

## 7 Zusammenfassung

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) ist eine Lipidkinase, die vor allem nach Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert wird. Der von ihr produzierte sekundäre Botenstoff PIP<sub>3</sub> aktiviert zahlreiche Effektorproteine, die PIP<sub>3</sub>-bindende PH-Domänen aufweisen. Zu ihnen zählen die Serin/Threonin-Kinase Akt, Tyrosinkinasen wie Btk sowie Regulatoren kleiner G-Proteine. Über diese Effektoren kontrolliert PI3K $\gamma$  zahlreiche zelluläre Prozesse wie das Zellüberleben, die Proliferation oder zytoskelettale Veränderungen. Entsprechend ihres Expressionsmusters vermindert ein Ausschalten des Gens für die katalytische p110 $\gamma$ -Untereinheit vor allem entzündliche und allergische Prozesse wie etwa Chemotaxis und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Neutrophilen und die Degranulation von Mastzellen. Darüber hinaus zeigten Studien, dass PI3K $\gamma$  auch bei der Regulation der Herzmuskelkontraktilität und der Entwicklung pathologischer Herzhypertrophien eine wichtige Rolle spielt.

PI3K $\gamma$  umfasst neben der katalytischen p110 $\gamma$ -Untereinheit auch eine regulatorische p101-Untereinheit, die für die Aktivierung der PI3K $\gamma$  essentiell ist. p101 bindet G $\beta\gamma$ -Komplexe, die vor allem nach Stimulation von G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptoren verfügbar werden. Dadurch transloziert p101 die p110 $\gamma$ -Untereinheit zur Plasmamembran, wo sich ihr Substrat PI(4,5)P<sub>2</sub> befindet. Dort wird p110 $\gamma$  ebenfalls durch G $\beta\gamma$ , aber auch durch Ras, zusätzlich allosterisch stimuliert. Trotz der Relevanz der von p101 vermittelten Interaktionen sind ihre Bindestellen für p110 $\gamma$  und G $\beta\gamma$  noch weitgehend ungeklärt. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, zunächst die Elemente in der Primärstruktur der p101 zu ermitteln, die für diese Interaktionen verantwortlich sind.

Dazu wurden p101-Deletionsmutanten erstellt und auf ihre Bindung zu p110 $\gamma$  und G $\beta\gamma$  hin untersucht. Mittels Koimmunpräzipitation und FRET konnte die p110 $\gamma$ -bindende Heterodimerisierungsdomäne auf die Aminosäuren 25–175 eingegrenzt werden. Angrenzende, weiter C-terminal gelegene Bereiche unterstützen die Funktion dieser Domäne. Durch Rekrutierungsassays wurde gezeigt, dass die G $\beta\gamma$ -Bindedomäne im C-Terminus der p101 liegt (Aminosäuren 650–850). Diese Domänen sind bei Orthologen der p101 hoch konserviert, während die übrigen Bereiche weniger streng konserviert sind.

Die Sequenzen der kartierten Domänen wurden für eine Datenbank-Suche nach potenziellen neuen p110 $\gamma$ -Interaktionspartnern und unbekanntem G $\beta\gamma$ -Effektoren genutzt. Dabei wurde eine cDNA-Sequenz identifiziert, die innerhalb der Interaktionsdomänen deutliche Ähnlichkeit zu p101 aufwies. Die Klonierung und nachfolgende Charakterisierung bestätigten, dass es sich um eine neue regulatorische PI3K $\gamma$ -Untereinheit handelt. Sie wurde als 87-kDa-PI3K $\gamma$ -

Adapter-Protein bezeichnet ( $p87^{PIKAP}$ ).

