

6 DISKUSSION

Klasse I PI-3-Kinasen katalysieren die 3'-Phosphorylierung von PI-4,5-P₂ und bilden so den „second messenger“ PI-3,4,5-P₃. Obwohl die Beteiligung von PI-3,4,5-P₃ an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Wachstum und Differenzierung, cytoskelettalen Veränderungen oder vesikulären Transportvorgängen nachgewiesen werden konnte, ist wenig über die molekularen Grundlagen der Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen durch Zelloberflächenrezeptoren bekannt. Insbesondere die G-Protein-Sensitivität dieser Enzymklasse ist nur unzureichend verstanden. Dies liegt zu einem gewissen Teil auch daran, daß viele Untersuchungen an ganzen Zellen bzw. durch Transfektion einzelner Komponenten durchgeführt wurden. Dabei ist der Zugewinn an Wissen über zelluläre Funktionen von PI-3-Kinasen meist hoch, über die tatsächlichen Wechselwirkungen der beteiligten Proteine kann jedoch wenig ausgesagt werden.

Um die Spezifität und den Mechanismus der Gβγ-vermittelten Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen besser zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit die direkte Interaktion und Funktion der beteiligten Komponenten, d.h. der katalytischen und nicht-katalytischen Untereinheit der PI-3-Kinasen und der Gβγ-Untereinheiten, mit Hilfe von definierten, gereinigten Proteinen näher untersucht. Da PI-3-Kinasen in nativem Gewebe nur in geringen Konzentrationen vorkommen, wurde statt dessen das Baculovirus/Sf9-Expressionssystem eingesetzt. Neben der Reinigung der PI-3-Kinasen in großer Menge und Reinheit bot es darüber hinaus die Möglichkeit, einzelne Untereinheiten als isolierte Proteine zu erhalten und zu untersuchen. Außerdem gestattete es, Gβγ-Komplexe zu reinigen, die aus definierten Gβ- und Gγ-Untereinheiten zusammengesetzt waren. Auf diese Weise konnte die Spezifität der Gβγ-sensitiven Klasse I PI-3-Kinasen für bestimmte Gβ-Isoformen untersucht werden.

6.1 Gβγ-Sensitivität von Klasse I PI-3-Kinasen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß sowohl die PI-3-Kinase β als auch die PI-3-Kinase γ durch nanomolare Konzentrationen von bovinem Gβγ stimuliert werden, wobei die Stimulation der PI-3-Kinase β auch ohne gleichzeitige Inkubation mit einem p85-Bindungspeptid möglich war (Maier et al., 1999). Im Gegensatz dazu beobachteten Kurosu und Mitarbeiter (1997) nur dann eine signifikante Aktivierung der PI-3-Kinase β, wenn sie mit Gβγ und dem p85-Bindungspeptid kostimuliert wurde. Diese Untersuchung wurde jedoch nicht an gereinigten Enzymen, sondern an p110β-Immunpräzipitaten von p110β/p85-transfizierten COS7-Zellen durchgeführt. Deshalb könnten die abweichenden

Ergebnisse auf eine Beeinflussung der enzymatischen Eigenschaften der PI-3-Kinase β durch die Bindung des Antikörpers an die katalytische Untereinheit zurückzuführen sein. Daneben gibt es schon ältere Literaturberichte, wonach eine nicht identifizierte p85-assoziierte PI-3-Kinase durch $G\beta\gamma$ stimuliert werden konnte (Thomason et al., 1994, Stephens et al., 1994). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann angenommen werden, daß es sich dabei um die PI-3-Kinase β handelte.

Aus physiologischer Sicht eröffnet die Regulierbarkeit von mehr als einer Isoform der Klasse I PI-3-Kinasen durch G-Proteine vor allem bei der Auslösung von Zellwachstums- und Differenzierungsvorgängen neue Interpretationsmöglichkeiten. Immer mehr Befunde weisen darauf hin, daß PI-3-Kinasen neben den typischen RTK-abhängigen Prozessen auch an G-Protein-abhängigen mitogenen Signalwegen beteiligt sind (Gutkind, 1998, Luttrell et al., 1999). Hierfür wurde bisher vor allem die schon länger bekannte $G\beta\gamma$ -Sensitivität der PI-3-Kinase γ verantwortlich gemacht. So führt die in COS7-Zellen überexprimierte p110 γ -Untereinheit $G\beta\gamma$ -abhängig zur Stimulation der MAPK (ERK). Die Signale werden dabei über eine Ras-abhängige Phosphorylierungs-Kaskade weitergeleitet (Lopez-Illasaca et al., 1997). Allerdings kann dies nicht Berichte erklären, wonach die $G\beta\gamma$ -induzierte MAPK-Aktivierung durch die Kotransfektion einer dominant negativen Mutante von p85 blockiert wird (Hawes et al., 1996, Hu et al., 1999). Hier könnte die p85-assoziierte PI-3-Kinase β als direkter Effektor von $G\beta\gamma$ diskutiert werden. Jedoch ist zu berücksichtigen, daß sich die EC_{50} -Werte der $G\beta\gamma$ -Stimulation der heterodimeren PI-3-Kinase β und γ stark unterscheiden (100 nM bzw. 5 nM). So sind zur Aktivierung der PI-3-Kinase β sehr viel höhere $G\beta\gamma$ -Konzentrationen nötig, was die Frage nach der physiologischen Relevanz eines PI-3-Kinase β -abhängigen Signalwegs stellt. Diese Insensitivität könnte jedoch durch die synergistische Aktivierung der PI-3-Kinase β durch $G\beta\gamma$ und Tyrosin-Kinasen kompensiert werden. Zwar bleiben die EC_{50} -Werte dabei unverändert, allerdings ist die Effizienz der Stimulation und damit die gebildete PI-3,4,5-P₃-Menge um ein Vielfaches höher (siehe Abb. 8). Die in einem solchen Szenario notwendige Tyr-Phosphorylierungs-Aktivität könnte aus dem gleichen initialen $G\beta\gamma$ -Signal hervorgehen, da bei den meisten $G\beta\gamma$ -induzierten, Ras-abhängigen MAPK-Signalwegen die Tyrosin-Phosphorylierung von Shc durch vermutlich Src-ähnliche Tyrosin-Kinasen beobachtet wird (Luttrell et al., 1996, 1997).

Faßt man die Befunde dieser Arbeit und der Literatur zusammen, so könnten die Signale von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen auf der Stufe der PI-3-Kinase β auf zwei unterschiedliche Arten zusammenlaufen. Einerseits ist vorstellbar, daß die PI-3-Kinase β von jedem der beidem Signalwege unabhängig aktiviert wird. Somit wäre sie ein Kreuzungspunkt, an dem $G\beta\gamma$ -induzierte Signale in p85-abhängige Signale übergehen können und umgekehrt. Andererseits könnte sie als ein Koinzidenzdetektor dienen, indem sie gleichzeitige Signale unterschiedlicher Rezeptorklassen integriert und verstärkt.

