

5 ERGEBNISSE

5.1 Sensitivität der Klasse I PI-3-Kinasen gegenüber verschiedenen Rezeptorklassen

Die Einteilung der Klasse I PI-3-Kinasen wird auf der Basis der nicht-katalytischen Untereinheit der heterodimeren Enzyme vorgenommen (Dekker und Segal, 2000). Während die p85-assoziierten p110 α , β und δ zur Klasse I_A gerechnet werden, bildet das p101/p110 γ -Dimer als bisher einziges Mitglied die Klasse I_B. Diese strukturelle Einteilung korrelierte bislang mit den funktionellen Eigenschaften der Klasse I PI-3-Kinasen, d.h. mit ihrer Sensitivität gegenüber Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Allerdings gab es auch Berichte, wonach nativ gereinigte p85-assoziierte PI-3-Kinasen durch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten stimuliert werden konnten (Thomason et al., 1994, Tang und Downes, 1997). Da bei der Reinigung aus nativem Gewebe eine Verunreinigung durch bis dahin noch unbekannte G $\beta\gamma$ -sensitive PI-3-Kinasen nicht ausgeschlossen wurde, war es erforderlich, die Übereinstimmung der strukturellen Einteilung der Klasse I PI-3-Kinasen mit den funktionellen Eigenschaften an rekombinant exprimierten, definierten Proteinen zu überprüfen.

Zu diesem Zweck wurden alle vier Mitglieder der Klasse I PI-3-Kinasen als heterodimere Enzyme in *Sf9*-Zellen exprimiert und hieraus gereinigt (Abb. 7).

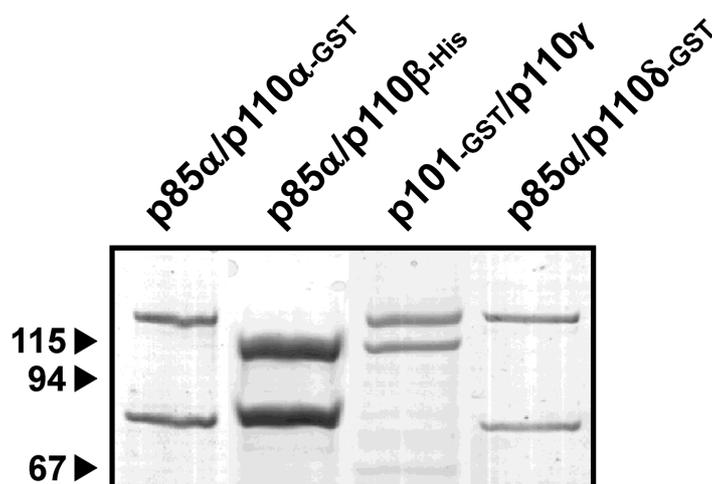


Abb. 7: Gereinigte Klasse I PI-3-Kinasen

Die heterodimeren PI-3-Kinasen α , β , γ und δ wurden, wie in den Methoden beschrieben, in *Sf9*-Zellen exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Die Proteine wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Bildrand markiert. Man beachte, daß das apparente Molekulargewicht der GST-fusionierten Untereinheiten (p110 α , p110 δ und p101) zu etwa 30 kDa höheren Werten verschoben ist.

Dabei konnten Berichte anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden, daß bei Koexpression der p110 α - zusammen mit der p85-Untereinheit die Menge des erhaltenen Proteins im Vergleich zum monomeren Enzym (p110 α) deutlich gesteigert wurde (Yu et al., 1998a,b). Darüber hinaus wurde ein analoges Verhalten für die Expression der ebenfalls p85-assoziierten Isoformen β und δ beobachtet. Im Gegensatz dazu konnten bei der p110 γ sowohl mit als auch ohne Koexpression der nicht-katalytischen p101-Untereinheit vergleichbare Proteinmengen gereinigt werden (nicht gezeigt). Es wurde jedoch ein stabilisierender Effekt der p101-Untereinheit beobachtet, da eine längere Lagerung des heterodimeren Enzyms ohne Aktivitätsverlust möglich war.

Alle vier gereinigten, heterodimeren Klasse I PI-3-Kinasen wurden auf ihre Sensitivität gegenüber G $\beta\gamma$ -Dimeren und RTKs untersucht. Da RTKs in gereinigter Form nur sehr schwer zugänglich sind, wurde als Surrogat ein p85-Bindungspeptid eingesetzt, dessen Sequenz aus dem PDGF-Rezeptor (*platelet-derived-growth-factor*) abgeleitet war (Stephens et al., 1994). Vergleichbar mit dem natürlichen Aktivierungsmechanismus des Rezeptors, mußten bei dem eingesetzten Peptid spezifische Tyr-Reste phosphoryliert sein, damit es einen stimulierenden Effekt auf die Klasse I PI-3-Kinasen hatte. Wie ihn Abb. 8A zu sehen ist, konnte nur das 2-fach Tyr-phosphorylierte Peptid (Tyr-P) die Aktivität der PI-3-Kinase α stimulieren, während das nicht-phosphorylierte Peptid keinen Effekt hatte. Ebenso war ohne die p85-Untereinheit keine Aktivierung der katalytischen p110 α -Untereinheit möglich.

Die Sensitivität aller vier PI-3-Kinasen gegenüber verschiedenen Signalwegen ist in Abb. 8B dargestellt. Wie zu erwarten war, konnte die PI-3-Kinase γ nur durch G $\beta\gamma$ -Komplexe aktiviert werden, während die PI-3-Kinasen α und δ ausschließlich nach Inkubation mit dem p85-Bindungspeptid eine Erhöhung der Enzymaktivität zeigten. Die Koinkubation mit beiden Stimuli führte nicht zu einer synergistischen Wirkung. Ganz anders verhielt sich die PI-3-Kinase β , bei der die Kostimulation zu einer synergistischen Aktivierung des Enzyms führte, wie es in zellbiologischen Ansätzen schon vermutet worden war (Kurosu et al., 1997). Interessanterweise stimulierte G $\beta\gamma$ auch in Abwesenheit des Tyr-phosphorylierten p85-Bindungspeptids die Aktivität der PI-3-Kinase β signifikant. Das Ausmaß dieser Aktivierung war mit der Wirkung von G $\beta\gamma$ auf die PI-3-Kinase γ vergleichbar, so daß die PI-3-Kinase β zu der ständig wachsenden Gruppe der G-Protein-regulierten Effektoren gezählt werden kann. Die G $\beta\gamma$ -Sensitivität der PI-3-Kinase β , als einzigem Vertreter der Klasse I_A PI-3-Kinasen, ist auch aus strukturellen Gesichtspunkten interessant, da die katalytischen Untereinheiten der PI-3-Kinasen β und δ mit 56 % zwar die größte Aminosäureidentität unter allen vier Klasse I PI-3-Kinasen aufweisen, aber dennoch unterschiedlich durch G $\beta\gamma$ stimulierbar sind. So lassen die Ergebnisse dieses Versuchs den Schluß zu, daß die strukturelle Verwandtschaft unter den Klasse I PI-3-Kinasen nicht mit ihrer Regulierbarkeit durch RTKs und G $\beta\gamma$ korreliert.

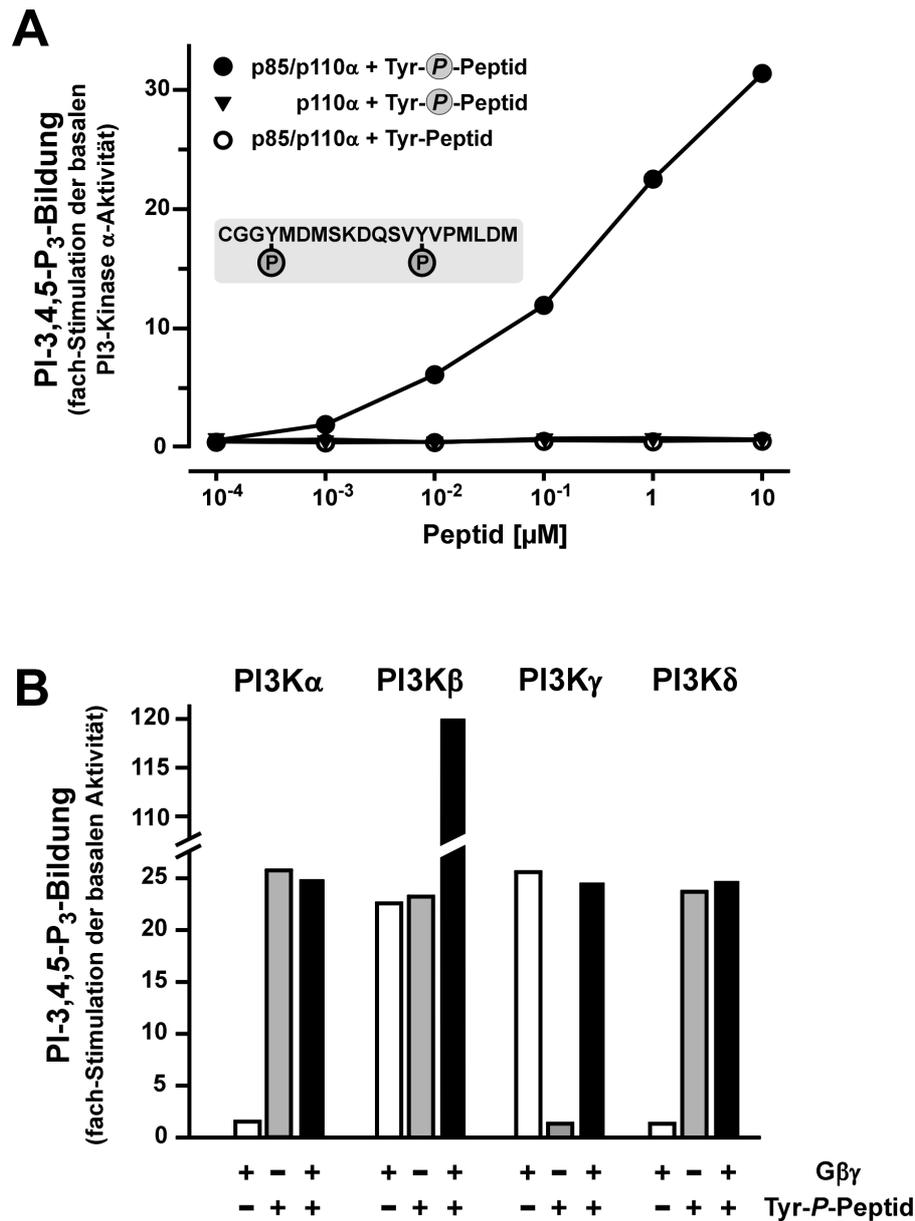


Abb. 8: Sensitivität von Klasse I PI-3-Kinasen gegenüber G $\beta\gamma$ und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

(A) Die heterodimere (p85/p110 α) bzw. monomere (p110 α) PI-3-Kinase α wurde mit steigenden Konzentrationen eines vom PDGF-Rezeptor abgeleiteten, zweifach Tyr-phosphorylierten p85-Bindungspeptids (Tyr-**P**-Peptid, grau unterlegt) bzw. des nicht-phosphorylierten Peptid (Tyr-Peptid) entsprechend den Angaben in den Methoden inkubiert. Dargestellt ist die Bildung von PI-3,4,5-P₃ als Vielfaches des Basalwertes. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus drei. (B) Die rekombinant gereinigten, heterodimeren PI-3-Kinasen α , β , γ , und δ wurden auf ihre Sensitivität gegenüber G $\beta\gamma$ (150 nM, weiße Säulen), dem p85-Bindungspeptid (Tyr-**P**-Peptid, 1 μ M, graue Säulen) bzw. beiden Stimuli gleichzeitig (schwarze Säulen) untersucht. Dargestellt ist die Bildung von PI-3,4,5-P₃ aus PI-4,5-P₂ als Vielfaches des Basalwertes. Die Stimulationen der PI-3-Kinasen β und γ durch G $\beta\gamma$ war in allen Experimenten zwischen 20- und 40-fach, während bei Koinkubation zusammen mit dem p85-Bindungspeptid stets fach-Stimulation von 100- bis 200-fach gemessen werden konnten. Die Basalaktivitäten lagen für die PI-3-Kinasen α , β und δ zwischen 0,023 und 0,067 mol \cdot min⁻¹ \cdot mol⁻¹ Enzym. Für die PI-3-Kinase γ wurde eine signifikant höhere Basalaktivität von 0,154 \pm 0,024 mol \cdot min⁻¹ \cdot mol⁻¹ Enzym gemessen. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus fünf.

5.2 Strukturelle Determinanten der $G\beta\gamma$ -Sensitivität der PI-3-Kinase β und γ

Seit der Entdeckung der $G\beta\gamma$ -Sensitivität der PI-3-Kinase γ (Stephens et al., 1994, Thomason et al., 1994) gab es widersprüchliche Befunde, welche strukturellen Grundlagen dafür die Ursache waren. Während einige Arbeitsgruppen die katalytische Untereinheit als $G\beta\gamma$ -sensitiv beschrieben (Stoyanov et al., 1995, Tang und Downes, 1997, Leopoldt et al., 1998), gibt es auch einen Bericht, in dem für die später gefundene nicht-katalytische p101-Untereinheit eine Funktion als $G\beta\gamma$ -Adaptor postuliert wurde (Stephens et al., 1997). Diese Annahme konnte jedoch nicht die $G\beta\gamma$ -Sensitivität von nativ gereinigten, p85-assoziierten PI-3-Kinasen erklären (Thomason et al., 1994, Okada et al., 1996, Tang und Downes, 1997). Aus den in Abb. 8 gezeigten Ergebnissen läßt sich schließen, daß hierfür die PI-3-Kinase β in Frage kommt.

Um nun näher einzugrenzen, welche Untereinheit für die $G\beta\gamma$ -Sensitivität der PI-3-Kinase β bzw. PI-3-Kinase γ verantwortlich war, wurden vergleichend Stimulationsversuche der heterodimeren (p85/p110 β bzw. p101/p110 γ) und monomeren (p110 β bzw. p110 γ) Kinasen mit $G\beta\gamma$ -Komplexen und dem p85-Bindungspeptid unternommen (Abb. 9).

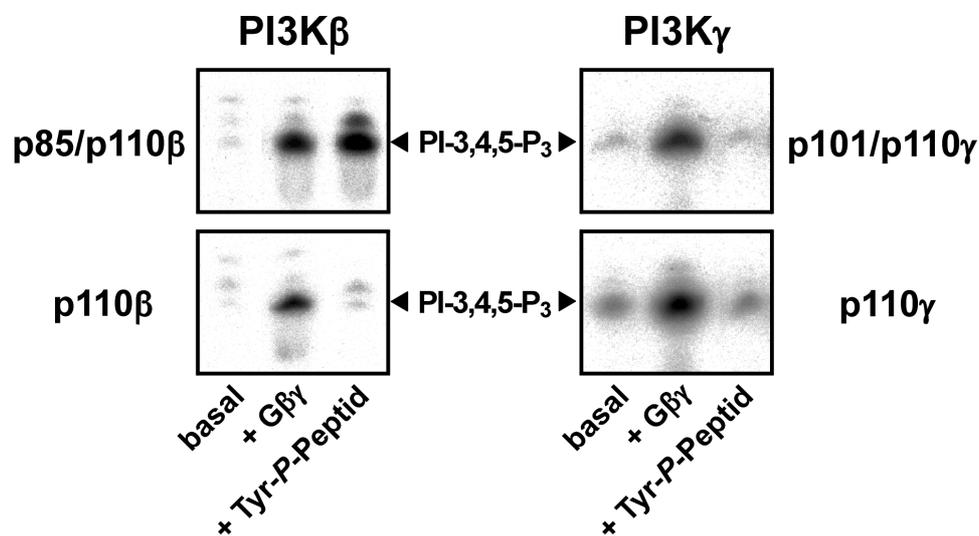


Abb. 9 Notwendigkeit der nicht-katalytischen Untereinheiten der PI-3-Kinase β und γ für die $G\beta\gamma$ -vermittelte Aktivierung

PI-3-Kinase β und PI-3-Kinase γ wurden in An- (p85/p110 β und p101/p110 γ) und Abwesenheit (p110 β und p110 γ) ihrer jeweiligen nicht-katalytischen Untereinheit auf ihre Sensitivität gegenüber $G\beta\gamma$ -Dimeren (150 nM) und einem p85-Bindungspeptid (Tyr-P-Peptid, 1 μ M) untersucht. Gemessen wurde die Bildung von PI-3,4,5-P₃ aus PI-4,5-P₂ unter basalen und stimulierten Bedingungen. Gezeigt ist das Autoradiogramm eines repräsentativen Versuchs von drei. Die erhaltenen Stimulationen lagen zwischen 20- und 40-fach bezogen auf den Basalwert.

Während die heterodimere PI-3-Kinase β sowohl durch $G\beta\gamma$ -Dimere als auch durch das p85-Bindungspeptid in ähnlichem Ausmaß aktiviert wurde, ging ihre Sensitivität gegenüber Tyrosin-Kinasen in Abwesenheit der p85-Untereinheit erwartungsgemäß verloren (Dhand et al., 1994a,b, Fruman et al., 1998). Im Gegensatz dazu konnte $G\beta\gamma$ unabhängig von p85 die Aktivität der katalytischen p110 β -Untereinheit stimulieren. Interessanterweise war die basale Aktivität der p110 β -Untereinheit mit $1,30 \pm 0,14 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ Enzym etwa um Faktor 25 höher als die des heterodimeren Enzyms ($0,05 \pm 0,01 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ Enzym), woraus geschlossen werden kann, daß die Assoziation der p110 β mit p85 eine Inhibition ihrer basalen Aktivität bewirkt. Dieser inhibierende Effekt der p85-Untereinheit wurde auch schon für die p110 α -Untereinheit beschrieben (Yu et al., 1998a,b; siehe auch 5.6.5).

Ein anderes Bild ergab sich bei der Analyse der PI-3-Kinase γ . Hier konnte eine p101-unabhängige $G\beta\gamma$ -Sensitivität beobachtet werden, während eine Stimulation durch das p85-Bindungspeptid erwartungsgemäß in keinem der beiden Fälle möglich war. Daß diese $G\beta\gamma$ -Effekte auch konzentrationsabhängig waren, zeigt Abb. 10.

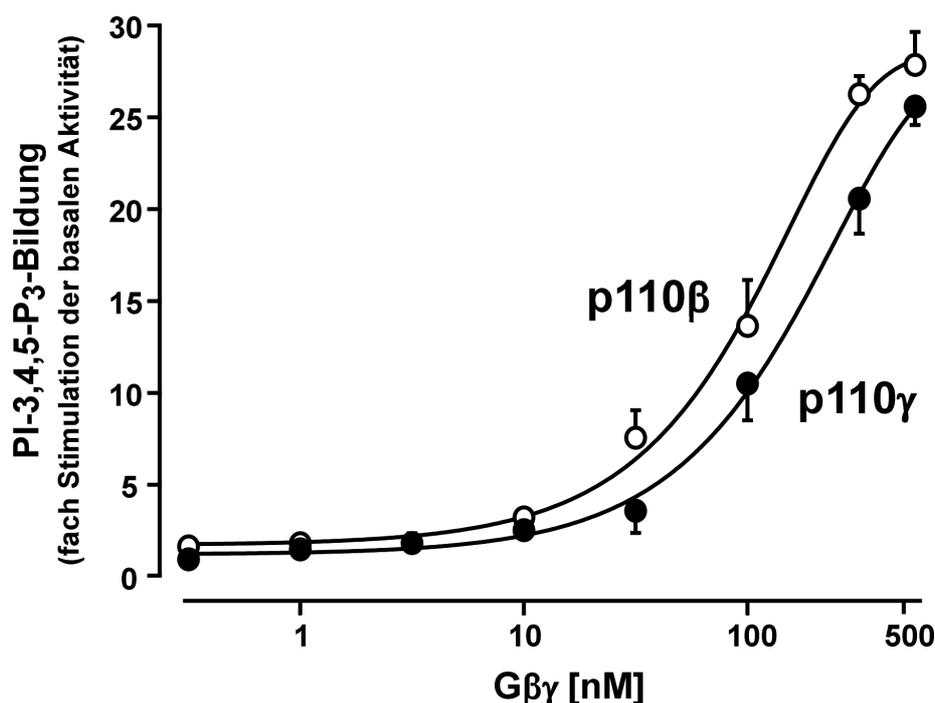


Abb. 10: Sensitivität der katalytischen Untereinheiten der PI-3-Kinase β und γ gegenüber $G\beta\gamma$

Rekombinant gereinigte p110 β -His (○) und p110 γ -GST (●) wurden mit steigenden Konzentrationen $G\beta\gamma_{\text{bov}}$ aktiviert. Die Isolation, Trennung und Quantifizierung von ^{32}P -markiertem PI-3,4,5- P_3 wurde entsprechend der Beschreibung in den Methoden durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm S.D., $n = 3$) der fach-Stimulation der PI-3,4,5- P_3 -Bildung bezogen auf die jeweilige basale Aktivität. Die Basalaktivitäten waren $1,30 \pm 0,14 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ p110 β -His bzw. $0,25 \pm 0,03 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ p110 γ -GST.

