEVAQMYCLVKDWPPIKPEQAME
          550        560        570        580        590        600

          610        620        630        640        650        660
h LLDCNYPDPMVRGFAVRCLEKYLTDDKLSQYLIQLVQVLKYEQYLDNLLVRFLLKKALTN
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
b LLDCNYPDPMVRGFAVRCLEKYLTDDKLSQYLIQLVQVLKYEQYLDNLLVRFLLKKALTN
          610        620        630        640        650        660

          670        680        690        700        710        720
h QRIGHFFFWHLKSEMHNKTVSQRFGLLLESYCRACGMYLKHLNRQVEAMEKLINLTDILK
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
b QRIGHFFFWHLKSEMHNKTVSQRFGLLLESYCRACGMYLKHLNRQVEAMEKLINLTDILK
          670        680        690        700        710        720
```

FIG. 18 (Fortsetzung)

```
          730        740        750        760        770        780
h QERKDETQKVQMKFLVEQMRRPDFMDALQGLLSPLNPAHQLGNLRLKECRIMSSAKRPLW
  ||:||||||||||||||||||||||||||:||||||||||||||:||||||||||||||
b QEKKDETQKVQMKFLVEQMRRPDFMDALQGFLSPLNPAHQLGNLRLEECRIMSSAKRPLW
          730        740        750        760        770        780

          790        800        810        820        830        840
h LNWENPDIMSELLFQNNEIIFKNGDDLRQDMLTLQIIRIMENIWQNQGLDLRMLPYGCLS
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
b LNWENPDIMSELLFQNNEIIFKNGDDLRQDMLTLQIIRIMENIWQNQGLDLRMLPYGCLS
          790        800        810        820        830        840

          850        860        870        880        890        900
h IGDCVGLIEVVRNSHTIMQIQCKGGLKGALQFNSHTLHQWLKDKNKGEIYDAAIDLFTRS
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
b IGDCVGLIEVVRNSHTIMQIQCKGGLKGALQF'NSHTLHQWLKDKNKGEIYDAAIDLFTRS
          850        860        870        880        890        900
```

FIG.18 (Fortsetzung)

```
          910        920        930        940        950        960
h CAGYCVATFILGIGDRHNSNIMVKDDGQLFHIDFGHFLDHKKKKFGYKRERVPFVLTQDF
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
b CAGYCVATFILGIGDRHNSNIMVKDDGQLFHIDFGHFLDHKKKKFGYKRERVPFVLTQDF
          910        920        930        940        950        960

          970        980        990       1000       1010       1020
h LIVISKGAQECTKTREFERFQEMCYKAYLAIRQHANLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIA
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
b LIVISKGAQECTKTREFERFQEMCYKAYLAIRQHANLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIA
          970        980        990       1000       1010       1020

         1030       1040       1050       1060       1070       1080
h YIRKTLALDKTEQEALEYFMKQMNDAHHGGWTTKMDWIFHTIKQHALNXKITEKMKAHSG
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
b YIRKTLALDKTEQEALEYFMKQMNDAHHGGWTTKMDWIFHTIKQHALNX
         1030       1040       1050       1060
```

FIG.18 (Fortsetzung)

Figur 19. Die prognostizierte Aminosäuresequenz der menschlichen p110-cDNA.