$p87^{PIKAP}$  und p101 binden mit vergleichbarer Affinität an  $p110\gamma$ . Da beide regulatorischen Untereinheiten um die Bindung an  $p110\gamma$  konkurrieren, nutzen sie die gleiche oder zumindest eine überlappende Bindestelle. Die Affinität von  $p87^{PIKAP}$  zu  $G\beta_1\gamma_2$  ist in lebenden Zellen geringer als bei p101, was sich auch in verminderter  $PI3K\gamma$ -Aktivität nach Stimulation eines  $G_i$ -gekoppelten Rezeptors äußert. Diese wurde über die Translokation des fluoreszierenden Biosensors YFP-Grp1-PH und über den Phosphorylierungsstatus von Akt nachgewiesen.  $p87^{PIKAP}$  ist damit in der Lage, die Rolle von p101 in der  $PI3K\gamma$ -Signaltransduktion zu übernehmen, obgleich das Heterodimer dadurch veränderte Eigenschaften erhält. Eine Analyse des Expressionsmusters von  $p87^{PIKAP}$ , p101 und  $p110\gamma$  zeigte, dass  $p110\gamma$  in allen untersuchten Zelltypen mit mindestens einem Adapter koexprimiert wird. Während in B- und T-Zellen p101 überwiegt, finden sich beide Untereinheiten in dendritischen Zellen, Makrophagen und Neutrophilen. Im Herzen und in Mastzellen hingegen ist fast ausschließlich  $p87^{PIKAP}$  vorhanden.

Für die weitere Untersuchung der Rolle von  $p87^{PIKAP}$  wurden daher diese beiden Systeme ausgewählt. In RBL-2H3-Zellen führt Stimulation mit Antigen-Antikörper-Komplexen ebenso wie in Mastzellen zur Degranulation. Eine shRNA-vermittelte Reduktion der  $p87^{PIKAP}$ -Expression führte zu einer stark verminderten Akt-Phosphorylierung nach Stimulation des endogenen,  $G_i$ -gekoppelten Adenosin- $A_3$ -Rezeptors. Ebenso fehlte unter diesen Bedingungen die  $p110\gamma$ -vermittelte Verstärkung der Degranulation, die über autokrine Stimulation von  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren verläuft. Dies weist auf eine essentielle Funktion von  $p87^{PIKAP}$  in diesem Kontext hin. Die negativ inotrope Wirkung von  $PI3K\gamma$  im Herzen konnte kürzlich einer Stimulation der PDE3B durch  $p110\gamma$  zugewiesen werden, die auf der Bildung eines Proteinkomplexes beruht. Jedoch kann  $p110\gamma$  alleine diese Interaktion nicht ausbilden. Daher wurde untersucht, ob  $p87^{PIKAP}$  PDE3B und  $p110\gamma$  verbinden kann. Tatsächlich konnte  $p87^{PIKAP}$  alleine und in Komplex mit  $p110\gamma$  mit PDE3B kopräzipitiert werden, jedoch keine Steigerung der PDE3B-Aktivität bewirken. Daher könnte  $p87^{PIKAP}$  zwar ebenfalls ein essentieller Bestandteil des PDE3B-regulierenden Komplexes sein, jedoch sind noch weitere Kofaktoren für eine PDE3B-Stimulation notwendig.

Um einen detaillierteren strukturellen Einblick in die p101- und  $p87^{PIKAP}$ -vermittelten Interaktionen zu erhalten, wurden mittels Peptid-SPOT-Analyse lineare Peptidpitope innerhalb von p101 und  $p87^{PIKAP}$  ermittelt, die Affinität zu  $p110\gamma$  und  $G\beta\gamma$  aufweisen. In Übereinstimmung mit der Analyse der p101-Deletionsmutanten wurden dabei für p101 und auch  $p87^{PIKAP}$  hauptsächlich N-terminale Bereiche, jedoch auch eventuelle Kontaktpunkte nahe der  $G\beta\gamma$ -Bindestelle gefunden. Von  $G\beta$  abgeleitete Peptide wurden auf die Bindung zu  $p110\gamma/p87^{PIKAP}$ -Komplexen hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass  $PI3K\gamma$  ähnlich wie andere  $G\beta\gamma$ -Effektoren an den Interaktions-Hot-Spot auf  $G\beta$  bindet, jedoch auch weitere Kontakte ausbildet. Erste Kristallisationsversuche mit gereinigten  $p110\gamma/p87^{PIKAP}$ -Komplexen wurden begonnen, um die Interaktion beider Untereinheiten mit atomarer Auflösung beschreiben zu können.