Die katalytische p110 β - und p110 γ -Untereinheit zeigten eine analoge Sensitivität gegenüber G $\beta\gamma$, wobei sowohl das Ausmaß der Stimulation als auch die EC₅₀-Werte (\approx 100-150 nM) von G $\beta\gamma$ für beide Enzympräparationen vergleichbar war.

Zusammenfassend läßt sich schließen, daß strukturelle Elemente für eine G $\beta\gamma$ -vermittelte Stimulation auf den katalytischen Untereinheiten der PI-3-Kinase β und γ lokalisiert sein müssen. Folglich ist die p101-Untereinheit kein notwendiger Adaptor für G $\beta\gamma$ -Dimere.

5.3 Funktion der p101-Untereinheit bei der G $\beta\gamma$ -vermittelten Stimulation der PI-3-Kinase γ

5.3.1 Bindung der p101- an die p110 γ -Untereinheit der PI-3-Kinase γ

Durch verschiedene Mutationsuntersuchungen war die Bindung von p85 an die p110-Untereinheiten der Klasse I_A PI-3-Kinasen α , β und δ auf deren erste 88-130 Aminosäuren im extremen N-Terminus eingegrenzt worden. Dieser Bereich weist bei den drei Isoformen eine sehr hohe Ähnlichkeit auf (Hu et al., 1993, Dhand et al., 1994a,b). Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß unmittelbar nach der Entdeckung der p101 als Bindungspartner für die katalytische Untereinheit der PI-3-Kinase γ vermutet wurde, daß die Assoziation der beiden Proteine in einem analogen Bereich erfolgt (Stoyanova et al., 1997). Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Bindung von p101 an eine um 97 N-terminale Aminosäuren verkürzte Mutante der p110 γ -Untereinheit untersucht (Abb. 11).

Überraschenderweise war die Bindung der p101-Untereinheit an die Deletionsmutante und an die „Wildtyp“-p110 γ -Untereinheit nahezu gleich. Daß es sich dabei tatsächlich um eine spezifische Bindung an Bereiche der p110 γ handelte, konnte dadurch belegt werden, daß weder eine Bindung der p101 an die Affinitäts-Matrix noch an den Glutathion-S-Transferase-Teil alleine beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß eine Bindung der p101 auch an Regionen außerhalb des extremen N-Terminus der p110 γ stattfindet. Diese Annahme wurde kürzlich durch Krugmann und Mitarbeiter (1999) unterstützt, die durch systematische Mutations- und Bindungsanalyse größere N-terminale Bereiche der p110 γ als Bindungsdomäne für die p101-Untereinheit identifizieren konnten.

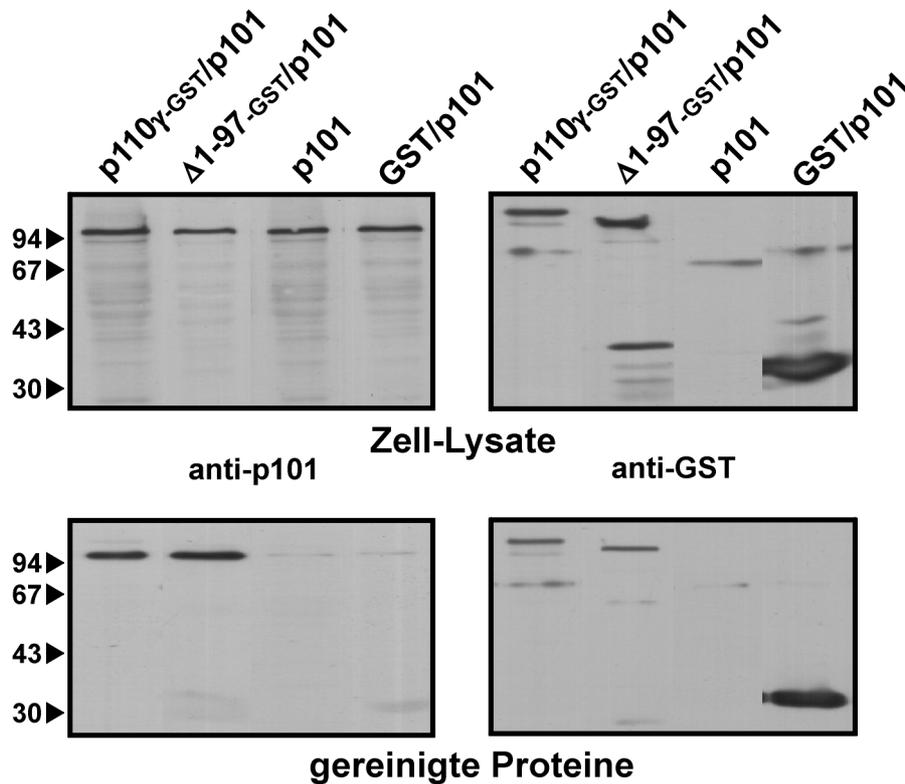


Abb. 11: Bindung der nicht-katalytischen p101- an die katalytische p110 γ -Untereinheit der PI-3-Kinase γ

Die p101-Untereinheit wurde zusammen mit einem Wildtyp-Konstrukt bzw. mit einem N-terminal deletierten Konstrukt (Δ 1-97) der p110 γ in *Sf9*-Zellen koinfiziert und über die an den Konstrukten der katalytischen Untereinheit fusionierte Glutathion-S-Transferase affinitätschromatographisch gereinigt. Zur Überprüfung der Bindungsspezifität wurde die p101 entweder alleine (p101) oder nur mit dem GST-Fusionsanteil (GST/p101) koexprimiert. Durch Immunoblot-Analyse der Zellysate mit spezifischen Antiseren gegen p101 bzw. GST wurde sichergestellt, daß vergleichbare Proteinmengen exprimiert wurden (oberer Teil). Anschließend wurden die GST-Fusionsproteine entsprechend den Angaben in den Methoden aufgereinigt. Die Eluat-Fractionen wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt, und durch Immunoblot-Analyse wurde gebundenes p101 (unten links) bzw. die gereinigten GST-Fusionsproteine (unten rechts) detektiert. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Bildrand markiert.

5.3.2 Affinität von PI-3-Kinase γ Untereinheiten für G $\beta\gamma$

Als nächstes wurde die Bindung von G $\beta\gamma$ -Komplexen an die beiden Untereinheiten der PI-3-Kinase γ untersucht. Eine ähnliche Analyse war in der Literatur zwar schon bekannt (Stephens et al., 1997), allerdings erschien aufgrund des Einsatzes anderer Affinitätsmarkierungen an den rekombinanten Untereinheiten eine Reproduktion dieser Ergebnisse sinnvoll (Abb. 12).



Abb. 12: Bindungsaffinität von $G\beta_1\gamma_2$ an die Untereinheiten der PI-3-Kinase γ

Die beiden Untereinheiten der PI-3-Kinase γ , p110 γ und p101, wurden jeweils als GST-Fusionsproteine mit $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ in *Sf9*-Zellen koexprimiert. Als Kontrolle diente die Koexpression der $G\beta\gamma$ -Untereinheiten mit Glutathion-S-Transferase (GST) alleine. Die Zellysate wurden auf eine ähnliche Expression der GST-Fusionsproteine sowie der $G\beta\gamma$ -Dimere durch Immunoblot-Analyse (anti-GST bzw. anti- $G\beta$) überprüft. Anschließend wurden die GST-haltigen Proteine, wie in den Methoden beschrieben, über eine Glutathion-Sepharose-Matrix gereinigt. Die eluierten Proteine wurden SDS-gelelektrophoretisch getrennt und durch Immunoblot-Analyse mit einem anti- $G\beta$ -Serum auf gebundene $G\beta\gamma$ -Dimere untersucht. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Bildrand markiert.

Während in dem literaturbekannten Versuch getrennt voneinander gereinigte PI-3-Kinase γ -Untereinheiten und $G\beta\gamma$ rekonstituiert wurden, kam hier ein Koreinigungsversuch zum Einsatz. Ein solcher Ansatz hat den Vorteil, daß sich die zu untersuchenden Komponenten schon während ihrer Verweildauer in der Zelle unter physiologischen Bedingung finden und präformieren können.

Die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes waren mit den publizierten Daten vergleichbar. Die nicht-katalytische p101-Untereinheit war stärker mit $G\beta\gamma$ assoziiert als die katalytische p110 γ -Untereinheit. Allerdings konnte dieses Ergebnis auch frühere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe bestätigen, in denen eine Bindung von $G\beta\gamma$ an die katalytische Untereinheit gezeigt worden war (Leopoldt et al., 1998).

5.3.3 *Mg²⁺-Abhängigkeit der Gβγ-vermittelten Stimulation der PI-3-Kinase γ*

Seit der Klonierung und ersten Charakterisierung der p101-Untereinheit gab es uneinheitliche Befunde verschiedener Arbeitsgruppen zu ihrer Funktion bei der Gβγ-vermittelten Stimulation der PI-3-Kinase γ (Stoyanov et al., 1995, Stephens et al., 1997, Tang und Downes, 1997, Leopoldt et al., 1998). Bei einem Vergleich dieser Arbeiten fielen Unterschiede in den experimentellen Details auf. Eine Differenz in den einzelnen Untersuchungen war die Verwendung unterschiedlicher Phospholipid-Substrate. Grundsätzlich können Klasse I PI-3-Kinasen *in vitro* PI, PI-4-P und PI-4,5-P₂ in der 3'-Position phosphorylieren, allerdings findet man in der Literatur hauptsächlich die Verwendung von PI bzw. PI-4,5-P₂. In unserer eigenen Arbeitsgruppe wurde für die bis zum Beginn dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ausschließlich das kostengünstigere PI als Phosphorylierungs-Substrat eingesetzt, wobei es in einzelnen Versuchen zum Ausfall der Gβγ-Aktivierbarkeit der PI-3-Kinase γ kam (Stoyanov et al., 1995, Leopoldt et al., 1998). Als ein weiterer Punkt wurden unterschiedliche Mg²⁺-Konzentrationen in den einzelnen Studien eingesetzt. Mg²⁺ spielt bei allen ATP-verbrauchenden Kinase-Reaktionen eine wichtige Rolle als Kofaktor. Eine Hauptaufgabe ist hierbei neben der orientierenden Wirkung die Abschirmung der negativ geladenen Phosphatgruppen von ATP. Dies ist notwendig, damit die Ladungen nicht die Elektronenpaare der angreifenden Nukleophile – besonders von Anionen – abstoßen. Bei einer Phosphorylierung von Phosphoinositiden kommt noch die Wechselwirkung mit den Phosphatgruppen des Lipid-Substrates hinzu.

Deshalb sollte zunächst eine genaue Analyse der Reaktionsparameter auf die Gβγ-vermittelte Stimulation der PI-3-Kinase γ erfolgen. Dazu wurden Gβγ-Stimulationsversuche der PI-3-Kinase γ in Anwesenheit von verschiedenen Mg²⁺-Konzentrationen durchgeführt. Um ein möglichst differenziertes Bild zu erhalten, wurde diese Abhängigkeit unter Variation des Phospholipid-Substrates und in An- und Abwesenheit der nicht-katalytischen p101-Untereinheit gemessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 13 dargestellt.

Bei Verwendung von PI-4,5-P₂ als Substrat konnte Gβγ die Enzymaktivität über einen breiten Mg²⁺-Bereich stimulieren (siehe Abb. 13 oben). Dieses Verhalten wurde durch die p101-Untereinheit kaum beeinflusst. Sowohl das heterodimere Enzym als auch die katalytische Untereinheit alleine wurden ab einer Mg²⁺-Konzentration von > 2,5 mM vergleichbar durch Gβγ aktiviert. Wurde dagegen PI als Substrat für die Phosphorylierung eingesetzt (siehe Abb. 13 unten), war eine Stimulation nur in einem schmalen Fenster von maximal ± 1 mM Mg²⁺ möglich. Die Lage dieses Fensters variierte von Versuch zu Versuch zwischen 8 und 10 mM Mg²⁺, wobei die Breite konstant blieb. Dies ist möglicherweise auf

den Herstellungsprozeß der Phospholipid-Vesikel zurückzuführen, der eine Ultraschallbehandlung einschließt und deshalb nicht immer das gleiche Ergebnis liefert. Eine höhere Mg^{2+} -Konzentration äußerte sich in einer erhöhten optischen Dichte der erhaltenen Suspension, so daß eine gewisse Variation der effektiven, freien Mg^{2+} -Konzentration wahrscheinlich nicht vermieden werden konnte.

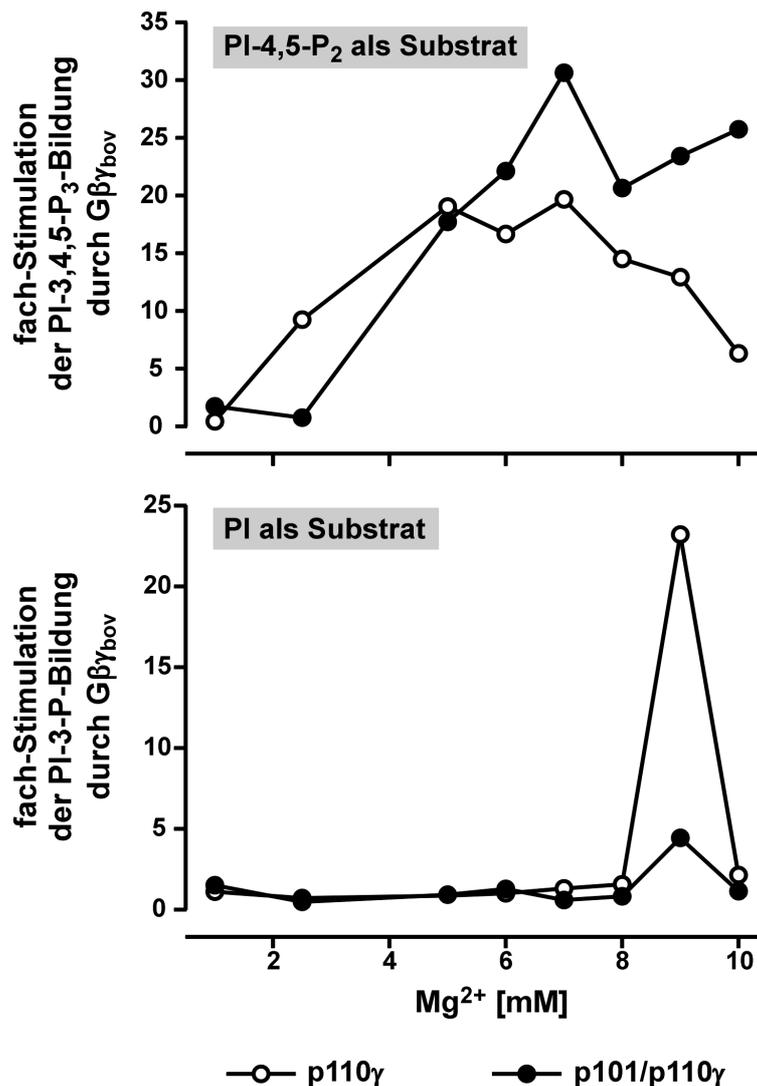


Abb. 13: Mg²⁺-Abhängigkeit der Gβγ-Stimulierbarkeit der PI-3-Kinase γ

PI-4,5-P₂ als Substrat. Gereinigte monomere p110γ-GST (○) bzw. heterodimere p101-GST/p110γ (●) wurden mit bovinen Gβγ-Komplexen (250 nM) in Anwesenheit der angegebenen Mg²⁺-Konzentrationen stimuliert. Gemessen wurde die Bildung von PI-3,4,5-P₃ aus PI-4,5-P₂ als Vielfaches der basalen enzymatischen Aktivität bei der jeweiligen Mg²⁺-Konzentration. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus vier. **PI als Substrat.** Hier wurden die identischen experimentellen Bedingungen wie für (A) verwendet, außer daß die Bildung von PI-3-P aus PI als Vielfaches des Basalwertes gemessen wurde. Die Stimulierbarkeit der PI-3-Kinase γ durch Gβγ war nur in einem schmalen Mg²⁺-Fenster zu beobachten, das eine Breite von ca. 1 mM Mg²⁺ aufwies und von Fall zu Fall zwischen 8 und 10 mM Mg²⁺ lag. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von sechs unabhängigen Untersuchungen, in denen drei verschiedene PI-3-Kinase γ-Präparationen zum Einsatz kamen.

Dennoch waren die Ergebnisse mit früheren Untersuchungen vergleichbar, in denen üblicherweise eine 20- bis 40-fache Stimulation für die katalytische p110 γ -Untereinheit alleine beobachtet worden war (Leopoldt et al., 1998). Die Befunde mit PI als Substrat konnten nun die beschriebenen Ausfälle der Stimulierbarkeit erklären, da konstant mit 10 mM Magnesium und PI als Substrat gearbeitet wurde (Leopoldt et al., 1998). Die Versuche zeigten aber auch, daß die Stimulierbarkeit der PI-Phosphorylierung signifikant von der Anwesenheit der p101-Untereinheit gehemmt wird. So wurde in allen unternommenen Versuchen eine maximale G $\beta\gamma$ -Stimulation der PI-Phosphorylierung auf das 6-fache des Basalwertes beobachtet. Dies war der erste Hinweis, daß die p101-Untereinheit die G $\beta\gamma$ -vermittelte Stimulation der p110 γ beeinflusste.

5.3.4 *G $\beta\gamma$ -Konzentrations-Abhängigkeit der PI-3-Kinase γ -Stimulation*

Die Kenntnis der geeigneten *in vitro*-Mg²⁺-Konzentrationen für jedes der eingesetzten Phospholipid-Substrate ermöglichte es nun, die G $\beta\gamma$ -Konzentrations-Abhängigkeit der PI-3-Kinase γ -Stimulation genauer zu untersuchen. Zunächst wurde die Enzymaktivität in An- und Abwesenheit der p101-Untereinheit unter basalen und stimulierten Bedingungen gemessen, wobei wiederum der Einfluß verschiedener Phospholipid-Substrate untersucht wurde. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 14 dargestellt.

Die zur Stimulation eingesetzten G $\beta\gamma$ -Konzentrationen von 30 nM entsprachen etwa der halb-maximal wirksamen Konzentration, wie sie schon von der eigenen Arbeitsgruppe für die Stimulation der PI-Phosphorylierung gefunden wurde (Leopoldt et al., 1998). So wurde die PI-3-P-Bildungs-Aktivität des monomeren Enzyms erwartungsgemäß durch 30 nM G $\beta\gamma$ signifikant stimuliert. Bei der heterodimeren PI-3-Kinase γ war jedoch der stimulierende Effekt von G $\beta\gamma$ deutlich geringer (Abb. 14 links). Dies stand im Einklang mit den bei der Mg²⁺-abhängigen Messung erhaltenen Daten, wo selbst die dort maximal wirksamen 250 nM G $\beta\gamma$ einen deutlich abgeschwächten Effekt auf das heterodimere im Vergleich zum monomeren Enzym zeigten. Ein konträres Bild ergab sich bei Verwendung von PI-4,5-P₂ als Substrat. Hier konnte G $\beta\gamma$ die PI-3,4,5-P₃-Bildungsrate der katalytischen p110 γ -Untereinheit nur dann stimulieren, wenn die p110 γ mit der p101-Untereinheit assoziiert war (Abb. 14 rechts). Interessanterweise konnte die Präferenz des heterodimeren Enzyms für PI-4,5-P₂, bzw. des monomeren für PI nur im G $\beta\gamma$ -stimulierten Zustand beobachtet werden. Im Basalzustand zeigten die monomere und heterodimere PI-3-Kinase γ eine vergleichbare Phosphorylierungs-Aktivität für das jeweilige Substrat. Ein hemmender Effekt der p101 auf die Aktivität der katalytischen p110 γ -Untereinheit, wie er von Stephens und Mitarbeitern (1997) beschrieben worden war, konnte nicht beobachtet werden. Allerdings war die basale

PI-Phosphorylierungs-Aktivität in beiden Fällen im Vergleich zur PI-4,5-P₂-Phosphorylierung etwa um den Faktor 2 erhöht.

