

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Signalverarbeitung

Die Wahrnehmung und Verarbeitung extrazellulärer Signale ist für eine Zelle von größter Wichtigkeit. Voraussetzung für die komplexe Funktion vielzelliger Organismen ist die Kommunikation zwischen den Zellen und eine entsprechend koordinierte Regulation ihrer intrazellulären Prozesse. Zellen haben für verschiedenste chemische oder physikalische Reize spezifische Rezeptoren, die die eintreffenden Signale über unterschiedliche Mechanismen in das Zellinnere weiterleiten. Der direkte Kontakt einer Zelle zu benachbarten Zellen oder zur extrazellulären Matrix wird von hierauf spezialisierten Adhäsionsmolekülen wahrgenommen (Aplin et al., 1998). Auch ohne direkten Kontakt können Zellen über Signalmoleküle miteinander kommunizieren. Diese Informationsträger bezeichnet man allgemein als Hormone bzw. als Neurotransmitter, wenn sie von Nervenzellen freigesetzt werden. Zu solchen Botenstoffen gehören Moleküle unterschiedlicher chemischer Struktur, unter anderem Proteine (z. B. das Follikel-stimulierende Hormon, FSH), kleinere Peptide (z. B. Vasopressin), Aminosäuren (z. B. Glutamat), biogene Amine (z. B. Adrenalin), Fettsäurederivate (z. B. Prostaglandine) und Steroide (z. B. Progesteron). Lipophile Moleküle wie die Steroidhormone können die Zellmembran leicht durch Diffusion überwinden und binden an spezifische Rezeptoren im Zellinneren (Evans, 1988). Für hydrophile Signalmoleküle wie Aminosäuren und Peptide hingegen stellt die Plasmamembran eine Barriere dar; sie binden daher an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche. Diese Transmembran-Proteine können infolge der Bindung des extrazellulären Signalmoleküls einen intrazellulären Effekt auslösen. Die Weiterleitung des Signals von der Zelloberfläche ins Zellinnere hinein bezeichnet man als transmembranäre Signaltransduktion. Im weiteren Sinne versteht man unter zellulärer Signaltransduktion auch die intrazellulären Signalverarbeitungs-Schritte, die zum zellulären Effekt wie z. B. der Transkription bestimmter Gene führen.

1.2 Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion

Entsprechend ihrer Funktionsweise unterscheidet man verschiedene Klassen von Zelloberflächen-Rezeptoren.

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind charakteristisch für die schnelle synaptische Signalübertragung zwischen elektrisch erregbaren Zellen. Diese Rezeptoren sind gleichzeitig Ionenkanäle, deren Permeabilität für bestimmte Ionen durch die Bindung des Liganden moduliert wird (Unwin, 1993). Z. B. ist der nikotinsche Acetylcholinrezeptor ein Kationenkanal, der durch die Bindung des Neurotransmitters Acetylcholin geöffnet wird (Krauss et al., 2001).

Enzym-gekoppelte Transmembran-Rezeptoren haben eine intrazelluläre Domäne mit enzymatischer Aktivität. So besitzen Wachstumsfaktor-Rezeptoren eine intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne. Neben solchen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) (Schlessinger, 2000) gibt es auch Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen (ten Dijke et al., 1996), Rezeptor-Phosphatasen (Streuli, 1996) und Rezeptor-Guanylylcyclasen (Garbers et al., 1994). Andere Zelloberflächen-Rezeptoren sind intermolekular mit einem intrazellulären Enzym assoziiert, z. B. Cytokin-Rezeptoren mit der Tyrosin-Kinase Jak (Taniguchi, 1995).

Wieder andere Zelloberflächen-Rezeptoren koppeln intrazellulär an heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) (Gudermann et al., 1995). Die extrazelluläre Agonistbindung führt über eine Konformationsänderung des Rezeptors zur Aktivierung des gebundenen G-Proteins, das dann seinerseits diverse intrazelluläre Effektorproteine moduliert (Nürnberg et al., 1995). Dieses Prinzip der Signaltransduktion hat sich im Laufe der Evolution offenbar bewährt (Bockaert & Pin, 1999). So findet man G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G-protein-coupled receptors*, GPCR) z. B. auch in Pflanzen und Hefen. Bei Vertebraten sollen über 1 % des Genoms für GPCRs codieren. Über GPCRs werden so unterschiedliche Signale wie z. B. Licht, Geruchsstoffe, Ca^{2+} , Nukleotide, Aminosäuren, biogene Amine, Peptide und Proteine wahrgenommen.

1.2.1 Signaltransduktion durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

Ligand-aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen geben das Signal durch intrazelluläre Tyrosin-Phosphorylierung weiter. Viele Enzyme werden durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität moduliert (Krebs & Beavo, 1979). Z. B. phosphorylieren sich die durch Bindung ihrer bivalenten Liganden zu Dimeren zusammengezogenen RTK-Moleküle gegenseitig an bestimmten Tyrosinresten in einer als Aktivierungsschleife (*activation loop*) bezeichneten Region ihrer intrazellulären Domänen, wodurch ihre Kinase-Aktivität gesteigert wird (Schlessinger, 1988; Hubbard et al., 1998). Die so aktivierten RTKs phosphorylieren dann weitere Tyrosinreste ihrer intrazellulären Domänen (außerhalb der Aktivierungsschleifen) sowie verschiedene andere Proteine, darunter Effektor-Enzyme. Die Phospholipase C γ (PLC γ) z. B. wird von RTKs phosphoryliert und dadurch aktiviert (Rhee, 2001). Die phosphorylierten Tyrosinreste der intrazellulären Domänen der RTKs stellen im Kontext mit benachbarten Aminosäuren Bindungsstellen für bestimmte Domänen anderer Proteine dar. Prototyp für Phosphotyrosin-bindende Domänen sind die häufig vorkommenden SH2-Domänen (benannt nach der Homologie zur 2. Domäne der Kinase Src, dem zellulären Homolog des onkogenen Genprodukts des *Rous sarcoma virus*) (Pawson & Gish, 1992). Die Tyrosin-Phosphorylierung eines Proteins reguliert also auch seine Interaktion mit anderen Proteinen (Abb. 1A). Protein-Protein-Interaktionen können wiederum zelluläre Umverteilungen bewirken, und die subzelluläre Lokalisation von Proteinen spielt bei der

Regulation verschiedener zellulärer Prozesse eine entscheidende Rolle. Die PLC γ bindet über zwei SH2-Domänen an Tyrosin-phosphorylierte RTKs und wird dadurch aus dem Cytosol an die Plasmamembran rekrutiert. So gelangt sie in die Nähe ihres Substrats, das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Matsuda et al., 2001). Andere Enzyme werden durch die Bindung ihrer SH2-Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste allosterisch aktiviert. Z. B. werden die durch Lipidmodifikationen bereits Membranassoziierten Mitglieder der Src-Familie (selbst Tyrosin-Kinasen) durch die Bindung ihrer SH2-Domäne an Tyrosin-phosphorylierte RTKs von einer inaktiven („geschlossenen“) in eine aktive („offene“) Konformation überführt (Thomas & Brugge, 1997). Src-Kinasen werden über andere Mechanismen auch von Rezeptoren ohne intrinsische Enzymaktivität aktiviert, z. B. die Src-Kinasen Fyn und Lck durch den T-Zell-Rezeptor.

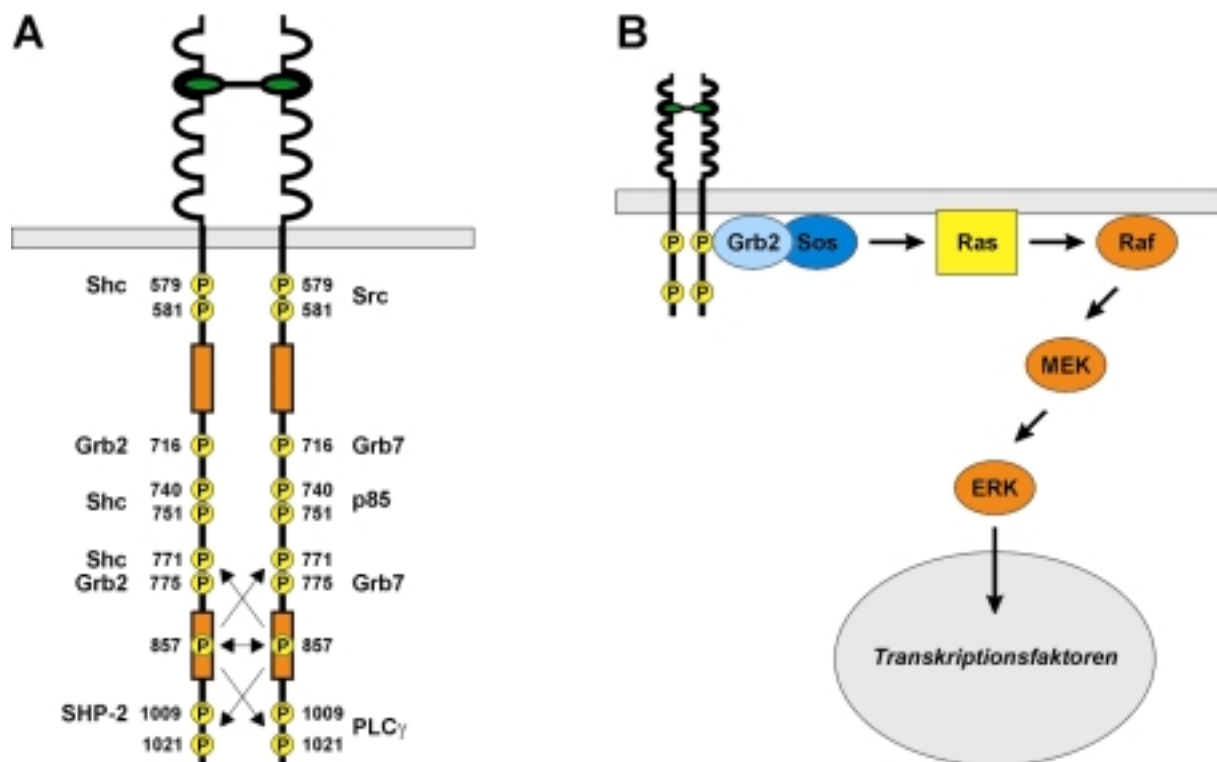


Abb. 1: A: Signaltransduktion durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen am Beispiel des PDGF- β -Rezeptors. Die Bindung des bivalenten Liganden führt zur Rezeptor-Dimerisierung. Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen phosphorylieren sich gegenseitig. Die Phosphorylierung in der katalytischen Domäne (beim PDGF-Rezeptor zweigeteilt) erhöht die Kinase-Aktivität. Die phosphorylierten Tyrosinreste außerhalb der katalytischen Domäne dienen als Andockstellen für weitere Signaltransduktions-Proteine. *Nach: Heldin & Westermark, 1999.* **B: Schematische Darstellung der Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen über die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade.** Erläuterungen siehe Text.

Neben den genannten Src-Kinasen und der PLC γ werden noch verschiedene andere Effektoren durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert. Häufig führt die Stimulation von RTKs über die sogenannte Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade zur Expression bestimmter Zielgene, die an der Kontrolle von Wachstum und Proliferation beteiligt sind (Abb. 1B). Dieser Signalweg und

die zugrundeliegenden Mechanismen sollen daher im Folgenden kurz diskutiert werden. Er ist außerdem der Prototyp einer Reihe von sogenannten Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskaden (MAP-Kinase- oder MAPK-Kaskaden), über die die Signale verschiedener mitogener Stimuli in den Zellkern weitergeleitet werden (Seger & Krebs, 1995).

An definierte phosphorylierte Tyrosin-Reste der intrazellulären RTK-Domänen kann über seine SH2-Domäne das Adapterprotein Grb2 binden (Growth factor receptor-bound protein 2) (Lowenstein et al., 1992). Außer einer SH2-Domäne hat Grb2 noch zwei SH3-Domänen, die die Interaktion mit Prolin-reichen Sequenzmotiven in anderen Proteinen vermitteln (Pawson & Gish, 1992). Über seine SH3-Domänen ist Grb2 mit dem Protein Sos komplexiert („Son of sevenless“, Ausdruck aus der *Drosophila*-Genetik) (Rozakis-Adcock et al., 1993; Li et al., 1993). Durch die Bindung an Tyrosin-phosphorylierte RTKs wird dieser Komplex aus dem Cytosol an die Plasmamembran rekrutiert. Damit spielt Grb2 die Rolle eines Adapters zwischen RTK und Sos. An der Plasmamembran kann nun Sos seine Wirkung entfalten: Sos ist ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor, GEF) für das an der Membran verankerte Guaninnukleotid-bindende Protein Ras (von Ratten-Sarkom-Virus): Sos fördert den Austausch des an Ras gebundenen GDP gegen GTP. Im GTP-gebundenen Zustand, der auch als aktiver Zustand bezeichnet wird, kann Ras wiederum mit anderen Proteinen interagieren, unter anderem mit der Serin/Threonin-Kinase Raf (Ras-aktivierter Faktor) (Wittinghofer & Nassar, 1996). Durch die Bindung an Ras wird Raf ebenfalls aus dem Cytosol an die Plasmamembran rekrutiert, was wiederum zur Aktivierung von Raf führt (Stokoe et al., 1994; Leever et al., 1994). An der Regulation von Raf sind noch weitere Proteine beteiligt, wobei die genauen Zusammenhänge aber noch unklar sind (Dhillon & Kolch, 2002). Das aktivierte Raf steht nun an erster Stelle einer mehrstufigen Kaskade von Kinasen, die sich nacheinander durch Phosphorylierung aktivieren (Robinson & Cobb, 1997). Raf phosphoryliert die Kinase MEK (MAPK-/ERK-Kinase). MEK phosphoryliert die Serin/Threonin-Kinase ERK (extracellular-signal-regulated kinase) (sowohl an Tyrosin- als auch an Threonin-Resten). Die phosphorylierte ERK transloziert in den Zellkern und phosphoryliert dort bestimmte Transkriptionsfaktoren, wodurch also schließlich die Expression von Genen unter der Kontrolle der entsprechenden regulatorischen Sequenzen angeschaltet wird (Karin & Hunter, 1995).