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

Um den Angriffsort von $G\beta\gamma$ an den beiden heterodimeren Enzymen einzugrenzen, wurden die katalytischen Untereinheiten in Abwesenheit von p85 bzw. p101 auf ihre Sensitivität gegenüber $G\beta\gamma$ untersucht. Sowohl die p110 β - als auch die p110 γ -Untereinheit zeigten eine konzentrationsabhängige, sättigbare Aktivierung durch $G\beta\gamma$. Das Ausmaß der Stimulation und die EC₅₀-Werte von $G\beta\gamma$ (\approx 100-150 nM) waren für beide Präparationen vergleichbar.

Daraus läßt sich schließen, daß die $G\beta\gamma$ -Sensitivität der Klasse I PI-3-Kinasen nicht auf ein gemeinsames Strukturelement zurückzuführen ist, wie es für die p85-Untereinheit zutrifft, die als Adaptor für die Aktivierung der PI-3-Kinasen α , β und δ durch Tyrosin-Kinasen verantwortlich ist. Bei der PI-3-Kinase β ist die katalytische Untereinheit alleine für die Stimulationsfähigkeit durch $G\beta\gamma$ verantwortlich, während bei der PI-3-Kinase γ beide Untereinheiten bestimmte Funktionen bei der Aktivierung durch $G\beta\gamma$ übernehmen (siehe auch 6.3). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Befunden, in denen eine direkte Interaktion von $G\beta\gamma$ mit der p110 γ -Untereinheit gezeigt wurde (Stoyanov et al., 1995, Tang und Downes, 1997, Leopoldt et al., 1998). Die strukturelle Einteilung in Klasse I_A und Klasse I_B PI-3-Kinasen stimmt demzufolge nicht, wie bisher angenommen, mit den funktionellen Eigenschaften ihrer Mitglieder überein. Es erscheint daher sinnvoll, Klasse I PI-3-Kinasen neben der rein strukturellen Klassifizierung auch nach funktionellen Gesichtspunkten zu einzuteilen, und zwar in rein G-Protein-sensitive Formen, wie die PI-3-Kinase γ , rein RTK-sensitive Formen, wie die PI-3-Kinase α und δ , und solche, wie die PI-3-Kinase β , die durch beide Rezeptorklassen aktiviert werden können (Abb. 37).

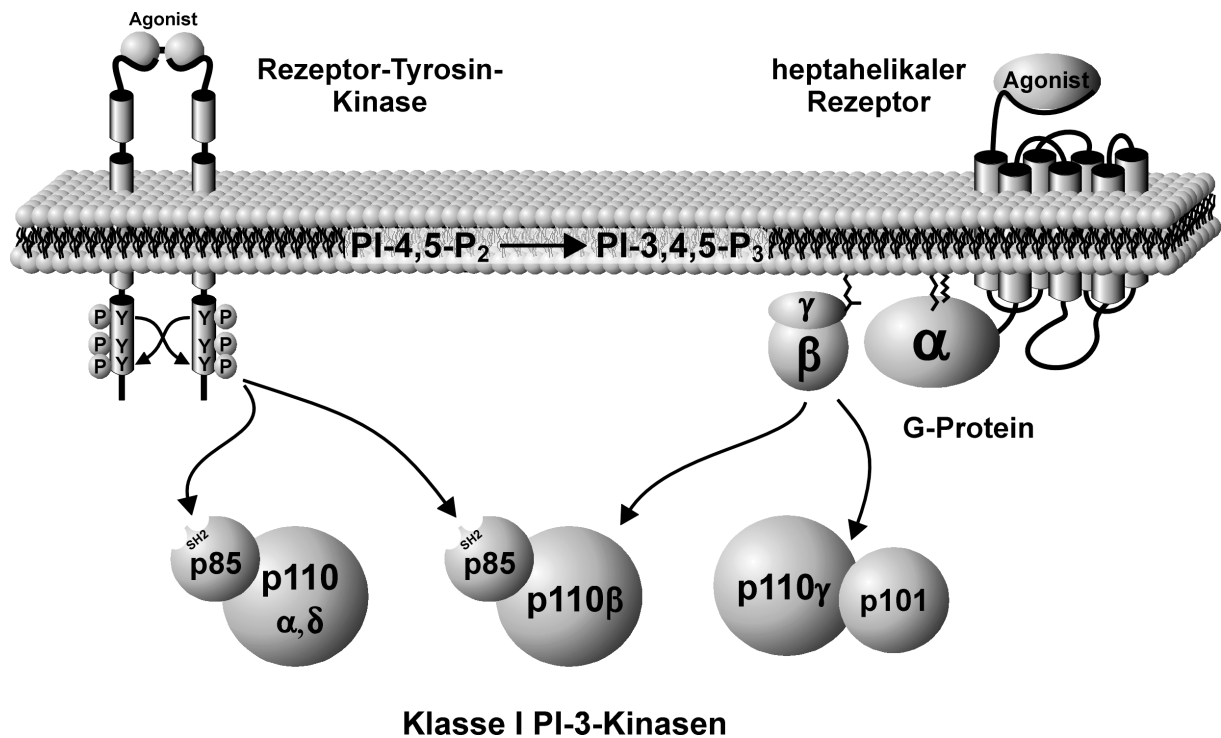


Abb. 37: Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen

Klasse I PI-3-Kinasen können durch verschiedene Rezeptorklassen aktiviert werden. Die Isoformen α und δ werden durch RTKs direkt aktiviert, wobei dies über die p85-Adaptor-Untereinheit vermittelt wird. Die PI-3-Kinase β kann zusätzlich durch G $\beta\gamma$ -Dimere stimuliert werden, die an der katalytischen Untereinheit angreifen. Wirken beide Signale gleichzeitig, führt dies zu einer synergistischen Aktivierung. Die PI-3-Kinase γ zeigt nur eine Sensitivität gegenüber G $\beta\gamma$. Der Angriff erfolgt ebenfalls an der katalytischen Untereinheit, während die p101-Untereinheit regulatorisch in die Aktivierung eingreift (siehe auch 6.3).

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

Eine wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Funktion der nicht-katalytischen p101-Untereinheit bei der G $\beta\gamma$ -vermittelten Stimulation der PI-3-Kinase γ . In Anwesenheit von p101 wurde die Sensitivität der p110 γ für G $\beta\gamma$ bei Verwendung von PI-4,5-P₂ als Substrat stark erhöht. Der EC₅₀-Wert für G $\beta\gamma$ war für das heterodimere Enzym (≈ 5 nM) im Vergleich zur monomeren p110 γ -Untereinheit (≈ 100 nM) um den Faktor 20 zu kleineren Konzentrationen verschoben. Im Gegensatz dazu war eine signifikante Stimulation der PI-Phosphorylierung nur in Abwesenheit von p101 möglich (siehe Abb. 15). Interessanterweise hatte die p101-Untereinheit keinen Einfluß auf die Substratspezifität im unstimulierten Zustand der PI-3-Kinase γ .