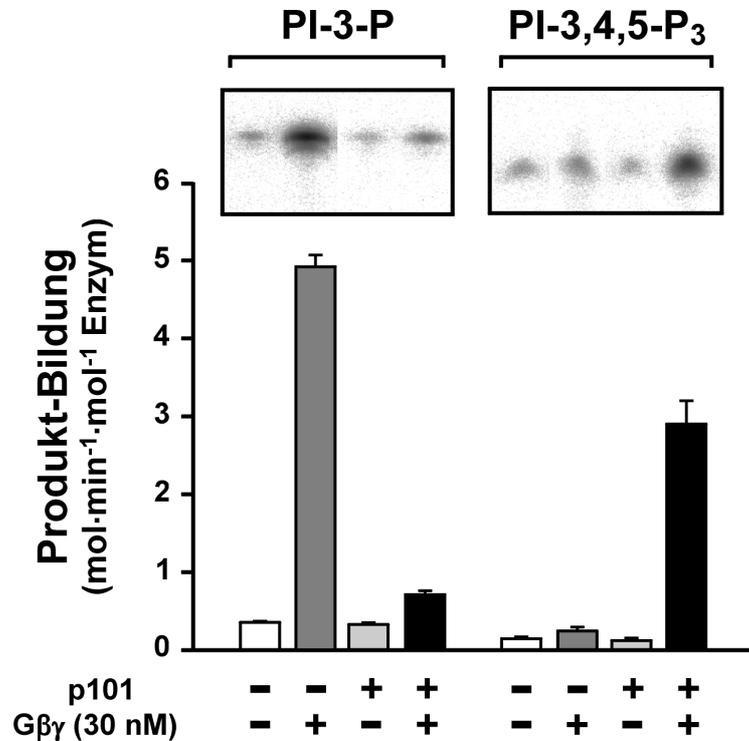


Abb. 14: Einfluß der p101-Untereinheit auf die Substratselektivität der Gβγ-stimulierten p110γ

Gereinigte rekombinante monomere („-“ p101) und heterodimere („+“ p101) PI-3-Kinase γ wurden jeweils mit 30 nM Gβγ stimuliert. Als Substrat wurde entweder PI (linker Teil, 9 mM Mg²⁺) oder PI-4,5-P₂ (rechter Teil, 7 mM Mg²⁺) eingesetzt. Die ³²P-markierten Reaktionsprodukte (PI-3-P bzw. PI-3,4,5-P₃) wurden, wie in den Methoden beschrieben, isoliert, getrennt und autoradiographisch quantifiziert. Gezeigt sind die Produktflecke eines repräsentativen Versuchs nach dünnschichtchromatographischer Trennung (oben) und Mittelwerte (± S.D.) von drei unabhängigen Versuchen (unten).

Da die PI-4,5-P₂-Selektivität der Gβγ-stimulierten PI-3-Kinase γ zwar bei 30 nM nicht aber bei 250 nM Gβγ zu beobachten war (vgl. Abb. 14 mit Abb. 13 oben), konnte vermutet werden, daß eine Abhängigkeit dieser Selektivität von der Gβγ-Konzentration bestand. Deshalb wurde die Stimulationsfähigkeit des monomeren und heterodimeren Enzyms in Abhängigkeit von der Gβγ-Konzentration unter Verwendung beider Substrate weiter untersucht (Abb. 15).

Bei Verwendung von PI als Substrat zeigte das monomere Enzym (p110γ) über den gesamten Gβγ-Konzentrationsbereich eine deutlich stärkere Stimulierbarkeit (siehe Abb. 15 oben). Die p101-Untereinheit hatte eine hemmende Wirkung auf die Gβγ-stimulierte Produktbildung, indem sie die Effizienz der Stimulierbarkeit, d.h. die maximale fach-Stimulation, nicht aber die Potenz, d.h. die halb-maximal wirksamen Gβγ-Konzentrationen, erniedrigte. Die ermittelten EC₅₀-Werte lagen für beide Enzympräparationen bei etwa 20 nM

und damit im Bereich der für die $G\beta\gamma$ -stimulierte PI-Phosphorylierung publizierten Werte (Parish et al., 1995, Leopoldt et al., 1998). Ein anderes Bild ergab sich bei der Verwendung von PI-4,5-P₂, wo beide Enzympräparationen durch $G\beta\gamma$ zwar mit gleicher Effizienz aber deutlich unterschiedlicher Potenz stimuliert wurden (siehe Abb. 15 unten). Während für die heterodimere PI-3-Kinase γ schon 5 nM $G\beta\gamma$ zur halb-maximalen Stimulation (EC₅₀) ausreichten, waren zur entsprechenden Aktivitätssteigerung der monomeren Form 100 nM notwendig. Im Unterschied zur PI-Situation war jedoch die maximale Stimulierbarkeit mit etwa 20- bis 30-fach für beide Enzympräparation gleich.

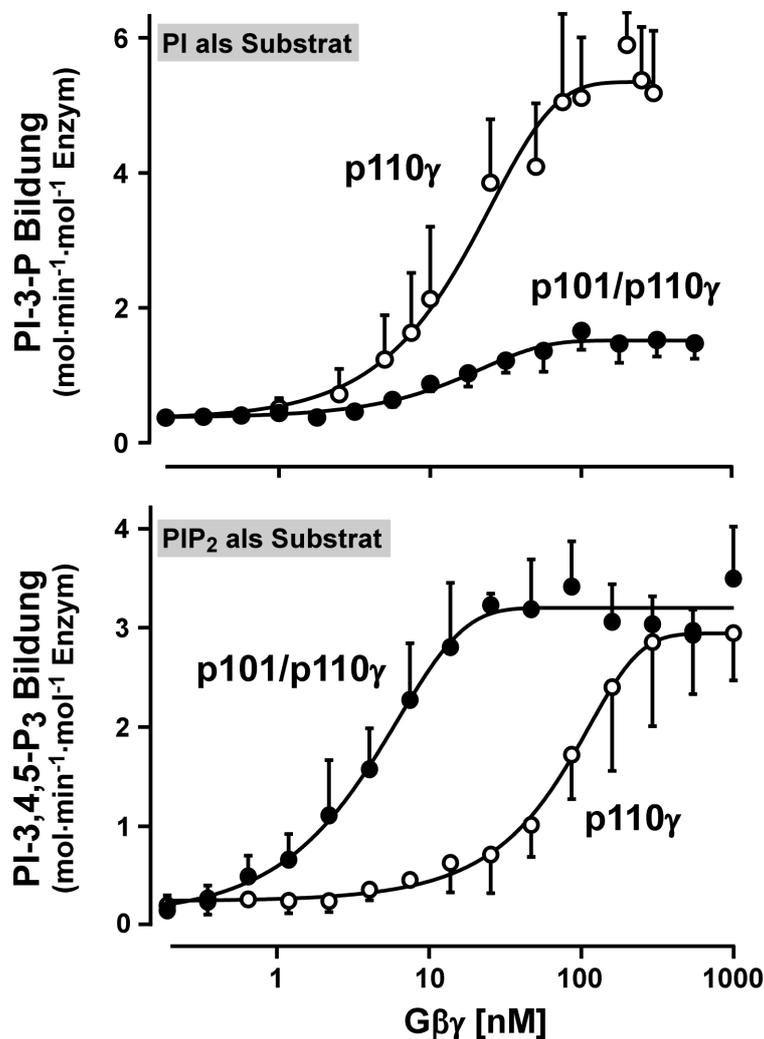


Abb. 15: $G\beta\gamma$ -Konzentrationsabhängigkeit der Substrat-Selektivität der PI-3-Kinase γ

Für das monomere (p110 γ , ○) bzw. das heterodimere (p101/p110 γ , ●) Enzym wurden $G\beta\gamma$ -Konzentrations-Wirkungs-Kurven aufgenommen. Dazu wurde die Bildung von PI-3-P aus PI (9 mM Mg²⁺, oben) bzw. PI-3,4,5-P₃ aus PI-4,5-P₂ (7 mM Mg²⁺, unten) in Abhängigkeit steigender Konzentrationen von bovinem $G\beta\gamma$ gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei Experimenten.

Demzufolge sorgt die p101-Untereinheit für eine PI-4,5-P₂-Präferenz der PI-3-Kinase γ , indem sie einerseits die G $\beta\gamma$ -induzierte PI-Phosphorylierung unterdrückt und andererseits die Stimulation der PI-3-Kinase γ in Anwesenheit von PI-4,5-P₂ durch Sensibilisierung der p110 γ für G $\beta\gamma$ erleichtert.

Vergleicht man die EC₅₀-Werte der G $\beta\gamma$ -vermittelten PI-3-Kinase γ -Stimulation mit Literaturdaten, so werden erhebliche Unterschiede deutlich. Für die G $\beta\gamma$ -stimulierte PI-4,5-P₂-Phosphorylierung wurden von anderen Arbeitsgruppen bisher Konzentrationen von 150 bis 300 nM G $\beta\gamma$ beschrieben, während für das monomere Enzym keine Stimulation detektiert werden konnte (Stephens et al., 1994, Thomason et al., 1994, Stephens et al., 1997, Tang und Downes, 1997). Ein Grund für die großen Differenzen könnte in den verwendeten G $\beta\gamma$ -Lösungen, insbesondere den darin enthaltenen Detergenzien, zu suchen sein. Aufgrund der hohen Konzentration (10 mg/ml) der in der vorliegenden Arbeit verwendeten G $\beta\gamma$ -Stammlösung war es möglich, durch ausreichende Verdünnung hemmende Effekte des G $\beta\gamma$ -Trägerpuffers auf die Enzymaktivität der PI-3-Kinase γ zu vermeiden (Leopoldt et al., 1998). Weitere kritische Faktoren für die Aktivität von G $\beta\gamma$ -Dimeren an Effektoren sind darüber hinaus die posttranslationalen Modifikationen der γ -Untereinheit (siehe auch 5.6). So wurde berichtet, daß vollständig methylierte G $\beta\gamma$ -Dimere im Vergleich zu den unmethylierten Proteinen eine bis zu 10-fach höhere stimulatorische Potenz an Effektoren wie z. B. der PLC- β_3 und der PI-3-Kinase γ besitzen (Parish et al., 1995).

Eine Frage, die sich nach der Interpretation dieser Ergebnisse sofort stellte, war, ob die Fähigkeit, die PI-4,5-P₂-Präferenz des Gesamtzyms zu bewirken, alleine auf die p101 beschränkt war, oder ob die p85-Untereinheit eine analoge Aufgabe bei der G $\beta\gamma$ -Stimulation der PI-3-Kinase β übernahm. Um dies zu klären, wurde die G $\beta\gamma$ -Stimulation der PI-4,5-P₂-Phosphorylierung von p110 β in An- und Abwesenheit der p85-Untereinheit gemessen (Abb. 16). Aus den beiden Konzentrations-Wirkungs-Kurven wird deutlich, daß die Assoziation der p110 β mit der p85-Untereinheit keinen Einfluß auf die Aktivierung durch G $\beta\gamma$ hatte. Weder die Effizienz noch die Potenz, mit der G $\beta\gamma$ die Enzymaktivität stimulierte, wurde signifikant verändert. Der EC₅₀-Wert lag in beiden Fällen bei etwa 100 nM G $\beta\gamma_{\text{bov}}$, was etwa dem Sensitivitäts-Bereich der monomeren p110 γ -Untereinheit entsprach (vgl. Abb. 10 und Abb. 15). Auch die Verwendung von PI als Substrat ergab das gleiche Bild mit fast unveränderten Werten (nicht gezeigt). Hieraus kann geschlossen werden, daß die Regulation der Substrat-Selektivität eine einzigartige Eigenschaft der p101-Untereinheit der PI-3-Kinase γ ist.

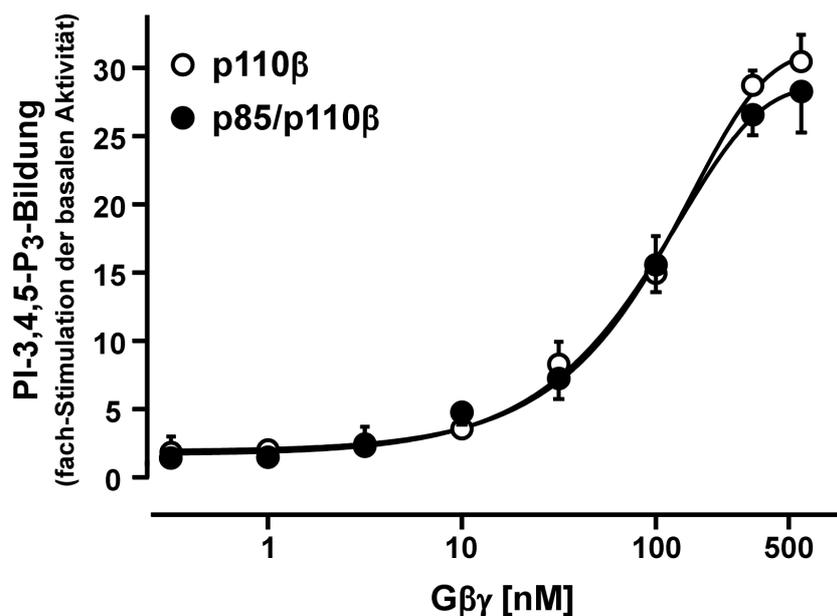


Abb. 16: Sensitivität der monomeren und heterodimeren PI-3-Kinase β gegenüber $G\beta\gamma$

Rekombinant gereinigte p110 β -His (○) und p85/p110 β -His (●) wurden mit steigenden Konzentrationen $G\beta\gamma_{\text{bov}}$ stimuliert. Die Isolation, Trennung und Quantifizierung von ^{32}P -markiertem PI-3,4,5- P_3 wurde entsprechend der Beschreibung in den Methoden durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm S.D., $n = 3$) der fach-Stimulation der PI-3,4,5- P_3 -Bildung bezogen auf die jeweilige basale Aktivität. Die Basalaktivitäten waren $1,30 \pm 0,14 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ p110 β -His bzw. $0,07 \pm 0,02 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ p85/110 β -His.

5.4 Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ

5.4.1 $G\beta\gamma$ -Sensitivität der Autophosphorylierung

Immer mehr Befunde deuten darauf hin, daß die Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität von PI-3-Kinasen eine eigene Signalqualität besitzt (Wymann und Pirola, 1998, Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999). So konnte z.B. für die PI-3-Kinase γ gezeigt werden, daß eine Lipidkinase-defiziente Mutante der p110 γ immer noch in der Lage war, MAPK-Signalwege zu induzieren (Bondeva et al., 1998). Allerdings ist der Mechanismus der Aktivierung der Proteinkinase-Aktivität und der Weitergabe des Signals an die entsprechenden direkten zellulären Substrate ungeklärt. Einziges bekanntes Substrat für die Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität war bislang die p110 γ -Untereinheit selbst, wobei die Autophosphorylierung nicht zu einer Beeinflussung der Lipidkinase-Aktivität der p110 γ führt (Stoyanova et al., 1997). Diese Untersuchungen wurden jedoch zu einer Zeit durchgeführt, als die p101-Untereinheit noch nicht bekannt war. So sollte hier zunächst die Frage geklärt werden, ob das heterodimere Enzym ein anderes Autophosphorylierungs-Verhalten zeigt als die p110 γ -Untereinheit alleine. Zu diesem Zweck wurde der Einbau von radioaktivem Phosphat in die p110 γ - bzw. p101-Untereinheit von gereinigten monomeren und heterodimeren PI-3-Kinase γ -

Präparationen untersucht. Gleichzeitig wurde geprüft, ob die radioaktive Markierung durch die Inkubation mit $G\beta\gamma$ -Komplexen gesteigert werden konnte (Abb. 17).

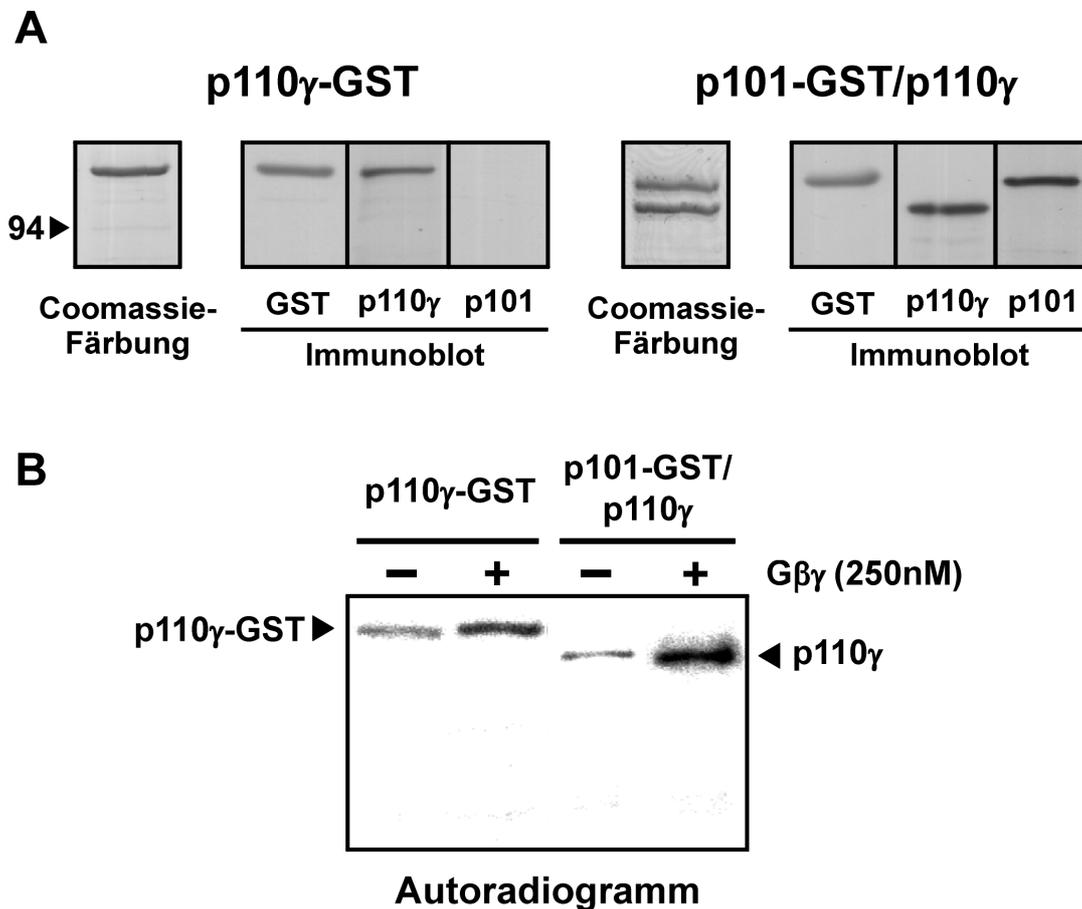


Abb. 17: Stimulation der Autophosphorylierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit durch $G\beta\gamma$

(A) Rekombinante p110 γ -GST bzw. p101-GST/p110 γ wurden in *Sf9*-Zellen exprimiert und aus der cytosolischen Fraktion affinitätschromatographisch gereinigt. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung bzw. Immunoblot-Analyse mit Hilfe spezifischer Antiseren detektiert. Man beachte, daß die katalytische Untereinheit im Falle der heterodimere exprimierten PI-3-Kinase γ ein niedrigeres Molekulargewicht aufweist als die p101-Untereinheit. Das relative Molekulargewicht eines 94 kDa schweren Markerproteins ist am linken Rand markiert. (B) Gereinigte monomere (p110 γ) und heterodimere (p101-GST/p110 γ) PI-3-Kinase γ wurden auf den Einbau von radioaktiv markiertem ^{32}P -Phosphat in An- (+) und Abwesenheit (-) von 250 nM bovinem $G\beta\gamma$ untersucht. Die Messung wurde entsprechend den Angaben in den Methoden durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine und anschließendem Transfer auf Nitrozellulose-Membranen. Der basale Einbau von ^{32}P -Phosphat in die katalytische Untereinheit war 36 und 24 mmol Phosphat pro mol p110 γ -GST bzw. p101-GST/p110 γ .

Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von p101 konnte jeweils nur eine radioaktive Bande detektiert werden (siehe Abb. 17B). Durch die Überlagerung mit der parallel durchgeführten Immunoblot-Analyse (siehe Abb. 17A) konnte die radioaktive Markierung in beiden Fällen der katalytischen p110 γ -Untereinheit zugeordnet werden. Daraus kann geschlossen werden, daß nur die p110 γ -, nicht aber die p101-Untereinheit phosphoryliert wurde. Die Inkubation mit 250 nM G $\beta\gamma$ führte sowohl für das monomere als auch für das heterodimere Enzym zu einem signifikant verstärkten Einbau von Radioaktivität in die katalytische Untereinheit (siehe Abb. 17B). Überraschenderweise konnte die Stimulation der Autophosphorylierung in initialen Experimenten nicht beobachtet werden. Erst die Anwesenheit von Phospholipid-Vesikeln ließ einen stimulierenden Effekt der G $\beta\gamma$ -Komplexe auf die PI-3-Kinase γ zu, wobei es unerheblich war, ob Lipidkinase-Substrate anwesend waren oder nicht (nicht gezeigt). Der Grund für die Notwendigkeit von Phospholipid-Vesikeln für die G $\beta\gamma$ -Stimulation der Proteinkinase-Aktivität könnte darin liegen, daß eine Präorientierung der Interaktionspartner auf der Oberfläche der Vesikel zu einer besseren Wechselwirkung führt.