1.2.2 Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und heterotrimere G-Proteine

1.2.2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und heterotrimere G-Proteine

G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durchspannen die Plasmamembran mit sieben α -Helices (I - VII) und werden daher auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet (Abb. 2). Die

strukturell sehr unterschiedlichen Liganden binden an verschiedenen Stellen des jeweiligen Rezeptors: direkt in der Transmembran-Region (in einer hydrophilen Bindungstasche), an den die Transmembran-Helices verbindenden extrazellulären Schleifen und/oder den strukturell sehr variablen N-terminalen extrazellulären Bereichen (Gudermann et al., 1995, Bockaert & Pin, 1999). Dennoch ist die Struktur der heptahelikalen Transmembran-Region bei allen GPCRs ähnlich. Am besten untersucht ist das für die Wahrnehmung von Licht verantwortliche Rhodopsin (Palczewski et al., 2000). Rhodopsin besteht aus Opsin, dem eigentlichen GPCR, und dem kovalent in der Transmembran-Region gebundenen 11-*cis*-Retinal. Dieses Chromophor isomerisiert nach Absorption eines Photons zu all-*trans*-Retinal. Dies führt zu einer Verschiebung und Verdrehung der relativen Positionen der Transmembran-Helices zueinander (Farrens et al., 1996). Man nimmt an, daß diese Konformationsänderung in der Transmembran-Region bei allen GPCRs vorkommt. Dabei entfernen sich an der cytoplasmatischen Seite der Transmembran-Region zwei Helices (VI und VII) von den anderen. Es wird spekuliert, daß so in der Transmembran-Region eine Bindungstasche für das heterotrimere G-Protein geöffnet wird (Bourne, 1997). Außerdem gibt es Hinweise auf eine vertikale Bewegung der Transmembran-Helix VI in Richtung Cytosol, wodurch ebenfalls eine Interaktion der G-Proteine mit sonst in der Membran verborgenen Aminosäuren möglich sein soll (Schöneberg et al., 1999). Andererseits geht die Umlagerung der Transmembran-Helices natürlich auch mit einer Konformationsänderung der sie verbindenden intrazellulären Schleifen einher. Aminosäuren dicht beiderseits der Übergänge zwischen Transmembran-Helices und intrazellulären Schleifen sind als essentiell für die Aktivierung der G-Proteine identifiziert worden; ihre genauen Funktionen hierbei sind aber noch unklar. Die Spezifität der Kopplung bestimmter GPCRs an bestimmte G-Protein-Subtypen soll durch die intrazellulären Schleifen sowie den intrazellulären C-terminalen Teil des Rezeptors mibestimmt werden (Wong & Ross, 1994; Namba et al., 1993). Hierbei spielen aber offenbar weniger Wechselwirkungen zwischen bestimmten Aminosäuren oder Sequenzmotiven (wie bei SH2-Domänen und phosphorylierten Tyrosinresten) eine Rolle; vielmehr ist es die Struktur der cytoplasmatischen Oberfläche des Rezeptors, die die Bindung bestimmter G-Proteine zuläßt oder nicht. Allein aus der Aminosäuresequenz eines GPCR läßt sich sein G-Protein-Kopplungsmuster noch nicht vorhersagen (Bourne, 1997).

Der Name G-Protein basiert auf der charakteristischen, reversiblen Guaninnukleotid-Bindung: Die Interaktion mit dem stimulierten GPCR fördert den Austausch des im Ruhezustand gebundenen GDP durch GTP, wodurch das G-Protein aktiviert wird (siehe unten). Seine intrinsische GTPase-Aktivität hydrolysiert das GTP zu GDP, wodurch der inaktive Ausgangszustand wieder hergestellt wird. Im Gegensatz zu den verwandten monomeren Guaninnukleotid-bindenden Proteinen wie Ras bestehen die heterotrimeren G-Proteine aus drei Untereinheiten: α , β und γ . Dabei ist das Guaninnukleotid an die $G\alpha$ -Untereinheit gebunden. Durch posttranslationale Lipidmodifikationen sind die G-Proteine an

der Innenseite der Plasmamembran assoziiert, wo sie mit den heptahelikalen Zelloberflächen-Rezeptoren interagieren (siehe Abb. 2). Heterotrimeren G-Proteine werden auch auf Endomembranen gefunden; über ihre möglichen Funktionen und Regulationen ist aber noch wenig bekannt (Nürnberg & Ahnert-Hilger, 1996).

Die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine haben ein Molekulargewicht von 39 - 52 kDa und werden posttranslational myristyliert und/oder palmitoyliert (Casey et al., 1994). Die $G\alpha$ -Untereinheiten werden nach ihrer Sequenzähnlichkeit in vier Subfamilien eingeteilt, die sich auch in ihren funktionellen Eigenschaften widerspiegeln: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$ (Simon et al., 1991, Wilkie et al., 1992). Entsprechend werden auch die heterotrimeren G-Proteine nach ihrer α -Untereinheit in die Subfamilien G_s , G_i , G_q und G_{12} eingeteilt. Die $G\alpha$ -Untereinheit besteht aus zwei Domänen, die als GTPase- und als helikale Domäne bezeichnet werden. Die GTPase-Domäne hat große Strukturähnlichkeit mit den monomeren G-Proteinen. Ihre Grundstruktur ist ein sechssträngiges β -Faltblatt. Die die Stränge verbindenden Schleifen bilden teilweise α -Helices und enthalten einige hoch konservierte Aminosäuren, die an der Bindung des Guaninnukleotids beteiligt sind. Die zweite, helikale Domäne ist bei monomeren GTPasen nicht zu finden. Sie besteht aus sechs α -Helices und ist über zwei flexible Polypeptidketten mit der GTPase-Domäne verbunden. Die genaue Funktion der helikalen Domäne ist nicht bekannt; diskutiert werden eine Unterstützung der GTP-Bindung, eine Modulation der GTPase-Aktivität oder eine Beteiligung bei der Erkennung spezifischer Effektoren (Sprang, 1997).

Die β - und γ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine lassen sich nur unter Denaturierung voneinander trennen (mit einer Ausnahme, siehe unten). Heterodimere $G\beta\gamma$ -Komplexe sind deshalb „funktionelle Monomere“ (Hamm, 1998).

$G\beta$ -Untereinheiten haben ein Molekulargewicht von 35 - 39 kDa. Es sind mittlerweile fünf (einschließlich Spleißvarianten sieben) verschiedene $G\beta$ -Isoformen bekannt (Tab. 1). Die $G\beta$ -Isoformen 1 - 4 sind sich strukturell sehr ähnlich (78 - 88 % Aminosäure-Identität). Erst kürzlich entdeckt wurde das $G\beta_5$, das sich von $G\beta_{1-4}$ deutlich strukturell (nur ca. 50 % Aminosäure-Identität) und funktionell unterscheidet. Im Gegensatz zu den anderen $G\beta$ -Untereinheiten läßt sich $G\beta_5$ auch als Monomer reinigen (Maier et al., 2000) und bildet außer mit $G\gamma$ -Untereinheiten (was bisher auch nur *in vitro* nachgewiesen werden konnte) auch funktionelle Komplexe mit bestimmten RGS-Proteinen (Regulatoren der G-Protein-Signaltransduktion, siehe unten) (Chase et al., 2001). Die Funktion des $G\beta_5$ als klassische $G\beta$ -Untereinheit ist daher unklar.

Die γ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine sind mit 6 - 8 kDa deutlich kleiner als $G\alpha$ und $G\beta$. Man kennt bisher zwölf $G\gamma$ -Isoformen ($G\gamma_{1-5}$ und $G\gamma_{7-13}$; der Name $G\gamma_6$ wird ausgelassen, um Verwechslungen mit $G\gamma_2$ zu vermeiden, das zunächst nach seinem Molekulargewicht als $G\gamma_6$ bezeichnet wurde; $G\gamma_{14}$ ist vermutlich die humane Variante des

murinen $G\gamma_{13}$) (siehe Tab. 1). Sie zeigen eine höhere Diversität als die $G\beta$ - und $G\alpha$ -Untereinheiten. Alle $G\gamma$ -Untereinheiten sind an ihrem C-Terminus prozessiert und tragen einen Isoprenrest, der durch eine vier Aminosäuren umfassende Signalsequenz, CAAX, determiniert wird. Dabei stehen C für Cystein, A für aliphatische und X für beliebige Aminosäuren. $G\gamma_1$, $G\gamma_9$ und $G\gamma_{11}$ haben als letzte Aminosäure (X) ein Serin und werden daher mit einem Farnesylrest (C15) am Cystein modifiziert; alle anderen $G\gamma$ -Untereinheiten haben an letzter Stelle ein Leucin und werden daher mit einem Geranylgeranylrest (C20) isoprenyliert (Chen et al., 1991; Ray et al., 1995). Anschließend können die drei letzten Aminosäuren (AAX) proteolytisch abgespalten werden, und das nun endständige Cystein (C) wird Carboxy-methyliert (Cook et al., 1998). Durch die Isoprenylierung an der γ -Untereinheit sind die $G\beta\gamma$ -Komplexe lipophil und dadurch in der Membran verankert (siehe Abb. 2).

Der N-Terminus der $G\beta$ -Untereinheit ist α -helikal strukturiert. Der restliche Teil des Proteins bildet eine sogenannte β -Propeller-Struktur aus sieben kreisförmig angeordneten β -Faltblättern (den „Propellerblättern“) aus je vier antiparallelen β -Strängen. Der N-Terminus der $G\gamma$ -Untereinheiten ist ebenfalls α -helikal strukturiert. Die beiden Helices von $G\beta$ und $G\gamma$ sind umeinander superspiralisiert („coiled coil“). Der restliche Teil der $G\gamma$ -Untereinheit geht in einer ausgestreckten Konformation entlang den äußeren Bereichen von drei „Propellerblättern“ der $G\beta$ -Untereinheit hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen mit dieser ein (siehe Abb. 2) (Sprang, 1997).

Die Selektivität der Komplexbildung von $G\beta$ - und $G\gamma$ -Isoformen ist gering ausgeprägt (Clapham & Neer, 1997). Auch bei der Interaktion mit $G\alpha$ -Untereinheiten sowie mit Effektoren gibt es nur geringe Unterschiede zwischen verschiedenen $G\beta\gamma$ -Komplexen (Gautam et al., 1998). Daher werden die heterotrimeren G-Proteine auch nach der Entdeckung der eigenen Signalwirkung der $G\beta\gamma$ -Komplexe immer noch nach ihren α -Untereinheiten klassifiziert.

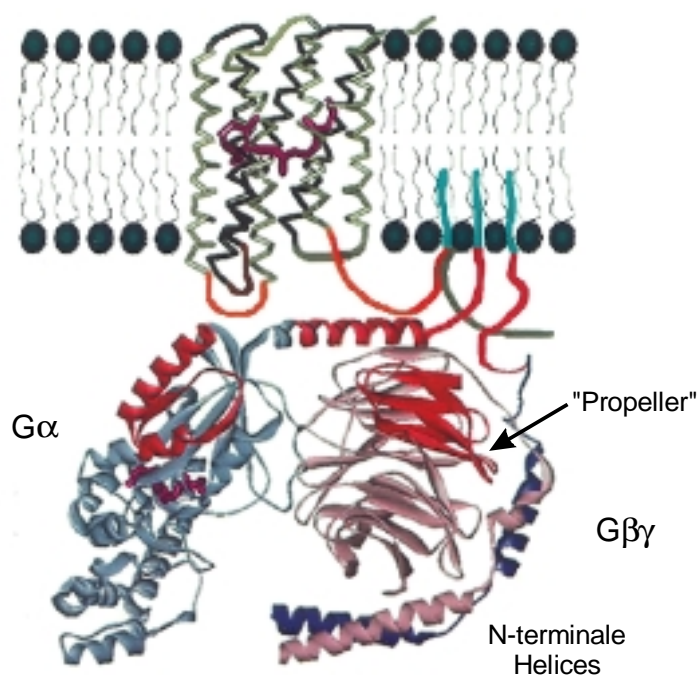


Abb. 2: Modell der Interaktion eines heptahelikalen Rezeptors und eines heterotrimeren G-Proteins an der Membran. Als Beispiele dargestellt sind Rhodopsin und Transducin. Erläuterungen siehe Text. Aus: Hamm et al., 1998.

Im heterotrimeren G-Protein interagiert hauptsächlich die β -Propeller-Struktur des $G\beta\gamma$ -Komplexes mit dem N-Terminus sowie einer der die β -Stränge verbindenden Schleifen der $G\alpha$ -Untereinheit (Lambright et al., 1996; Sprang, 1997).