Die Ergebnisse zeigen, daß die p101-Untereinheit kein G $\beta\gamma$ -Adaptor für die katalytische p110 γ -Untereinheit ist, sondern die Substratspezifität des G $\beta\gamma$ -stimulierten Enzyms bestimmt. Dies könnte die *in vivo*-beobachtbare Präferenz der PI-3-Kinase γ für PI-4,5-P₂ erklären. Bisher war es völlig unklar, weshalb Klasse I PI-3-Kinasen *in vitro* drei Phosphoinositide, PI, PI-4-P und PI-4,5-P₂, als Substrate akzeptieren, obwohl nach Aktivierung der Enzyme *in vivo* nur PI-3,4,5-P₃ als unmittelbares Produkt gebildet wird (Stephens et al., 1991, Hawkins et al., 1992). Auch die Beobachtung, daß die p101-Untereinheit die Substratpräferenz der PI-3-Kinase γ nur im G $\beta\gamma$ -stimulierten Zustand beeinflusst, ist mit der *in vivo*-Situation vereinbar, da Klasse I PI-3-Kinasen in ruhenden Zellen kaum eine Aktivität zeigen. Dadurch wird die membranäre Konzentration von PI-3,4,5-P₃ unter Basalbedingungen auf einem sehr niedrigen Niveau gehalten (Traynor-Kaplan et al., 1988). Offen bleibt jedoch, wodurch die *in vivo*-PI-4,5-P₂-Selektivität der Klasse I_A PI-3-Kinasen determiniert wird. Wie in der vorliegenden Arbeit für die PI-3-Kinase β gezeigt werden konnte, wird die Substratspezifität der p110 β durch die Assoziation mit p85 nicht verändert. Daß hier andere Mechanismen diskutiert werden müssen, erscheint aus mehreren Gründen wahrscheinlich. Zum einen ist die p110 γ deutlich sensitiver gegenüber Detergenzien als die p110 α , was auf einen Unterschied in der Interaktion der beiden Enzyme mit Lipid-artigen Strukturen und damit auch mit den Substraten hindeutet (Stoyanova et al., 1997). Zum anderen gibt es auch strukturelle Unterschiede, die eine, C-terminal der hochkonservierten Kinase-Domäne gelegene, putative Substratbindungsregion betreffen. Dort weisen die p110 α , β und δ im Gegensatz zur p110 γ eine Abfolge von mehreren basischen Aminosäuren auf. Solche polybasischen Bereiche sind auch schon in anderen Proteinen als PI-4,5-P₂-Bindungsregionen identifiziert worden (siehe auch 6.4).

Die hier vorgestellten Befunde lassen vermuten, daß zur optimalen PI-3,4,5-P₃-Bildung durch die PI-3-Kinase γ ein Komplex aus drei Komponenten gebildet werden muß (Maier et al., 1999). Dieser besteht aus G $\beta\gamma$, der katalytischen p110 γ -Untereinheit und der regulatorischen p101-Untereinheit. Die strukturellen Grundlagen, die dafür sorgen, daß genau diese Anordnung zu einer maximalen Stimulierbarkeit der PI-4,5-P₂-Phosphorylierung führt, sind derzeit unbekannt. Die Interaktion von G $\beta\gamma$ mit p110 γ und p101 konnte in dieser und anderen Arbeiten schon gezeigt werden (Stoyanov et al., 1995, Stephens et al., 1997, Tang und Downes, 1997, Leopoldt et al., 1998). Eine weitere Ursache könnte darin liegen, daß G $\beta\gamma$ und PI-4,5-P₂ ihre Bindung an Proteine gegenseitig verstärken können. So führte die gemeinsame, kooperative Bindung von G $\beta\gamma$ und PI-4,5-P₂ an die β -adrenerge Rezeptorkinase (β ARK) zur einer verstärkten Membrantranslokation und Stimulation (Pitcher et al., 1995). Inwieweit ein ähnlicher Mechanismus auch für die PI-3-Kinase γ in Frage kommt, muß noch durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Interessanterweise gibt es Hinweise, daß p110 γ nicht konstitutiv mit p101 assoziiert sein soll, sondern möglicherweise als monomere p110 γ -Untereinheit Funktionen ausüben kann. So führte z.B. die Stimulation von U937-Zellen mit Retinsäure zur einer Erhöhung der p110 γ -, nicht aber der p101-Expression. Als Folge davon konnte eine dauerhafte MAPK-Aktivierung beobachtet werden (Baier et al., 1999). Daneben gibt es Befunde, wonach in HepG2-Zellen die G $\beta\gamma$ -Stimulation der PI-3-Kinase γ eine Translokation der katalytischen p110 γ -Untereinheit in den Zellkern bewirkt, während p101 cytosolisch lokalisiert bleibt (Metjian et al., 1999). Zusammengenommen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit würde dies die Möglichkeit eröffnen, daß die katalytische p110 γ -Untereinheit selektiv PI-3-P bzw. PI-3,4,5-P₃ bilden kann, je nachdem ob sie als monomeres oder p101-assoziiertes, heterodimeres Enzym vorliegt. In diesem Zusammenhang sind Berichte interessant, wonach die Konzentration von PI-3-P im Zellkern während der G₀/M-Phase des Zellzyklusses erhöht ist (Dobos et al., 1993). So wäre es vorstellbar, daß die PI-3-Kinase γ nicht nur durch die Lipid- und Proteinkinase-Aktivität (siehe 6.4), sondern auch durch die selektive Bildung von Phosphoinositiden unterschiedliche Signale weitergeben könnte.

6.4 *G $\beta\gamma$ -Sensitivität der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ*

Neben ihrer Fähigkeit, Phosphoinositide an der 3'-Position des Inositolrings zu phosphorylieren, besitzen Klasse I PI-3-Kinasen eine Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität. Für die PI-3-Kinase γ wurde gezeigt, daß diese Aktivität zu einer Phosphorylierung der katalytischen p110 γ -, nicht aber der p101-Untereinheit führte (Stoyanova et al., 1997, Maier et al., 1999).

Ein viel wichtigeres Ergebnis ist in diesem Zusammenhang jedoch die Stimulierbarkeit der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ -Dimere. Analog zur PI- und PI-4,5-P₂-Phosphorylierung konnte auch die Autophosphorylierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit sowohl in An- als auch in Abwesenheit der nicht-katalytischen p101-Untereinheit durch G $\beta\gamma$ stimuliert werden. Allerdings wurde das Ausmaß der Aktivitätssteigerung durch die Assoziation von p110 γ mit p101 signifikant erhöht. Im Gegensatz zur Aktivierung der Lipidkinase-Aktivität blieb jedoch der EC₅₀-Wert von G $\beta\gamma$ nahezu unbeeinflusst. Dies unterstreicht, daß die G $\beta\gamma$ -Sensitivität der PI-3-Kinase γ nicht ausschließlich auf der p101-Untereinheit beruhen kann, sondern daß sie als regulatorisches Element in diese Aktivierung eingreift. Im Gegensatz zu den Klasse I_A PI-3-Kinasen α , β und δ ist die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase γ nicht Mn²⁺-abhängig, sondern erfordert ähnliche Mg²⁺ und G $\beta\gamma$ -Konzentrationen, die auch bei der Lipidkinase-Aktivität beobachtet werden.