5.4.2 Metall-Abhängigkeit der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase γ

Eine bekannte Eigenschaft von Proteinkinasen ist ihre mitunter auftretende Mn²⁺-Abhängigkeit *in vitro*. So ist vor allem die Aktivität von einigen Tyrosin-Kinasen in Anwesenheit von Mn²⁺ mindestens vergleichbar oder sogar stärker ausgeprägt als in Anwesenheit von Mg²⁺. Ser/Thr-Kinasen zeigen üblicherweise eine Präferenz für Mg²⁺, wobei auch hier schon einige Ausnahmen bekannt sind (Schinkmann et al., 1997, He et al., 1997). Diese Ausnahmen schließen die unmittelbaren Verwandten der PI-3-Kinase γ , die PI-3-Kinase α , β und δ , mit ein. Alle drei zeigen nur in Anwesenheit von Mn²⁺-Ionen eine signifikante *in vitro*-Proteinkinase-Aktivität, die in allen Fällen die Stimulation der Lipidkinase-Aktivität verhindert (Carpenter et al., 1993, Dhand et al., 1994a,b, Roche et al., 1998, Vanhaesebroeck et al., 1999).

Um die Metall-Abhängigkeit die PI-3-Kinase γ näher zu untersuchen, wurde die Autophosphorylierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit in Anwesenheit von Mg²⁺ oder Mn²⁺ gemessen. Zusätzlich wurde für jede der eingesetzten Metallionen-Konzentrationen auch ein G $\beta\gamma$ -stimulierter Wert ermittelt, um zu prüfen, inwieweit die G $\beta\gamma$ -induzierte Stimulation der Proteinkinase-Aktivität von der Art und Konzentration der Metallionen beeinflusst wird (Abb. 18).

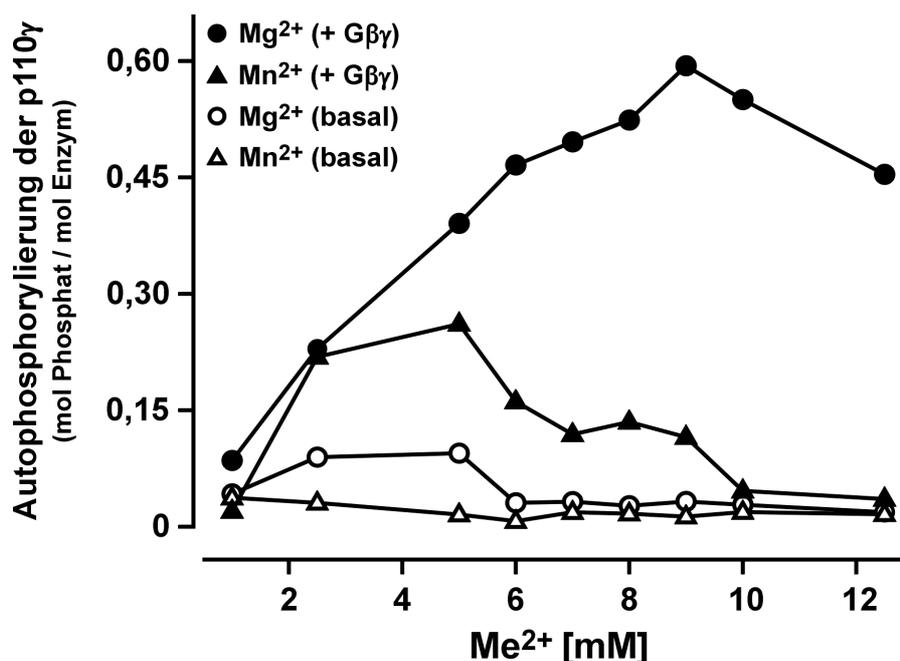


Abb. 18: Metall-Abhängigkeit der PI-3-Kinase γ -Autophosphorylierung

Die Autophosphorylierung von gereinigter heterodimerer PI-3-Kinase γ wurde in Anwesenheit der angezeigten Mg^{2+} (Kreise) bzw. Mn^{2+} -Konzentrationen (Dreiecke) gemessen. Der Einbau von ^{32}P -markiertem Phosphat in die katalytische Untereinheit wurde zusätzlich in An- (leere Symbole) und Abwesenheit (gefüllte Symbole) von 250 nM bovinem $G\beta\gamma$ entsprechend der Beschreibung in den Methoden gemessen. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes von zwei.

Aus den Ergebnissen wurde deutlich, daß die PI-3-Kinase γ als einziges Mitglied der Klasse I PI-3-Kinasen keine Mn^{2+} -Abhängigkeit der Proteinkinase-Aktivität zeigt. Sowohl im basalen als auch im $G\beta\gamma$ -stimulierten Zustand war in Anwesenheit von Mg^{2+} ein stärkerer Einbau von Phosphat in die katalytische $p110\gamma$ -Untereinheit zu beobachten. Darüber hinaus erlaubten beide Kationen eine Stimulation durch $G\beta\gamma$, die jedoch in Anwesenheit von Mg^{2+} stärker ausgeprägt war. Interessanterweise waren die Mg^{2+} -Konzentrationen vergleichbar, die für eine optimale $G\beta\gamma$ -induzierte Stimulation der Proteinkinase- und PI-4,5- P_2 -Phosphorylierungs-Aktivität benötigt wurden (6 bis 9 mM, vgl. auch Abb. 13). Dies deutet darauf hin, daß die hier *in vitro* charakterisierbare Stimulation der Proteinkinase-Aktivität auch unter physiologischen Bedingungen stattfinden kann. Diese Annahme fällt bei den Klasse I_A PI-3-Kinasen α , β und δ schwer, da in Zellen die Konzentration von Mg^{2+} die an Mn^{2+} bei weitem überwiegt.

5.4.3 Einfluß der p101-Untereinheit auf die $G\beta\gamma$ -vermittelte Stimulation der p110 γ -Autophosphorylierung

Wie schon für die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ wurde nun auch für Proteinkinase-Aktivität der Einfluß der p101-Untereinheit auf die $G\beta\gamma$ -vermittelte Stimulation der Autophosphorylierung untersucht. Dazu wurde das monomere und heterodimere Enzym mit steigenden Mengen $G\beta\gamma$ stimuliert (Abb. 19).

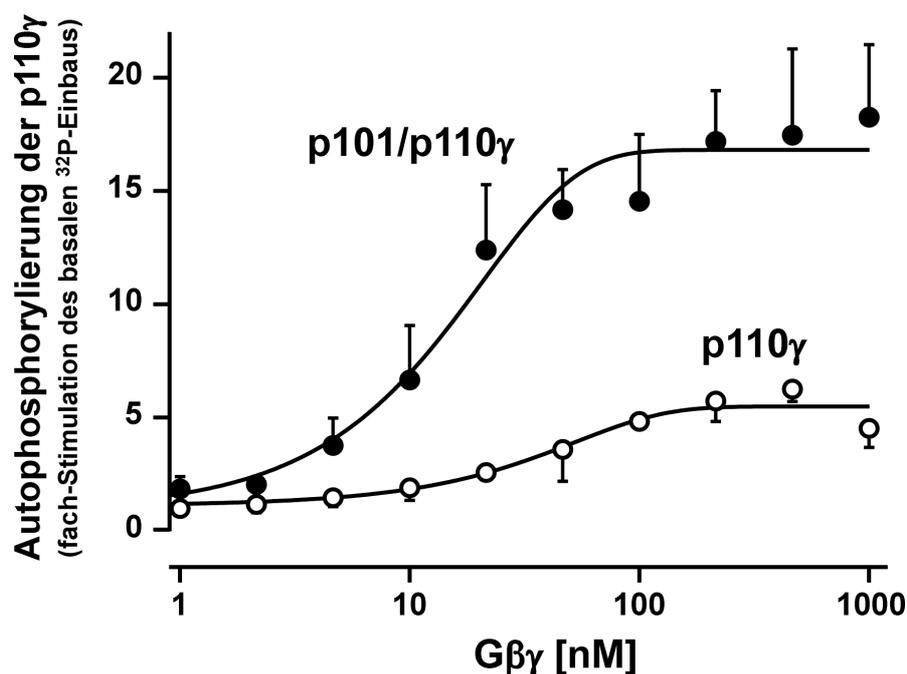


Abb. 19: Verstärkung der $G\beta\gamma$ -stimulierten p110 γ -Autophosphorylierung durch die p101-Untereinheit

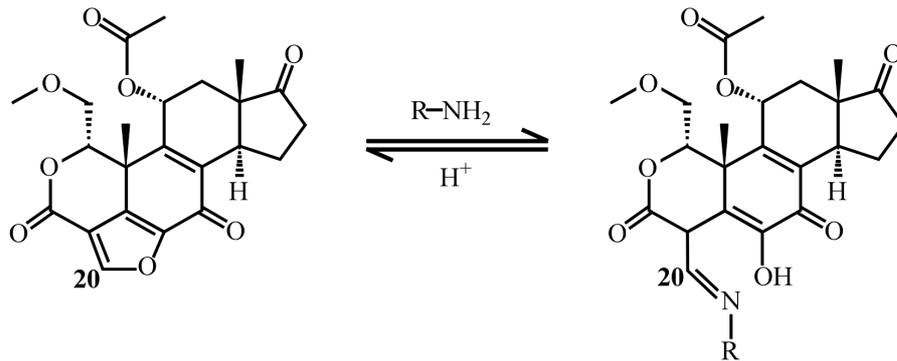
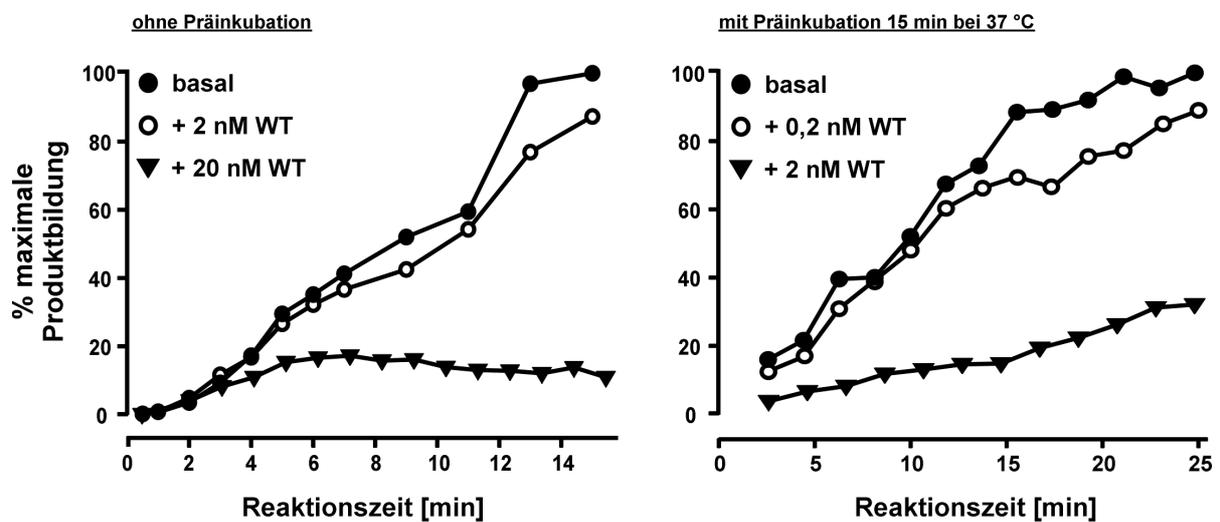
Die Proteinkinase-Aktivität von monomerer (p110 γ , ○) bzw. heterodimerer (p101/p110 γ , ●) PI-3-Kinase γ wurde mit steigenden Konzentrationen von bovinem $G\beta\gamma$ stimuliert. Dazu wurde der Einbau von ^{32}P -markiertem Phosphat in die katalytische p110 γ -Untereinheit als Vielfaches des Basalwertes gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm S.D.) aus je vier unabhängigen Experimenten.

Aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven ist zu erkennen, daß die Anwesenheit der p101-Untereinheit die Effizienz der $G\beta\gamma$ -stimulierten Autophosphorylierung verstärkte. In beiden Fällen lagen die EC_{50} -Werte in einem mit der PI-4,5-P₂-Phosphorylierung vergleichbaren Bereich, nämlich ca. 18 nM für das heterodimere bzw. 30 nM für das monomere Enzym.

5.5 Wortmannin-Sensitivität der PI-3-Kinase γ

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die nicht-katalytische p101-Untereinheit bei der Stimulation der PI-3-Kinase γ eine wichtige Rolle spielt (siehe 5.3), sollte nun geklärt werden, inwieweit sie einen Einfluß auf die Hemmung der Enzymaktivität durch Wortmannin hat. Wortmannin ist ein Metabolit aus *Penicillium*-Stämmen, der in niedrigen nanomolaren Konzentrationen als selektiver PI-3-Kinase-Inhibitor eingesetzt wird. Dabei zeigt es die stärksten hemmenden Effekte auf die Klasse I PI-3-Kinasen. Diese Eigenschaften wurden schon in zahlreichen Untersuchungen ausgenutzt, um PI-3-Kinase-abhängige Signalwege zu identifizieren (Ui et al., 1995, Hazeki et al., 1996, Galetic et al., 1999). Sogar einzelnen Mitgliedern der Klasse I PI-3-Kinasen konnten so bestimmte Wirkungen zugeordnet werden (Zhang et al., 1996a).

Der Mechanismus der Hemmung beruht auf der kovalenten Modifikation eines spezifischen Lys-Restes, der innerhalb eines hoch konservierten IFK-Motivs in der katalytischen Domäne aller vier Klasse I PI-3-Kinasen lokalisiert ist (Wymann et al., 1996, Stoyanova et al., 1997). Dabei kommt es bei Wortmannin zur Öffnung des Furanrings an C-20 unter Bildung eines Enamins. Dieses Enamin steht im tautomeren Gleichgewicht mit einer Schiff'schen Base, die bei physiologischen pH-Werten sehr stabil ist (Abb. 20A). Der kovalente Hemmungsmechanismus könnte auch ein Ursache für die großen Unterschiede in den publizierten IC_{50} -Werten sein, die zwischen 2 und 40 nM schwanken (Stephens et al., 1994, Stoyanova et al., 1997, Tang und Downes, 1997, Leopoldt et al., 1998). Daher sollte zunächst eine Analyse der Reaktionsbedingungen erfolgen, um möglichst reproduzierbare Werte zu erhalten (Abb. 20B). Hierzu wurde die Hemmung der PI-3-Kinase γ -Aktivität in Abhängigkeit von der Reaktionszeit gemessen, wobei zusätzlich der Einfluß der Präinkubation der Kinase mit Wortmannin untersucht wurde. Im linken Teil von Abb. 20B sieht man, daß die Inkubationszeit einen Einfluß auf die Hemmung der Kinase durch Wortmannin hat. Während der ersten zwei Minuten lief der Produktzuwachs bei allen drei Konzentrationen noch parallel, doch ab drei Minuten wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der mit 20 nM Wortmannin gehemmten Probe deutlich niedriger, bis sie bei etwa 6-7 min ganz zum Stillstand kam. Die Probe, die mit 2 nM Wortmannin inkubiert wurde, zeigte nur eine sehr geringe Hemmung.

A**B****Abb. 20: Zeitabhängige Hemmung der PI-3-Kinase γ -Aktivität durch Wortmannin**

(A) Vereinfachte Darstellung der Reaktion von Wortmannin mit Proteinen. Klasse I PI-3-Kinasen reagieren mit einem spezifischen Lys-Rest (R-NH₂) im katalytischen Zentrum mit der C-20-Position von Wortmannin unter Bildung eines Enamins. Dieses tautomerisiert zu einer bei physiologischen pH-Werten stabilen Schiff'schen Base (nach Nakanishi und Mitarbeitern, 1995). (B) Die basale Aktivität der heterodimeren PI-3-Kinase γ wurde mit den angegebenen Konzentrationen von Wortmannin (WT) gehemmt. Die Reaktion wurde unmittelbar nach Zugabe des Enzyms zu den Wortmannin-haltigen Phospholipid-Vesikeln gestartet und die PI-4,5-P₂-Phosphorylierung bei 37 °C gemessen (oben). Nach den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion entsprechend der Angaben in den Methoden gestoppt, und die Produkte wurden isoliert und quantifiziert. Im unteren Teil ist das Ergebnis eines analogen Versuchs dargestellt, außer daß hier das Enzym vor der Messung der PI-4,5-P₂-Phosphorylierungs-Aktivität für 15 min bei 37 °C mit WT präinkubiert wurde. Dargestellt ist in beiden Fällen die [%] der maximalen Enzymaktivität, die bei der jeweils längsten Zeit der ungehemmten Probe gemessen wurde.

Ein anderes Bild ergab sich bei 15-minütiger Präinkubation bei 37 °C vor der eigentlichen Messung (siehe Abb. 20B rechts). Hier hatte 2 nM Wortmannin etwa die gleiche hemmende Wirkung auf die Aktivität der PI-3-Kinase γ wie 20 nM ohne vorherige Präinkubation. Allerdings beobachtete man in diesem Fall keine Sättigung der Produktbildung, da vermutlich 2 nM Wortmannin nicht genügte, um die eingesetzte Kinasemenge vollständig kovalent zu modifizieren. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die IC₅₀-Werte für die Hemmung von

PI-3-Kinasen durch Wortmannin nur in Verbindung mit der Angabe der Inkubationszeiten und -Temperaturen Vergleiche untereinander zulassen.

Zur Untersuchung des Einflusses der p101-Untereinheit auf die Wortmannin-Hemmbarkeit der PI-3-Kinase γ wurde nun die Versuchsanordnung mit 15-minütiger Präinkubation bei 37 °C gewählt. Entsprechend dieser Methodik wurde die katalytische p110 γ -Untereinheit und das heterodimere Enzym mit steigenden Konzentrationen von Wortmannin gehemmt. Zur Untersuchung einer eventuellen Substratabhängigkeit wurde die Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit PI und PI-4,5-P₂ als Phospholipid-Substrat aufgenommen (Abb. 21). Die IC₅₀-Werte für das heterodimere Enzym lagen, unabhängig vom Substrat, im Bereich von 3,1 - 4,1 nM Wortmannin. Die Inhibition des monomeren Enzyms konnte schon bei etwas niedrigeren Konzentrationen beobachtet werden (0,75 - 1,75 nM). Dies deutet darauf hin, daß die p101-Untereinheit entweder das Enzym stabilisiert oder den Angriff von Wortmannin sterisch behindern kann, obwohl Wortmannin und die p101-Untereinheit an verschiedene Bereiche der katalytischen Untereinheit binden. So modifiziert Wortmannin Lys⁷⁹⁹ in der C-terminalen katalytischen Domäne, während größere N-terminale Bereiche für die p101-Untereinheit verantwortlich sind. Dennoch konnte gezeigt werden, daß die Deletion von mehr als 100 N-terminalen Aminosäuren zum Verlust der Wortmannin-Bindungs-fähigkeit führt (Wymann et al., 1996, Stoyanova et al., 1997).

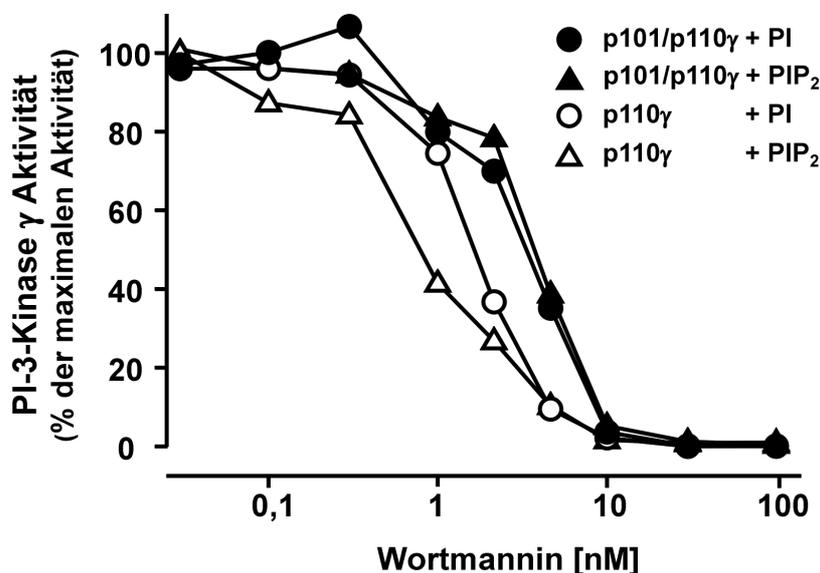


Abb. 21: Einfluß der p101-Untereinheit auf die Wortmannin-Sensitivität der PI-3-Kinase γ

Die basale enzymatische Aktivität der katalytischen p110 γ -Untereinheit (leere Symbole) und des heterodimeren Enzyms (gefüllte Symbole) wurde mit steigenden Konzentrationen von Wortmannin gehemmt. Als Substrat wurde entweder PI (Kreise) oder PI-4,5-P₂ (Dreiecke) eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei.