Die Interaktion mit dem stimulierten heptahelikalen Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des heterotrimeren G-Proteins, die die Freisetzung des im Ruhezustand gebundenen GDP katalysiert. Wenngleich das Guaninnukleotid an der $G\alpha$ -Untereinheit gebunden ist, so übernimmt der $G\beta\gamma$ -Komplex doch bei der Rezeptor-vermittelten Regulation des Nukleotidaustauschs wichtige Funktionen: Die spontane Freisetzung von GDP aus der $G\alpha$ -Untereinheit wird durch die Interaktion mit dem $G\beta\gamma$ -Komplex behindert (Sprang, 1997). Die Affinität zum GPCR wird durch den $G\beta\gamma$ -Komplex erhöht (Hamm, 1998). Der Rezeptor interagiert direkt sowohl mit $G\alpha$ als auch mit $G\beta\gamma$ (Kisselev et al., 1999). Schließlich sind die $G\beta\gamma$ -Komplexe auch für die Rezeptor-induzierte GDP-Freisetzung aus der $G\alpha$ -Untereinheit notwendig (Iiri et al., 1998): Vermutlich wird die Rezeptor-induzierte Öffnung der Nukleotid-Bindungstasche, die relativ weit vom mit dem Rezeptor interagierenden C-Terminus der $G\alpha$ -Untereinheit entfernt liegt, zumindest teilweise über $G\beta\gamma$ vermittelt.

Anstelle des GDP bindet die $G\alpha$ -Untereinheit nun GTP, für das sie eine höhere Affinität aufweist. Der aktivierte GPCR wirkt also für ein heterotrimeres G-Protein bzw. seine α -Untereinheit als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (ähnlich wie Sos für Ras), und zwar indem er die Freisetzung des GDP fördert und den Nukleotid-freien Übergangszustand stabilisiert. Durch die Bindung von GTP statt GDP kommt es zu einer Konformations-änderung der $G\alpha$ -Untereinheit. Diese betrifft vor allem drei Regionen in den die β -Stränge verbindenden Schleifen, die daher auch als Schalter-Regionen (*switch*) bezeichnet werden (Lambright et al., 1996). Die *switch*-Regionen werden durch die Bindung von GTP aus einer ungeordneten, flexiblen in eine geordnete, definierte Struktur überführt. In der GTP-gebundenen Konformation hat die $G\alpha$ -Untereinheit nun eine verringerte Affinität zum $G\beta\gamma$ -Komplex, so daß es zur Dissoziation des Heterotrimeren in freies $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ sowie vom Rezeptor kommt. Beide, $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ können nun jeweils unabhängig voneinander verschiedene Effektorenzyme aktivieren (siehe unten, Kapitel 1.2.2.2 und 1.2.2.3). Dabei haben die $G\alpha$ -Untereinheiten in der GTP-gebundenen Konformation gleichzeitig eine höhere Affinität für ihre Effektoren. Die Konformation der $G\beta\gamma$ -Komplexe hingegen ändert sich kaum. Vielmehr werden ihre Effektor-Bindungsregionen durch die Dissoziation von der $G\alpha$ -Untereinheit freigegeben.

Die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit stellt einen Abschalt-Automatismus der Signalweitergabe dar: Nach Hydrolyse des GTP zu GDP re-assoziert $G\alpha$ wieder mit $G\beta\gamma$ zum inaktiven Heterotrimer. Die Dauer der Signalwirkung wird also durch die Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse bestimmt. Diese hängt vom Subtyp der $G\alpha$ -Untereinheit ab und kann durch einige G-Protein-Effektoren (z. B. $PLC\beta_1$ für $G\alpha_{q/11}$) sowie durch sogenannte RGS-Proteine (Regulatoren der G-Protein-Signaltransduktion) moduliert werden (Berstein et al., 1992; DeVries et al., 2000).

Viele der von $G\alpha$ oder $G\beta\gamma$ aktivierten Effektoren sind Enzyme, die die Bildung von verschiedenen selbst nicht katalytisch aktiven Signalmolekülen katalysieren (sogenannte *second messenger*), die ihrerseits wiederum Effektoren in ihrer Aktivität regulieren. Solche mehrschrittigen Signalkaskaden ermöglichen die Verstärkung des Ausgangssignals sowie eine Signalverzweigung einschließlich einer modulatorischen Interaktion mit anderen Signalwegen („*cross talk*“).

1.2.2.2 Signaltransduktion durch $G\alpha$ -Untereinheiten

Das ubiquitär exprimierte G_s war das zuerst entdeckte G-Protein (Pfeuffer et al., 1977). Seine α -Untereinheit ($G\alpha_s$) stimuliert Adenylylcyclasen (AC) (Sunahara et al., 1996). Diese membranständigen Enzyme katalysieren die Umsetzung von ATP zu cAMP, welches als *second messenger* cAMP-abhängige Serin/Threonin-Kinasen, auch als Proteinkinase A (PKA) bezeichnet, bindet und aktiviert (Meinkoth et al., 1993). Eine Vielzahl verschiedener Proteine wird von PKAs phosphoryliert und in ihrer Aktivität moduliert, z. B. Rezeptoren, Ionenkanäle, Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus, der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP-response element-binding protein*) sowie Phosphodiesterasen. Letztere hydrolysieren cAMP und sorgen so für eine negative Rückkopplung cAMP-abhängiger Signalwege.

Als nächstes G-Protein wurde G_i identifiziert, das mit seinen Isoformen eine eigene Subfamilie bildet. Seine α -Untereinheit ($G\alpha_i$) inhibiert Adenylylcyclasen (Kaziro et al., 1991). Inzwischen kennt man drei G_i -Isoformen, wobei G_{i1} überwiegend neuronal, G_{i2} ubiquitär und G_{i3} überwiegend nicht-neuronal exprimiert werden. Zur G_i -Subfamilie gehört auch das im Gehirn und in Blutplättchen exprimierte G_z , dessen α -Untereinheit ($G\alpha_z$) ebenfalls Adenylylcyclasen inhibiert (Wong et al., 1992), sich aber ansonsten in seinen biochemischen Eigenschaften deutlich von $G\alpha_i$ und anderen $G\alpha$ -Untereinheiten unterscheidet (Casey et al., 1990). Zur G_i -Subfamilie gehören auch die G_o -Proteine, wenngleich deren inhibitorische Wirkung auf Adenylylcyclasen umstritten ist. G_o -Proteine findet man vor allem in neuronalen und neuroendokrinen Zellen, wo eine Beteiligung der $G\alpha_o$ -Untereinheiten an der Regulation des vesikulären Neurotransmitter-Transports (Ahnert-Hilger et al., 1998, Höltje et al., 2000) sowie des Neuriten-Wachstums (Chen et al., 1999) diskutiert wird. Zur Familie der G_i -Proteine zählt man auch die in den Geschmacksknospen exprimierten Gustduzine (G_{gust}) (McLaughlin et al., 1992) sowie die an das erwähnte Rhodopsin koppelnden Transduzine (G_t) (Yarfitz & Hurley, 1994). Beide stimulieren Phosphodiesterasen, die cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) spalten.

G_i -Proteine kommen in großer Menge vor. Bei der Signaltransduktion über $G\beta\gamma$ -Komplexe (siehe unten, Kapitel 1.2.2.3) stammen diese meist aus G_i -Proteinen.

Im Gegensatz zu den Mitgliedern der anderen G-Protein-Subfamilien werden fast alle G_i -Proteine an ihrer α -Untereinheit (Ausnahmen: G_{α_z} sowie die lange Spleißvariante des G_{α_2}) durch Pertussistoxin (PTX, Exotoxin von *Bordetella pertussis*) ADP-ribosyliert, wodurch ihre Aktivierung durch den Rezeptor blockiert wird.

Die dritte G-Protein-Subfamilie ist G_q . Neben den ubiquitär exprimierten G_q und G_{11} gehören hierzu auch G_{14} und G_{15} (Maus) bzw. G_{16} (Mensch), die ein restriktiveres Expressionsmuster aufweisen. G_{α_q} (wie auch die anderen α -Untereinheiten der Mitglieder der G_q -Familie) stimuliert Phospholipasen C β (PLC β) (Smrcka et al., 1991; Blank et al., 1991). Phospholipasen C spalten das Membran-Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns-4,5-P₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃). Die β -Isoformen der PLCs werden über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durch G_{α_q} oder $G\beta\gamma$ stimuliert (Smrcka & Sternweis, 1993), möglicherweise auch das monomere Guaninnukleotid-bindende Protein Rho (Illenberger et al., 1998). Man nimmt an, daß G_{α_q} bzw. $G\beta\gamma$ die PLC β aus dem Cytosol an die Plasmamembran zu ihrem Substrat rekrutieren (wie bei Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und PLC γ) und dadurch aktivieren (Rhee, 2001). Dieses Modell ist allerdings umstritten (Runnels et al., 1996; Romoser et al., 1996).

Das in der Membran verbleibende DAG stimuliert Proteinkinasen C (PKC) (Newton, 1997). Die PKCs werden hierbei aus dem Cytosol an die Plasmamembran transloziert (Schaefer et al., 2001). Die Bindung von DAG an die beiden C1-Domänen (*conserved in PKCs*) induziert neben der Membrantranslokation auch eine Konformationsänderung, durch die die sonst verborgene katalytische Domäne freigegeben wird. Die Membranbindung wird durch die Phospholipid-bindende C2-Domäne unterstützt und die aktive Konformation der PKC so stabilisiert. PKCs phosphorylieren eine Vielzahl verschiedener Proteine und modulieren so deren Aktivität.

Das neben DAG bei der Spaltung des Membranlipids PtdIns-4,5-P₂ gebildete InsP₃ diffundiert durch das Cytosol und bindet am endoplasmatischen Retikulum (ER) an InsP₃-Rezeptoren, die gleichzeitig Ca²⁺-Kanäle sind, und bewirkt so eine Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER ins Cytosol. Die erhöhte freie Ca²⁺-Konzentration im Cytosol ist ein Signal für eine Vielzahl verschiedener zellulärer Funktionen (Bootman & Berridge, 1995).

Die zuletzt entdeckte Familie von G-Proteinen ist die G_{12} -Familie (Strathmann & Simon, 1991). Beide Mitglieder, G_{12} und G_{13} , sind ubiquitär, aber nur in geringen Mengen exprimiert (Spicher et al., 1994). $G_{\alpha_{13}}$ aktiviert Guaninnukleotid-Austauschfaktoren des monomeren GTP-bindenden Proteins Rho (Hart et al., 1998), welches vor allem an der Regulation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt ist (Mackay & Hall, 1998). Außerdem konnte die Aktivierung eines Na⁺/H⁺-Austauschers sowie der Jun-Kinase durch G_{12} -Proteine gezeigt werden (Dhanasekaran et al., 1994; Prasad et al., 1995). Vor kurzem wurde eine direkte Interaktion

von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ mit Cadherinen (Ca^{2+} -abhängigen Adhäsionsmolekülen) gefunden und eine Beeinflussung der entsprechenden Signalwege postuliert (Meigs et al., 2001).

1.2.2.3 Signaltransduktion durch $G\beta\gamma$ -Komplexe

Die aktive Rolle von $G\beta\gamma$ -Komplexen in der Signaltransduktion von Säugerzellen wurde erst viel später entdeckt als die der $G\alpha$ -Untereinheiten. Mittlerweile sind aber eine ganze Reihe von Effektoren von $G\beta\gamma$ bekannt (siehe Tab. 1). PLC β und Adenylylcyclasen wurden bereits als Effektoren von $G\alpha$ -Untereinheiten vorgestellt; sie werden zusätzlich aber auch durch $G\beta\gamma$ -Komplexe reguliert. PLC β -Isoformen können durch $G\beta\gamma$ alleine oder additiv mit $G\alpha_q$ aktiviert werden (Smrcka & Sternweis, 1993). Adenylylcyclasen hingegen werden nicht durch $G\beta\gamma$ alleine reguliert, sondern die durch $G\alpha_s$ stimulierte Aktivität wird durch $G\beta\gamma$ je nach AC-Isoform entweder inhibiert oder synergistisch weiter erhöht (Clapham & Neer, 1997; Taussig & Gilman, 1995). Wie erwähnt wird vor allem die Signaltransduktion G_i -koppelnder Rezeptoren oft über die $G\beta\gamma$ -Komplexe der G_i -Proteine vermittelt.

Tab. 1: Vorkommen der $G\beta$ - und $G\gamma$ -Isoformen und Effektoren von $G\beta\gamma$ -Komplexen.
 \uparrow = Stimulation; \downarrow = Hemmung.