Die funktionelle Bedeutung der Autophosphorylierung ist ungeklärt. Im Gegensatz zur PI-3-Kinase α und δ führt sie nicht zu einer Inhibition der Lipidkinase-Aktivität. Vorstellbar ist, daß die p110 γ -Autophosphorylierung einen Beitrag zu der beobachteten PI-4,5-P₂-Selektivität der G $\beta\gamma$ -stimulierten PI-3-Kinase γ leistet, indem sie die Bindungsaffinität der p110 γ -Untereinheit für PI-4,5-P₂ und G $\beta\gamma$ vergrößert. Diese Hypothese basiert auf Berichten, in denen der Einfluß von Ser/Thr-Phosphorylierungen auf die Bindung von Phosphoinositiden und G $\beta\gamma$ beschrieben wurde. Einerseits war die kooperative Bindung von G $\beta\gamma$ und PI-4,5-P₂ an humanes Pleckstrin durch die Phosphorylierung von spezifischen Ser- und Thr-Resten verstärkt (Abrams et al., 1996). Andererseits führte die Bindung von PI-3,4,5-P₃ bzw. PI-4,5-P₂ an ein von Neurogranin abgeleitetes, synthetisches Peptid zu einer verstärkten Phosphorylierung des darin enthaltenen Ser-Restes durch Proteinkinase C- α (Lu und Chen, 1997). Eine strukturelle Gemeinsamkeit dieser Phosphoinositid-Bindungsregionen ist ein Konsensusmotiv von mehreren basischen Aminosäureresten, welches auch in einer N-terminalen Region der p110 γ -Untereinheit vorhanden ist (Abb. 38).

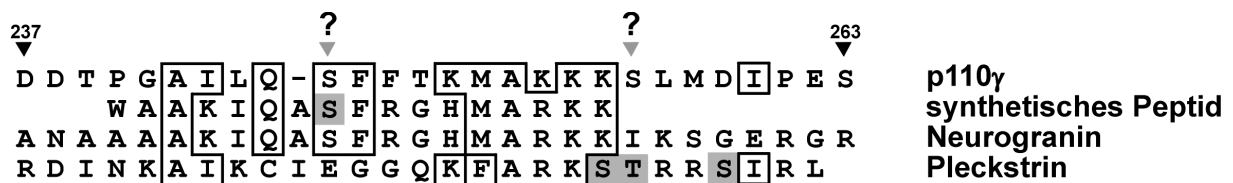


Abb. 38: Konsensussequenz Phosphoinositid-bindender Strukturen

Sequenzvergleich der Phosphoinositid-Bindungsregionen von Pleckstrin, Neurogranin, einem davon abgeleiteten, synthetischen Peptid und einem N-terminalen Ausschnitt der katalytischen p110 γ -Untereinheit der PI-3-Kinase γ . Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen von Pleckstrin und Neurogranin bzw. dem synthetischen Peptid sind grau unterlegt. Potentielle Phosphorylierungsstellen der p110 γ -Sequenz sind durch graue Dreiecke (?) markiert.

Solche polybasischen Bereiche sind auch schon in einigen anderen Proteinen, wie z.B. Gelsolin, Villin oder auch der PLC- β ₂, als PI-4,5-P₂-Bindungsregionen identifiziert worden (Yu et al., 1992, Janmey et al., 1992, Simões et al., 1995). Wie die Einführung eines negativ geladenen Phosphatrestes die Bindungsaffinität für ebenso negativ geladene Phosphoinositide verstärken kann, ist bislang jedoch unklar.

Zusätzlich zur eigenen katalytischen Untereinheit kann die PI-3-Kinase γ vermutlich auch andere Substrate phosphorylieren und so zelluläre Antworten auslösen. So ist eine Lipidkinase-defiziente p110 γ -Mutante nach Transfektion in COS7-Zellen zwar nicht mehr zur PKB-Aktivierung in der Lage, führt aber immer noch zu einer Wortmannin-abhängigen MAPK-Stimulation (Bondeva et al., 1998). Eine Voraussetzung dafür, daß die PI-3-Kinase γ Rezeptor-abhängig über die Proteinkinase-Aktivität tatsächlich Signale weiterleiten kann, wäre jedoch der Nachweis ihrer Stimulierbarkeit durch G $\beta\gamma$. Einen Hinweis dafür liefert die

vorliegende Arbeit, indem gezeigt wurde, daß die Proteinkinase-Aktivität, gemessen als Autophosphorylierung der p110 γ -Untereinheit, signifikant durch G $\beta\gamma$ -Dimere stimuliert werden kann. Zusammengefaßt läßt sich schlußfolgern, daß die PI-3-Kinase γ nach Rezeptor-vermittelter Aktivierung durch zwei voneinander unabhängige Mechanismen sekundäre Effekte in der Zelle auslöst. Die selektive Bildung von PI-3,4,5-P₃ bewirkt unter anderem die Aktivierung von PKB, während ihre Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität zur Stimulation des MAPK-Signalweges führt (Abb. 39).

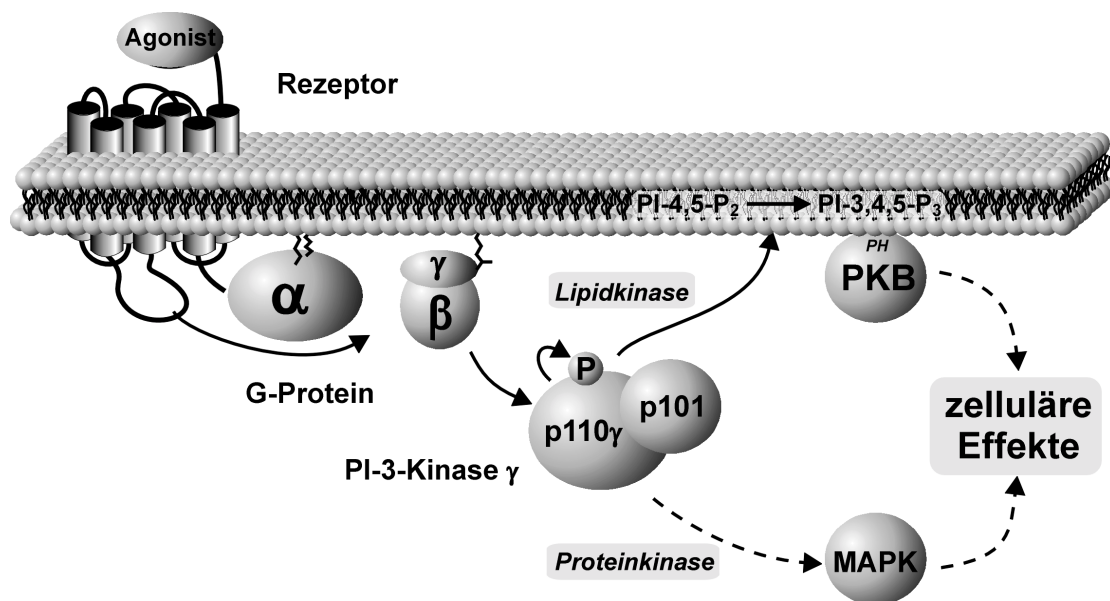


Abb. 39: Signalqualitäten der PI-3-Kinase γ

Die PI-3-Kinase γ kann sowohl durch ihre Lipidkinase- als auch durch ihre Proteinkinase-Aktivität zelluläre Effekte auslösen. Die Lipidkinase-Aktivität führt zu selektiven Bildung von PI-3,4,5-P₃, das dann zur Stimulation der PKB und weiteren zellulären Substraten führt (siehe auch Abb. 6). Die Proteinkinase-Aktivität kann vermutlich davon unabhängig MAPK-Signalwege stimulieren.

