

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Kommunikation

Eine entscheidende Voraussetzung für die Funktion vielzelliger Organismen ist der Informationsaustausch zwischen den Zellen, aus denen sie bestehen. Diese Kommunikation erfolgt durch elektrische Signale aber auch hormonal über Hunderte verschiedener Signalmoleküle. Dazu gehören Proteine, kleinere Peptide, Aminosäuren, Nukleotide, Steroide, Fettsäurederivate und sogar lösliche Gase wie Stickstoffmonoxid. Die meisten dieser Signalgeber verlassen die signalisierende Zelle über Exocytose, andere über Diffusion durch die Plasmamembran. Wieder andere bleiben an der Zelloberfläche gebunden und können so nur bei direktem Zell-Zell-Kontakt ein Signal weitergeben.

Die Zielzelle bindet die ankommenden Signalmoleküle mit Hilfe spezifischer Proteine, den sog. Rezeptoren, die verschieden lokalisiert sein können. So binden z.B. Schilddrüsen- und Steroidhormone, die aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften die Zellmembran leicht überwinden können, an Rezeptoren im Cytosol (Evans, 1988, Parker, 1993). Die meisten Signalmoleküle sind jedoch hydrophiler Natur und können somit nicht ins Zellinnere diffundieren. Die entsprechenden Rezeptoren sind membranständig und generieren nach Bindung eines primären Botenstoffs außerhalb der Zelle einen sekundären Botenstoff im Innern, den sog. „*second messenger*“. Je nach Mechanismus dieser Transduktion eines extrazellulären in ein intrazelluläres Signal kann man verschiedene Klassen von membranständigen Rezeptoren unterscheiden (Abb. 1).

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind am schnellen synaptischen Signalprozeß zwischen elektrisch erregbaren Zellen beteiligt (siehe Abb. 1C). Für diese Art der Signalübertragung sind nur wenige Neurotransmitter verantwortlich, die an die extrazellulären Bereiche der multimeren Kanalstruktur binden und dadurch die Permeabilität der Pore für bestimmte Ionen kurzzeitig verändern. So sind nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren, ionotrope Glutamat-Rezeptoren oder ein Serotonin-Rezeptor (5-HT₃-R) im aktivierten Zustand für Kationen durchlässig, während die Pore des γ -Aminobuttersäure- (GABA_A) und auch des Glycin-Rezeptors nur für Anionen passierbar ist (Kotzyba-Hilbert et al., 1999, MacDermott et al., 1999, Whiting et al., 1999). Die weiteren Effekte im Zellinnern werden dann durch das veränderte Membranpotential der entsprechenden Ionen ausgelöst.