$G\beta$-Untereinheiten	$G\gamma$-Untereinheiten	$G\beta\gamma$-Effektoren
$G\beta_1$: ubiquitär	$G\gamma_1$: Retina (Stäbchen)	AC \downarrow , \uparrow (je nach AC-Isoform)
$G\beta_2$: ubiquitär	$G\gamma_2$: ubiquitär	K^+ -Kanäle (GIRKs) \uparrow
$G\beta_3$: ubiquitär	$G\gamma_3$: neuronal, Hoden	N-, P/Q-, R-Typ Ca^{2+} -Kanäle \downarrow
$G\beta_4$: neuronal, Lunge	$G\gamma_4$: verbreitet	Phospholipasen C- β \uparrow
$G\beta_5$: neuronal, Retina, Pankreas, Herz, Leber, Niere	$G\gamma_5$: Plazenta, Leber	Phospholipase A_2 \uparrow
	$G\gamma_7$: weit verbreitet	Phosphoinositid-3-Kinasen β , γ \uparrow
	$G\gamma_8$: neuronal, olf. Zilien	β -Adrenorezeptor-Kinasen (β ARK) \uparrow
	$G\gamma_9$: Retina (Zäpfchen)	Raf-1-Proteinkinase \uparrow
	$G\gamma_{10}$: ubiquitär	Ras-Austauschfaktor p140Ras-GEF \uparrow
	$G\gamma_{11}$: nicht-neuronal	Bruton-Tyrosinkinase (Btk) \uparrow
	$G\gamma_{12}$: ubiquitär	Tsk-Tyrosinkinase \uparrow
	$G\gamma_{13}$: Geschmacksknospen	

$G\beta\gamma$ -Komplexe haben keine enzymatische Aktivität. Es gibt prinzipiell zwei Möglichkeiten, wie das Signal von $G\beta\gamma$ -Komplexen an Effektoren weitergegeben wird:

- Membranrekrutierung: Durch die Bindung an das (über seine Isoprenylierung an der Membran verankerte) $G\beta\gamma$ wird der Effektor aus dem Cytosol an die Membran transloziert, wodurch dessen Interaktion mit anderen membranständigen Molekülen (Substrat oder weiterer Effektor) ermöglicht wird.

b) Allosterische Regulation: Die Bindung an $G\beta\gamma$ induziert eine Konformationsänderung des Effektors, durch die seine Aktivität moduliert wird.

Beide Mechanismen werden tatsächlich bei der Signaltransduktion von $G\beta\gamma$ auf verschiedene Effektoren ausgenutzt. Im Folgenden soll deshalb jeweils ein Beispiel kurz vorgestellt werden. Prinzipiell könnte ein $G\beta\gamma$ -Effektor auch durch beide Mechanismen gleichzeitig reguliert werden, ein solcher Effektor ist aber bisher nicht beschrieben worden.

Ein Beispiel für Effektoren, die $G\beta\gamma$ durch Translokation aus dem Cytosol an die Membran aktiviert, sind die β -Adrenorezeptor-Kinasen (β ARK) (Benovic et al., 1986; Benovic et al., 1991). Diese gehören zu den bereits erwähnten GPCR-Kinasen (GRK), die durch Phosphorylierung heptahelikaler Rezeptoren deren Desensibilisierung und Internalisierung einleiten. Man kennt sieben verschiedene GRKs (GRK1 - GRK7), die sich in ihrer Struktur, ihrem Aktivierungsmechanismus und in ihrem Vorkommen in verschiedenen Geweben unterscheiden (Ferguson, 2001). Die beiden β -Adrenorezeptor-Kinasen β ARK1 und β ARK2 werden auch als GRK2 und GRK3 bezeichnet. Im Gegensatz zu den anderen GRKs haben die β ARKs keine Lipidmodifikationen als Membrananker und liegen daher im Cytosol vor. Um einen Transmembran-Rezeptor zu phosphorylieren, müssen die β ARKs daher zunächst aus dem Cytosol an die Plasmamembran translozieren. Eben dies geschieht durch die Bindung an das Membran-assoziierte $G\beta\gamma$. Es konnte gezeigt werden, daß $G\beta\gamma$ die β ARKs allein durch die Rekrutierung an die Membran stimuliert, eine theoretisch denkbare zusätzliche allosterische Aktivierung wurde nicht gefunden (Pitcher et al., 1992).

$G\beta\gamma$ -Effektoren, bei deren Regulation eine Membrantranslokation ganz offensichtlich keine Rolle spielt, sind Ionenkanäle (Dascal, 2001). Z. B. aktiviert, das heißt öffnet, $G\beta\gamma$ bestimmte K^+ -Kanäle, die GIRKs (*G-protein-regulated inwardly rectifying K^+ channels*, G-Protein-regulierte einwärts gleichrichtende K^+ -Kanäle) (Logothetis et al., 1987). Die resultierende Hyperpolarisation der Membran bewirkt eine Hemmung der postsynaptischen Erregung im Gehirn (Lüscher et al., 1997) bzw. eine Verringerung der Herzfrequenz (Wickman et al., 1998). GIRKs sind Homo- oder Heterotetramere aus ein oder zwei verschiedenen Untereinheiten, von denen insgesamt vier verschiedene bekannt sind (Krapivinsky et al., 1995). Die gefundene Bindungsstöchiometrie von bis zu vier $G\beta\gamma$ pro tetramerem GIRK läßt die Bindung von je einem $G\beta\gamma$ -Komplex an je eine der vier GIRK-Untereinheiten vermuten (Corey & Clapham, 2001). Die Bindung von $G\beta\gamma$ an die intrazellulären Bereiche der GIRKs (Kunkel & Peralta, 1995) bewirkt eine Konformationsänderung der Transmembranregionen und so die Öffnung des Kanals (Yi et al., 2001; Sadjja et al., 2001).

1.3 Phosphoinositid-3-Kinasen

1.3.1 Phosphoinositide als intrazelluläre Botenstoffe

Wie bereits am Beispiel der Spaltung des PtdIns-4,5-P₂ durch G-Protein- oder RTK-regulierte Phospholipasen C gezeigt wurde, haben Membranlipide neben ihrer Funktion für die Membranstruktur auch wichtige Rollen in der Signaltransduktion. Hierbei kommt dem Phosphatidylinositol (PtdIns) eine herausragende Bedeutung zu: Im Gegensatz zu anderen Membranlipiden kann es an den freien Hydroxylgruppen seines Inositolringes phosphoryliert werden. PtdIns und seine phosphorylierten Derivate bezeichnet man zusammenfassend als Phosphoinositide (PI); sie machen zusammen etwa 1 % der Lipide einer Plasmamembran aus. In Zellen wurden Phosphoinositide mit Phosphorylierungen an den Positionen 3, 4 und 5 des Inositolrings gefunden (und zwar in allen theoretisch möglichen Kombinationen), nicht jedoch an den Positionen 2 und 6 (Position 1 ist definiert durch die Verknüpfung mit dem DAG-Phosphat). Über 90 % der Phosphoinositide in Säugerzellen sind unphosphoryliertes PtdIns, der Rest besteht wiederum zu über 90 % aus PtdIns-4-P und PtdIns-4,5-P₂, und die Mengen der anderen Phosphoinositide liegen nochmal mindestens um den Faktor 10 niedriger (Vanhaesebroeck et al., 2001).

PtdIns-4,5-P₂ ist auch das Substrat für eine weitere in der Signaltransduktion wichtige Reaktion: Stimulierte RTKs oder GPCRs aktivieren bestimmte Phosphoinositid-3-Kinasen (PI-3-Kinasen, siehe unten, Kapitel 1.3.3 und 1.3.4). Diese phosphorylieren PtdIns-4,5-P₂ an der 3'-Position des Inositolrings zu PtdIns-3,4,5-P₃. So steigt z. B. die PtdIns-3,4,5-P₃-Konzentration in neutrophilen Zellen nach Stimulation mit dem chemotaktischen Peptid fMLP (formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin), dessen Rezeptor G_i-Protein-gekoppelt ist, auf das etwa 40-fache (Stephens et al, 1993). PtdIns-3,4,5-P₃ bewirkt nun als *second messenger* die Membrantranslokation und Aktivierung verschiedener Proteine, die mit sogenannten Pleckstrin-Homologie-Domänen (PH-Domänen) an PtdIns-3,4,5-P₃ binden (siehe unten, Kapitel 1.3.5).

1.3.2 Klassifizierung und Struktur der PI-3-Kinasen

Der Phosphoinositid-Haushalt wird durch eine Reihe von PI-Kinasen und PI-Phosphatasen reguliert. PI-Kinasen phosphorylieren den Inositolring jeweils bevorzugt an einer der drei Positionen. Man unterteilt sie daher in PI-3-, -4- und -5-Kinasen. Außerdem akzeptieren sie jeweils mehr oder weniger spezifisch nur bestimmte Substrate, z. B. bestimmte PI-3-Kinasen nur unphosphoryliertes PtdIns, nicht aber PtdIns-4-P, PtdIns-5-P oder PtdIns-4,5-P₂ (Vanhaesebroeck et al., 2001).

PI-3-Kinasen lassen sich daher unter anderem nach ihrer Substratspezifität in drei Klassen einteilen (Tab. 2): Klasse I PI-3-Kinasen können *in vitro* PtdIns, PtdIns-4-P oder PtdIns-4,5-P₂ phosphorylieren, während Klasse II PI-3-Kinasen nur PtdIns oder PtdIns-4-P (aber kein PtdIns-4,5-P₂) und Klasse III PI-3-Kinasen sogar ausschließlich PtdIns als Substrat akzeptieren (Vanhaesebroeck et al., 2001). Die erwähnte Rezeptor-induzierte PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung erfolgt also durch Klasse I PI-3-Kinasen, die als einzige PtdIns-4,5-P₂ phosphorylieren können. *In vivo* scheinen Klasse I PI-3-Kinasen sogar ausschließlich PtdIns-4,5-P₂ umzusetzen: Die PtdIns-3-P-Konzentration ändert sich nach Stimulation nicht; und PtdIns-3,4-P₂ entsteht vermutlich erst durch die Aktivität einer PI-5-Phosphatase aus PtdIns-3,4,5-P₃, denn die maximale PtdIns-3,4-P₂-Konzentration wird erst erreicht, wenn die PtdIns-3,4,5-P₃-Konzentration bereits wieder abfällt (Stephens et al., 1993).

Neben der unterschiedlichen Substratspezifität bestehen zwischen den Mitgliedern der drei PI-3-Kinase-Klassen weitere funktionelle sowie strukturelle Unterschiede (siehe Tab.2).



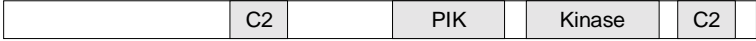

Klasse I PI-3-Kinasen sind heterodimere Enzyme aus einer etwa 110 kDa großen katalytischen Untereinheit (p110) und einer kleineren (50 - 101 kDa) nicht-katalytischen Untereinheit (Vanhaesebroeck et al., 2001). In Säugerzellen kennt man zur Zeit vier verschiedene p110-Isoformen: p110 α (Hiles et al., 1992), β (Hu et al., 1993), γ (Stoyanov et al., 1995) und δ (Vanhaesebroeck et al., 1997). Die heterodimeren Klasse I PI-3-Kinasen bezeichnet man entsprechend als PI-3-Kinasen α , β , γ und δ . Klasse I PI-3-Kinasen sind überwiegend im Cytosol lokalisiert. Sie werden durch Zelloberflächen-Rezeptoren aktiviert und dabei vermutlich aus dem Cytosol an die Plasmamembran rekrutiert. Man unterteilt sie weiter in Klasse I_A und Klasse I_B: Die Klasse I_A PI-3-Kinasen α , β und δ haben eine 50 - 85 kDa große regulatorische Untereinheit (Prototyp: p85) und werden vor allem durch Rezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosin-Kinase-Aktivität aktiviert (siehe unten, Kapitel 1.3.3). Hiervon wird die PI-3-Kinase γ als Klasse I_B PI-3-Kinase abgegrenzt: Sie enthält eine 101 kDa große nicht-katalytische Untereinheit und wird vor allem über GPCRs durch G $\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert (siehe unten, Kapitel 1.3.4).

Klasse II PI-3-Kinasen sind im Gegensatz zu Klasse I PI-3-Kinasen monomere Enzyme und größtenteils in der Membranfraktion (vor allem Golgi) zu finden (Ono et al., 1998). Sie haben ein Molekulargewicht von 170 - 210 kDa. Charakteristisch für die Klasse II PI-3-Kinasen ist eine am C-Terminus gelegene C2-Domäne (MacDougall et al., 1995). Die drei in Säugerzellen gefundenen Klasse II PI-3-Kinase-Isoformen bezeichnet man daher als PI3K-C2 α , PI3K-C2 β und PI3K-C2 γ (alternativ auch PI3K-II α , PI3K-II β und PI3K-II γ). Es gibt Hinweise auf eine Aktivierung der Klasse II PI-3-Kinasen durch Rezeptoren für Chemokine (Turner et al., 1998), Insulin (Brown et al., 1999) und Wachstumsfaktoren (Arcaro et al., 2000). Die hier zugrunde liegenden Mechanismen und zellulären Funktionen sind aber noch unklar.

Prototyp der Klasse III PI-3-Kinasen ist das in *Saccharomyces cerevisiae* gefundene *vacuolar protein-sorting protein* Vps34p (Schu et al., 1993). Wie der Name bereits andeutet,

spielt es eine Rolle bei intrazellulären Transportvorgängen (Herman & Emr, 1990). Das homologe Protein in Säugerzellen wird ebenfalls als Vps34p bezeichnet (Stephens et al., 1994b, Volinia et al., 1995), und man nimmt an, daß es hier ähnliche Funktionen übernimmt. Diese scheinen jedoch nicht durch extrazelluläre Stimuli reguliert zu werden, denn die Konzentration von PtdIns-3-P (dem einzigen Lipidprodukt einer Klasse III PI-3-Kinase) in Zellen bleibt weitgehend konstant. Vps34p liegt als Heterodimer mit einer myristoylierten Serin-/Threonin-Kinase vor, die bei der Hefe als Vps15p, bei den Mammalia als Vps150p bezeichnet wird (Stack et al., 1993, Panaretou et al., 1997). Die Lipidmodifikation vermittelt die Membranassoziation der heterodimeren Klasse III PI-3-Kinase. Die Rolle der Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität ist hingegen unklar.

