

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Klasse I PI-3-Kinasen sind wichtige „second messenger“-bildende Enzyme, die an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Zellwachstums- und Differenzierungsvorgängen, cytoskelettalen Veränderungen oder der Steuerung von vesikulären Transportvorgängen beteiligt sind. Allerdings ist wenig über ihre Regulation und den Mechanismus ihrer Aktivierung bekannt. Insbesondere die G-Protein-Sensitivität dieser Enzymklasse ist nur unzureichend verstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Mechanismus und die Spezifität der G $\beta\gamma$ -vermittelten Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen besser zu verstehen.

Zu diesem Zweck wurden die vier heterodimeren Klasse I PI-3-Kinasen als rekombinant gereinigte Enzyme auf ihre Sensitivität gegenüber G $\beta\gamma$  untersucht. Die PI-3-Kinase  $\beta$  und  $\gamma$  wurden durch nanomolare Konzentration von G $\beta\gamma$  stimuliert. Dabei blieb die Stimulierbarkeit durch G $\beta\gamma$  auch ohne die Assoziation mit der jeweiligen nicht-katalytischen Untereinheit p85 bzw. p101 erhalten. Interessanterweise war die Sensitivität von p110 $\beta$  und p110 $\gamma$  mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von ca. 100 nM G $\beta\gamma$  nahezu gleich. Folglich stimmt die strukturelle Einteilung der Klasse I PI-3-Kinasen in p85- und nicht p85-assoziierte Formen nicht, wie bisher angenommen, mit der Sensitivität gegenüber Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und G $\beta\gamma$  überein.

Um die Rolle der p101-Untereinheit bei der G $\beta\gamma$ -vermittelten Aktivierung genauer zu analysieren, wurden G $\beta\gamma$ -Stimulationsversuche mit der monomeren (p110 $\gamma$ ) und der heterodimeren (p101/p110 $\gamma$ ) PI-3-Kinase  $\gamma$  durchgeführt. Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener Substrate auf die Stimulierbarkeit der Enzyme untersucht. Dabei zeigte sich, daß die p101-Untereinheit die Substratspezifität der G $\beta\gamma$ -stimulierten PI-3-Kinase  $\gamma$  beeinflusst. Einerseits wurde durch die p101 die G $\beta\gamma$ -Stimulation der PI-Phosphorylierung gehemmt, andererseits wurde die Sensitivität der p110 $\gamma$  für G $\beta\gamma$  in Anwesenheit von PI-4,5-P<sub>2</sub> stark erhöht. So war für PI-4,5-P<sub>2</sub> als Substrat der EC<sub>50</sub>-Wert für die G $\beta\gamma$ -Stimulation des heterodimeren Enzyms im Vergleich zur katalytischen p110 $\gamma$ -Untereinheit um Faktor 20 zu kleineren Konzentrationen verschoben. Dieser Mechanismus könnte teilweise eine Erklärung dafür sein, daß es nach Stimulation G $\beta\gamma$ -sensitiver PI-3-Kinasen *in vivo* zur selektiven Phosphorylierung von PI-4,5-P<sub>2</sub> und damit zur Bildung von PI-3,4,5-P<sub>3</sub> kommt, obwohl auch PI und PI-4-P *in vitro*-Substrate für Klasse I PI-3-Kinasen sind.

Die Untersuchung der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  ergab, daß es nur zu einer Autophosphorylierung der katalytischen p110 $\gamma$ -Untereinheit, nicht aber der p101-Untereinheit kommt. Auch diese Enzymqualität zeigte eine Sensitivität gegenüber G $\beta\gamma$ , wobei die Assoziation der p110 $\gamma$  mit der p101 zu einer verstärkten Stimulierbarkeit der

Proteinkinase-Aktivität führte. Allerdings unterschieden sich die jeweils benötigten  $G\beta\gamma$ -Konzentration zur halb-maximalen Stimulation kaum und lagen im einem Bereich, der auch für die Stimulation der PI-4,5-P<sub>2</sub>-Phosphorylierung gefunden wurde. Dies spricht dafür, daß die Lipid- und Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  parallel ablaufen können.

Um die Spezifität der Interaktion von  $G\beta\gamma$  mit PI-3-Kinasen zu analysieren, wurden  $G\beta\gamma$ -Komplexe, bestehend aus definierten  $G\beta$ - und  $G\gamma$ -Untereinheiten, mit Hilfe des Baculovirus/*Sf9*-Expressionssystems gereinigt und auf ihre Fähigkeit zur Stimulation der PI-3-Kinase  $\beta$  und  $\gamma$  untersucht. Dabei zeigte sich, daß sowohl die  $G\beta$ - als auch die  $G\gamma$ -Untereinheit die Interaktion mit den PI-3-Kinasen beeinflusst. Während  $G\beta_1\gamma_2$ ,  $G\beta_2\gamma_2$  und  $G\beta_3\gamma_2$  mit fast identischer Potenz (10 nM) und Effizienz die PI-3-Kinase  $\gamma$  stimulierten, war der EC<sub>50</sub>-Wert (500 nM) für Transduzin- $\beta\gamma$  (T<sub>D</sub> $\beta\gamma$ ), das hauptsächlich aus  $G\beta_1\gamma_1$  besteht, um den Faktor 50 zu höheren Konzentrationen verschoben. Interessanterweise zeigte  $G\beta_5\gamma_2$  keine stimulatorische Aktivität an den getesteten PI-3-Kinase-Isoformen. Dies umfaßte sowohl die Lipid- und Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  als auch die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\beta$ , mit und ohne Kostimulation durch ein Tyr-phosphoryliertes p85-Bindungspeptid. Der Grund für die fehlende Stimulierbarkeit durch  $G\beta_5\gamma_2$  war die fehlende Interaktionsfähigkeit zwischen  $G\beta_5\gamma_2$  und der PI-3-Kinase  $\beta$  bzw  $\gamma$ . Hieraus kann geschlossen werden, daß Klasse I PI-3-Kinasen nicht durch  $G\beta_5$  reguliert werden. Dessen ungeachtet war  $G\beta_5\gamma_2$  in der Lage, die Pertussistoxin-vermittelte ADP-Ribosylierung von  $G\alpha_{i1}$  zu unterstützen und darüber hinaus die Aktivität der Phospholipase C- $\beta_2$  zu stimulieren. Dies belegte, daß es sich bei den eingesetzten  $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexen um funktionell aktive Proteine handelte, die sowohl mit  $G\alpha$  als auch mit Effektoren interagieren können.

Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, daß die Spezifität G-Protein-abhängiger PI-3-Kinase-Signale auf verschiedenen Ebenen determiniert ist. Auf Rezeptorebene, indem nur bestimmte PI-3-Kinase-Isoformen aktiviert werden, auf G-Protein-Ebene, da PI-3-Kinasen nur von bestimmten  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten stimuliert werden können, und auf der PI-3-Kinase-Ebene selbst, wo die selektive Bildung von 3'-phosphorylierten Lipidprodukten die Vielfalt der auslösbaren Effekte einschränkt.