6.5 $G\beta\gamma$ -Isoformspezifität der PI-3-Kinase β und γ

Bei der G $\beta\gamma$ -vermittelten Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen handelt es sich um eine direkte Interaktion der beteiligten Proteine, was in der vorliegenden Arbeit durch verschiedene Ansätze, wie Koreinigungs- und Stimulationsexperimente, demonstriert werden konnte. Die Spezifität dieser Wechselwirkung zwischen G $\beta\gamma$ und PI-3-Kinase β bzw. γ wurde durch die Verwendung definierter G $\beta\gamma$ -Komplexe bestimmt, die mit Hilfe des Baculovirus/*Sf9*-Expressionssystems erhalten wurden. Dabei zeigte sich, daß sowohl die Identität der G β - als auch die der G γ -Untereinheit einen Einfluß auf die stimulatorische Aktivität des G $\beta\gamma$ -Komplexes hatte.

Aus den Retinae von Rindern isoliertes Transduzin- $\beta\gamma$ zeigte eine stark verminderte Potenz in der Stimulation der PI-3-Kinase γ im Vergleich zu rekombinant gereinigtem $G\beta_1\gamma_2$, $G\beta_2\gamma_2$ und $G\beta_3\gamma_2$. Dieses Ergebnis stimmt mit zahlreichen Untersuchungen an anderen Enzymen überein, bei denen Transduzin- $\beta\gamma$ stets eine abgeschwächte Fähigkeit zur Effektormodulation zeigte (Clapham und Neer, 1997). In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß dieses besondere Verhalten des $G\beta_1\gamma_1$ -Dimers nicht nur von der Farnesylierung, sondern auch von der Aminosäuresequenz der $G\gamma_1$ -Untereinheit abhängt (Myung et al., 1999). So zeigte ein $G\beta_1\gamma_2$ (C15-Farnesyl)-Dimer im Vergleich zu $G\beta_1\gamma_2$ eine ebenso verringerte Fähigkeit zur PLC- β_2 -Aktivierung wie ein Komplex aus $G\beta_1$ und $G\gamma_1$ (C20-Geranylgeranyl). Interessanterweise war bei der parallel untersuchten $G\beta\gamma$ -Stimulation der membranären Adenylylcyclase der Einfluß einer veränderten $G\gamma$ -Proteinsequenz größer als die Verkürzung des $G\gamma$ -Isoprenrestes. So scheint sowohl die Peptidstruktur als auch die Isoprenylierung der $G\gamma$ -Untereinheit eine Bedeutung bei der Kopplung an Effektoren zu haben. Der jeweilige Beitrag zum Gesamteffekt ist jedoch offensichtlich davon abhängig, ob die zu modulierenden Enzyme schon an bzw. in der Membran lokalisiert sind oder erst durch $G\beta\gamma$ dorthin transloziert werden (Matsuda et al., 1998).

Bei den Untersuchungen zur $G\beta$ -Isoformspezifität wurde in allen Fällen $G\gamma_2$ als Bindungspartner eingesetzt, da dieses $G\gamma$ in den bisher veröffentlichten Studien zu einer effektiven Dimerbildung mit allen $G\beta$ in der Lage war (Iñiguez-Lluhi et al., 1992, Watson et al., 1994, Lindorfer et al., 1998). In den hier vorgestellten Untersuchungen zeigte $G\beta_5\gamma_2$ als einzige der getesteten $G\beta\gamma$ -Kombinationen keinerlei stimulierende Wirkung auf die Aktivität der PI-3-Kinase β und $-\gamma$. Dieses Verhalten umfaßte sowohl die Lipid- und Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ , als auch die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase β mit und ohne Kostimulation durch ein p85-Bindungspeptid. Im Gegensatz dazu konnte $G\beta_1\gamma_2$ in allen Fällen die Enzymaktivitäten potent und effizient stimulieren. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß Klasse I PI-3-Kinasen nicht durch $G\beta_5$ reguliert werden.

Daraus ergibt sich die Frage, welche funktionellen Konsequenzen eine solche Spezifität nach sich zieht. In diesem Zusammenhang sind Befunde aus Transfektions-Untersuchungen interessant, wonach $G\beta_5\gamma_2$ im Gegensatz zu $G\beta_1\gamma_2$ in COS7-Zellen keine Aktivierung von ERKs (*extracellular signal-regulated kinase*) und JNK (*c-jun N-terminal kinase*) induzieren konnte (Zhang et al., 1996b). Wie durch zahlreiche Studien in den letzten Jahren belegt wurde, tragen $G\beta\gamma$ -Komplexe zur Auslösung mitogener Effekte durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bei (Gutkind, 1998, Luttrell et al., 1999). Dabei verläuft die Aktivierung der MAPK hauptsächlich über Ras-abhängige Signalwege, während bei der Induktion der JNK-Aktivität Ras-verwandte kleine GTPasen, wie Rac1 und Cdc42, involviert sind (Coso et al., 1995, Fanger et al., 1997). Für PI-3-Kinasen als ein mögliches Bindeglied zwischen $G\beta\gamma$ und Ras bzw. Rac1 spricht die schon erwähnte ERK-Aktivierung durch die

PI-3-Kinase γ (Lopez-Illasaca et al., 1997, Bondeva et al., 1998). Daneben wurde aber auch eine $G\beta\gamma$ -induzierte Stimulation des MAPK-Signalwegs beschrieben, die über p85-assoziierte PI-3-Kinasen verläuft (Hawes et al., 1996, Hu et al., 1999). Wenn hier eine direkte Stimulation der PI-3-Kinase durch $G\beta\gamma$ erfolgt, könnte hierfür die PI-3-Kinase β verantwortlich sein, da diese, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die einzige $G\beta\gamma$ -sensitive, p85-assoziierte PI-3-Kinase ist.