5.6 Untersuchung der G β -Isoformspezifität der PI-3-Kinase β und $-\gamma$

5.6.1 Charakterisierung der endogenen G $\beta\gamma$ -Komplexe aus Sf9-Zellen

Um die Spezifität der PI-3-Kinase β und $-\gamma$ für bestimmte G β -Isoformen zu untersuchen, wurden verschiedene G β -Untereinheiten mit G γ_2 und G α_{i1} -His in Sf9-Zellen koinfiziert und durch eine kombinierte Affinitäts- und Untereinheitenaustausch-Chromatographie gereinigt. Die G γ_2 -Untereinheit wurde deshalb gewählt, da sie in früheren Studien am besten in der Lage war, mit G β funktionelle Dimere zu bilden (Yan et al., 1996, Zhang et al., 1996b, Lindorfer et al., 1998). In Abb. 22 ist zu erkennen, daß von allen G β -Isoformen vergleichbare Proteinmengen exprimiert wurden. Die gelelektrophoretische Analyse zeigte auch, daß die Reinheit der so erhaltenen rekombinanten G $\beta_x\gamma_2$ -Komplexe nicht ausreichen würde, um eine Untersuchung der G β -Isoformspezifität durchzuführen. Neben den gewünschten Banden der einzelnen G β -Isoformen konnte zusätzlich noch eine Proteinbande bei 35 kDa angefärbt werden, die etwa der Laufhöhe von G β_1 entsprach.

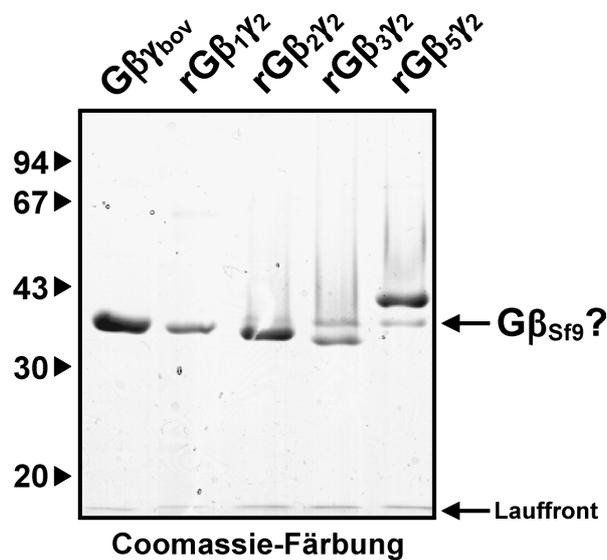


Abb. 22: Gelelektrophoretische Charakterisierung affinitätschromatographisch gereinigter, rekombinante G $\beta\gamma$ -Komplexe

Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren infiziert, die für G α_{i1} -His, G γ_2 und die jeweilige G β -Isoform kodierten. Die Proteine wurden durch kombinierte Affinitäts- und Untereinheitenaustausch-Chromatographie entsprechend der Beschreibung in den Methoden gereinigt. Die mit AMF-haltigem Puffer eluierten Proteine wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch anschließende Färbung mit Coomassie Brilliant Blue detektiert. Zum Laufhöhenvergleich wurde zusätzlich aus Rinderhirn gereinigtes G $\beta\gamma$ aufgetragen (ganz links). Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Bildrand markiert.

Die Vermutung, daß es sich dabei um mitgereinigtes endogenes $G\beta\gamma_{Sf9}$ handelte, lag nahe, da die rekombinanten $G\beta\gamma$ -Komplexe ($rG\beta_x\gamma_2$) bei diesem Reinigungsverfahren keine exogene Affinitätsmarkierung besaßen, sondern über ihre Affinität zu der koexprimierten Hexa-Histidin-markierten $G\alpha_{i1}$ -Untereinheit isoliert wurden. Auch schon von anderen Arbeitsgruppen war eine Kontamination von rekombinant exprimierten $G\beta\gamma$ -Dimeren mit endogenem $G\beta\gamma_{Sf9}$ beschrieben worden, allerdings war weder eine strukturelle noch eine funktionelle Charakterisierung dieser *Sf9*-Proteine erfolgt (Iniguez-Lluhi et al., 1992). Daß diese Verunreinigung bei funktionellen Untersuchungen stören könnte, wurde deutlich, als mit gereinigtem $G\beta\gamma_{Sf9}$ (siehe 5.6.1.1) ein Stimulationsversuch der PI-3-Kinase γ durchgeführt wurde (Abb. 23). So stimulierte $G\beta\gamma_{Sf9}$ die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ ebenso potent und effizient wie bovines $G\beta\gamma$ (EC_{50} -Werte: 15 bzw. 25 nM $G\beta\gamma$).

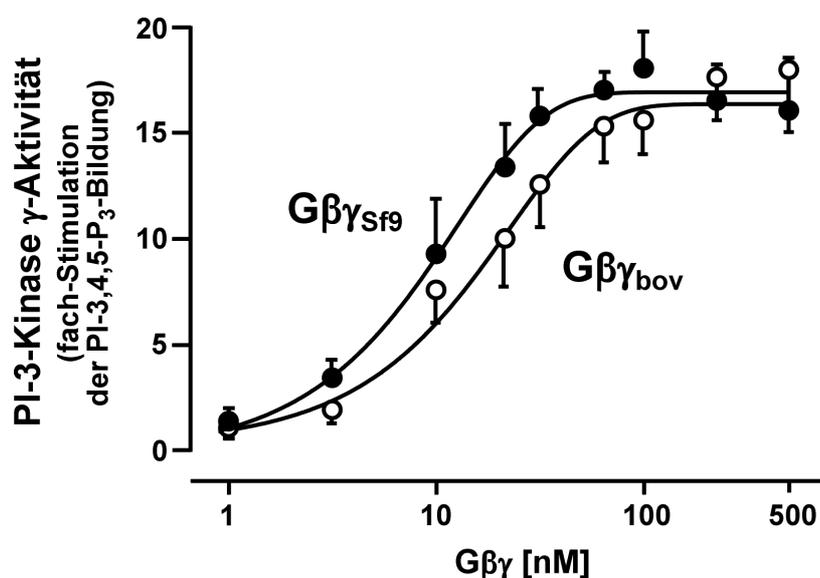


Abb. 23: Stimulation der PI-3-Kinase γ -Aktivität durch $G\beta\gamma_{Sf9}$

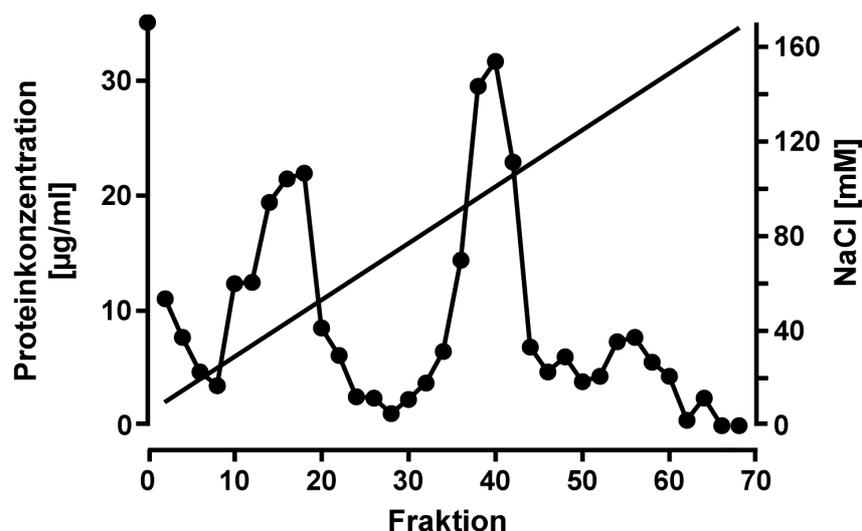
$G\beta\gamma_{Sf9}$ (●) und $G\beta\gamma_{bov}$ (○) wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Lipidkinase-Aktivität der heterodimeren PI-3-Kinase γ zu stimulieren. Gemessen wurde die fach-Stimulation der basalen PI-3,4,5- P_3 -Bildung durch die jeweiligen Stimuli. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Gerade aufgrund dieser funktionellen Eigenschaften erschien es interessant, Informationen über die Struktur der $G\beta\gamma_{Sf9}$ -Komplexe zu erhalten. Die Kenntnis der Aminosäuresequenz eines phylogenetisch weit entfernten, aber dennoch funktionell vergleichbaren Verwandten der Säuger- $G\beta\gamma$ -Familie könnte einen Beitrag zum Verständnis der $G\beta\gamma$ -induzierten Stimulation von Effektoren leisten. Ein in der eigenen Arbeitsgruppe schon erfolgreich angewandtes Verfahren ist die massenspektrometrische Analyse von Proteinen mittels

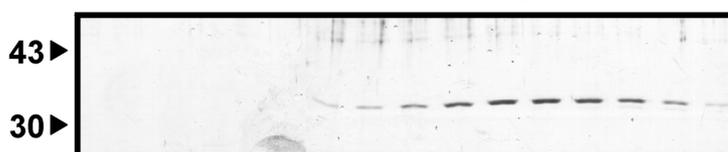
MALDI bzw. Tandem-Elektrospray-Ionisierung (Exner et al., 1999). Diese Methoden lassen die Fragmentierung und Sequenzierung von kleinsten Proteinmengen zu, die mit herkömmlichen Verfahren, wie dem klassischen Edman-Abbau, nicht zugänglich sind.

5.6.1.1 Reinigung von $G\beta\gamma_{Sf9}$

Um eine massenspektrometrische Charakterisierung durchführen zu können, mußten zunächst ausreichende Mengen von $G\beta\gamma_{Sf9}$ gereinigt werden. Hierfür bietet sich ein Affinitätschromatographisches Verfahren an, bei dem eine hexa-Histidin-markierte $G\alpha_{i1}$ -Untereinheit ($G\alpha_{i1}$ -His) in *Sf9*-Zellen exprimiert wird, um dann die daran gebundenen endogenen $G\beta\gamma_{Sf9}$ -Dimere mit AMF-haltigem Puffer zu eluieren. Eine Schwierigkeit bei der Reinigung von endogenen *Sf9*-Proteinen ist, daß deren Menge während der Infektionszeit abnimmt. Dies konnte sowohl für $G\alpha$ - als auch für $G\beta$ -Untereinheiten beobachtet werden (Leopoldt et al., 1997). Aus diesem Grund wurde die Infektion spätestens nach 48 Stunden beendet. Da für die massenspektrometrische Analyse vor allem die Reinheit der Proteine entscheidend war, wurde im Anschluß an die Affinitäts- und Untereinheitenaustausch-Chromatographie noch eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Ein typisches Ergebnis einer solchen Reinigung ist in Abb. 24 dargestellt. Aus der Silberfärbung ist erkennbar, daß die $G\beta\gamma_{Sf9}$ -Komplexe als homogener Peak bei etwa 90 mM NaCl eluierten. Offensichtlich konnte nur eine $G\beta$ -Isoform durch dieses Verfahren gereinigt werden, da auch in der Immunoblot-Analyse (siehe Abb. 24 unten) keine zusätzliche Proteinbande detektiert wurde. Aus diesem immunologischen Verhalten und der in Abb. 23 gezeigten Fähigkeit, die PI-3-Kinase γ zu stimulieren, konnte schon jetzt geschlossen werden, daß dieses Insekten- $G\beta$ einen relativ hohen Verwandtschaftsgrad zu den Säugerorthologen aufweisen mußte. Die Detektion der $G\gamma_{Sf9}$ -Untereinheit erfolgte nach Konzentrierung mehrerer $G\beta\gamma_{Sf9}$ -haltiger Fraktionen (Abb. 25).



Silberfärbung



AS 398 (anti-Gβ_c)



Fraktion 12 14 16 18 20 22 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44

Abb. 24: Reinigungsprofil endogener Gβ_{Sf9}-Komplexe

Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren, die für Gα₁-His kodierten, infiziert und nach 48 Stunden entsprechend den Angaben in den Methoden aufgearbeitet. Die durch AMF-haltigen Puffer eluierten Proteine wurde vereinigt, verdünnt und auf eine Mono Q-Säule geladen. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten. Der Proteingehalt der erhaltenen Fraktionen wurde nach Bradford bestimmt (oben). Parallel dazu wurden die Proteinfractionen gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Silberfärbung (mitte) bzw. Immunoblot-Analyse (unten) mit Hilfe eines Gβ-spezifischen Antiserums (AS 398) detektiert. Die apparenten Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind jeweils am linken Bildrand markiert.

Durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue konnte eine Proteinbande bei ca. 6 kDa detektiert werden, was dem Molekulargewichtsbereich der bisher bekannten Gγ-Untereinheiten entsprach. Allerdings war mit verschiedenen Säuger-Gγ-spezifischen Antiseren gegen Gγ_{2/3}, Gγ₅ bzw. Gγ₇ keine Detektion dieser Bande möglich. Die weitere Charakterisierung sollte deshalb massenspektrometrisch erfolgen (siehe 5.6.1.2)

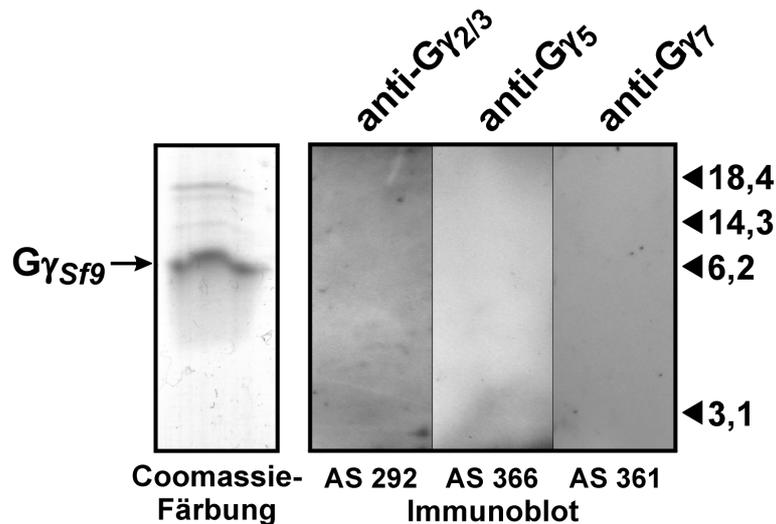


Abb. 25: Gelelektrophoretische und immunologische Charakterisierung der $G\gamma_{Sf9}$ -Untereinheit

Zur Charakterisierung der $G\gamma_{Sf9}$ -Untereinheit wurden je 2,5 μg der vereinigten und konzentrierten Fraktionen 34-44 (siehe Abb. 24) gelelektrophoretisch (15 % Acrylamid) aufgetrennt und anschließend durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (links) bzw. durch Immunoblot-Analyse mit spezifischen Antisera gegen verschiedene $G\gamma$ -Untereinheiten (rechts) analysiert. Die apparenten Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am rechten Bildrand markiert.

5.6.1.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von $G\beta_{Sf9}$

Von beiden Untereinheiten wurde nun mittels MALDI eine Peptidkartierung durchgeführt. Dazu wurden die Proteine nach SDS-gelelektrophoretischer Trennung durch Trypsin vollständig verdaut und die Masse der dabei entstandenen Bruchstücke bestimmt. Trypsin katalysiert spezifisch die Hydrolyse von Peptidbindungen, die von der α -Aminogruppe von Lysin oder Arginin gebildet werden. Dadurch konnte aus der erhaltenen Masse eines Fragmentes durch Vergleich mit den Massen theoretischer Trypsin-Fragmente bekannter Proteine auf die Aminosäuresequenz des analysierten Proteins zurückgeschlossen werden. Die Peptide, die keinem theoretischen Trypsin-Fragment entsprachen, wurde mittels Tandem-Elektrospray-Ionisierung (MSMS) analysiert. Bei diesem Verfahren werden in einem ersten Massenspektrometer Primär-Ionen erzeugt, die auf dem Weg in ein nachgeschaltetes Massenspektrometer in Sekundär-Ionen zerfallen. Diese Fragmentierung betrifft bevorzugt die Peptidbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren. Dadurch läßt sich an den Massendifferenzen des Ionenstromes die Aminosäureabfolge des Peptids ablesen. Eine Übersicht über die so erhaltenen Primärstruktur-Ausschnitte der $G\beta_{Sf9}$ -Untereinheit ist in Tab. 5 zusammengestellt.

Tab. 5: Identifizierte Massen und Sequenzen der Trypsin-Fragmente von G β _{Sf9}

Peptid-Masse (u)	Sequenz	erhalten durch
(1) 2686,3	ADQELAMYSHDNIICGITSVAFSK	MALDI
(2) 2505,2	SGRLLLAGYDDFNCNVWDTMK	MALDI
(3) 2473,1	VSCLGVTENGMAVATGSWDSFLR	MALDI
(4) 2100,2	LIVWDSHTTNKVHAIPLR	MALDI
(5) 1313,7	LIVWDSHTTNK	MSMS
(6) 1212,7	TFVSGACDASAK	MSMS
(7) 1018,5	N(L/I)VSASQDGK	MSMS
(8) 985,6	VTS(L/I)AN(L/I)(L/I)R	MSMS

MALDI = matrix assisted laser desorption ionization; Die Aminosäuresequenz der Peptide wurde durch Vergleich mit theoretischen Trypsinfragmenten aus Peptidmassen-Datenbanken erhalten.

MSMS = Tandem-Elektrospray-Ionisierung; Leucin (L) und Isoleucin (I) können aufgrund der absoluten Massengleichheit nicht unterschieden werden.

u = $1/12$ der Masse des ^{12}C -Isotops

Insgesamt konnten 117 Aminosäuren, d.h. rund ein Drittel der gesamten G β -Primärstruktur, identifiziert werden. Die C-terminale Aminosäure war bei allen Peptiden entweder Lysin (L) oder Arginin (R), was mit der Spaltungsspezifität von Trypsin übereinstimmte. Durch Sequenzvergleiche mittels Proteindatenbanken wurde für 7 der 8 erhaltenen Fragmente eine vollständige Identität mit einem G β aus *Drosophila melanogaster* (G β _{1Dm}) gefunden (Yarfitz et al., 1988). Lediglich Fragment 8 zeigte keinerlei Homologie mit einer bekannten Proteinsequenz. Durch die 100%ige Aminosäureidentität der analysierten Bereiche von G β _{Sf9} mit G β _{1Dm} war jedoch davon auszugehen, daß auch die restlichen Aminosäuren nahezu identisch sind. Daher handelte es sich bei Peptid 8 vermutlich um eine Verunreinigung durch ein unbekanntes Protein.

Die Analyse der $G\gamma$ -Untereinheit ergab 3 Fragmente, die überraschenderweise keine Homologie zu einer bekannten $G\gamma$ -Untereinheit aufwiesen (Tab. 6).

Tab. 6: Identifizierte Massen und Sequenzen der Trypsin-Fragmente von $G\gamma_{Sf9}$

Peptid-Masse (u)	Sequenz	erhalten durch
(1) 1379,8	XV(L/I)DSVVVSPAHK	MSMS
(2) 1252,6	V(L/I)X(L/I)VGFGDXK	MSMS
(3) 1241,8	VPVSVVVPVSMK	MSMS

Leucin (L) und Isoleucin (I) können aufgrund der absoluten Massengleichheit nicht unterschieden werden;
 X = nicht als Aminosäure identifizierbare Masse
 MSMS = Tandem-Elektrospray-Ionisierung
 u = $1/12$ der Masse des ^{12}C -Isotops

Besonders auffällig war der hohe Gehalt an Valin in den erhaltenen Peptidfragmenten, wobei allerdings auch in $G\gamma_1$ aus *Drosophila melanogaster* die Aminosäureabfolge „VVV“ zu finden ist (Ray und Ganguly, 1992). Im Vergleich zu $G\beta$ zeigen $G\gamma$ -Untereinheiten eine sehr viel höhere Divergenz in ihrer Primärstruktur. Selbst innerhalb der Säugerfamilie liegt die Aminosäureidentität lediglich bei 25% bis 69%. Dadurch ist es sehr schwierig, $G\gamma$ -Untereinheiten anhand von Teilsequenzen zu identifizieren.