Tab. 2: Klassifizierung der PI-3-Kinasen nach Substratspezifität und strukturellen Merkmalen der katalytischen Untereinheiten. Erklärungen siehe Text. p85b = p85-Bindungsdomäne. Nach: Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999.

<u>Klasse</u>	<u>Isoformen</u>	<u>Substrate</u> (<i>in vitro</i>)	<u>Struktur der katalytischen Untereinheit</u>
I _A	p110 α p110 β p110 δ	PtdIns PtdIns-4-P PtdIns-4,5-P ₂	
I _B	p110 γ		
II	PI3K-C2 α PI3K-C2 β PI3K-C2 γ	PtdIns PtdIns-4-P	
III	Vps34p	PtdIns	

Trotz der Unterschiede zwischen den Mitgliedern der einzelnen Klassen haben doch alle PI-3-Kinasen eine gemeinsame Grundstruktur: In ihrer Primärstruktur weisen alle PI-3-Kinasen drei konservierte Bereiche auf, die auch als Homologie-Regionen (HR) bezeichnet und von C- nach N-terminal durchnummeriert werden (HR1 - HR3) (Vanhaesebroeck et al., 2001). Die Kristallstruktur ist bislang nur von einer N-terminal trunkierten p110 γ (katalytische Untereinheit der PI-3-Kinase γ) bekannt (Abb. 3) (Walker et al., 1999). Man geht davon aus, daß die dreidimensionalen Strukturen der anderen PI-3-Kinasen, vor allem der katalytischen p110-Untereinheiten der anderen Klasse I PI-3-Kinasen, der p110 γ -Kristallstruktur ähnlich sind.

Die p110 γ -Kristallstruktur zeigt deutlich einen modularen Aufbau des Enzyms aus einzelnen Domänen, die unter anderem den Homologie-Regionen HR1 - HR3 entsprechen (siehe Abb. 3 und Tab. 2).

Die HR1 ist die hoch konservierte Kinase-Domäne. Ihre Struktur ähnelt der Struktur der Kinase-Domänen bekannter Protein-Kinasen, besonders an der ATP-Bindungsstelle. In der Tat haben einige PI-3-Kinasen neben ihrer charakteristischen Lipidkinase- auch eine Proteinkinase-Aktivität (Hunter, 1995). Die Kinase-Domäne der p110 γ ist sowohl aus α -Helices als auch aus β -Faltblättern aufgebaut. Sie läßt sich wiederum in eine N-terminale und eine C-terminale Subdomäne aufteilen, zwischen denen das ATP gebunden wird. Der Adenin-Baustein wird über zwei hydrophobe Wechselwirkungen mit einer Schleife zwischen je einem β -Faltblatt der N- und der C-terminalen Subdomäne gebunden. Die Bindung der Phosphatgruppen des ATP wird von der N-terminalen Subdomäne übernommen. Der α -Phosphatrest des ATP interagiert mit einem Lysinrest an Position 833 der p110 γ . Die Wirkung des aus *Penicillium wortmanni* gewonnenen PI-3-Kinase-Inhibitors Wortmannin (Baggiolini et al., 1987) beruht auf einer kovalenten Bindung an diesen Lysinrest. Ebenso führt die Mutation dieses Lysins zu Arginin (K833R) zum Verlust der enzymatischen Aktivität (Wymann et al., 1996; Stoyanova et al., 1997). Der β -Phosphatrest des ATP interagiert mit einem Serinrest in der Schleife zwischen dem ersten und zweiten Strang des fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatts der N-terminalen Subdomäne. Diese Schleife entspricht der sogenannten P-Schleife der katalytischen Domänen von Protein-Kinasen, auch hier zwischen dem ersten und zweiten Strang eines fünfsträngigen β -Faltblatts. Der γ -Phosphatrest des ATP wird vermutlich durch zwei Mg²⁺-Ionen koordiniert, die ihrerseits mit einem Asparaginrest bzw. zwei Aspartatresten interagieren. Die Bindung des Phosphoinositid-Substrats erfolgt an der C-terminalen Subdomäne der HR1 der PI-3-Kinasen. Die Phosphatreste am Inositolring des PtdIns-4,5-P₂ werden durch verschiedene Lysin- und Arginireste der p110 γ koordiniert. Die Abwesenheit von basischen Resten an den entsprechenden Positionen in Klasse II und Klasse III PI-3-Kinasen könnte erklären, warum diese keine an den Positionen 4 bzw. 5 des Inositolrings phosphorylierten Phosphoinositide als Substrat akzeptieren (Vanhaesebroeck et al., 2001). Diese Annahme wird unterstützt durch Experimente zur Substratselektivität entsprechender PI-3-Kinase-Hybride bzw. -Mutanten (Bondeva et al., 1998; Pirola et al., 2001).

Die HR2 kommt in allen Lipidkinasen vor und wird auch als PIK-Domäne bezeichnet, da sie zuerst in PI-4-Kinasen gefunden wurde (Flanagan et al., 1993). In der p110 γ -Kristallstruktur ist zu erkennen, daß die HR2 als Rückgrat fungiert, um das herum die anderen Domänen angeordnet sind. Die HR2 besteht aus fünf Paaren antiparalleler α -Helices und wird daher auch als helikale Domäne bezeichnet. Aus anderen Proteinen ist bekannt, daß ein solches Strukturmotiv an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist.

Die HR3-Region der PI-3-Kinasen ist eine C2-Domäne. C2-Domänen sind häufig in die Ca²⁺-abhängige oder Ca²⁺-unabhängige Bindung von Proteinen an Phospholipid-Membranen involviert. So konnte für die isolierte C2-Domäne der p110 γ eine Ca²⁺-

unabhängige Interaktion mit Phospholipid-Vesikeln gezeigt werden (Walker et al., 1999). Strukturell ist die C2-Domäne der p110 γ ein „Sandwich“ aus zwei jeweils viersträngigen antiparallelen β -Faltblättern.

Alle katalytischen p110-Untereinheiten der Klasse I PI-3-Kinasen haben als weiteres gemeinsames Strukturmerkmal eine Ras-Bindungs-Domäne (RBD). Diese liegt N-terminal der HR3 und wird auch als HR4 bezeichnet. Die Struktur der Ras-Bindungs-Domäne im p110 γ -Kristall aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt mit zwei flankierenden α -Helices entspricht der Struktur der RBD bekannter Ras-Effektoren wie Raf.

Die Interaktion der katalytischen p110-Untereinheiten der Klasse I_A PI-3-Kinasen α , β und δ mit ihren 50 - 85 kDa großen regulatorischen Untereinheiten erfolgt über eine noch N-terminal der HR4 gelegene sogenannte p85-Bindungsdomäne. Bei der Klasse I_B PI-3-Kinase γ gibt es widersprüchliche Befunde zur Bedeutung des N-terminalen Bereichs der p110 γ -Untereinheit für ihre Interaktion mit der nicht-katalytischen p101-Untereinheit (Krugmann et al., 1999; Maier et al., 1999). Die 3D-Struktur dieses Bereichs ist nicht bekannt, da für die Kristallisation eine um die ersten 143 Aminosäuren verkürzte p110 γ verwendet wurde.

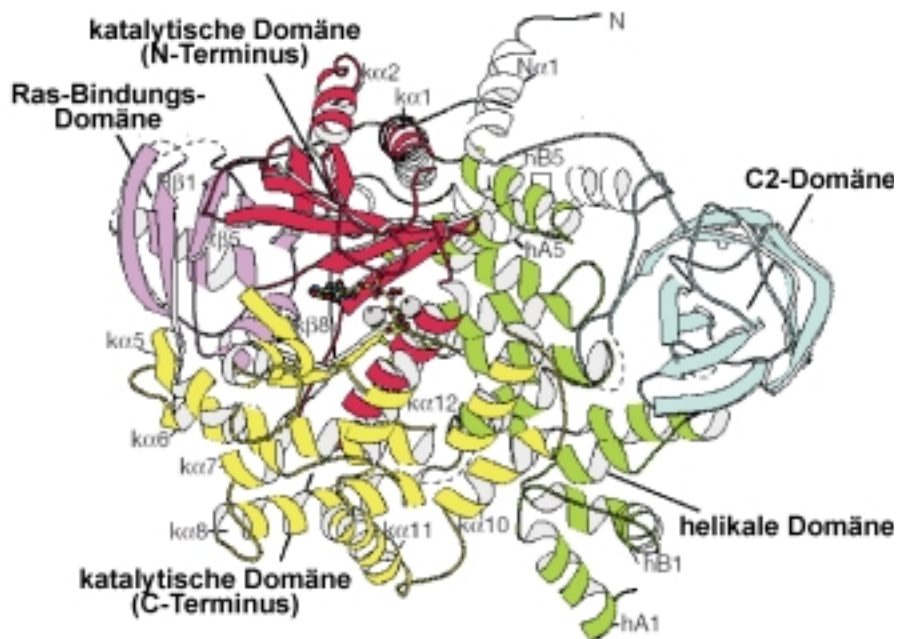


Abb. 3: Kristallstruktur der katalytischen p110 γ -Untereinheit der PI-3-Kinase γ . Erläuterungen siehe Text. Aus: Walker et al., 1999.

1.3.3 Regulation der Klasse I_A PI-3-Kinasen

Charakteristisch für die Klasse I_A PI-3-Kinasen α , β und δ ist die konstitutive Assoziation der katalytischen p110-Untereinheit mit einer 50 - 85 kDa großen nicht-katalytischen Untereinheit. Diese nicht-katalytischen Untereinheiten spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Klasse I_A PI-3-Kinasen. Eine wichtige Funktion der

regulatorischen Untereinheit ist die Stabilisierung der katalytischen p110-Untereinheit: Die Klasse I_A p110-Untereinheiten sind als Monomere nicht stabil (Yu et al., 1998a; Maier et al., 1999). Außerdem wird die Basalaktivität der Klasse I_A PI-3-Kinasen durch die regulatorische Untereinheit niedrig gehalten, und die Aktivierung der Klasse I_A PI-3-Kinasen durch bestimmte Stimuli ist eigentlich eine Desinhibition (Yu et al., 1998a).

Man kennt sieben verschiedene solcher regulatorischer Klasse I_A PI-3-Kinase-Untereinheiten: p85 α (Escobedo et al., 1991; Skolnik et al., 1991; Otsu et al., 1991), p85 β (Otsu et al., 1991) und p55 γ (Pons et al., 1995; Dey et al., 1998) werden von je einem Gen codiert, und von p85 α gibt es noch vier weitere Spleißvarianten (Antonetti et al., 1996; Fruman et al., 1996; Inukai et al., 1996, 1997, 2001). Diese sieben Proteine sind sich strukturell sehr ähnlich, außer daß p55 γ sowie den kleineren p85 α -Spleißvarianten der N-terminale Bereich der größeren p85-Untereinheiten fehlt. Eine Selektivität bei der Heterodimerisierung mit bestimmten p110-Isoformen ist bis jetzt nicht nachgewiesen (Fruman et al., 1998). Man bezeichnet die verschiedenen nicht-katalytischen Klasse I_A PI-3-Kinase-Untereinheiten daher oft zusammenfassend als p85-Untereinheiten. Sie sind modular aus mehreren Protein-Interaktions-Domänen aufgebaut (Abb. 4): vom N-Terminus aus gesehen zuerst eine SH3-Domäne, dann eine erste Prolin-reiche Sequenz (P1), eine BH-Domäne (homolog zu Bcr, einem GTPase-aktivierenden Protein für das monomere Guaninnukleotid-bindende Protein Rac), eine zweite Prolin-reiche Sequenz (P2), dann zwei SH2-Domänen (NSH2 und CSH2, nach der relativen Nähe zum N- bzw. C-Terminus), unterbrochen von der sogenannten inter-SH2-Region (iSH2), über die die Interaktion mit der katalytischen p110-Untereinheit erfolgt (Klippel et al., 1993; Dhand et al., 1994a).

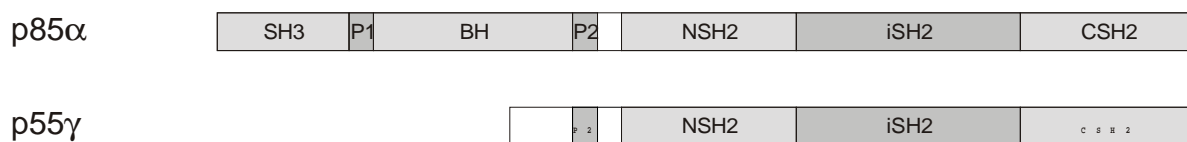


Abb. 4: Aufbau der p85 α -Untereinheit als Prototyp der regulatorischen Untereinheiten der Klasse I_A PI-3-Kinasen sowie der p55 γ -Untereinheit als Beispiel für die kürzeren Varianten. Erläuterungen siehe Text. Nach: Wyman & Pirola, 1998.

Über ihre diversen Protein-Interaktions-Domänen (siehe Abb. 4) vermitteln die p85-Untereinheiten die Regulation der Klasse I_A PI-3-Kinasen durch verschiedene andere Proteine.