Durch verschiedene Arbeiten ergeben sich immer mehr Hinweise, daß PI-3-Kinasen auch an der Regulation von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen vom L-Typ beteiligt sind. Dabei scheinen sowohl RTK- als auch GPCR (*G-protein coupled receptor*)-abhängige Signalwege eine Rolle zu spielen (Blair und Marshall, 1997, Takahashi et al., 1999). In Kooperation mit Dr. Nathalie Macrez, Bordeaux, konnten wir zeigen, daß Angiotensin II (AT II) in Portalvenen-Myocyten L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle über eine $G\beta\gamma$ -sensitive PI-3-Kinase aktiviert (Viard et al., 1999, siehe Abb. 40).

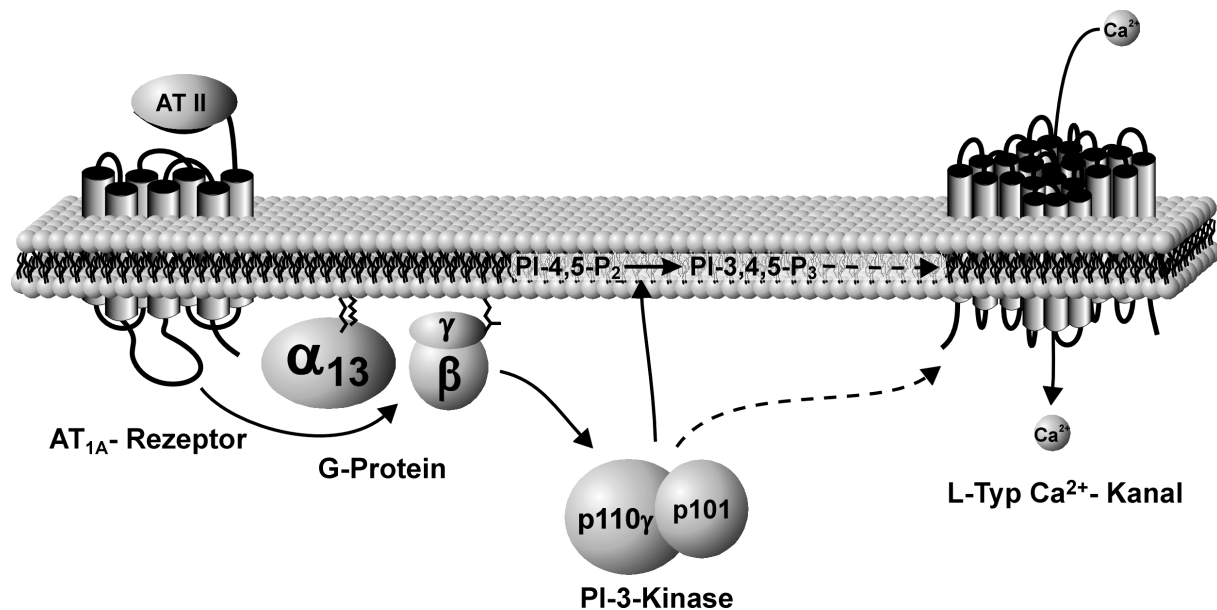


Abb. 40: Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen durch Angiotensin II in Portalvenen-Myocyten

Die Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen in Portalvenen-Myocyten durch Angiotensin II (AT II) verläuft über ein G_{13} -Protein, dessen $G\beta\gamma$ -Untereinheiten eine PI-3-Kinase stimulieren.

Dabei kommt es vermutlich zur Stimulation eines PTX-insensitiven G-Proteins, dessen freigesetzte $G\beta\gamma$ -Untereinheiten eine PI-3-Kinase stimulieren (Macrez et al., 1997). Ob schließlich die Bildung von PI-3,4,5-P₃ oder die PI-3-Kinase-abhängige Stimulation anderer Proteine die Aktivierung des Ca^{2+} -Kanals bewirkt, ist noch unklar und wird derzeit untersucht. Bekannt ist allerdings, daß Portalvenen-Myocyten sowohl $G\beta_1$ als auch $G\beta_5$ exprimieren (Macrez et al., 1997). So lag es nahe, zu überprüfen, inwieweit die durch

Rekonstitution von gereinigten Proteinen erhaltenen Befunde zur G β -Isoformspezifität von Klasse I PI-3-Kinasen auf ein Ganz-Zell-System übertragen werden können. In der Tat war G $\beta_5\gamma_2$ im Gegensatz zu G $\beta_1\gamma_2$ nicht mehr in der Lage einen verstärkten Ca²⁺-Einstrom zu induzieren (Abb. 41). Daraus kann geschlossen werden, daß die Spezifität der AT II-induzierten PI-3-Kinase-Aktivierung auf der G $\beta\gamma$ -Ebene mitbestimmt wird.

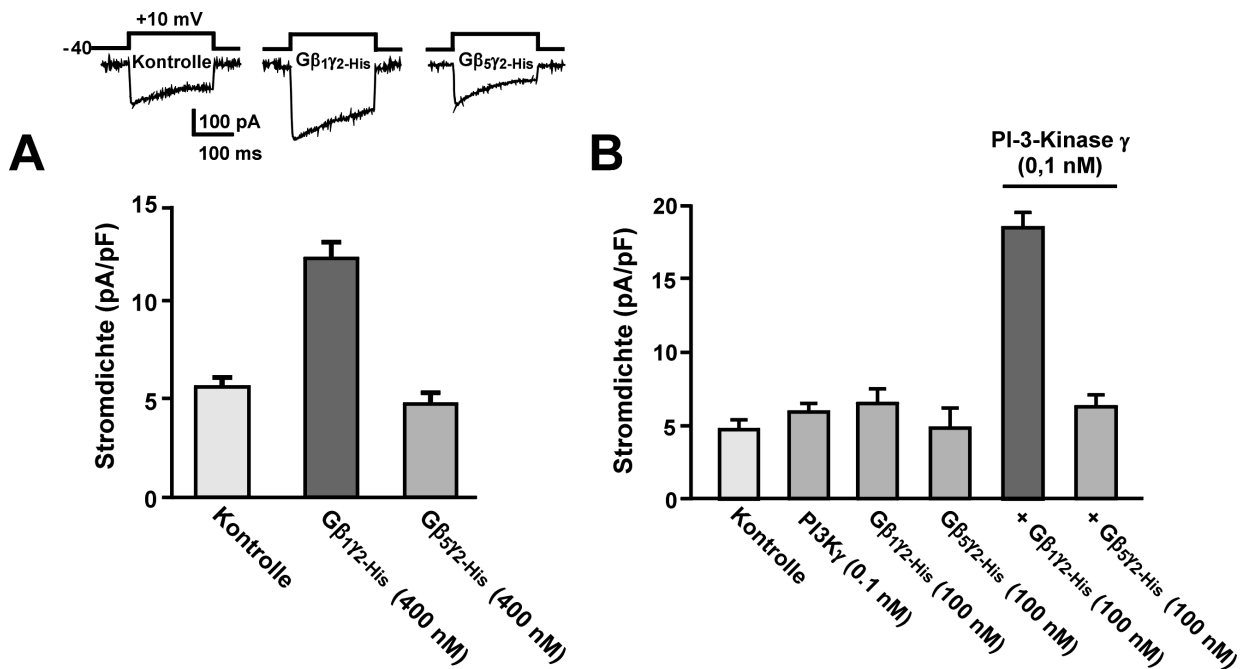


Abb. 41: G β -Isoform-spezifische Aktivierung von L-Typ Ca²⁺-Kanälen in Portalvenen-Myocyten