Durch einen Sequenzvergleich mit verschiedenen Säuger- $G\beta$ -Untereinheiten sollte nun geprüft werden, inwieweit die Übereinstimmung der funktionellen Eigenschaften (siehe Abb. 23) durch die strukturelle Ähnlichkeit der Proteine bedingt war (Abb. 26). Wie zu erkennen ist, passen sich die $G\beta_{Sf9}$ -Fragmente sehr gut in eine Auswahl der bisher bekannten $G\beta$ -Sequenzen ein. Der höchste Verwandtschaftsgrad besteht, wie schon erwähnt, zu $G\beta_{1Dm}$. Aber auch zu humanem $G\beta_1$ weist $G\beta_{Sf9}$ immerhin noch eine Aminosäureidentität von 85% auf. Dabei sind alle Aminosäurereste, die bis jetzt als kritisch für die $G\beta\gamma$ -Effektor-Interaktion identifiziert wurden, wie z.B. K78, I80, K89 oder W332, in der $G\beta_{Sf9}$ -Sequenz nicht verändert (Ford et al., 1998). Diese hohe Konserviertheit ist für die Familie der G-Proteine typisch und erklärt auch das vergleichbare funktionelle Verhalten (siehe Abb. 23). Selbst in Pflanzen konnten einige Vertreter mit Hilfe von Antiseren, die gegen bestimmte Peptidsequenzen von Säuger-G-Proteinen gerichtet waren, nachgewiesen werden (Schlicher et al., 1996).

Peptid 7										Peptid 4										Peptid 6										Peptid 1																												
69										96										198										209										257																		
N	L	V	S	A	S	Q	D	G	K	L	I	V	W	D	S	H	T	T	N	K	V	H	A	I	P	L	R	.	T	F	V	S	G	A	C	D	A	S	A	K	.	.	A	D	Q	E	L	A	M	Y	S	H	D	N	I	G β (Sf9)		
R	N	L	V	S	A	S	Q	D	G	K	L	I	V	W	D	S	H	T	T	N	K	V	H	A	I	P	L	R	.	K	T	F	V	S	G	A	C	D	A	S	A	K	.	R	A	D	Q	E	L	A	M	Y	S	H	D	N	I	G β_1 (Dm)
R	N	L	V	S	A	S	Q	D	G	K	L	I	V	W	D	S	H	T	T	N	K	V	H	A	I	P	L	R	.	R	T	F	I	S	G	A	C	D	A	S	A	K	.	R	A	D	Q	E	L	A	M	Y	S	H	D	N	I	G β_1 (Ce)
R	L	L	V	S	A	S	Q	D	G	K	L	I	I	W	D	S	Y	T	T	N	K	V	H	A	I	P	L	R	.	R	T	F	V	S	G	A	C	D	A	S	T	K	.	R	A	D	Q	E	L	L	M	Y	S	H	D	N	I	G β_2 (Hs)
R	L	L	V	S	A	S	Q	D	G	K	L	I	I	W	D	S	Y	T	T	N	K	M	H	A	I	P	L	R	.	K	T	F	V	S	G	A	C	D	A	S	S	K	.	R	A	D	Q	E	L	L	L	Y	S	H	D	N	I	G β_4 (Hs)
R	L	L	V	S	A	S	Q	D	G	K	L	I	I	W	D	S	Y	T	T	N	K	V	H	A	I	P	L	R	.	R	L	F	V	S	G	A	C	D	A	S	A	K	.	R	A	D	Q	E	L	M	T	Y	S	H	D	N	I	G β_1 (Hs)
K	L	L	V	S	A	S	Q	D	G	K	L	I	V	W	D	S	Y	T	T	N	K	V	H	A	I	P	L	R	.	N	L	F	I	S	G	A	C	D	A	S	A	K	.	R	A	D	Q	E	L	I	C	F	S	H	E	S	I	G β_3 (Hs)
R	R	I	V	S	S	Q	D	G	K	V	I	V	W	D	S	F	T	T	N	K	E	H	A	V	T	M	P	.	N	T	F	V	S	G	G	C	D	K	K	A	M	.	R	A	D	R	E	V	A	I	Y	S	K	E	S	I	G β_5 (Hs)	
R	H	C	V	T	G	S	L	D	G	K	L	I	I	W	D	T	W	T	A	N	K	V	Q	I	I	P	L	R	.	K	T	Y	I	T	G	S	V	D	K	T	A	K	.	R	A	D	Q	Q	I	A	Q	Y	E	P	P	Q	K	G β_2 (Dm)
R	H	I	V	S	S	Q	D	G	K	V	I	V	W	D	G	F	T	T	N	K	E	H	A	L	T	M	P	.	N	T	F	I	S	A	G	A	D	K	H	S	L	.	R	A	D	R	Q	V	C	V	Y	E	K	E	S	I	G β_5 (Ce)	

Peptid 1										Peptid 2										Peptid 3																																						
280										301										315										337																												
I	C	G	I	T	S	V	A	F	S	K	S	G	R	L	L	L	A	G	Y	D	D	F	N	C	N	V	W	D	T	M	K	.	.	V	S	C	L	G	V	T	E	N	G	M	A	V	A	T	G	S	W	D	S	F	L	R	G β (Sf9)	
I	C	G	I	T	S	V	A	F	S	K	S	G	R	L	L	L	A	G	Y	D	D	F	N	C	N	V	W	D	T	M	K	.	R	V	S	C	L	G	V	T	E	N	G	M	A	V	A	T	G	S	W	D	S	F	L	R	G β_1 (Dm)	
I	C	G	I	T	S	V	A	F	S	K	S	G	R	L	L	L	A	G	Y	D	D	F	N	C	N	V	W	D	S	M	R	.	R	V	S	C	L	G	V	T	E	D	G	M	A	V	C	T	G	S	W	D	S	F	L	K	G β_1 (Ce)	
I	C	G	I	T	S	V	A	F	S	R	S	G	R	L	L	L	A	G	Y	D	D	F	N	C	N	I	W	D	A	M	K	.	R	V	S	C	L	G	V	T	D	D	G	M	A	V	A	T	G	S	W	D	S	F	L	K	G β_2 (Hs)	
I	C	G	I	T	S	V	A	F	S	K	S	G	R	L	L	L	A	G	Y	D	D	F	N	C	S	V	W	D	A	L	K	.	R	V	S	C	L	G	V	T	D	D	G	M	A	V	A	T	G	S	W	D	S	F	L	R	G β_4 (Hs)	
I	C	G	I	T	S	V	S	F	S	K	S	G	R	L	L	L	A	G	Y	D	D	F	N	C	N	V	W	D	A	L	K	.	R	V	S	C	L	G	V	T	D	D	G	M	A	V	A	T	G	S	W	D	S	F	L	K	G β_1 (Hs)	
I	C	G	I	T	S	V	A	F	S	L	S	G	R	L	L	L	A	G	Y	D	D	F	N	C	N	V	W	D	S	M	K	.	R	V	S	C	L	G	V	T	A	D	G	M	A	V	A	T	G	S	W	D	S	F	L	K	G β_3 (Hs)	
I	F	G	A	S	S	V	D	F	S	L	S	G	R	L	L	L	A	G	Y	N	D	Y	T	I	N	V	W	D	V	L	K	.	R	V	S	T	L	R	V	S	P	D	G	T	A	F	C	S	G	S	W	D	H	T	L	R	G β_5 (Hs)	
N	T	G	F	T	S	C	A	L	S	T	S	G	R	Y	L	M	C	G	I	E	G	N	V	H	S	W	D	T	M	K	.	R	I	T	C	I	S	L	C	P	N	G	M	C	L	A	S	T	S	W	D	Q	Q	V	R	G β_2 (Dm)		
L	F	P	V	N	G	V	D	F	S	L	S	G	R	I	L	L	F	A	G	Y	G	D	Y	R	V	G	V	W	D	S	L	K	.	R	I	S	C	L	R	T	S	P	D	G	T	A	V	C	S	A	S	W	D	C	T	I	R	G β_5 (Ce)

Abb. 26: Sequenzvergleich der G β_{Sf9} -Peptide mit bekannten G β -Sequenzen

Die Proteine sind von höchster Identität (oben) nach niedrigster Identität (unten) mit den erhaltenen G β_{Sf9} -Fragmenten angeordnet. Die mit G β_{Sf9} identischen Aminosäurereste sind umrandet, abweichende Reste sind grau unterlegt. Die angegebenen Aminosäure-Positionen entsprechen der Numerierung von G β_1 (Hs). Die Spezies der jeweiligen G β -Untereinheiten sind in Klammern angegeben (Dm = *Drosophila melanogaster*, Ce = *Caenorhabditis elegans*, Hs = *Homo sapiens*).

5.6.2 Reinigung funktionell aktiver G $\beta_x\gamma$ -Isoformen

Um nun eine Untersuchung der G β -Isoformspezifität der PI-3-Kinase β und γ durchführen zu können, mußte das endogene G $\beta\gamma_{Sf9}$ von den rekombinanten G $\beta_{1,2,3,5}\gamma_2$ -Komplexen abgetrennt werden. Hierfür kam eine Mono Q-Anionenaustausch-Chromatographie zur Anwendung, die schon bei der Auftrennung boviner G $\beta\gamma$ -Dimere gute Ergebnisse geliefert hatte. In der Tat konnten durch diesen Reinigungsschritt alle rekombinant exprimierten G $\beta_x\gamma_2$ -Komplexe in G $\beta\gamma_{Sf9}$ -freier Form erhalten werden (Abb. 27).

Aus der Abbildung ist ebenfalls ersichtlich, daß es sich im Falle des bovinen G $\beta\gamma$ (G $\beta\gamma_{bov}$) um ein komplex zusammengesetztes Gemisch aus verschiedenen G $\beta\gamma$ -Isoformen handelte, da im Gegensatz zu den rekombinanten G $\beta\gamma$ -Komplexen mehrere G γ -Banden angefärbt werden konnten (Asano et al., 1993). Interessanterweise hatte die G γ_1 -Untereinheit des Transduzin- $\beta\gamma$ (T $D\beta\gamma$) trotz der größeren Masse (8,5 kDa) im Vergleich zur G γ_2 -Untereinheit (7,9 kDa) eine höhere elektrophoretische Mobilität, was auch schon früher von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde (Iñiguez-Lluhi et al., 1992).

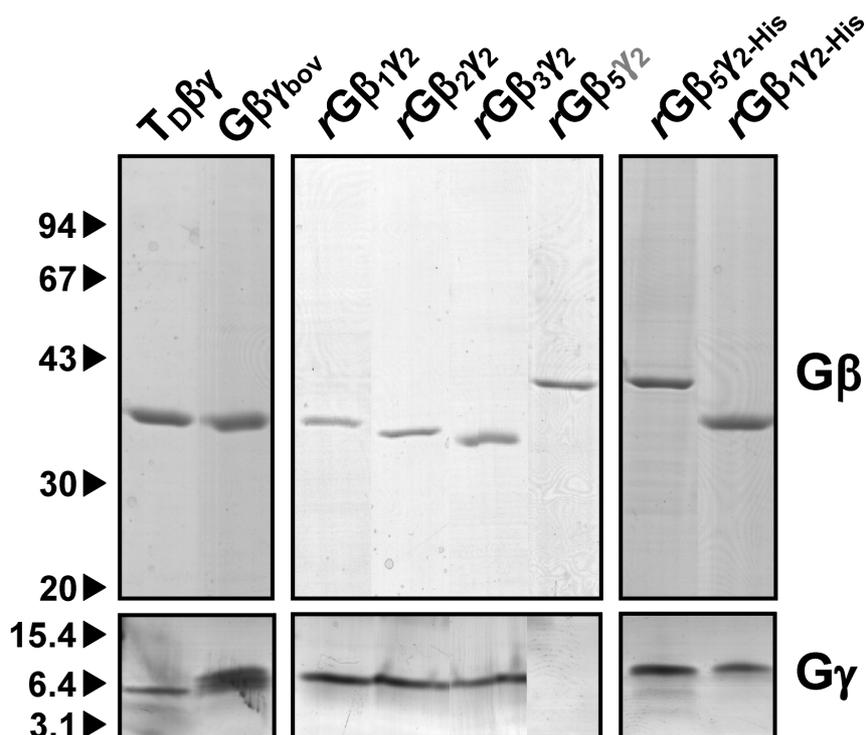


Abb. 27: Gelelektrophoretische Charakterisierung gereinigter G β γ -Komplexe

Native Rinderhirn- (G β γ_{bov}) bzw. rekombinante G β γ -Komplexe wurden entsprechend den Angaben in den Methoden gereinigt. Transduzin-G β γ (T $_D$ β γ) wurde freundlicherweise von Daria Illenberger, Ulm, zur Verfügung gestellt (Gierschik und Camps, 1994). Zur Detektion der G β -Untereinheiten wurden je 0,75 μ g Protein SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt (10 % Acrylamid) und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Zur Detektion der G γ -Untereinheiten wurden je 5 μ g Protein auf einem 4-20 %iges Tris/Tricine-Gel aufgetrennt und danach mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Die apparenten Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Bildrand markiert. Man beachte, daß nach Anionenaustausch-Chromatographie des rG $\beta_5\gamma_2$ -Dimers zwar die G β_5 , nicht aber die G γ_2 -Untereinheit detektiert werden konnte.

Die G β_5 -Isoform zeigte ein außergewöhnliches Verhalten, da sie ihre G γ -Untereinheit bei diesem Reinigungsschritt verloren hatte und als freie G β -Untereinheit von der Säule eluiert wurde (siehe Abb. 27, rG $\beta_5\gamma_2$). Aus diesem Grund mußte ein alternatives Reinigungsverfahren angewandt werden. Dazu wurde G β_5 zusammen mit einer hexa-Histidin-markierten G γ_2 -Untereinheit in *Sf9*-Zellen koexprimiert und über Ni $^{2+}$ -NTA-Agarose in einem einzigen affinitätschromatographischen Schritt gereinigt. Hierbei kam es nicht zu einer Dissoziation des G $\beta_5\gamma_2$ -His-Dimers, und darüber hinaus konnte keine Kontamination mit G $\beta\gamma_{Sf9}$ detektiert werden (siehe Abb. 27, rG $\beta_5\gamma_2$ -His).

Dieses Verfahren hat jedoch auch Nachteile. Zum einen kann es zu einer Verunreinigung durch nicht vollständig posttranslational modifizierte G β γ -Dimere kommen, da alleine der Proteinteil mit der hexa-Histidin-Markierung zur Reinigung genügt. Bei der klassischen Reinigung nach Kozasa und Gilman (1995) hingegen können nur vollständig prozessierte G β γ -Dimere mit der koexprimierten G α_{i1} -His-Untereinheit wechselwirken, wodurch eine funktionelle Selektion eingeschlossen ist. Zum anderen kann ein Einfluß der hexa-Histidin-Markierung auf die modulatorischen Eigenschaften der G β γ -Komplexe nicht

ausgeschlossen werden. Aus diesen Gründen wurde als Kontrolle $G\beta_1\gamma_2$ -His gereinigt, um durch den Vergleich mit nicht markierten $G\beta_1\gamma_2$ -Dimeren den Einfluß der Affinitätsmarkierung beurteilen zu können (siehe Abb. 27, $rG\beta_1\gamma_2$ -His, rechts).

5.6.3 Sensitivität der PI-3-Kinase γ gegenüber $G\beta_{1-3}\gamma_2$ und $T_D\beta\gamma$

Zunächst wurde die stimulatorische Wirkung von $G\beta_1\gamma_2$, $G\beta_2\gamma_2$ und $G\beta_3\gamma_2$ auf die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ untersucht. Um den Einfluß der $G\gamma$ -Untereinheit auf die Aktivierung der PI-3-Kinase γ zu überprüfen, wurde Transduzin- $\beta\gamma$ ($T_D\beta\gamma$) mit in den Stimulationsversuch einbezogen, das als Hauptbestandteil $G\beta_1\gamma_1$ enthält. Im Unterschied zu dem C20-geranylgeranylierten $G\gamma_2$ ist $G\gamma_1$ mit einem um 5 C-Atome verkürzten Farnesylrest modifiziert. Die graphische Auswertung des Versuchs ist in Abb. 28 dargestellt.

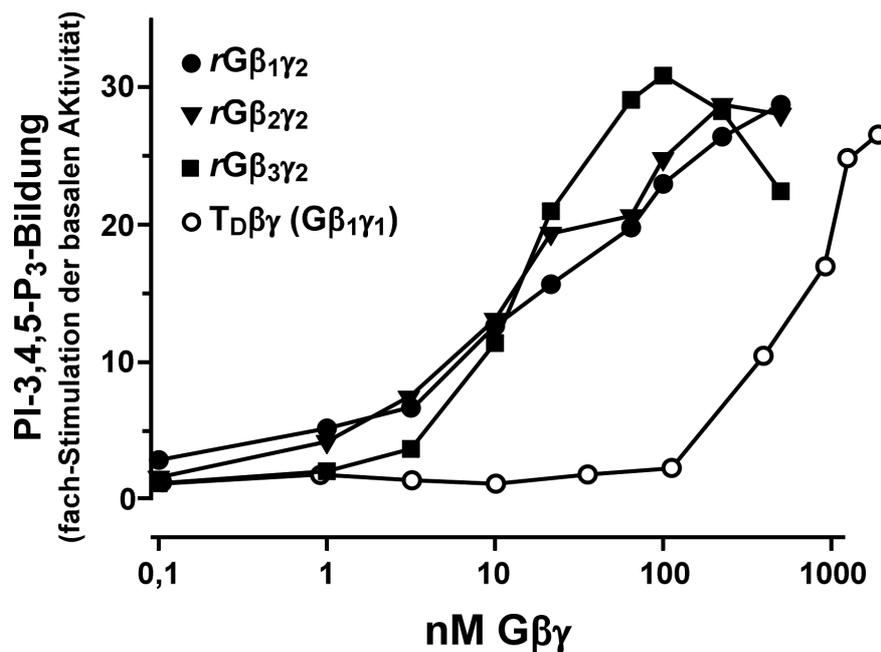


Abb. 28: Stimulation der PI-3-Kinase γ -Aktivität durch definierte $G\beta\gamma$ -Isoformen

Heterodimere PI-3-Kinase γ wurde mit steigenden Konzentrationen von rekombinantem $G\beta_1\gamma_2$ (●), $G\beta_2\gamma_2$ (▼), $G\beta_3\gamma_2$ (■) und nativem Transduzin- $\beta\gamma$ ($T_D\beta\gamma$, ○) stimuliert. ^{32}P -markiertes PI-3,4,5- P_3 wurde entsprechend der Beschreibung in den Methoden isoliert und quantifiziert. Dargestellt ist die fach-Stimulation der basalen Aktivität. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei.

Die drei rekombinanten $G\beta\gamma$ -Isoformen stimulierten die PI-3-Kinase γ -Aktivität mit vergleichbarer Potenz und Effizienz. Die EC_{50} -Konzentrationen (ca. 10 nM) waren mit dem Wert für $G\beta\gamma_{bov}$ vergleichbar, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß die $G\beta_{1-3}\gamma_2$ -Dimere mehrheitlich korrekt gefaltet und vollständig posttranslational prozessiert waren. Aus

dem Ergebnis für Transduzin- $\beta\gamma$ wurde deutlich, daß die Art der $G\gamma$ -Untereinheit für die Potenz, mit der die PI-3-Kinase γ stimuliert werden konnte, entscheidend war, da der EC_{50} -Wert mit 500 nM $T_D\beta\gamma$ um das 50-fache zu höheren Konzentrationen verschoben war.

5.6.3.1 Rolle der Isoprenylierung der $G\gamma_2$ -Untereinheit bei der $G\beta\gamma$ -Stimulation der PI-3-Kinase γ

Während lange Zeit die Isoprenylierung der $G\gamma$ -Untereinheit nur als Membrananker für die $G\beta\gamma$ -Untereinheit angesehen wurde, gibt es in jüngster Zeit Befunde, wonach diese posttranslationale Modifikation auch eine wichtige Rolle bei der Interaktion von $G\beta\gamma$ -Dimeren mit Effektoren spielt. So fallen beim Vergleich der Röntgenstruktur-Analysen von freiem und Phosduzin-gebundenem $T_D\beta\gamma$ einige konformelle Veränderungen in der $G\beta$ -Struktur auf (Sondek et al., 1996, Loew et al., 1998). Die Folge der Phosduzin-Bindung ist die Insertion des Farnesylrestes in eine hydrophobe Tasche von $G\beta$, die sich zwischen den Propellerblättern 5 und 6 ausbildet. Diese Regionen wurden auch in $G\beta$ -Mutations-Studien als wichtig für die Interaktion mit Effektoren identifiziert (Panchenko et al., 1998). Vor diesem Hintergrund war es interessant zu prüfen, inwieweit ein nicht isoprenyliertes $G\beta\gamma$ -Dimer noch in der Lage war, die PI-3-Kinase γ zu stimulieren.