```
1     MPPRPSSGEL WGIHLMPPRI LVECLLPNGM IVTLECLREA TLVTIKHELF
51    KEARKYPLHQ LLQDESSYIF VSVTQEAERE EFFDETRRLC DLRLFQPFLK
101   VIEPVGNREE KILNREIGFA IGMPVCEFDM VKDPEVQDFR RNILNVCKEA
151   VDLRDLNSPH SRAMYVYPPH VESSPELPKH IYNKLDRGQI IVVIWVIVSP
201   NNDKQKYTLK INHDCVPEQV IAEAIRKKTR SMLLSSEQLK LCVLEYQGKY
251   ILKVCGCDEY FLEKYPLSQY KYIRSCIMLG RMPNLKMMAK ESLYSQLPMD
301   CFTMPSYSRR ISTATPYMNG ETSTKSLWVI NRALRIKILC ATYVNLNIRD
351   IDKIYVRTGI YHGGEPLCDN VNTQRVPCSN PRWNEWLNYD IYIPDLPRAA
401   RLCLSICSVK GRKGAKEEHC PLAWGNINLF DYTDTLVSGK MALNLWPVPH
451   GLEDLLNPIG VTGSNPNKET PCLELEFDWF SSVVKFPDMS VIEEHANWSV
```


DE 693 34 113 T2 2007.10.31

501 SREAGFSYSH AGLSNRLARD NELRENDKEQ LKAISTRDPL SEITEQEKDF

551 LWSHRHYCVT IPEILPKLLL SVKWNSRDEV AQMYCLVKDW PPIKPEQAME

601 LLDCNYPDPM VRGFAVRCLE KYLTDDKLSQ YLIQLVQVLK YEQYLDNLLV

651 RFLLKKALTN QRIGHFFFWH LKSEMHNKTV SQRFGLLLES YCRACGMYLK

701 HLNRQVEAME KLINLTDILK QERKDETQKV QMKFLVEQMR RPDFMDALQG

751 LLSPLNPAHQ LGNLRLKECR IMSSAKRPLW LNWENPDIMS ELLFQNNEII

801 FKNGDDLRQD MLTLQIIRIM ENIWQNQGLD LRMLPYGCLS IGDCVGLIEV

851 VRNSHTIMQI QCKGGLKGAL QFNSHTLHQW LKDKNKGEIY DAAIDLFTRS

901 CAGYCVATFI LGIGDRHNSN IMVKDDGQLF HIDFGHFLDH KKKKFGYKRE

951 RVPFVLTQDF LIVISKGAQE CTKTREFERF QEMCYKAYLA IRQHANLFIN

1001 LFSMMLGSGM PELQSFDDIA YIRKTLALDK TEQEALEYFM KQMNDAHHGG

1051 WTTKMDWIFH TIKQHALN*

FIG.19 (Fortsetzung)

Das menschliche PITR-c-Partial-cDNA-Nucleotid und die abgeleitete Aminosäuresequenz.

```
1   GGAGACGACTTGCGACAGGATCAACTTATTCTTCAAATCATTTCACTC
    GlyAspAspLeuArgGlnAspGlnLeuIleLeuGlnIleIleSerLeu

49  ATGGACAAGCTGTTACGGAAAGAAAATCTGGACTTGAAATTGACACCT
    MetAspLysLeuLeuArgLysGluAsnLeuAspLeuLysLeuThrPro

97  TATAAGGTGTTAGCCACCAGTACAAAACATGGCTTCATGCAGtTTATC
    TyrLysValLeuAlaThrSerThrLysHisGlyPheMetGlnPheIle

145 CAGTCAGTtCCTGTGGCTGAaGTTCTTGATACAGAGGGAAGCATTCAG
    GlnSerValProValAlaGluValLeuAspThrGluGlySerIleGln

193 AACTTTTTTAGAAAATATGCACCAAGTGAGAATGGGCCAAATGGGATT
    AsnPhePheArgLysTyrAlaProSerGluAsnGlyProAsnGlyIle

241 AGTGCTGAGGTCATGGACACTtACGTTAAAAGCTGTGCTGGATATTGC
    SerAlaGluValMetAspThrTyrValLysSerCysAlaGlyTyrCys

289 GTGATCACCTATATACTTGGAGTTGGAGACAGGCACCTGGATAACCTT
    ValIleThrTyrIleLeuGlyValGlyAspArgHisLeuAspAsnLeu
```

Figur 20

DE 693 34 113 T2 2007.10.31

```
337  TTGCTAACCcAAAACAGGCAAACTCTTCCACATCGATTTCGGcCAC
     LeuLeuThrLysThrGlyLysLeuPheHisIleAspPheGlyHis
```

FIG. 20 (Fortsetzung)

Das menschliche PITR-f-Partial-cDNA-Nucleotid und die abgeleitete Aminosäuresequenz.

```
1   GGGGATGACTTACGGCAGGACATGCTAACGCTGCAGATGATTCGCATC
    GlyAspAspLeuArgGlnAspMetLeuThrLeuGlnMetIleArgIle