(A) Die Ba²⁺-Ströme wurden durch Depolarisation auf +10 mV ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV erhalten. Die Stromdichte wurde in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. in Anwesenheit von 400 nM (Pipettenkonzentration) G $\beta_1\gamma_2$ -His bzw. G $\beta_5\gamma_2$ -His gemessen. Gezeigt sind typische Strom-Zeit-Kurven (oben) bzw. Mittelwerte (+ S.E.M.) von 8-9 Messungen (unten). (B) In einem analogen Versuchsansatz wurden die Ba²⁺-Ströme unter Kontrollbedingungen und nach Infusion von PI-3-Kinase γ (0,1 nM), G $\beta_1\gamma_2$ -His bzw. G $\beta_5\gamma_2$ -His (je 100 nM) gemessen. Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß die getrennte Infusion von G $\beta\gamma$ -Komplexen und PI-3-Kinase γ keine signifikante Stimulation der Ca²⁺-Kanäle bewirkte. Gezeigt sind Mittelwerte (+ S.E.M.) von je 5-10 Messungen.

6.6 G $\beta_5\gamma_2$ als hochselektiver Modulator von Effektoren

Ein sehr überraschendes Ergebnis der vorliegenden Arbeit war, daß G $\beta_5\gamma_2$ innerhalb der eng verwandten Phospholipase C- β -Familie zwischen den Isoformen differenzierte. Die PLC- β_2 wurde durch G $\beta_5\gamma_2$ im gleichen Umfang wie durch G $\beta_1\gamma_2$ stimuliert, während die PLC- β_3

durch $G\beta_1\gamma_2$, nicht aber durch $G\beta_5\gamma_2$ aktiviert werden konnte. Die Sensitivität der PLC- β_2 gegenüber $G\beta_5$ war schon früher sowohl durch Transfektions-Studien als auch durch Rekonstitution gereinigter Proteine gezeigt worden (Watson et al., 1994, Lindorfer et al., 1998). Zur PLC- β_3 existierten bislang jedoch keine Daten bezüglich ihrer Regulation durch $G\beta_5$. Unabhängig von jeglicher physiologischer Relevanz konnte auch die PLC- β_1 sowohl durch $G\beta_1\gamma_2$ als auch durch $G\beta_5\gamma_2$ aktiviert werden (Abb. 42).

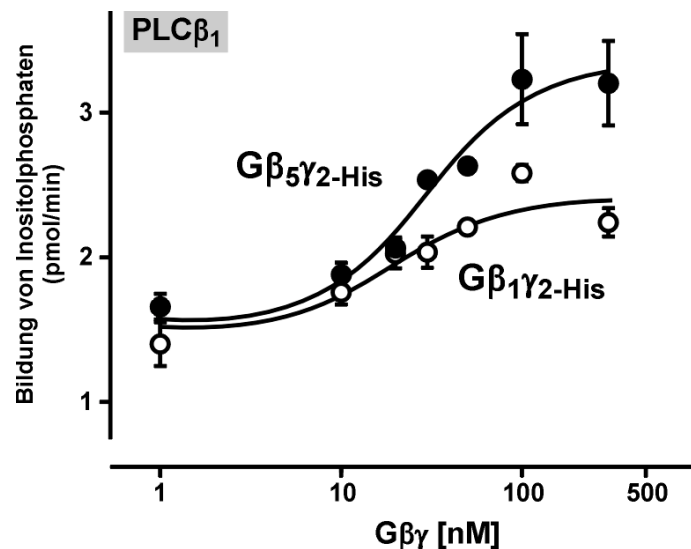


Abb. 42: Stimulation der PLC- β_1 durch $G\beta_1\gamma_2$ und $G\beta_5\gamma_2$

Die PLC- β_1 wurden mit steigenden Konzentrationen $G\beta_1\gamma_2$ -His und $G\beta_5\gamma_2$ -His stimuliert. Die Durchführung der Experimente erfolgte entsprechend Illenberger und Mitarbeitern (1998). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte von Doppelwerten (\pm S.E.M.) (D. Illenberger, U. Maier, A. Babich, P. Gierschik, B. Nürnberg, unveröffentlichte Befunde).

Dies zeigte, daß die PLC- β_3 offensichtlich die einzige $G\beta\gamma$ -sensitive PLC- β -Isoform ist, die nicht durch $G\beta_5\gamma_2$ aktiviert wird. Zusammengenommen mit der spezifischen Regulation der Klasse I PI-3-Kinasen lassen diese Ergebnisse den Schluß zu, daß auf der Ebene von $G\beta\gamma$, unabhängig von der GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit, eine hochselektive Modulation Phospholipid-abhängiger Effektoren stattfindet.

Hieraus ergibt sich die Frage, auf welchen strukturellen Grundlagen die beobachtete Spezifität in der Effektorregulation durch $G\beta_5$ beruht. Bedenkt man die relativ große Abweichung der Primärstruktur von $G\beta_5$ im Vergleich zu den anderen $G\beta$ -Isoformen, so sollte dieses außergewöhnliche Verhalten durch die Kenntnis der interagierenden Strukturen von $G\beta\gamma$ und Effektoren leicht erklärbar sein. In der Tat wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien veröffentlicht, die bestimmte Aminosäuren von $G\beta$ für die Interaktion mit verschiedenen Effektoren verantwortlich gemacht haben (Yan und Gautam, 1997, Ford et al., 1998, Panchenko et al., 1998). So wurden sogar zwei $G\beta_1$ -Mutanten beschrieben, von denen die

eine zwar noch die PLC- β_2 , aber nicht mehr die PLC- β_3 stimulierte, während die andere Mutante das umgekehrte Effektor-Kopplungsmuster zeigte (Li et al., 1998). Leider handelte es sich bei jeder dieser Aminosäuren um hochkonservierte Reste, die in allen G β -Isoformen, einschließlich G β_5 , vorkommen. Daher sind für eine detailliertere Aussage zur G β -Isoform-spezifischen Regulation von Effektoren weitere Mutationsanalysen erforderlich, die vor allem solche Aminosäuren betreffen, durch die sich G β_5 von den anderen G β -Isoformen unterscheidet.

