

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Rezeptor-regulierten Klasse I PI-3-Kinasen generieren das Membranlipid PtdIns-3,4,5-P₃ als *second messenger*, was zur Membranrekrutierung und Aktivierung verschiedener Effektoren mit PtdIns-3,4,5-P₃-bindenden PH-Domänen führt. Auf diese Weise kontrollieren Klasse I PI-3-Kinasen wichtige zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung oder cytoskelettale Veränderungen. Die Regulation und Funktion der erst vor relativ Kurzem entdeckten PI-3-Kinasen ist aber erst unvollständig verstanden. Da die Klasse I PI-3-Kinasen vorwiegend im Cytosol gefunden werden, ging man davon aus, daß sie durch ihre Stimuli zunächst selbst aus dem Cytosol an die Membran zu ihrem Substrat rekrutiert werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal mittels Fluoreszenz-mikroskopischer Untersuchungen in lebenden Zellen gezeigt werden.

Klasse I PI-3-Kinasen sind heterodimere Enzyme und werden nach ihren nicht-katalytischen Untereinheiten weiter in Klasse I_A und I_B eingeteilt: Die Klasse I_A PI-3-Kinasen α , β und δ werden typischerweise durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert, wobei ihre nicht-katalytische p85-Untereinheit als Adapter fungiert, der über seine SH2-Domänen die Interaktion mit dem autophosphorylierten Rezeptor vermittelt. Entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der PI-3-Kinase β gezeigt, daß das heterodimere Enzym infolge RTK-Stimulation aus dem Cytosol an die Membran transloziert wird, nicht aber seine monomere katalytische p110 β -Untereinheit in Abwesenheit der p85-Adapter-Untereinheit.

Die bisher einzige bekannte Klasse I_B PI-3-Kinase γ hat anstelle der p85- eine p101-Untereinheit und wird typischerweise über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durch G $\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert. Hierbei war allerdings umstritten, welche Rolle die nicht-katalytische p101-Untereinheit spielt, und ob G $\beta\gamma$ die PI-3-Kinase γ ebenfalls an die Membran rekrutiert und hierdurch aktiviert. In der vorliegenden Arbeit wurde nun gezeigt, daß G $\beta\gamma$ die PI-3-Kinase γ tatsächlich aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert, und zwar durch Interaktion mit ihrer p101-Untereinheit, die insofern also ähnlich der p85-Untereinheiten der Klasse I_A PI-3-Kinasen als Adapter fungiert.

Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität und Rezeptor-vermittelten Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen in lebenden Zellen wurde ein Verfahren angewandt, bei dem die Bildung ihres Lipidprodukts PtdIns-3,4,5-P₃ durch die Membrantranslokation von hieran bindenden Fluoreszenz-markierten PH-Domänen sichtbar gemacht wird. Wie aus der Notwendigkeit der p101-Untereinheit für die Membranrekrutierung der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ bereits zu vermuten war, konnte so gezeigt werden, daß die p101-Untereinheit auch für die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ *in vivo* notwendig ist.

Um nun zu aufzuklären, ob die Rekrutierung aus dem Cytosol an die Membran zu ihrem Substrat gleichzeitig den Mechanismus darstellt, wie G $\beta\gamma$ die PI-3-Kinase γ aktiviert, wurde eine künstlich Membran-assoziierte PI-3-Kinase γ untersucht. In der Tat war die Membran-assoziierte PI-3-Kinase γ bereits ohne weitere Stimulation enzymatisch aktiv.

Hierfür war die nicht-katalytische p101-Untereinheit nicht notwendig, was ihre Rolle als Vermittler der Membranrekrutierung durch G $\beta\gamma$ unterstreicht. Interessanterweise konnte die Membran-assoziierte PI-3-Kinase γ aber durch G $\beta\gamma$ -Komplexe noch weiter stimuliert werden, offenbar also durch einen allosterischen Mechanismus. Auch hierbei machte die An- oder Abwesenheit der p101-Untereinheit keinen Unterschied. G $\beta\gamma$ interagiert also auch direkt mit der katalytischen p110 γ -Untereinheit, nur offenbar nicht stark genug, um sie auch unabhängig von der p101-Untereinheit an die Membran zu rekrutieren.

Auf der Basis dieser Befunde läßt sich ein Zwei-Schritt-Mechanismus für die Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ mit jeweils spezifischen Rollen für ihre p101- und die p110 γ -Untereinheit postulieren: Im ersten Schritt rekrutiert G $\beta\gamma$ die PI-3-Kinase γ aus dem Cytosol an die Membran, und zwar durch Interaktion mit ihrer nicht-katalytischen p101-Untereinheit, die hierfür als notwendiger Adapter fungiert. Bereits die Colokalisation der Lipidkinase mit ihrem Substrat führt aufgrund der Basalaktivität des Enzyms zu einer signifikanten PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung. An der Membran wird die PI-3-Kinase γ aber von G $\beta\gamma$ noch weiter aktiviert, und zwar durch direkte Interaktion mit ihrer katalytischen p110 γ -Untereinheit.

Neben der Aufklärung des Aktivierungsmechanismus der Klasse I_B PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ *in vivo* wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Erkenntnisse über die Funktion dieses Enzyms gewonnen. Mittels Gelfiltration wurde gezeigt, daß die p101- und die p110 γ -Untereinheit ein festes Heterodimer bilden, und FRET-Untersuchungen ergaben interessante Hinweise auf die Orientierung der beiden Untereinheiten im Heterodimer zueinander. Weiterhin wurde gezeigt, daß die p110 γ - auch ohne p101-Untereinheit als Monomer stabil ist, nicht aber umgekehrt. In Abwesenheit der p101-Untereinheit kann die monomere p110 γ zwar nicht durch G $\beta\gamma$ an die Membran rekrutiert werden, aber durch Ras.