Um diese Frage zu beantworten, wurde ein $G\beta\gamma$ -Komplex aus *Sf9*-Zellen gereinigt, der aus einer $G\beta_1$ und einer $G\gamma_{2-His}$ -Untereinheit bestand, bei der durch eine Mutation von Cys⁶⁸ gegen Ser (C68S) keine posttranslationale Prozessierung mehr möglich war. Im Unterschied zur Reinigung aller anderen verwendeten $G\beta\gamma$ -Komplexe erfolgte die Isolierung dieses $G\beta_1\gamma_{2(C68S)-His}$ -Dimers aus der cytosolischen Fraktion, und darüber hinaus war kein Zusatz von Detergenz zur Stabilisierung erforderlich (Dietrich et al., 1992). Der anschließende Stimulationsversuch der Lipid- und Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ ist in Abb. 29 dargestellt. In beiden Fällen war die nicht isoprenylierte Form ($G\beta_1\gamma_{2(C68S)-His}$) selbst in den höchsten eingesetzten Konzentrationen nicht in der Lage, die Enzymaktivitäten der PI-3-Kinase γ zu stimulieren, während es mit den korrekt posttranslational modifizierten Komplexen ($G\beta_1\gamma_{2-His}$) zu einer signifikanten Aktivitätserhöhung kam. Dieses Ergebnis läßt den unmittelbaren Schluß zu, daß die Isoprenylierung der $G\gamma$ -Untereinheit für die Stimulation der Lipidkinase- wie auch der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ unbedingt erforderlich ist.

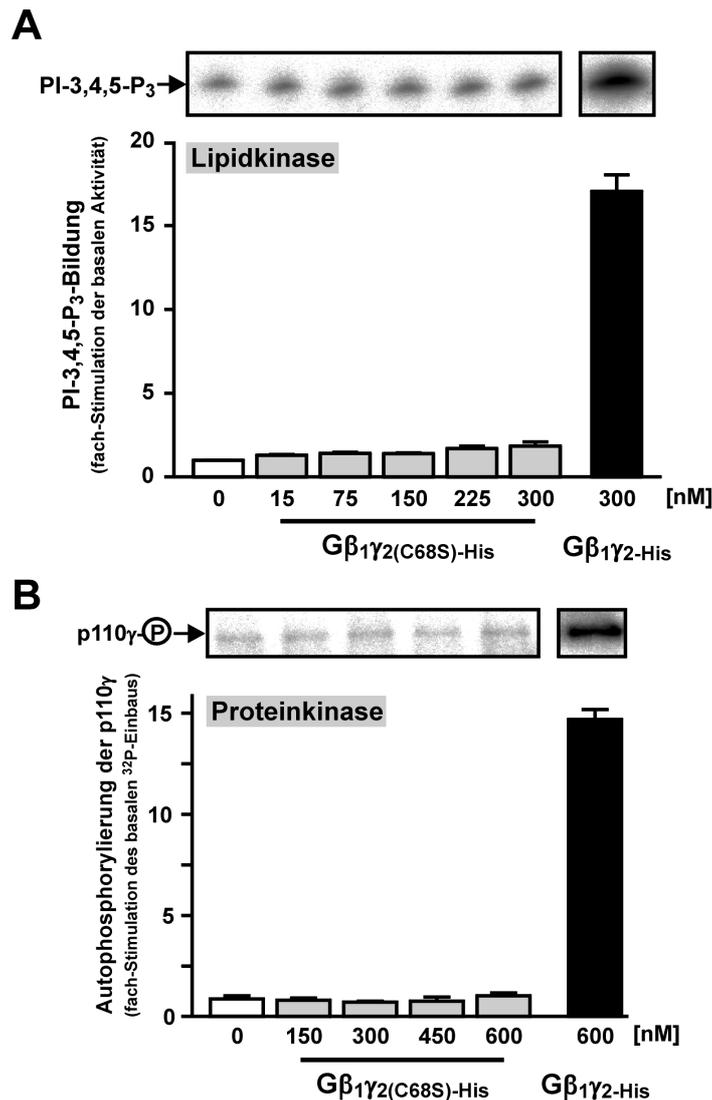


Abb. 29: Einfluß der Isoprenylierung der G γ ₂-Untereinheit auf die G β γ -Stimulation der Lipid- und Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ

(A) Lipidkinase-Aktivität. Heterodimere PI-3-Kinase γ wurde auf ihre Stimulierbarkeit mit steigenden Konzentrationen G β ₁γ₂(C68S)-His untersucht. Gemessen wurde die Bildung von ³²P-markiertem PI-3,4,5-P₃ als Vielfaches des Basalwertes. Als Kontrolle wurde der Stimulationsversuch in der höchsten Konzentration zusätzlich mit G β ₁γ₂-His durchgeführt. **(B) Proteinkinase-Aktivität.** In einem parallelen Ansatz wurde die Stimulierbarkeit der Autophosphorylierung der katalytischen p110γ-Untereinheit durch G β ₁γ₂(C68S)-His untersucht. Als Kontrolle wurde wiederum ein Stimulationsversuch in der höchsten Konzentration mit G β ₁γ₂-His durchgeführt. Gemessen wurde der Einbau von radioaktivem Phosphat in die katalytische p110γ-Untereinheit der PI-3-Kinase γ als Vielfaches des Basalwertes. Gezeigt sind in beiden Fällen Mittelwerte (\pm S.E.M) von Doppelwerten.

5.6.4 Sensitivität der PI-3-Kinase γ gegenüber G β ₅γ₂

Schon die bei der Reinigung der rekombinanten G β _xγ₂-Dimere gewonnenen Erfahrungen (siehe 5.6.2) ließen erkennen, daß die G β ₅-Isoform besondere physikochemische Eigenschaften innerhalb der G β -Familie besitzt. Auch die relativ geringe Aminosäureidentität von 50 % mit den anderen bekannten vier G β -Isoformen ließ vermuten, daß neben der

strukturellen Ausnahmestellung auch funktionelle Unterschiede, z.B. in der Effektorkopplung, zu erwarten sind.

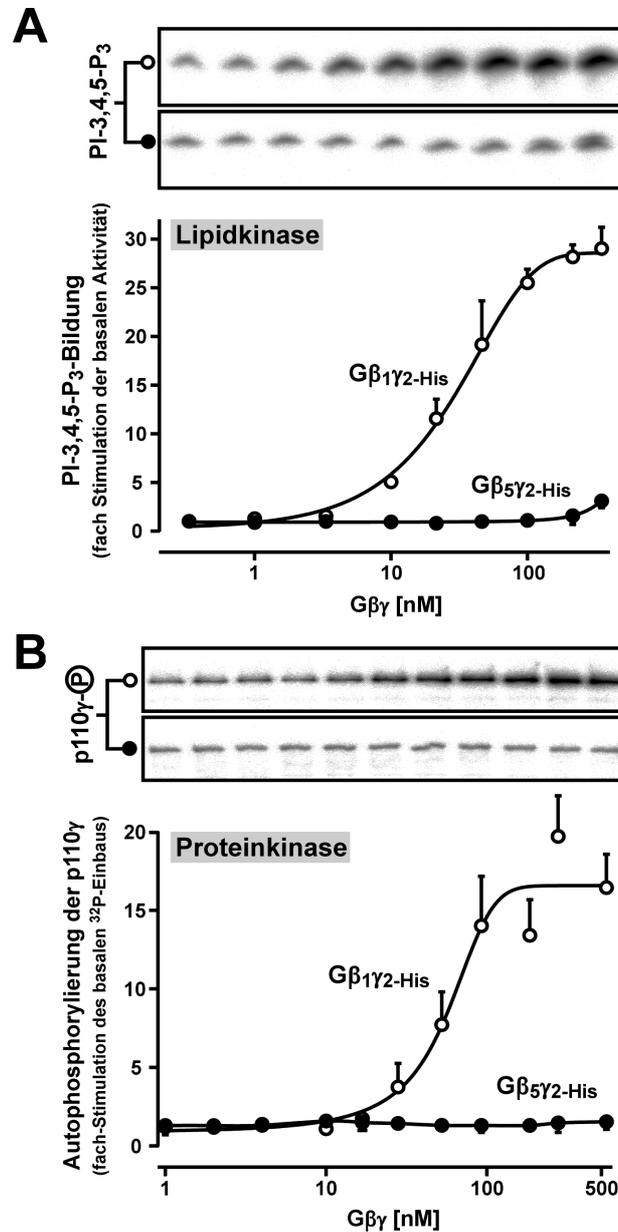


Abb. 30: Sensitivität der PI-3-Kinase γ gegenüber $G\beta_5\gamma_2$

(A) Lipidkinase-Aktivität. $G\beta_1\gamma_2$ -His (○) und $G\beta_5\gamma_2$ -His (●) wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ in konzentrationsabhängiger Weise zu stimulieren. ³²P-markiertes PI-3,4,5-P₃ wurde dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und quantifiziert. Gezeigt ist ein Autoradiogramm eines repräsentativen Experiments (oben) und Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen (unten).

(B) Proteinkinase-Aktivität. Ebenso wurde untersucht, ob die Autophosphorylierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit der heterodimeren PI-3-Kinase γ durch beide $G\beta\gamma$ -Isoformen stimuliert werden konnte. Ein Autoradiogramm eines repräsentativen Experiments ist oben dargestellt. Darunter ist die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwerte \pm S.D.) gezeigt.

Zunächst wurde die PI-3-Kinase γ auf ihre Sensitivität gegenüber $G\beta_5\gamma_2$ -His-Dimeren untersucht. Um zu überprüfen, ob die hexa-Histidin-Markierung an der $G\gamma$ -Untereinheit einen Einfluß auf die Aktivierung hat, wurde parallel ein Stimulationsversuch mit $G\beta_1\gamma_2$ -His durchgeführt (Abb. 30). $G\beta_5\gamma_2$ -His war nicht in der Lage, die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ zu stimulieren (siehe Abb. 30A). Im Gegensatz dazu zeigte $G\beta_1\gamma_2$ -His eine potente und effiziente Aktivierung des Enzyms. Allerdings lag der gemessene EC_{50} -Wert für $G\beta_1\gamma_2$ -His (30 nM) etwas höher als bei $G\beta_1\gamma_2$ (10 nM, siehe Abb. 28). Dies könnte auf eine Verunreinigung der Präparation mit nicht vollständig prozessiertem $G\beta_1\gamma_2$ -His hindeuten, das, wie in Abschnitt 5.6.3.1 gezeigt werden konnte, keine stimulatorische Aktivität besitzt. Daß nicht isoprenylierte Spezies auch bei der Isolierung von $G\beta\gamma$ -Komplexen aus Membranen mitgereinigt werden, wurde schon von Lindorfer und Mitarbeitern (1998) berichtet.

Die Untersuchung der Proteinkinase-Aktivität ergab ein analoges Bild (siehe Abb. 30B). Auch hier konnte $G\beta_5\gamma_2$ -His keine Verstärkung der Autophosphorylierung bewirken, während $G\beta_1\gamma_2$ -His zwar etwas weniger potent, jedoch mit gleicher Effizienz wie $G\beta\gamma_{\text{bov}}$, die Proteinkinase-Aktivität stimulierte (vgl. Abb. 19). Der Grund für den leicht erhöhten EC_{50} -Wert (60 nM $G\beta_1\gamma_2$ -His) ist, wie schon bei der Stimulation der Lipidkinase-Aktivität, vermutlich in der Kontamination mit nicht aktiven $G\beta\gamma$ -Komplexen zu suchen.

5.6.5 Sensitivität der PI-3-Kinase β gegenüber $G\beta_5\gamma_2$

Die ebenso $G\beta\gamma$ -sensitive PI-3-Kinase β ist im Gegensatz zur PI-3-Kinase γ in Säuger- gewebe fast ubiquitär exprimiert. Sie könnte daher an Guaninnukleotid-sensitiven, PI-3-Kinase-abhängigen Prozessen beteiligt sein, die gerade in solchen Zellen ablaufen, in denen die PI-3-Kinase γ nachweislich nicht vorkommt (Bernstein et al., 1998, Sasaki et al., 2000, Li et al., 2000, Hirsch et al., 2000). Diese Annahme steht auch im Einklang mit einer immer größer werdenden Zahl von Berichten, die G-Protein-abhängige Signalwege beschreiben, die über p85-assoziierte PI-3-Kinasen verlaufen (Hawes et al., 1996, Graness et al., 1998, Hu et al., 1999).

Wie schon in Abb. 8B gezeigt wurde, kann die PI-3-Kinase β sowohl durch $G\beta\gamma$ -Dimere als auch durch ein p85-Bindungspeptid (Tyr-P-Peptid), welches aus der Sequenz des PDGF-Rezeptors abgeleitet ist, stimuliert werden. Bei gleichzeitiger Inkubation mit beiden Stimuli kam es zu einer synergistischen Aktivierung. Entsprechend wurde nun die Sensitivität der PI-3-Kinase β für $G\beta_5\gamma_2$ sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit einer konstanten Konzentration des p85-Bindungspeptids untersucht (Abb. 31A, B).

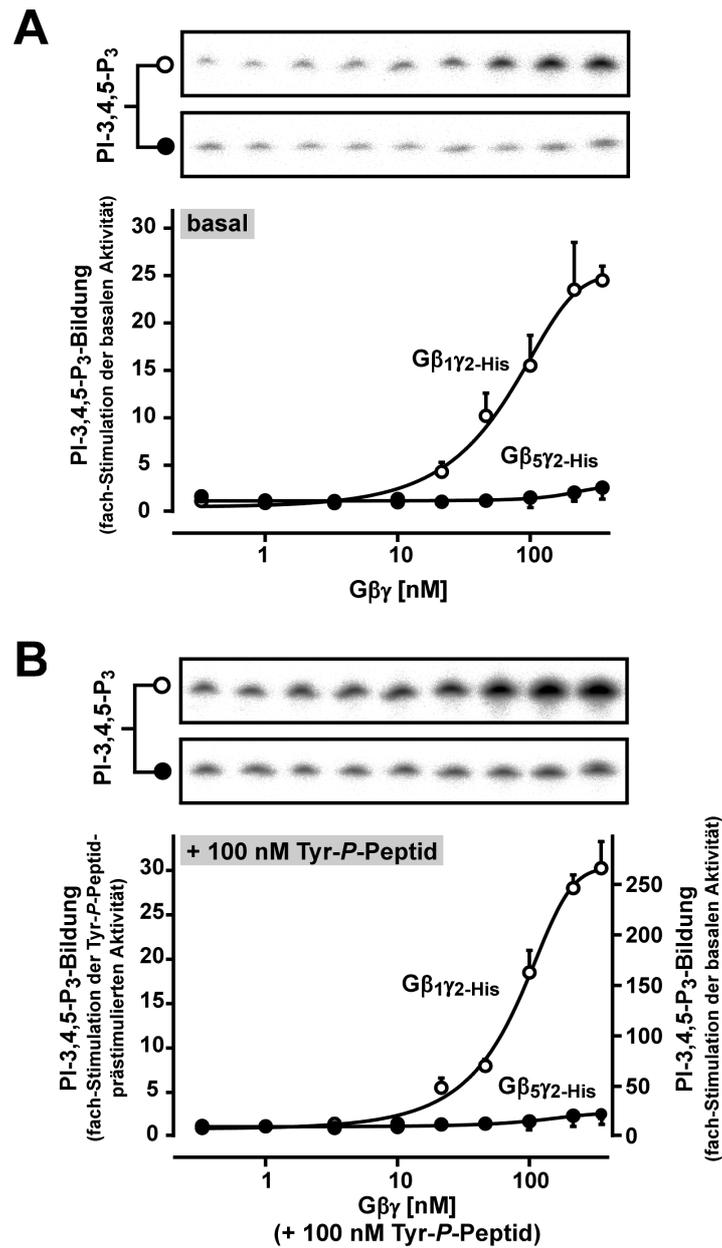


Abb. 31: Sensitivität der PI-3-Kinase β gegenüber $G\beta_5\gamma_2$

(A) Stimulation der basalen Lipidkinase-Aktivität. Heterodimere PI-3-Kinase β wurde auf ihre Sensitivität gegenüber steigenden Konzentrationen von $G\beta_1\gamma_2$ -His (○) bzw. $G\beta_5\gamma_2$ -His (●) untersucht. Radioaktiv markiertes PI-3,4,5-P₃ wurde isoliert, aufgetrennt und quantifiziert. Gezeigt ist ein Autoradiogramm eines repräsentativen Versuchs (oben) und die Auswertung (Mittelwerte \pm S.D.) von drei unabhängigen Versuchen (unten).

(B) Synergistische Stimulation der Lipidkinase-Aktivität. Die Experimente wurden wie unter (A) beschrieben durchgeführt, außer daß die PI-3-Kinase β zusätzlich zu $G\beta_1\gamma_2$ -His (○) bzw. $G\beta_5\gamma_2$ -His (●) mit 100 nM des p85-Bindungspeptids (Tyr-P-Peptid) kostimuliert wurde. Gezeigt ist wiederum ein repräsentatives Autoradiogramm (oben) und die Auswertung (Mittelwerte \pm S.D.) von drei unabhängigen Experimenten (unten). Die Ordinaten geben die Stimulation der PI-3-Kinase β -Aktivität bezogen auf die Prästimulation durch 100 nM p85-Bindungspeptid (linke Achse) bzw. auf die basale PI-3-Kinase β -Aktivität ohne Prästimulation (rechte Achse).

In keinem der beiden Fälle konnte $G\beta_5\gamma_2$ -His im untersuchten Konzentrationsbereich eine signifikant verstärkte Bildung von PI-3,4,5-P₃ bewirken, während $G\beta_1\gamma_2$ -His sowohl mit als auch ohne Koinkubation mit dem p85-Bindungspeptid die PI-3-Kinase β mit gleicher Potenz und Effizienz stimulierte.

Durch Yu und Mitarbeiter (1998a,b) wurde postuliert, daß es sich bei der Stimulation der p85-assoziierten PI-3-Kinasen im eigentlichen Sinne um eine „De-inhibition“ handelt, was bedeuten soll, daß durch die Bindung von aktivierten Tyrosin-Kinasen an die SH2-Domänen der p85-Untereinheit lediglich die inhibierende Wirkung von p85 auf die katalytische p110-Untereinheit aufgehoben wird. Eine ähnliches Verhalten konnte hier auch für die PI-3-Kinase β beobachtet werden, die im heterodimeren Zustand eine etwa 25-fach niedrigere spezifische Aktivität aufwies als die katalytische p110 β -Untereinheit alleine (siehe 5.2). Allerdings konnte die Aktivität der „de-inhibierten“ PI-3-Kinase β durch $G\beta_1\gamma_2$ weiter signifikant gesteigert werden (siehe Abb. 31B).

Um zu untersuchen, ob die fehlende stimulatorische Aktivität von $G\beta_5\gamma_2$ auf die PI-3-Kinase β auf einer fehlenden Interaktionsfähigkeit der beiden Proteine beruhte, wurden Lipid-Assoziations-Versuche durchgeführt. Dabei sollte geprüft werden, inwieweit $G\beta_1\gamma_2$ -His bzw. $G\beta_5\gamma_2$ -His eine vermehrte Assoziation der Kinase an PI-4,5-P₂-haltige Phospholipid-Vesikel bewirken konnten (Abb. 32). Interessanterweise hatte die PI-3-Kinase β schon ohne Zusatz von $G\beta\gamma$ eine gewisse Affinität zu den Phospholipid-Vesikeln (siehe Abb. 32 rechts, 0 nM $G\beta\gamma$). Dennoch war $G\beta_1\gamma_2$ -His in der Lage, die Assoziation der PI-3-Kinase β mit den Vesikeln konzentrationsabhängig zu verstärken. Man sieht deutlich, daß die Erhöhung der $G\beta_1\gamma_2$ -His-Menge an den Vesikeln mit einer Zunahme des p110 β -Signals korrelierte. $G\beta_5\gamma_2$ -His dagegen konnte diese Translokation der Kinase an die künstlichen Membranen nicht bewirken, obwohl die Wechselwirkung von $G\beta_5\gamma_2$ -His mit den Phospholipid-Vesikeln sowohl qualitativ als auch quantitativ dem Verhalten von $G\beta_1\gamma_2$ -His entsprach (siehe Abb. 32 unten).

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, daß Klasse I PI-3-Kinasen nicht durch $G\beta_5$ reguliert werden, wobei die Ursache dafür in der fehlenden Interaktionsfähigkeit zu suchen ist.