Obwohl die G $\beta\gamma$ -sensitiven PLC- β_1 , PLC- β_2 und PLC- β_3 eine hohe Aminosäure-identität aufweisen, scheint es doch Unterschiede in der Interaktion mit G $\beta\gamma$ zu geben. Während bei allen drei Isoformen eine G $\beta\gamma$ -Bindung an größere N-terminale Bereiche gezeigt werden konnte, ist nur für die PLC- β_2 eine zusätzliche Bindungsstelle innerhalb der katalytischen Domäne am Beginn der sog. Y-Region bekannt (Sankaran et al., 1998, Wang et al., 1999, Barr et al., 2000, siehe auch Abb. 3). Im Gegensatz zur N-terminalen Bindungsregion, die etwa 200 bis 300 Aminosäuren umfaßt, kann dieses zusätzliche Bindungsmotiv der PLC- β_2 auf 10 Aminosäuren eingegrenzt werden. Möglicherweise bilden die beiden Bereiche eine gemeinsame Bindungstasche und können so zu der beobachteten Spezifität der G β_5 -Aktivierung beitragen.

Über die Aktivität von G β_5 an anderen Effektorsystemen war bis zum Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Erst in jüngster Zeit häufen sich Berichte, in denen G β_5 ein abweichendes Verhalten im Vergleich zu den anderen G β -Isoformen zeigt. Aufgrund dieser und der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse läßt sich nun ein differenzierteres Bild der Regulation von Effektoren durch G $\beta\gamma$ -Komplexe erhalten (Tab. 7).

Tab. 7: G β -Isoform-spezifische Effektor-Regulation

Effektor	G β_1	G β_5	Referenz
PI-3-Kinase			
PI3K β	↑	–	Maier et al., 2000
PI3K γ	↑	–	Stoyanov et al., 1995, Maier et al., 2000
Phospholipase C-β			
PLC- β_1	↑	↑	Smrcka und Sternweis, 1993, Maier et al., 2000
PLC- β_2	↑	↑	Katz et al., 1992, Lindorfer et al., 1998
PLC- β_3	↑	–	Carozzi et al., 1993, Maier et al., 2000
Adenylylcyclase			
AC I	↓	↓	Tang und Gilman, 1991, Bayewitch et al., 1998a
AC II	↑	↓,(↑) ?	Bayewitch et al., 1998a, Lindorfer et al., 1998
AC V	↑,↓ ?	(↓)	Posner et al., 1999, Bayewitch et al., 1998b
AC VI	↓	(↓)	Bayewitch et al., 1998b
N-Typ Ca²⁺-Kanal	↓	↓	Garcia et al., 1998, Ruiz und Ikeda, 2000

Für die in der Tabelle nicht aufgeführten Effektoren liegen noch keine Daten bzgl. ihrer Regulation durch G β_5 vor. ↑ = Stimulation; ↓ = Hemmung; (↑),(↓) = eingeschränkte Stimulation bzw. Hemmung, – = keine Modulation; ? = widersprüchliche Ergebnisse.

Dabei werden Effektoren von G β_1 und G β_5 gleichartig oder entgegengesetzt moduliert, oder G β_5 zeigt eine abgeschwächte bzw. überhaupt keine Wirkung. Die inkonsistenten Angaben für bestimmte AC-Isoformen resultieren aus widersprüchlichen Ergebnissen von Transfektions-Studien und rekonstituierten Systemen mit gereinigten Proteinen. Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, die Klassifizierung von G-Proteinen nicht mehr ausschließlich auf der Basis der enthaltenen G α -Untereinheit vorzunehmen, da auch die G $\beta\gamma$ -Untereinheit die Signaleigenschaften des G-Proteins wesentlich mitbestimmt.

Ein weiterer wichtiger Befund der vorliegenden Arbeit ist, daß sich die Ursachen für die selektive Regulation von G $\beta\gamma$ -sensitiven Effektoren unterscheiden. Die fehlende Stimulation der PI-3-Kinasen konnte auf eine fehlende Interaktion zwischen G $\beta_5\gamma_2$ und der PI-3-Kinase β bzw. - γ zurückgeführt werden (siehe Abb. 33 und 37). Im Gegensatz dazu war G $\beta_5\gamma_2$ in der Lage, mit der PLC- β_3 weiter zu interagieren, indem es die Stimulation durch G $\beta_1\gamma_2$ hemmte (siehe Abb. 37). Diese Beobachtungen werden durch eine erst kürzlich erschienene Arbeit unterstützt, die zeigt, daß die Interaktionsfläche zwischen G β und PLC- β_2 in zwei Bereiche aufgeteilt werden kann. Davon ist eine Region für die reine Bindung und die andere für die Übertragung des Signals auf den Effektor verantwortlich (Buck et al., 1999). Überträgt man

diese Theorie auf den vorliegenden Fall, so könnte $G\beta_5\gamma_2$ auf drei verschiedene Arten in G-Protein-abhängige Signalwege eingreifen. Erstens, durch die reguläre Modulation von Effektoren, zweitens, durch die Auslassung von Effektoren aufgrund fehlender Bindungsfähigkeit und drittens, durch die Antagonisierung $G\beta\gamma$ -induzierter Effekte als Folge der Bindung an Effektoren ohne Signaltransfer (Abb. 43).

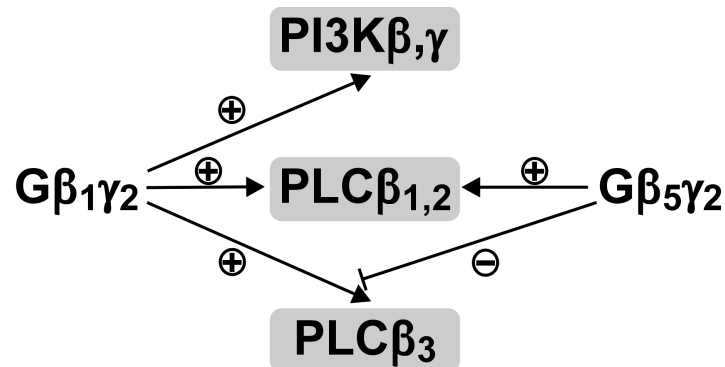


Abb. 43: Selektive Modulation Phospholipid-abhängiger Effektoren durch $G\beta_1\gamma_2$ und $G\beta_5\gamma_2$

Das Wissen über die Interaktion von $G\beta_5$ mit Effektoren hat sich in den letzten zwei Jahren beträchtlich erweitert (siehe Tab. 7). Demgegenüber weiß man nur wenig über die $G\alpha$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten, mit denen $G\beta_5$ unter physiologischen Bedingungen assoziiert vorliegt. Auch sind keine Rezeptoren bekannt, die an G-Proteine mit $G\beta_5$ koppeln. Interessanterweise wurde von Fletcher und Mitarbeitern (1998) beschrieben, daß $G\beta_5$ bevorzugt mit $G\alpha_q$ interagieren soll. Dies würde dafür sprechen, daß vor allem typische G_q -koppelnde Rezeptoren für die Freisetzung von $G\beta_5\gamma$ -Dimeren verantwortlich sein könnten. Allerdings wurde in den hier vorgestellten Untersuchungen auch die Interaktion von $G\beta_5\gamma_2$ mit $G\alpha_i$ nachgewiesen (Maier et al., 2000). Es ist deshalb erforderlich, in zukünftigen Untersuchungen solche Rezeptoren zu identifizieren, die die Aktivierung $G\beta_5$ -haltiger G-Proteine bewirken.