Die PI-3-Kinase γ ist vorwiegend in Leukozyten exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von entzündlichen und allergischen Prozessen. Die in der vorliegenden Arbeit aufgeklärte Notwendigkeit der p101-Untereinheit für die G-Protein-vermittelte Aktivierung des Enzyms *in vivo* macht die Entwicklung eines an der p101-Untereinheit angreifenden anti-inflammatorischen Pharmakons vorstellbar, zumal die p101 keinerlei Ähnlichkeit mit anderen bekannten Proteinen aufweist.

Summary

Receptor-regulated class I PI-3-kinases produce the membrane lipid PtdIns-3,4,5-P₃ as a second messenger. This in turn induces membrane recruitment and activation of diverse cellular effectors harboring PtdIns-3,4,5-P₃-binding PH domains. Thereby, class I PI-3-kinases control important cellular functions such as growth, differentiation or cytoskeletal rearrangements. However, since PI-3-kinases have only recently been discovered, their regulation and function are not fully understood. Since class I PI-3-kinases are predominantly found in the cytosol, it has been assumed that they are recruited from the cytosol to the membrane, i. e. to their substrate, upon stimulation. This was shown here for the first time in living cells using fluorescence microscopy.

Class I PI-3-kinases are heterodimeric enzymes, and are further classified according to their type of non-catalytic subunit: The p85 non-catalytic subunit of the class I_A PI-3-kinases α , β and δ mediates their characteristic activation by receptor tyrosine kinases through interaction of its SH2 domains with the autophosphorylated receptor. Accordingly, using PI-3-kinase β as an example, it was shown here that upon RTK stimulation the heterodimeric enzyme, but not its monomeric catalytic p110 β subunit in the absence of the p85 adapter subunit, indeed translocates from the cytosol to the plasma membrane.

The only known class I_B PI-3-kinase to date is PI-3-kinase γ . Instead of p85 it has a p101 subunit, and is typically activated *via* G protein-coupled receptors by G $\beta\gamma$ complexes. In this context, it is controversially discussed which role the non-catalytic p101 subunit plays, and whether PI-3-kinase γ is also membrane-recruited by G $\beta\gamma$ and activated in this way. Here it was shown that G $\beta\gamma$ recruits PI-3-kinase γ from the cytosol to the membrane, namely through interaction with its non-catalytic p101 subunit. In this respect p101 functions as an adapter, comparable to the role of the p85 subunit of class I_A PI-3-kinases.

To study the enzymatic activity and receptor-mediated activation of class I PI-3-kinases, a method was applied that visualizes the generation of the PI-3-kinase lipid product PtdIns-3,4,5-P₃ as a translocation of fluorescence-tagged PtdIns-3,4,5-P₃-binding PH domains from the cytosol to the membrane. Using this method it was shown that the p101 subunit is required for the G protein-mediated activation of PI-3-kinase γ *in vivo*. This finding is in line with the requirement of p101 for the G $\beta\gamma$ -induced membrane recruitment of the enzyme.

In order to elucidate whether the recruitment from the cytosol to the membrane, i. e. to the substrate, represents the mechanism by which G $\beta\gamma$ activates PI-3-kinase γ , a membrane-targeted PI-3-kinase γ mutant was studied. Indeed, the membrane-associated PI-3-kinase γ displays enzymatic activity without further stimulation. The non-catalytic p101 subunit was not required for this, underlining its role as an adapter for the membrane recruitment of PI-3-kinase γ by G $\beta\gamma$. However, interestingly, the membrane-associated PI-3-kinase γ was further stimulated by G $\beta\gamma$, indicating an allosteric activation. Again the effect was independent of the

absence or presence of p101. Hence, G $\beta\gamma$ directly interacts with the catalytic p110 γ subunit - although with a weaker affinity than p101, which therefore acts a high affinity adapter mediating the membrane recruitment of the heterodimeric enzyme.

In conclusion, a two-step mechanism for the activation of PI-3-kinase γ by G $\beta\gamma$ is postulated, with specific roles for its p101 and its p110 γ subunit: As a first step, G $\beta\gamma$ recruits the enzyme from the cytosol to the membrane through interaction with its non-catalytic p101 subunit as a mandatory adapter. As a consequence of its intrinsic basal enzymatic activity, the colocalization of the lipid kinase with its substrate readily induces some PtdIns-3,4,5-P₃ production. However, at the membrane, PI-3-kinase γ is further allosterically activated by G $\beta\gamma$ by direct interaction with its catalytic p110 γ subunit.

In addition, further insights about the function of the enzyme were obtained. Gel filtration confirmed that the p101 and the p110 γ subunit form a tight dimer. The results of FRET analysis indicated the relative orientation of the two subunits within the heterodimer. Furthermore it was shown that p110 γ is also stable as a monomer in the absence of p101, but not *vice versa*. In the absence of p101, monomeric p110 γ can not be membrane-recruited by G $\beta\gamma$, but by Ras.

PI-3-kinase γ is predominantly expressed in leukocytes and plays an important role in the regulation of inflammatory and allergic processes. The requirement of p101 for the G protein-mediated activation of the enzyme *in vivo*, demonstrated here, qualifies p101 as a potential target for anti-inflammatory drugs, particularly since p101 has no similarity to any other known proteins.