49  ATGAGCAAGATCTGGGTCCAGGAGGGGCTGGACATGCGCATGGTCATC
    MetSerLysIleTrpValGlnGluGlyLeuAspMetArgMetValIle

97  TTCCGCTGCTTCTCCACCGGCCGGGGCAGAGGGATGGTGGAGATGATC
    PheArgCysPheSerThrGlyArgGlyArgGlyMetValGluMetIle

145 CCTAATGCTGAGACCCTGCGTAAGATCCAGGTGGAGCATGGGGTGACc
    ProAsnAlaGluThrLeuArgLysIleGlnValGluHisGlyValThr

193 GGCTCGTTCAAGGACCGGCCCCTGGCAGACCGGCTGCAGAAACACAAC
    GlySerPheLysAspArgProLeuAlaAspArgLeuGlnLysHisAsn

241 CCTGGGGAGGACGAGTATGAGAAGGCTGTGGaGAACTTTATCTACTCC
    ProGlyGluAspGluTyrGluLysAlaValGluAsnPheIleTyrSer

289 TGCGCTGGCTGCTGCGTGGCCACGTACGTCTTGGGCATCTGTGACCga
    CysAlaGlyCysCysValAlaThrTyrValLeuGlyIleCysAspArg
```

Figur 21

DE 693 34 113 T2 2007.10.31

337 CATAATGACAACATCATGCTGAAGACCACTGGTCACATGTTCCACATC
HisAsnAspAsnIleMetLeuLysThrThrGlyHisMetPheHisIle

385 GACTTCGGC
AspPheGly

FIG.21 (Fortsetzung)

Angleichung von menschlichem p110, menschlichen PI3-Kinase-verwandten Genen PITR-C und PITR-F sowie Hefe-PI3-Kinase VPS34.

Im oberen Fall sind Aminosäuren gezeigt, die in 3 oder mehr der Proteine konserviert sind. Die in die ATP-Bindung involvierten Reste sind unterstrichen.

```
           1                                                  50
 vps34     GDDLRQDqLvvQIIslMnellknEnvDLkLtPYkiLaTGpqeGaIEfIpN
 PITR-c    GDDLRQDqLiLQIIslMdkllrkEnLDLkLtPYkvLaTstkhGFmqfIqs
 hump110   GDDLRQDmLtLQIIriMeniwqnqgLDLrMlPYgcLsiGdcvGLIEvVrN
 PITR-f    GDDLRQDmLtLQmIriMskiwvqEgLDMrMviFrcFsTGrgrGMVEmIpN
Consensus  GDDLRQD-L-LQII--M------E-LDL---PY--L-TG---G-IE-I-N

           51                                                 100
 vps34     dtlasilskyhGIlGy.......LklhypdeNatlgVqgwvlDnFVkSCA
 PITR-c    vpvaevldtegsIqnf.......FrkYapseNgpngIsaevmDtYVkSCA
 hump110   shtimqiqckgGlkGalqfnshtLhqWlkdkNkge.IydaaiDlFtrSCA
 PITR-f    aetlrkiqvehGVtGs..fkdrpLadrlqkhNpgedeyekavEnFIySCA
Consensus  ----------GI-G--------L--------N----I-----D-FV-SCA
```

Figur 22

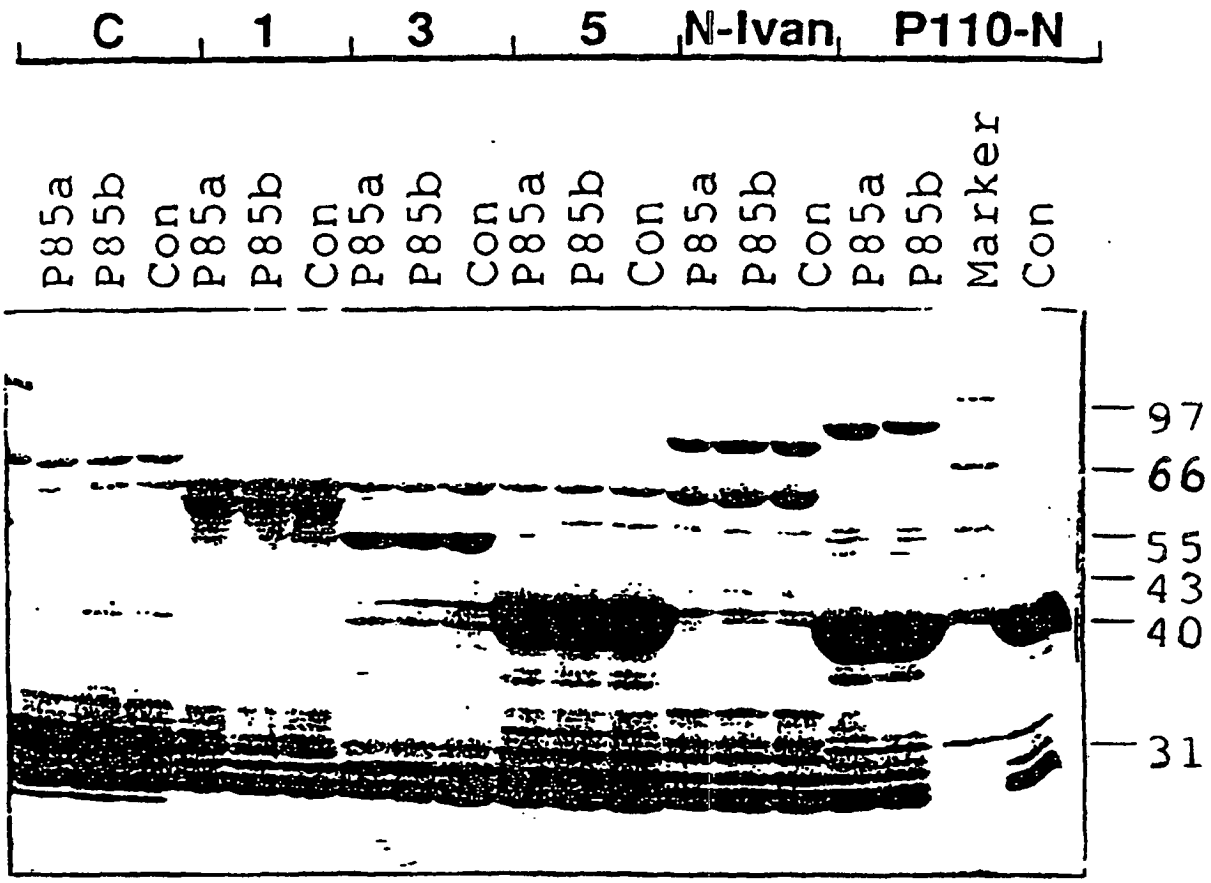
DE 693 34 113 T2 2007.10.31