Am besten charakterisiert ist die Aktivierung der Klasse I_A PI-3-Kinasen durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Kaplan et al., 1987; Whitman et al., 1988; Auger et al., 1989; Hawkins et al., 1992) über die beiden SH2-Domänen der p85-Untereinheit (McGlade et al., 1992). Beide SH2-Domänen binden an das Motiv pYXXM, also ein phosphorylierter Tyrosinrest (pY) gefolgt von zwei beliebigen Aminosäureresten (X) und einem Methioninrest (M) (Songyang et al., 1993). Man geht davon aus, daß die Bindung der SH2-Domänen der p85-Untereinheit an Tyrosin-phosphorylierte RTKs zur Rekrutierung der heterodimeren

Klasse I_A PI-3-Kinase aus dem Cytosol an die Membran und somit zu ihrem Substrat führt, ähnlich der beschriebenen Membranrekrutierung der PLC γ oder des Grb/Sos-Komplexes. Die Membrantranslokation einer Fluoreszenz-markierten p85-Untereinheit infolge RTK-Stimulation ist gezeigt worden (Gillham et al., 1999). Weiterhin wurde gezeigt, daß eine künstlich an der Membran verankerte p110 α -Untereinheit bereits ohne Rezeptor-Stimulation aktiv ist (Klippel et al., 1996). Außerdem führt die Bindung der SH2-Domänen der p85-Untereinheit an pYXXM-Motive aber auch zur Aufhebung der inhibitorischen Wirkung der regulatorischen p85- auf die katalytische p110-Untereinheit, also zu einer allosterischen Aktivierung der PI-3-Kinase durch Desinhibierung (Yu et al., 1998a). Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, daß die C-terminale SH2-Domäne der p85-Untereinheit vor allem für die Spezifität und Affinität der Interaktion mit dem Rezeptor verantwortlich ist (Klippel et al., 1992), während die desinhibierende Wirkung vor allem über die näher am N-Terminus gelegene SH2-Domäne vermittelt wird (Yu et al., 1998b). Außerdem gibt es Hinweise auf eine indirekte Interaktion zwischen RTK und p85 über Adapterproteine wie Shc und Cbl (Harrison-Findik et al., 1995; Soltoff & Cantley, 1996). Diese sollen sowohl über ihre pYXXM-Motive mit SH2-Domänen der p85-Untereinheiten, als auch zusätzlich über ihre Prolin-reichen Sequenzen mit den SH3-Domänen der regulatorischen Klasse I_A PI-3-Kinase-Untereinheiten interagieren. Umgekehrt soll das bereits erwähnte Adapterprotein Grb2 über seine SH3-Domänen mit den Prolin-reichen Sequenzen der p85 interagieren und hierdurch die PI-3-Kinase mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen verknüpfen (Wang et al., 1995). Weiterhin wurde gefunden, daß RTKs die p85-Untereinheiten an verschiedenen Stellen phosphorylieren (Hayashi et al., 1993; Kavanaugh et al., 1994; Pons et al., 1995). Die physiologische Bedeutung hiervon ist aber noch weitgehend unklar.

Klasse I_A PI-3-Kinasen werden auch von aktivierten Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie z. B. Src-Kinasen aktiviert (Sugimoto et al., 1984; Whitman et al., 1985; Fukui & Hanafusa, 1989). Diese weisen zwar phosphorylierte Tyrosinreste auf, aber keine pYXXM-Motive, so daß die Interaktion hier nicht über die SH2-Domänen der p85-Untereinheit erfolgt (Fry et al., 1992). An mehreren Beispielen, vor allem den durch T-Zell-Rezeptoren aktivierten Src-Kinasen Fyn und Lck, konnte gezeigt werden, daß sie über ihre SH3-Domänen mit der p85-Untereinheit der Klasse I_A PI-3-Kinasen interagieren (Prasad et al., 1993a, 1993b; Vogel & Fujita, 1993), und zwar mit den beiden Prolin-reichen Regionen (P1 und P2) als unabhängige Bindungsstellen (Kapeller et al., 1994). Die durch Lipidmodifikation bzw. Assoziation mit dem Rezeptor Membran-assoziierten Src-Kinasen könnten die PI-3-Kinasen durch Rekrutierung an die Membran zu ihrem Substrat aktivieren. Die PI-3-Kinase-Aktivität wird aber auch durch die isolierten SH3-Domänen offenbar allosterisch aktiviert (Pleiman et al., 1994). Zusätzlich scheint auch die Tyrosin-Kinase-Aktivität der Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bei der Regulation der Klasse I_A PI-3-Kinasen von Bedeutung zu sein (Chan et al., 1990). Durch Tyrosin-Phosphorylierung eines dritten Moleküls mit einem pYXXM-Motiv könnte eine weitere Bindungsstelle für die p85-Untereinheit über ihre SH2-Domänen

entstehen, ein solcher dritter Partner ist aber noch nicht gefunden worden. Es konnte hingegen gezeigt werden, daß die Kinasen Lck und Abl einen Tyrosinrest innerhalb der C-terminalen SH2-Domäne der p85-Untereinheit phosphorylieren (von Willebrand et al., 1998). Dies führt offenbar über eine intramolekulare Interaktion des phosphorylierten Tyrosinrests der CSH2-Domäne mit der NSH2-Domäne derselben p85-Untereinheit zur Desinhibierung der PI-3-Kinase-Aktivität (Cuevas et al., 2001).

Eine intramolekulare Interaktion kann auch zwischen der SH3-Domäne und den Prolin-reichen Regionen einer p85-Untereinheit bestehen (Kapeller et al., 1994). Ebenso können zwei p85-Untereinheiten über diese Regionen dimerisieren (Harpur et al., 1999). Eine regulatorische Funktion dieser Interaktionen wäre vorstellbar, ist aber noch nicht gezeigt worden. Die Aktivierung der PI-3-Kinase durch Bindung von Rac und Cdc42, beides Mitglieder der Rho-Subfamilie der monomeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine, an die genau zwischen den beiden Prolin-reichen Regionen gelegene BH-Domäne der p85-Untereinheit (Zheng et al., 1994; Toliás et al., 1995) könnte auf einer Modulation dieser intramolekularen Interaktion beruhen (Fruman et al., 1998). Des Weiteren gibt es einzelne Berichte über eine Aktivierung von Klasse I_A PI-3-Kinasen durch Ca²⁺/Calmodulin über die SH2-Domänen der p85-Untereinheit (Joyal et al., 1997) und durch das Metalloprotease-Disintegrin-Protein ADAM12 (*a disintegrin and metalloprotease*) über die SH3-Domäne der p85 (Kang et al., 2001), sowie über eine Hemmung der Klasse I_A PI-3-Kinasen durch das Protein Ruk (Regulator ubiquitärer Kinasen) über die SH3-Domäne der p85-Untereinheit (Gout et al., 2000).

Die nicht-katalytischen Klasse I_A PI-3-Kinase-Untereinheiten vermitteln also mit ihren multiplen Protein-Interaktions-Domänen (siehe Abb. 4) die Regulation der PI-3-Kinasen durch verschiedenste Proteine. Durch gleichzeitige Bindung mehrerer Partner wäre eine Integration mehrerer Signale und die Feinabstimmung der PI-3-Kinase-Aktivität vorstellbar (Wymann & Pirola, 1998). Trotz der weitgehenden Übereinstimmung der Domänenstruktur der sieben verschiedenen regulatorischen Klasse I_A PI-3-Kinase-Untereinheiten gibt es Hinweise auf eine differentielle Regulation durch verschiedene Stimuli (Pons et al., 1995; Inukai et al., 1997, 2001; Baltensperger et al., 1994). Außerdem wird vermutet, daß die p85-Proteine neben ihrer Funktion als PI-3-Kinase-Untereinheiten auch p110-unabhängige Funktionen haben könnten (Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2001; Kang et al., 2002), zumal sie (im Gegensatz zu den p110-Untereinheiten der Klasse I_A PI-3-Kinasen) auch als Monomere stabil sind.

Bei der Regulation der Klasse I_A PI-3-Kinasen über ihre p85-Untereinheiten spielen neben deren Interaktion mit verschiedenen Proteinen auch die Lipidbindungs-Eigenschaften der regulatorischen Untereinheiten eine Rolle. Die inter-SH2-Domäne bindet an Phosphoinositide und könnte diese der katalytischen p110-Untereinheit präsentieren. Hierzu paßt, daß die iSH2-Domäne mit der höchsten Affinität an PtdIns-4,5-P₂ bindet, also das bevorzugte Substrat der Klasse I PI-3-Kinasen (End et al., 1993). Außerdem binden die SH2-Domänen der p85-Untereinheiten nicht nur an Tyrosin-phosphorylierte Proteine, sondern auch an

PtdIns-3,4,5-P₃, also das Produkt der PI-3-Kinase-Reaktion, was einen Mechanismus zur negativen Rückkopplung darstellt (Rameh et al., 1995; Ching et al., 2001).

Ein anderer negativer Rückkopplungsmechanismus ist die Phosphorylierung eines Serinrests in der iSH2-Domäne der p85-Untereinheit durch die Proteinkinase-Aktivität der p110-Untereinheit (interessanterweise aber nicht p110 δ), die zur Hemmung der Lipid-Kinase-Aktivität führt (Carpenter et al., 1993; Dhand et al., 1994b; Vanhaesebroeck et al., 1997). Vermutlich behindert die zusätzliche negative Ladung die Bindung des PtdIns-4,5-P₂ an die iSH2-Domäne und somit die Substrat-Präsentation.

Neben der Vielzahl der regulatorischen Wechselwirkungen über die p85-Untereinheit können Klasse I PI-3-Kinasen auch durch direkte Interaktion mit der katalytischen p110-Untereinheit aktiviert werden.

Wie bereits erwähnt interagiert Ras im aktivierten (GTP-gebundenen) Zustand mit den katalytischen p110-Untereinheiten der Klasse I PI-3-Kinasen und aktiviert sie dadurch (Rodriguez-Viciana et al., 1994). Dabei ist die Farnesylierung des Ras für die Aktivierung der PI-3-Kinase notwendig, was darauf hindeuten könnte, daß der Effekt zumindest teilweise auf der Rekrutierung an die Membran beruht. Die Aktivierung der Klasse I_A PI-3-Kinasen durch Ras ist synergistisch mit dem Effekt von stimulierenden Peptiden mit dem pYXXM-Motiv (Rodriguez-Viciana et al., 1996). Außerdem scheint das aktivierte Ras zumindest in bestimmten Fällen sogar Voraussetzung für die Aktivierung der Klasse I_A PI-3-Kinasen durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen zu sein (Rodriguez-Viciana et al., 1994).

Ein weiteres Beispiel für eine p85-unabhängige Regulation einer Klasse I_A PI-3-Kinase ist die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase δ . Im Gegensatz zur PI-3-Kinase α erfolgt die Phosphorylierung hier nicht an der regulatorischen, sondern an der katalytischen Untereinheit, was aber ebenso zum Abschalten der Lipidkinase-Aktivität des Enzyms führt (Vanhaesebroeck et al., 1999).

Eine besondere Eigenschaft der PI-3-Kinase β im Vergleich zu den anderen Klasse I_A PI-3-Kinasen ist ihre Stimulierbarkeit durch G $\beta\gamma$ -Komplexe (Kurosu et al., 1997), die ebenfalls unabhängig von der p85-Untereinheit ist (zumindest *in vitro*) (Maier et al., 1999, 2000). Die gleichzeitige Stimulation der PI-3-Kinase β durch pYXXM-Peptide und G $\beta\gamma$ hat *in vitro* wie *in vivo* einen synergistischen Effekt. Unklar ist hingegen, ob die PI-3-Kinase β tatsächlich auch *in vivo* durch G $\beta\gamma$ alleine aktiviert werden kann, oder ob hier eine Co-Stimulation über die p85-Untereinheit Voraussetzung ist (Hazeki et al., 1998).

1.3.4 Regulation der Klasse I_B PI-3-Kinase γ

Im Gegensatz zu den Klasse I_A PI-3-Kinasen hat die PI-3-Kinase γ keine p85-Untereinheit und wird unter anderem daher als (bisher einzige) Klasse I_B PI-3-Kinase von diesen abgegrenzt. Die für die Klasse I_A PI-3-Kinasen charakteristischen p85-vermittelten Interaktionen spielen somit bei der Regulation der PI-3-Kinase γ keine Rolle. Stattdessen wird die PI-3-Kinase γ typischerweise über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durch G $\beta\gamma$ -Komplexe aktiviert (Stephens et al., 1994a). Anstelle der regulatorischen p85-Untereinheit der Klasse I_A PI-3-Kinasen kann die PI-3-Kinase γ eine p101-Untereinheit enthalten, die interessanter Weise keinerlei Ähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinen aufweist (Stephens et al., 1997). Obwohl die durch Stimulation des G-Protein-gekoppelten fMLP-Rezeptors induzierte PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung (Traynor-Kaplan et al., 1988) praktisch gleichzeitig mit der Wachstumsfaktor-induzierten PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung (Kaplan et al., 1987; Whitman et al., 1988; Auger et al., 1989) entdeckt wurde, wurde die hierfür verantwortliche G-Protein-regulierte PI-3-Kinase γ erst später identifiziert, und ihre Regulation ist weit weniger verstanden.