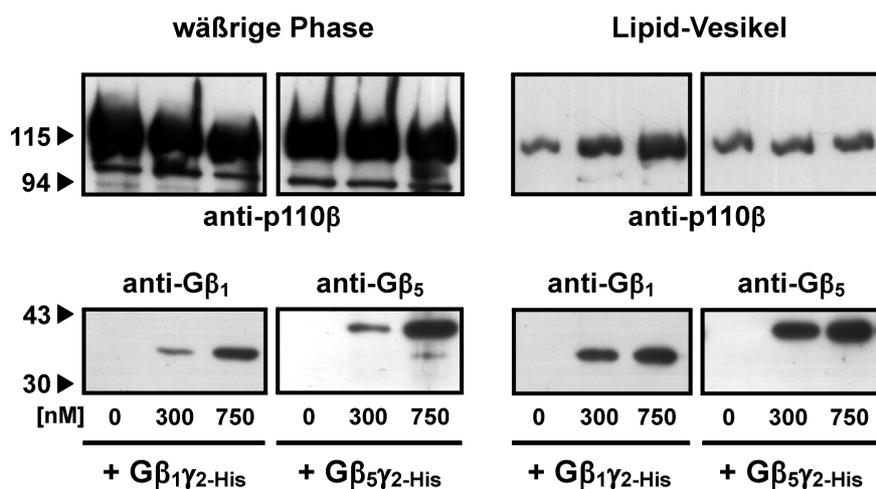


Abb. 32: Interaktion von $G\beta_1\gamma_2$ und $G\beta_5\gamma_2$ mit der PI-3-Kinase β

$G\beta_1\gamma_2$ -His und $G\beta_5\gamma_2$ -His wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Assoziation der heterodimeren PI-3-Kinase β mit Phospholipid-Vesikeln zu verstärken. Der Versuch wurde analog einer Lipidkinase-Aktivitäts-Bestimmung durchgeführt (siehe 4.5.2.2). Nach Trennung der wässrigen Phase von den Phospholipid-Vesikeln durch Zentrifugation wurden Aliquote beider Phasen gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Immunoblot-Analyse mit spezifischen Antisera gegen die katalytische p110 β -Untereinheit, gegen $G\beta_1$ (AS 398) und $G\beta_5$ (AS 422) detektiert. Die Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Bildrand markiert. Die Vesikel- und die wässrige Phase wurden vor der gelelektrophoretischen Trennung auf das gleiche Volumen eingestellt, so daß die relativen Intensitäten der Immunoblot-Signale auch der Verteilung der Proteine zwischen den beiden Phasen entsprechen.

5.6.6 Überprüfung der funktionellen Aktivität der $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexe

In den vorgestellten Daten zur $G\beta\gamma$ -Isoformspezifität von Klasse I PI-3-Kinasen zeigte $G\beta_5\gamma_2$ -His keine Aktivität an den getesteten Effektoren. Daß die Dissoziation der $G\beta_5\gamma_2$ -His-Komplexe, wie sie unter bestimmten Reinigungsbedingungen in dieser Arbeit gefunden und erst kürzlich auch von einer anderen Arbeitsgruppe berichtet wurde (siehe Abb. 27 und Jones et al., 1999) als Ursache für die Inaktivität in Betracht gezogen werden muß, konnte durch die in Abb. 32 dargestellten Versuche ausgeschlossen werden. Dort ist zu sehen, daß sich $G\beta_5\gamma_2$ -His-Dimere bzgl. ihrer Assoziation mit Phospholipid-Vesikeln genauso verhalten wie $G\beta_1\gamma_2$ -His-Dimere. Da diese Experimente unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgten, ist auch von einer Dissoziation der $G\beta_5\gamma_2$ -His-Dimere während der Reaktion nicht auszugehen, da monomeres $G\beta_5$ ohne die γ -Untereinheit eine sehr geringe Affinität zu Lipid-Vesikeln hat (A. Babich, persönliche Mitteilung). Dennoch können diese Kontrollen nicht beweisen, daß $G\beta_5\gamma_2$ -His auch tatsächlich in der Lage war, mit anderen Proteinen zu interagieren. So war es unerlässlich, durch weitere Untersuchungen die funktionelle Aktivität der $G\beta_5\gamma_2$ -His-Dimere nachzuweisen. Dies beinhaltete neben der Interaktion mit $G\alpha$ -Untereinheiten auch die Stimulation $G\beta\gamma$ -sensitiver Mitglieder der PLC- β -Familie (Exton, 1997).

5.6.6.1 Unterstützung der PTX-vermittelten ADP-Ribosylierung von $G\alpha_{i1}$ durch $G\beta_5\gamma_2$

Ein Standardverfahren zum Nachweis der Interaktionsfähigkeit von $G\beta\gamma$ mit $G\alpha$ ist die Pertussistoxin-vermittelte ADP-Ribosylierung von $G\alpha$ -Untereinheiten der G_i -Familie (Katada et al., 1982, Exner et al., 1999). Da die Übertragung des ADP-Ribose-Restes bevorzugt auf die $G\alpha$ -Untereinheit im heterotrimeren Zustand erfolgt, können $G\beta\gamma$ -Komplexe diese Reaktion unterstützen, wenn sie mit der $G\alpha$ -Untereinheit interagieren können. Abb. 33 zeigt einen entsprechenden Versuch.

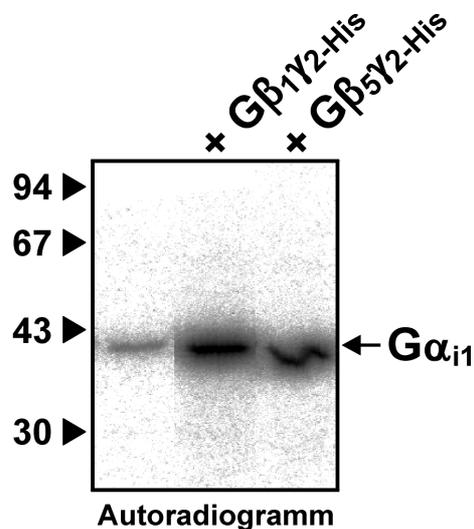


Abb. 33: Unterstützung der Pertussistoxin-vermittelten ADP-Ribosylierung von $G\alpha_{i1}$ durch $G\beta_5\gamma_2$

Aus Rinderhirn gereinigtes $G\alpha_{i1}$ wurde in An- und Abwesenheit von 300 nM $G\beta_1\gamma_2$ -His bzw. $G\beta_5\gamma_2$ -His durch Pertussistoxin ADP-ribosyliert. Der Versuch wurde wie in den Methoden beschrieben durchgeführt. Die Molekulargewichte (kDa) von Markerproteinen sind am linken Bildrand markiert. Gezeigt ist ein Autoradiogramm eines repräsentativen Experiments. Der Einbau von ^{32}P -ADP-Ribose wurde durch $G\beta_1\gamma_2$ -His und $G\beta_5\gamma_2$ -His 45- bzw. 25-fach gesteigert.

Wie zu erkennen ist, bewirkte sowohl $G\beta_5\gamma_2$ -His als auch $G\beta_1\gamma_2$ -His einen verstärkten Einbau von ^{32}P -ADP-Ribose in die $G\alpha_{i1}$ -Untereinheit, woraus geschlossen werden kann, daß $G\beta_5\gamma_2$ -His mit dieser $G\alpha$ -Untereinheit intakte Heterotrimere bilden konnte. Die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten ergab dabei, daß die ADP-Ribosylierungs-Aktivität des Pertussistoxins durch $G\beta_1\gamma_2$ stärker gesteigert wurde als durch $G\beta_5\gamma_2$. Dies könnte auf quantitative Unterschiede in der Interaktionsfähigkeit der beiden $G\beta$ -Isoformen mit $G\alpha_{i1}$ hindeuten.

5.6.6.2 Aktivierung von Phospholipase C- β -Isoformen durch $G\beta_5\gamma_2$

Die Phospholipase C- β -Familie ist eines der am besten charakterisierten $G\beta\gamma$ -Effektorsysteme, wobei jedoch nicht alle Isoenzyme die gleiche Sensitivität gegenüber $G\beta\gamma$ zeigen (Exton, 1997). Während die PLC- β_2 und - β_3 durch nanomolare Konzentrationen von $G\beta\gamma$ signifikant stimuliert werden, ist die PLC- β_4 insensitiv. Die zuerst entdeckte Isoform, PLC- β_1 , zeigt nur eine geringe Aktivierung, deren physiologische Relevanz fraglich ist. Bis zum Beginn dieser Arbeit gehörte die PLC- β_2 -Isoform zu den wenigen Effektoren, für die eine $G\beta_5$ -Sensitivität gezeigt worden war. So stimulierte $G\beta_5\gamma_2$ die Aktivität einer kotransfizierten PLC- β_2 in ähnlichem Ausmaß wie $G\beta_1\gamma_2$ (Watson et al., 1994). Auch an gereinigten PLC- β -Präparationen aus Truthahn-Erythrozyten zeigte $G\beta_5\gamma_2$ eine mit $G\beta_1\gamma_2$ vergleichbare Stimulation (Lindorfer et al., 1998). Allerdings stimmen die Ergebnisse aus Transfektions-Untersuchungen nicht immer mit denen überein, die durch Rekonstitution gereinigter Komponenten erhalten wurden. Während gereinigte bovine $G\beta\gamma$ -Komplexe reproduzierbar die PLC- β_3 stimulierten (Carozzi et al., 1992, Park et al., 1993, Smrcka und Sternweis, 1993, Hepler et al., 1993, Exton, 1997), war kein solches Verhalten nach Kotransfektion in COS7-Zellen zu beobachten (Jiang et al., 1996).

In einem ersten Schritt wurde deshalb zunächst die $G\beta\gamma$ -Sensitivität der eingesetzten PLC- β -Präparationen PLC- β_2 und PLC- β_3 verifiziert (Abb. 34).

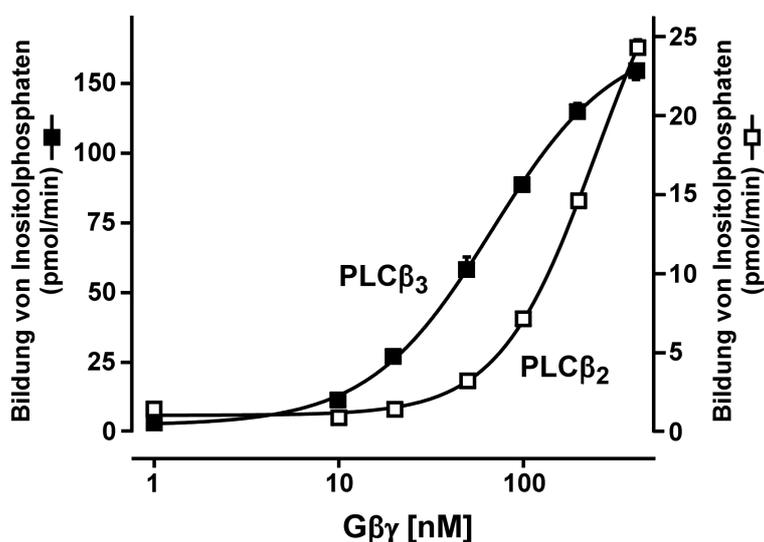


Abb. 34: $G\beta\gamma$ -Sensitivität der PLC- β_2 und - β_3

Rekombinante PLC- $\beta_2\Delta$ (□) und - β_3 (■) wurden mit steigenden Konzentrationen $G\beta\gamma_{bov}$ stimuliert. Die Experimente wurden entsprechend Illenberger und Mitarbeitern (1998) durchgeführt. PLC- $\beta_2\Delta$, eine C-terminale Deletionsmutante der humanen PLC- β_2 , verhält sich bzgl. der Interaktion mit PI-4,5- P_2 , Ca^{2+} und $G\beta\gamma$ -Dimeren genauso wie das Wildtyp-Enzym. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte von Doppelwerten (\pm S.E.M.). Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten.

$G\beta\gamma_{\text{bov}}$ konnte beide Präparationen signifikant stimulieren, wenn auch, wie an der Produktbildungsrate zu erkennen ist, mit unterschiedlicher Potenz und Effizienz. Diese hier gefundene höhere Stimulierbarkeit der PLC- β_3 im Vergleich zur PLC- β_2 deckte sich mit den von anderen Arbeitsgruppen erhobenen Daten (Carozzi et al., 1993, Smrcka et al., 1993).

Als nächstes wurde die stimulatorische Aktivität der gereinigten $G\beta_5\gamma_2$ -His-Komplexe untersucht (Abb. 35).

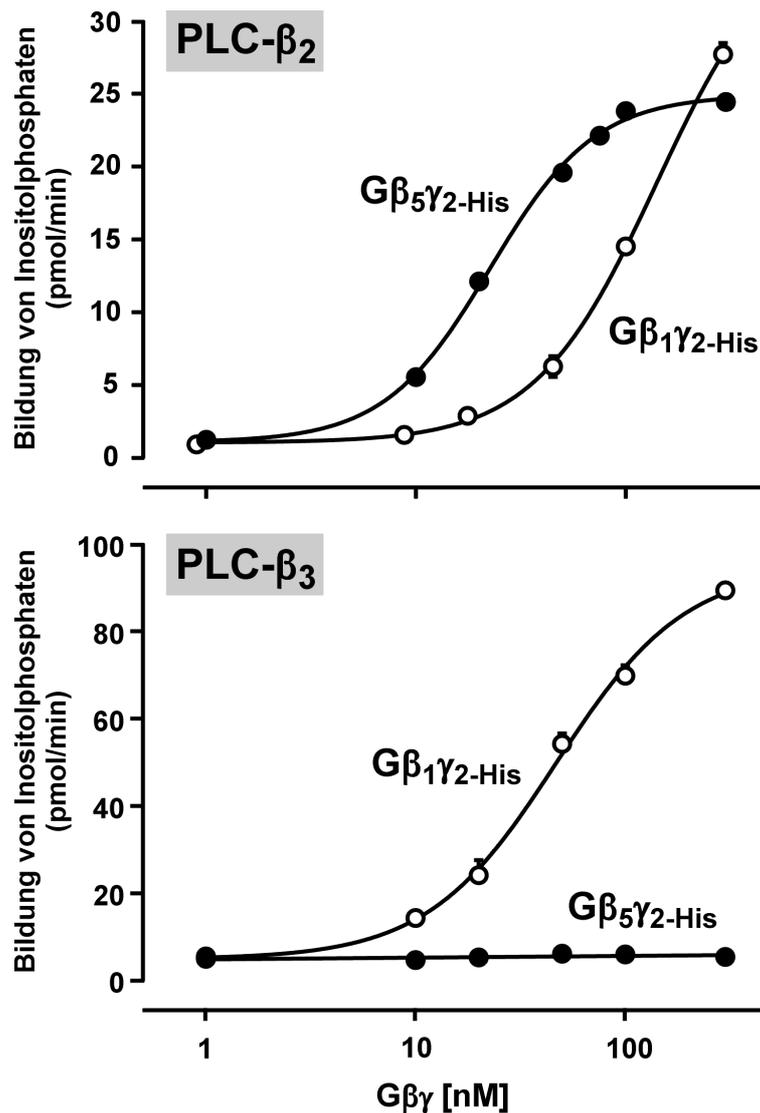


Abb. 35: Sensitivität der PLC- β_2 und - β_3 gegenüber $G\beta_5\gamma_2$

PLC- $\beta_2\Delta$ und PLC- β_3 wurden auf ihre Sensitivität gegenüber steigenden Konzentration von $G\beta_1\gamma_2$ -His (○) bzw. $G\beta_5\gamma_2$ -His (●) untersucht. Die Experimente wurden entsprechend Illenberger und Mitarbeitern (1998) durchgeführt. Gezeigt ist je ein repräsentativer Versuch (Mittelwerte aus Doppelwerten \pm S.E.M.) aus drei.

Erwartungsgemäß stimulierten $G\beta_5\gamma_2$ -His und $G\beta_1\gamma_2$ -His die PLC- β_2 -Aktivität in ähnlichem Ausmaß. Obwohl die EC_{50} -Werte von Versuch zu Versuch relativ großen Schwankungen unterlagen (30-120 nM für $G\beta_5\gamma_2$ -His bzw. 80-300 nM für $G\beta_1\gamma_2$ -His; $n = 3$), war $G\beta_5\gamma_2$ -His in allen Experimenten der potentere Stimulator. Die benötigten $G\beta\gamma$ -Mengen stimmten auch mit den Konzentrationen überein, die für die Stimulation PLC- β aus Truthahn-Erythrozyten gefunden wurden. Diese war bis dahin die einzige PLC- β -Isoform, die in gereinigter Form mit $G\beta_5\gamma_2$ rekonstituiert worden war (Lindorfer et al., 1998). Die Daten belegen, daß es sich bei den gereinigten $G\beta_5\gamma_2$ -His-Dimeren mehrheitlich um korrekt gefaltete und vollständig prozessierte Komplexe handelte, die mit Effektoren funktionell interagieren können. Überraschenderweise war $G\beta_5\gamma_2$ -His nicht in der Lage, die Aktivität der PLC- β_3 zu stimulieren. Dies war jedoch nicht Folge der hexa-Histidin-Markierung von $G\gamma_2$, da $G\beta_1\gamma_2$ -His die PLC- β_3 ähnlich wie $G\beta\gamma_{bov}$ aktivierte (vgl. Abb. 34).

Wie schon bei der Regulation der PI-3-Kinasen stellte sich auch hier die Frage, welches die Ursachen für die fehlende stimulatorische Aktivität von $G\beta_5\gamma_2$ an der PLC- β_3 sein könnten. Um die Interaktionsfähigkeit zwischen beiden Proteinen zu untersuchen, wurde geprüft, in wieweit $G\beta_5\gamma_2$ -His in der Lage war, durch Bindung an die PLC- β_3 den stimulierenden Effekt von $G\beta_1\gamma_2$ -His auf das Enzym zu hemmen. Zum Vergleich wurde eine analoge Untersuchung mit der PI-3-Kinase γ durchgeführt (Abb. 36).

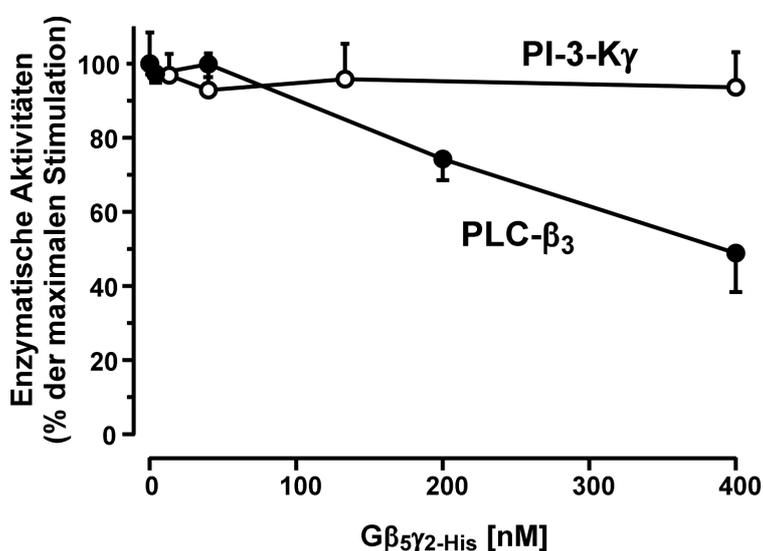


Abb. 36: $G\beta_5\gamma_2$ -His antagonisiert die stimulierende Wirkung von $G\beta_1\gamma_2$ -His auf die PLC- β_3

$G\beta_5\gamma_2$ -His wurde auf seine Fähigkeit untersucht, mit $G\beta_1\gamma_2$ -His um die Bindung an der PI-3-Kinase γ bzw. PLC- β_3 zu konkurrieren. Die PLC- β_3 wurde mit einer konstanten Menge an $G\beta_1\gamma_2$ -His (40 nM) und steigenden Konzentration von $G\beta_5\gamma_2$ -His inkubiert. Im Falle der PI-3-Kinase γ wurde der Versuch analog durchgeführt, außer daß die Lipidkinase-Aktivität mit 30 nM $G\beta\gamma_{bov}$ stimuliert wurde. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Experimenten.

Hierbei zeigte sich interessanterweise ein Unterschied zwischen PI-3-Kinase γ und PLC- β_3 . Im Falle der PLC- β_3 konnte die G $\beta\gamma$ -stimulierte Aktivität durch steigende G $\beta_5\gamma_2$ -His-Konzentrationen gehemmt werden, wohingegen die G $\beta\gamma$ -Stimulation der PI-3-Kinase γ auch bei zehnfachem Überschuß von G $\beta_5\gamma_2$ -His konstant blieb.

Faßt man die Ergebnisse der Untersuchung der G β -Isoformspezifität der Klasse I PI-3-Kinasen und der PLC- β -Isoformen zusammen, läßt dies den Schluß zu, daß G β_5 im Unterschied zu den anderen Mitgliedern der G β -Familie eine selektive Kopplung an typische G $\beta\gamma$ -regulierte Effektoren zeigt. Dabei sind die G $\beta\gamma$ -sensitiven Klasse I PI-3-Kinasen völlig von der Regulation durch G β_5 ausgenommen, während innerhalb der PLC- β -Familie eine selektive Aktivierung einzelner Mitglieder zu beobachten ist. Darüber hinaus geht aus Abb. 36 hervor, daß sich die Ursachen diese selektiven Kopplung an beide Effektorsysteme offenbar unterscheiden.