```
           101                                  133
vps34      GYCViTYILGVGDRHlDNlLvtpdGhFFHaDFG
PITR-c     GYCViTYILGVGDRHlDNlLltktGkLFHIDFG
hump110    GYCVaTFILGIGDRHnsNiMvkddGqLFHIDFG
PITR-f     GCCVaTYVLGIcDRHnDNiMlkttGhMFHIDFG
Consensus  GYCV-TYILG-GDRH-DN------G-LFHIDFG
```

FIG. 22 (Fortsetzung)

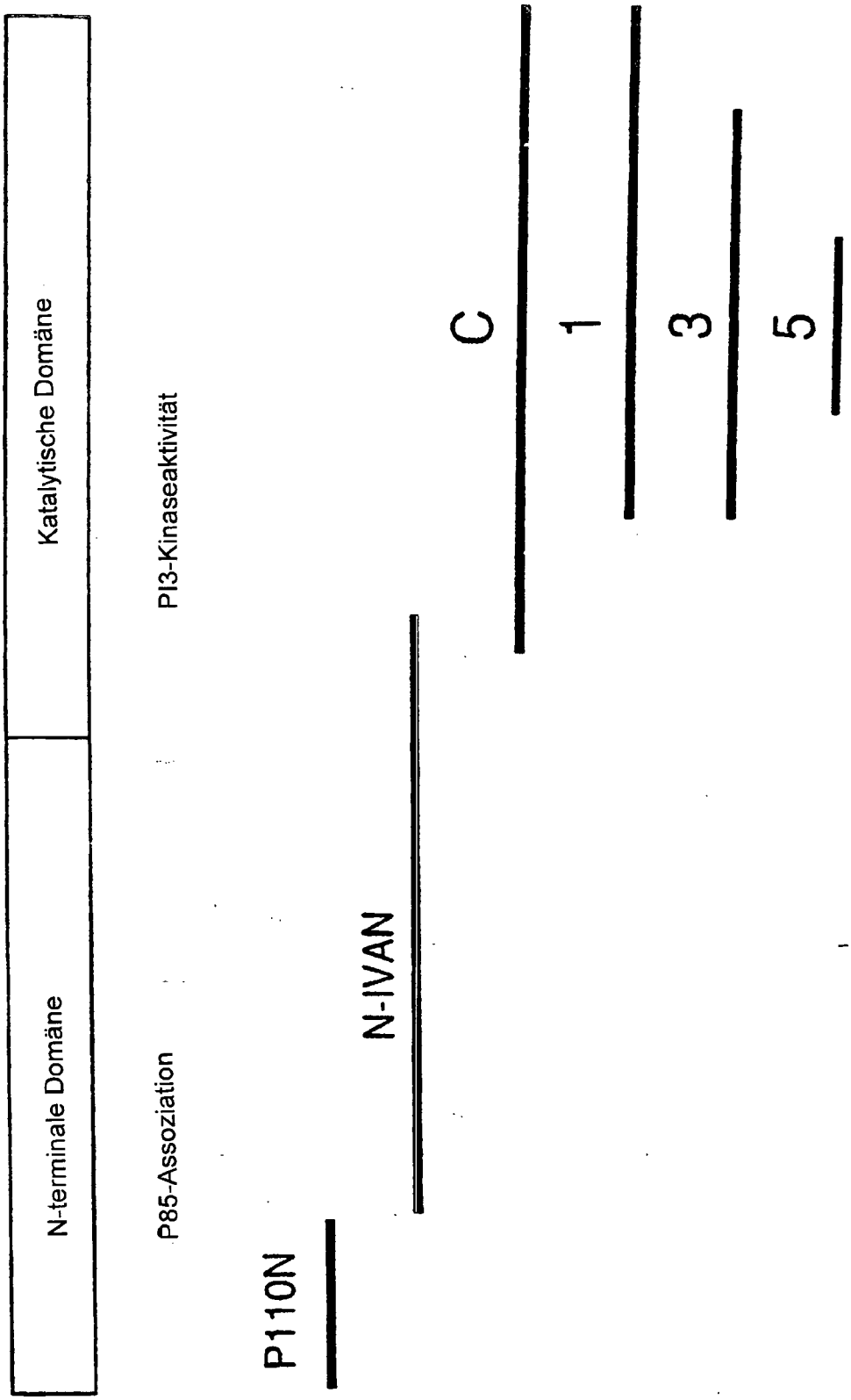
Figur 23 A

Kartierung der P85-Bindungsstelle auf P110



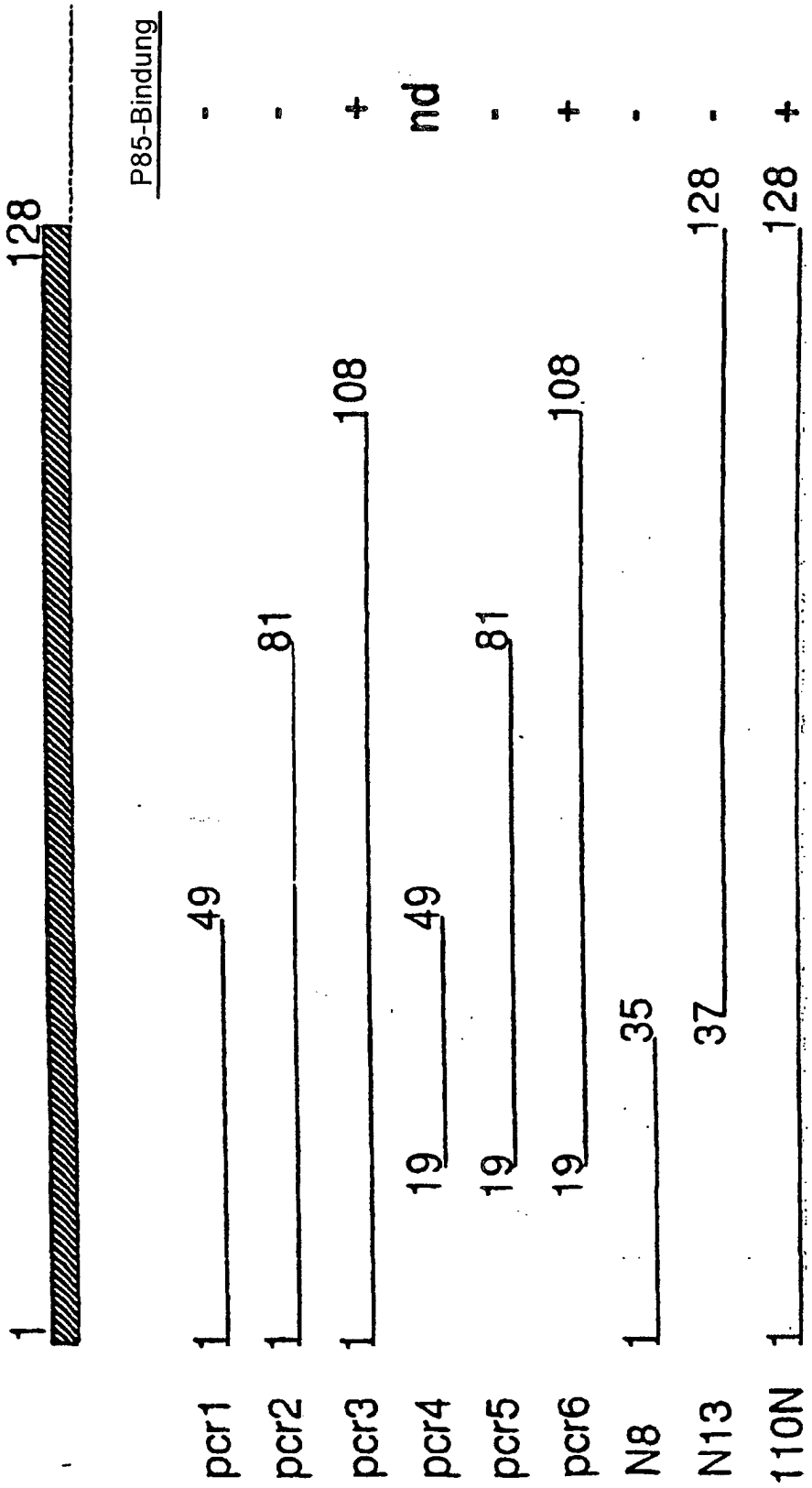
Figur 23 B

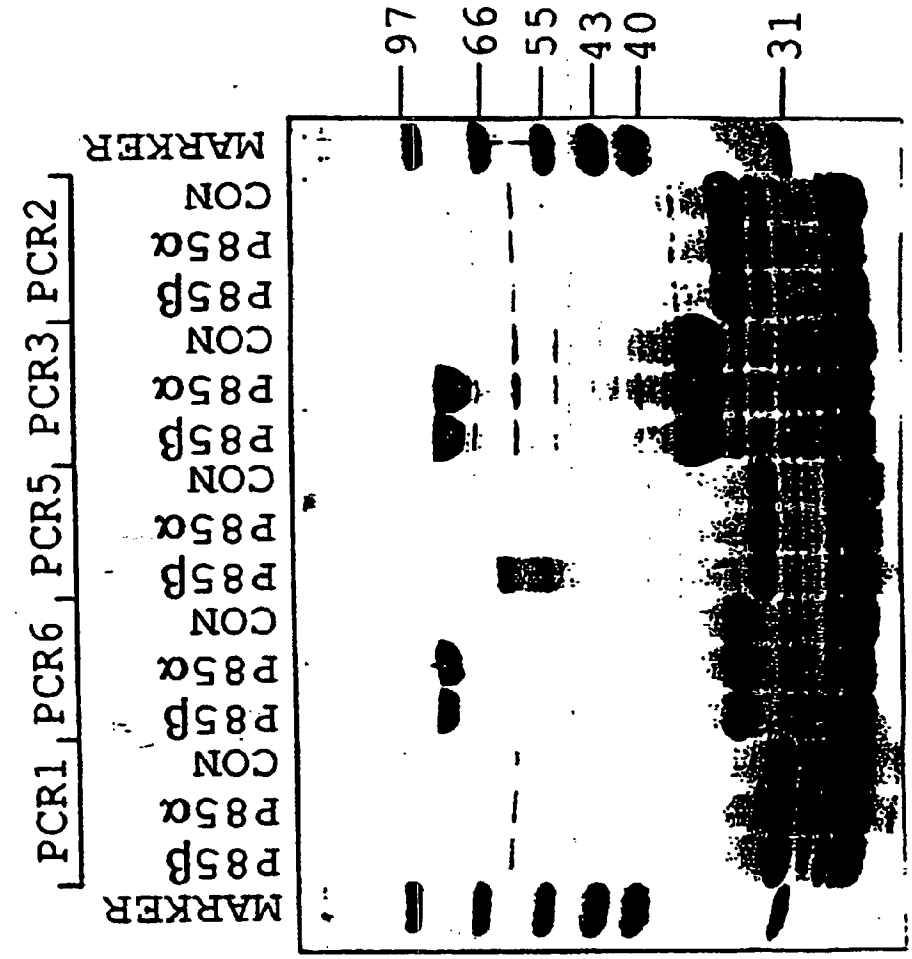
Lokalisierung der P85-Bindungsstelle auf P110



Figur 24

Kartierung der P85-Bindungsstelle auf P110





Figur 25 A

Kartierung der P85-Bindungsstelle auf P110

Figur 25 B

Kartierung der P85-Bindungsstelle auf P110 (2)