Im Gegensatz zu den katalytischen Untereinheiten der Klasse I_A PI-3-Kinasen ist die p110 γ -Untereinheit zumindest *in vitro* auch als Monomer stabil (Maier et al., 1999), und es gibt Hinweise auf ein Vorkommen monomer exprimierter p110 γ (Baier et al., 1999). Hingegen soll die Bindung zwischen den beiden Untereinheiten im p110 γ /p101-Heterodimer sehr fest sein (Stephens et al., 1997). Wie bereits erwähnt gibt es widersprüchliche Befunde zur Bedeutung des N-Terminus der p110 γ -Untereinheit für ihre Interaktion mit der p101-Untereinheit (Krugmann et al., 1999; Stephens et al., 1999; Maier et al., 1999). Umgekehrt ergaben Experimente mit trunkierten p101-Untereinheiten, daß weite Teile der p101 inklusive N- und C-Termini an ihrer Bindung an die p110 γ -Untereinheit beteiligt sind (Krugmann et al., 1999).

Die Rolle der p101-Untereinheit bei der Regulation der PI-3-Kinase γ wird kontrovers diskutiert. Während Stephens und Mitarbeiter der p101-Untereinheit eine der p85-Untereinheit der Klasse I_A PI-3-Kinasen analoge Adapterfunktion bei der Stimulation der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ -Komplexe zuschreiben (Stephens et al., 1997; Krugmann et al., 1999), fanden andere Arbeitsgruppen auch eine direkte Aktivierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit durch G $\beta\gamma$ (Stoyanov et al. 1995, Leopoldt et al., 1998). Ebenso gibt es widersprüchliche Befunde dazu, ob die Basalaktivität der katalytischen p110 γ -Untereinheit entsprechend der Situation bei den Klasse I_A PI-3-Kinasen durch die nicht-katalytische p101-Untereinheit gehemmt wird (Stephens et al., 1997; Krugmann et al., 1999) oder nicht (Maier et al., 1999). Da die Experimente zur Charakterisierung der PI-3-Kinasen vor allem *in vitro* unter Verwendung von gereinigten rekombinanten Proteinen und künstlichen Lipidvesikeln durchgeführt wurden, könnten die scheinbar widersprüchlichen Befunde durch unterschiedliche Versuchsbedingungen verursacht sein (Zusammensetzung der Lipidvesikel u. a.). Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die G $\beta\gamma$ -stimulierte monomere p110 γ bevorzugt PtdIns (anstelle

von PtdIns-4,5-P₂) phosphoryliert, das p110γ/p101-Dimer hingegen bevorzugt PtdIns-4,5-P₂ (anstelle von PtdIns) (Maier et al., 1999). Unstrittig ist also, daß bei der PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung *in vitro* die p101-Untereinheit die PI-3-Kinase γ sensitiver gegenüber Gβγ macht (Stephens et al., 1997; Maier et al., 1999) (wenngleich sich die jeweils berichteten EC₅₀-Werte für die Gβγ-stimulierte PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung der heterodimeren PI-3-Kinase γ deutlich unterscheiden).

Hierzu passen die übereinstimmenden Befunde, daß die p101-Untereinheit stärker an Gβγ-Komplexe bindet als die p110γ-Untereinheit (Stephens et al., 1997; Maier et al., 1999). Als Gβγ-Bindungsstelle der p110γ wurde zunächst eine putative PH-Domäne in der Nähe der N-terminalen Hälfte vermutet, da solche Strukturen unter anderem an Gβγ-Komplexe binden (siehe unten, Kapitel 1.3.5). Es gibt jedoch Hinweise auf eine weitere Gβγ-Bindungsstelle in der C-terminalen Hälfte des Enzyms, möglicherweise also direkt in der Kinase-Domäne (Leopoldt et al., 1998). Die Gβγ-Bindungsstelle der p101-Untereinheit ist nicht bekannt.

Auch wurde über eine Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch Gα-Untereinheiten berichtet (Stoyanov et al., 1995; Murga et al., 1998). Jedoch scheint eine mögliche Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch Gα-Untereinheiten im Vergleich zur Stimulation durch Gβγ-Komplexe quantitativ nur unbedeutend zu sein (Leopoldt et al., 1998).

Der molekulare Mechanismus, wie Gβγ die PI-3-Kinase γ stimuliert, ist unklar. So können Effektoren durch Gβγ-Komplexe entweder durch Rekrutierung an die Membran zu ihrem Substrat oder allosterisch aktiviert werden.

Wie die anderen Klasse I PI-3-Kinasen ist auch die PI-3-Kinase γ ein lösliches Enzym und zumindest zum größten Teil im Cytosol lokalisiert. Entsprechend führt die Permeabilisierung von neutrophilen Zellen zu einem Verlust der PI-3-Kinase γ und somit der fMLP-induzierten PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung (Kular et al., 1997). Dennoch ist die PI-3-Kinase γ nach subzellulärer Fraktionierung auch in der partikulären Fraktion nachweisbar (Stephens et al., 1994a). Nach Stimulation von G-Protein-gekoppelten Chemokin- bzw. fMLP-Rezeptoren in NK-Zellen (*natural killer*), HL-60-Zellen (*humane Promyelozytenleukämie-Zelllinie*) sowie Neutrophilen soll es zu einer nicht näher quantifizierten Zunahme der PI-3-Kinase γ in der partikulären Fraktion kommen (Al-Aoukaty et al., 1999; Czupalla, 2002; Naccache et al., 2000). Interessanterweise kann die PI-3-Kinase γ mit der β-Adrenorezeptor-Kinase (βARK) copräzipitiert werden (Naga Prasad et al., 2001), so daß eine Membrantranslokation eines gemeinsamen Komplexes vorstellbar wäre. Jüngste Berichte zeigen, daß *in vitro* die PI-3-Kinase γ vermutlich über ihre C2-Domäne auch in Abwesenheit von Gβγ-Komplexen an PtdIns-4,5-P₂-haltige Lipidvesikel bindet (Krugmann et al., 2002; Kirsch et al., 2001; Walker et al., 1999), wobei die Aussagekraft dieser Befunde *in vitro* mit künstlichen Lipidvesikeln für die Situation *in vivo* mit komplexen biologischen Membranen unklar ist. Insgesamt ist also unzureichend verstanden, ob bzw. in welchem Ausmaß die PI-3-Kinase γ bereits in ruhenden Zellen auch an der Plasmamembran lokalisiert ist, und ob bzw. in welchem Ausmaß sie nach

GPCR-Stimulation von aus heterotrimeren G-Proteinen freigesetzten G $\beta\gamma$ -Komplexen aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert wird.

Künstlich an der Membran verankerte p110 γ ist bereits ohne Rezeptor-Stimulation aktiv (Bondeva et al., 1998). Die Stimulation der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ könnte also tatsächlich auf einer Rekrutierung an die Membran beruhen. Die Möglichkeit einer zusätzlichen allosterischen Regulation der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ ist allerdings nicht auszuschließen und wird durch jüngste Befunde *in vitro* unterstützt, wonach G $\beta\gamma$ die PI-3-Kinase γ stimulieren soll, obwohl diese bereits mit den künstlichen Lipidvesikeln assoziiert ist (Krugmann et al., 2002).

Wie die katalytischen p110-Untereinheiten der Klasse I_A PI-3-Kinasen interagiert auch die p110 γ mit aktiviertem Ras und wird hierdurch stimuliert (Pacold et al., 2000; Suire et al., 2002). Die Aktivierung der p110 γ durch Ras ist synergistisch mit dem Effekt von G $\beta\gamma$, wobei die p101-Untereinheit nicht unbedingt erforderlich ist. Der Mechanismus der Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch Ras könnte ebenso wie ihre Aktivierung durch G $\beta\gamma$ -Komplexe entweder auf einer Rekrutierung an die Membran zu ihrem Substrat oder auf einem allosterischen Effekt beruhen. Ein Hinweis auf eine mögliche allosterische Regulation ergibt sich aus Unterschieden in der Kristallstruktur der mit Ras kokristallisierten p110 γ im Vergleich zur Struktur der p110 γ alleine (Pacold et al., 2000).

Wie die p110 δ phosphoryliert sich auch die p110 γ selbst (Stoyanova et al., 1997). Diese Autophosphorylierung wird durch G $\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert (Maier et al., 1999). Nach jüngsten Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe hat die Autophosphorylierung der p110 γ aber keinen Einfluß auf ihre Lipidkinase-Aktivität (Czupalla et al., eingereicht).

1.3.5 Zelluläre Funktionen der Klasse I PI-3-Kinasen

Die von den PI-3-Kinasen gebildeten und an der 3'-Position ihres Inositolrings phosphorylierten Phosphoinositide interagieren mit bestimmten Domänen in Proteinen und vermitteln so deren Bindung an die Membran. Das von den Klasse III PI-3-Kinasen gebildete PtdIns-3-P interagiert mit sogenannten FYVE- und PX-Domänen (Misra et al., 2001). Das von den Klasse II PI-3-Kinasen gebildete PtdIns-3,4-P₂ sowie das von den Klasse I PI-3-Kinasen gebildete PtdIns-3,4,5-P₃ binden an sogenannte PH-Domänen mit unterschiedlicher Spezifität (Hurley & Misra, 2000). PH steht für Pleckstrin-Homologie und Pleckstrin wiederum für platelet and leukocyte C kinase substrate protein. PtdIns-3,4-P₂ wird nicht nur von Klasse II PI-3-Kinasen synthetisiert, sondern entsteht vor allem auch durch Dephosphorylierung von PtdIns-3,4,5-P₃ an der 5'-Position des Inositolrests, ist also indirekt auch ein Produkt der Klasse I PI-3-Kinasen. Hierfür sind entsprechende Phosphatasen wie z.

B. SHIP (SH2-Domänen enthaltende Inositid-5-Phosphatase) verantwortlich (Woscholski & Parker, 1997). Die Abschaltung der Signaltransduktion über 3'-phosphorylierte Phosphoinositide erfolgt durch Dephosphorylierung der 3'-Position des Inositolrings durch entsprechende Phosphatasen wie z. B. PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) (Vanhaesebroeck et al., 2001).

Die Signaltransduktion über die Rezeptor-regulierten Klasse I PI-3-Kinasen und deren Lipidprodukte PtdIns-3,4,5-P₃ und PtdIns-3,4-P₂ erfolgt also durch Interaktion dieser membranständigen *second messenger* mit PH-Domänen in Effektorproteinen (Abb. 5). PH-Domänen sind durch ihre hohe strukturelle Ähnlichkeit definiert; ihre Sequenzähnlichkeit ist hingegen nur gering (Rebecchi & Scarlatta, 1998). Die meisten PH-Domänen binden an Phosphoinositide. Einige PH-Domänen sind (zumindest *in vitro*) auch an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt, z. B. mit Gβγ-Komplexen. Bestimmte PH-Domänen binden mit hoher Affinität an 3'-phosphorylierte Phosphoinositide, wobei manche PH-Domänen mit hoher Spezifität nur an PtdIns-3,4,5-P₃ binden (z. B. die PH-Domäne des Guaninnukleotid-Austauschfaktors GRP1, siehe unten), andere hingegen sowohl mit PtdIns-3,4,5-P₃ als auch mit PtdIns-3,4-P₂ interagieren (z. B. die PH-Domäne der Proteinkinase B, siehe unten) (Hurley & Misra, 2000). Diverse Fluoreszenz-markierte PH-Domänen werden als Werkzeug für die räumlich und zeitlich aufgelöste Darstellung der entsprechenden Phosphoinositide in lebenden Zellen verwendet (Balla et al., 2000).

Der am besten charakterisierte Effektor von PI-3,4-P₂ ist die Serin-/Threonin-Kinase Akt (Franke et al., 1997), das zelluläre Homolog des viralen Onkoproteins v-Akt. Wegen ihrer Ähnlichkeit zu den bereits beschriebenen Proteinkinasen A und C wird Akt auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet. Infolge der Bildung von PtdIns-3,4,5-P₃ und vor allem PtdIns-3,4-P₂ wird Akt/PKB also über ihre PH-Domäne an die Membran rekrutiert. Man nimmt an, daß dies eine Konformationsänderung der Akt/PKB induziert, wodurch zwei sonst verborgene Phosphorylierungsstellen freigelegt werden (Lawlor & Alessi, 2001). Die Serin-/Threonin-Kinase PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) (Alessi et al., 1996, 1997, 2001; Stokoe et al., 1997; Stephens et al., 1998; Toker & Newton, 2000a), die ebenfalls eine PtdIns-3,4-P₂- / PtdIns-3,4,5-P₃-bindende PH-Domäne enthält, phosphoryliert nun Akt/PKB an einem Threoninrest und aktiviert sie dadurch. Akt/PKB wird noch an einer zweiten Stelle, einem Serinrest, phosphoryliert und dadurch noch weiter aktiviert. Die hierfür verantwortliche Kinase ist noch nicht eindeutig identifiziert und wird als PDK2 bezeichnet (Chan & Tsichlis, 2001). Es gibt Hinweise darauf, daß PDK2 die PKB selbst ist und sich also autophosphoryliert (Toker & Newton, 2000b). Die so an der Membran phosphorylierte und dadurch aktivierte Akt/PKB löst sich wieder von der Membran ab und diffundiert durch das Cytosol in den Zellkern, wo sie (vermutlich in beiden Kompartimenten) weitere Proteine phosphoryliert (Lawlor & Alessi, 2001). Hierbei kann die Akt/PKB durch Interaktion mit

weiteren Proteinen in ihrer Aktivität moduliert werden (Brazil et al., 2002). Zu den Substraten der Akt/PKB gehören z. B. Transkriptionsfaktoren der *forkhead*-Familie (Kops et al., 2002) oder die Kinasen GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) (Cross et al., 1995) und BAD (*Bcl-2 antagonist causing cell death*) (Franke & Cantley, 1997). Über diese und weitere Effektoren wirkt Akt/PKB unter anderem Proliferations-fördernd sowie Apoptose-hemmend. Neben der Akt/PKB phosphoryliert die PDK1 auch die p70^{S6}-Kinase (Pullen et al., 1998) (diese wiederum phosphoryliert das ribosomale Protein S6), was vor allem zu gesteigerten Zellwachstum führt (Dufner & Thomas, 1999). Fehler in diesen Signalwegen können also zu erhöhter Proliferation und gesteigertem Wachstum und somit zur Tumor-Transformation der Zellen führen. Wie erwähnt ist v-Akt als retrovirales Onkogenprodukt bekannt, und entsprechend findet man in verschiedenen Tumoren eine erhöhte Expression des zellulären Homologs Akt/PKB (Vivanco & Sawyers, 2002). Ebenso stellen die Klasse I PI-3-Kinasen Proto-Onkogene dar, und entsprechende Mutationen werden ebenfalls in zahlreichen Tumoren gefunden (Vivanco & Sawyers, 2002). Auch die Abschaltung der durch 3'-phosphorylierte Phosphoinositide vermittelten Signalwege durch die erwähnte 3'-Phosphoinositid-Phosphatase PTEN ist in diesem Zusammenhang von größter Wichtigkeit: PTEN wirkt als Tumor-Suppressor (Cantley & Neel, 1999).

PH-Domänen, die spezifisch an PtdIns-3,4,5-P₃ binden, findet man unter anderem in Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für monomere Guaninnukleotid-bindende Proteine. So aktiviert PtdIns-3,4,5-P₃ z. B. GRP1 (*general receptor for phosphoinositides 1*) (Klarlund et al., 1997, 1998), einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor für das monomere Guaninnukleotid-bindende Protein ARF (ADP-Ribosylierungs-Faktor), welches wiederum an der Regulation der Bildung intrazellulärer Vesikel beteiligt ist. Ebenso aktiviert PtdIns-3,4,5-P₃ Vav (Han et al., 1998), einen Austauschfaktor für Rac (und andere monomere Guaninnukleotid-bindende Protein der Rho-Familie), wodurch wiederum cytoskelettale Veränderungen induziert werden, z. B. bei der chemotaktischen Migration von Zellen.

Die nur in hämatopoetischen Zellen vorkommende Tyrosin-Kinase Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) wird ebenfalls spezifisch durch PtdIns-3,4,5-P₃ an die Membran rekrutiert und dort durch Gβγ-Komplexe aktiviert (Lowry & Huang, 2002). Die stimulierte Btk phosphoryliert und aktiviert die Phospholipase C γ, was wiederum für die Entwicklung und Proliferation von B-Lymphozyten von großer Bedeutung ist. So führt eine die PtdIns-3,4,5-P₃-Bindung störende Mutation in der PH-Domäne der (auf dem X-Chromosom codierten) Btk zu einem schweren Immundefekt, der als *X-linked agammaglobulinemia* (XLA) beim Menschen bzw. *X-linked immunodeficiency* (XID) bei der Maus charakterisiert ist. Möglicherweise wird auch die PLCγ selbst über ihre PH-Domäne durch PtdIns-3,4,5-P₃ an die Membran rekrutiert (Falasca et al., 1998).

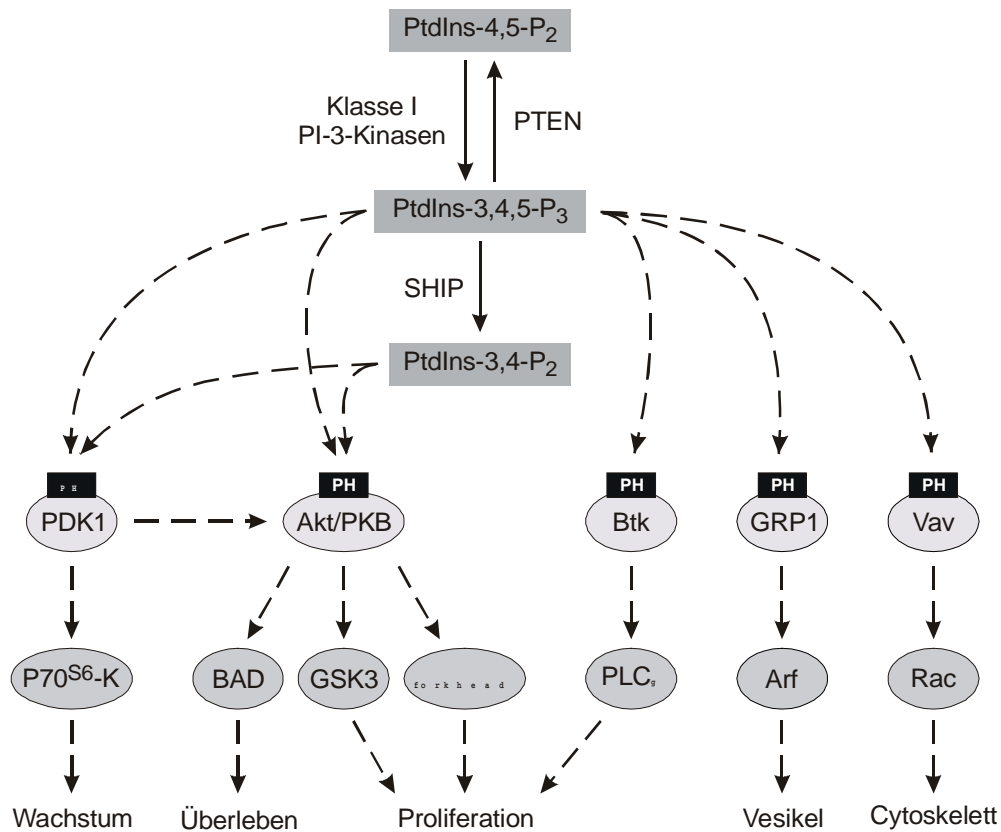


Abb. 5: Effektoren und zelluläre Effekte von PtdIns-3,4,5-P₃ und PtdIns-3,4-P₂. Vereinfachtes Schema der wichtigsten Signalwege. Erläuterungen siehe Text. *Nach: Rameh & Cantley, 1999; Cantley, 2002.*

Im Gegensatz zu den relativ gut charakterisierten Signalwirkungen der Lipidprodukte der Klasse I PI-3-Kinasen ist eine mögliche hiervon unabhängige Signaltransduktion über ihre Proteinkinase-Aktivität unverstanden. Die Autophosphorylierung bestimmter Isoformen führt zum Abschalten ihrer Lipidkinase-Aktivität, könnte also einen Mechanismus zur negativen Rückkopplung darstellen (siehe oben, Kapitel 1.3.3). Für die PI-3-Kinase α konnte neben der Autophosphorylierung *in vitro* auch eine Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats 1 (IRS1) nachgewiesen werden (Lam et al., 1994; Tanti et al., 1994), die physiologische Relevanz ist aber noch unklar. Die PI-3-Kinase γ soll über ihre Proteinkinase-Aktivität die MAP-Kinase ERK stimulieren (Bondeva et al., 1998). Hierbei ist aber noch ungeklärt, ob bzw. welche weiteren Moleküle an der Signalübertragung beteiligt sein sollen.

Wichtige Erkenntnisse über die physiologischen Funktionen der Klasse I PI-3-Kinasen wurden durch die Analyse transgener Mäuse gewonnen (Katso et al., 2001).

Mäuse, deren p85 α -Gen so inaktiviert wurde („knock-out“), daß keine der drei Spleißvarianten p85 α , p55 α und p50 α exprimiert werden (p85 α -p55 α -p50 α ^{-/-}) sterben meist einige Tage nach der Geburt (Fruman et al., 1999, 2000). Bei der Untersuchung von Lymphozyten aus diesen Mäusen wurden Störungen bei der Entwicklung und Proliferation

von B-Zellen gefunden, interessanterweise aber nicht von T-Zellen (Fruman et al., 1999). Bei der Untersuchung von Mastzellen aus diesen Mäusen wurde eine verringerte Antwort auf Stimulation des Kit-Rezeptors beobachtet, wohingegen interessanterweise die (vermutlich ebenfalls durch eine Klasse I_A PI-3-Kinase vermittelte) Signaltransduktion des FcεRI (hochaffiner Immunglobulin-E-Rezeptor) unbeeinflusst blieb, was also auf eine spezifische Kopplung verschiedener Rezeptoren an bestimmte p85-Isoformen hindeutet (Lu-Kuo et al., 2000). Wird das p85α-Gen so inaktiviert, daß die beiden kurzen Spleißvarianten p55α und p50α noch exprimiert werden (p85α^{-/-}), sterben die Mäuse erst einige Wochen nach der Geburt, und zwar an bakteriellen Infektionen, also offenbar aufgrund von Defekten in der Immunabwehr (Suzuki et al., 1999). Die Lymphozyten der p85α^{-/-}-Mäuse verhalten sich so wie die der p85α-p55α-p50α^{-/-}-Mäuse (Suzuki et al., 1999). Des Weiteren fehlen den p85α^{-/-}-Mäusen bestimmte Populationen von Mastzellen (Fukao et al., 2002). Der Phänotyp der p85α^{-/-}-Mäuse ähnelt dem der beschriebenen XID-Mäuse (Mutation in der PI-3,4,5-P₃-bindenden PH-Domäne der Btk) (Suzuki et al., 1999). Außerdem kommt es bei p85α^{-/-}-Mäusen wie auch p85β^{-/-}-Mäusen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Insulin (und dadurch zu einer Hyperglykämie), wobei aber der genaue Zusammenhang noch unklar ist (Terauchi et al., 1999; Ueki et al., 2002).

Die Deletion der p85-Bindungsdomäne der katalytischen p110α-Untereinheit führt dazu, daß die Mäuse infolge starker Defekte der Zellproliferation noch vor der Geburt sterben (Bi et al., 1999). Die gezielte Expression von konstitutiv aktiver oder von dominant negativer p110α in Herzmuskelzellen führt zu einer Vergrößerung bzw. Verkleinerung der Cardiomyozythen und somit der Herzen, was die Rolle der PI-3-Kinase α bei Wachstumsprozessen unterstreicht (Shioi et al., 2000, Crackower et al., 2002).

Im Gegensatz zu den ubiquitär exprimierten Klasse I_A PI-3-Kinasen α und β wird die Klasse I_B PI-3-Kinase γ vorwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert, was eine spezifische Rolle der G-Protein-regulierten PI-3-Kinase γ in Leukozyten vermuten läßt (Stephens et al., 2002). Wichtige Leukozyten-Funktionen werden aber auch über Klasse I_A PI-3-Kinasen vermittelt, z. B. die Signaltransduktion von B- und T-Zell-Antigen-Rezeptoren sowie hochaffinen Immunglobulin-E-Rezeptoren (FcεRI) (Fruman & Cantley, 2002). Die Klasse I_B PI-3-Kinase γ ist vor allem in die Signaltransduktion der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für Chemokine (z. B. Interleukin 8, IL-8) und chemotaktische Peptide (z. B. das bereits erwähnte fMLP) involviert, über die inflammatorische Prozesse wie die chemotaktische Rekrutierung von phagocytotischen Zellen sowie deren Superoxid-Produktion („respiratory burst“) aktiviert werden. Entsprechend weisen neutrophile Granulozyten von Mäusen mit inaktiviertem p110γ-Gen (p110γ^{-/-}) eine verringerte Superoxid-Produktion und eine verringerte chemotaktische Migration *in vitro* und *in vivo* auf (Sasaki et al., 2000; Li et al., 2000; Hirsch et al., 2000; Hannigan et al., 2002). Auch die chemotaktische Migration von Makrophagen von p110γ^{-/-}-Mäusen ist *in vitro* und *in vivo* verringert (Hirsch et al. 2000).

Außerdem wurden bei der Untersuchung der Thymozyten von $p110\gamma^{-/-}$ -Mäusen Hinweise auf eine spezifische Rolle der PI-3-Kinase γ bei der Entwicklung der T-Lymphozyten im Thymus gefunden (Sasaki et al., 2000). Des Weiteren wurde bei der Untersuchung von Mastzellen von $p110\gamma^{-/-}$ -Mäusen gefunden, daß die Fc ϵ RI-vermittelte Degranulation über einen autokrinen Mechanismus über G_i -Protein-gekoppelte Rezeptoren (vermutlich vor allem über Adenosin und den A_3 Adenosin-Rezeptor) und die PI-3-Kinase γ verstärkt wird (Laffargue et al., 2002). Insgesamt ist die PI-3-Kinase γ ist also wesentlich an der Regulation von entzündlichen und allergischen Prozessen beteiligt. Zusätzlich ergab die Untersuchung von Blutplättchen von $p110\gamma^{-/-}$ -Mäusen einen Defekt in der ADP-induzierten Thrombozyten-Aggregation (Hirsch et al., 2001). Jüngste Untersuchungen an Cardiomyozyten sowie ganzen Herzen von $p110\gamma^{-/-}$ -Mäusen ergaben eine Beteiligung der PI-3-Kinase γ bei der Regulation der Herzmuskel-Kontraktion (Crackower et al., 2002).