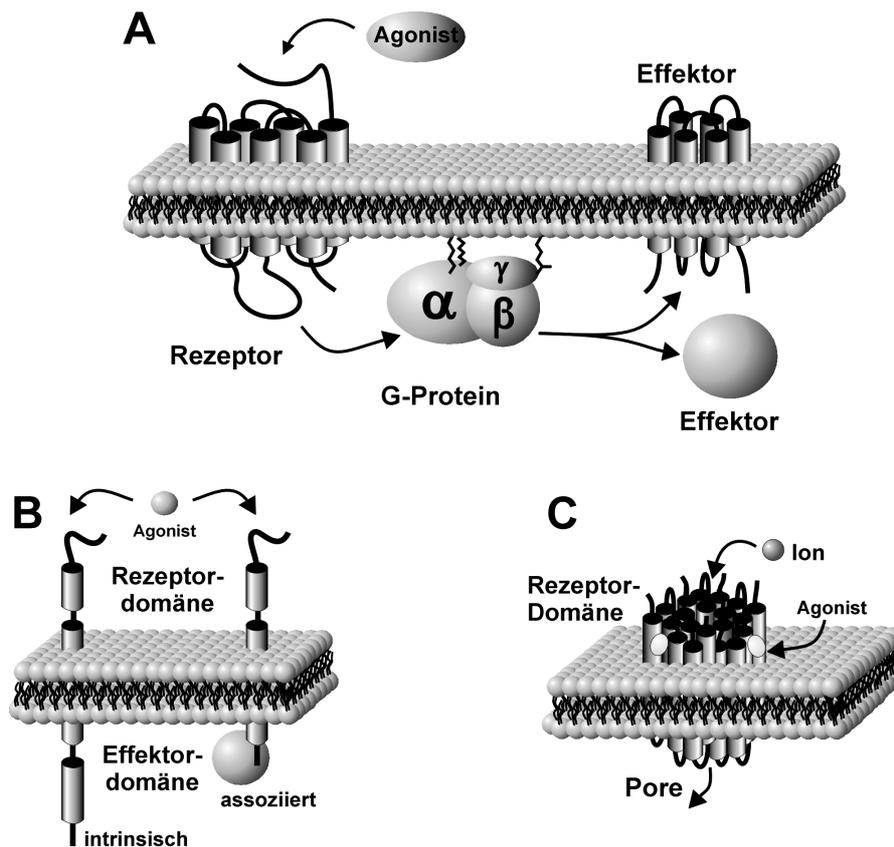


Abb. 1: Ausgewählte Prinzipien der Signaltransduktion durch Zelloberflächen-Rezeptoren

Die Anwesenheit von extrazellulären Signalmolekülen kann auf verschiedene Weise in ein intrazelluläres Ereignis umgewandelt werden. Die Klasse der **G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (A)** benötigt zur Weiterleitung des Signals an Effektoren ein zusätzliches Schaltermolekül, das sog. G-Protein. Die modulierten Effektoren können ihrerseits membranständig oder cytosolisch lokalisiert sein. **Enzym-gekoppelte Rezeptoren (B)** besitzen entweder selbst eine katalytische Aktivität oder sind mit Enzymen assoziiert. Bei **Liganden-gesteuerten Ionenkanälen (C)** bilden die extrazelluläre Rezeptordomäne und die Kanalpore, die durch den Liganden gesteuert wird, prinzipiell eine molekulare Einheit.

Enzym-gekoppelte Rezeptoren durchspannen die Zellmembran nur einmal (siehe Abb. 1B). Als Folge der Ligandenbindung an die extrazelluläre Rezeptordomäne kommt es zur Heterodimerisierung zweier Rezeptoren, wodurch die Enzymaktivität der intrazellulären Effektordomänen induziert wird. Zu dieser Klasse gehören neben Rezeptor-Guanylyl-Cyclasen, die nach Bindung des Liganden cyclisches GMP (cGMP) bilden (Garbers et al., 1994), auch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, zu denen die meisten Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie der Insulin- oder der PDGF (*platelet derived growth factor*)-Rezeptor zu rechnen sind (Songyang und Cantley, 1995). Die Signalweiterleitung erfolgt hierbei durch Tyr-Phosphorylierung spezifischer Proteinsubstrate bzw. durch Bindung von Adaptorproteinen an die phosphorylierten Domänen des Rezeptors. Darüber hinaus gibt es auch Vertreter dieser Klasse, bei denen Rezeptor- und Effektorfunktion von zwei verschiedenen Proteinen übernommen wird, wie z.B. der TNF-Rezeptor, dessen Rezeptordomäne mit einer intrazellulär lokalisierten Tyrosin-Kinase assoziiert ist (Taniguchi et al., 1995).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können eine Vielzahl von Liganden binden, die strukturell sehr divergent sind. Diese umfassen neben biogenen Aminen (z.B. Histamin), Aminosäuren (z.B. Glutaminsäure), Peptiden (z.B. Angiotensin II), Glykoproteinen (z.B. TSH), Fettsäurederivaten (z.B. Thromboxan A₂) oder Phospholipidderivaten (z.B. Lysophosphatidsäure) auch einfache physikalische Reize wie Lichtquanten, die über das am Rhodopsin-Rezeptor gebundene Retinal aktivierend wirken (Ji et al., 1998).

Die mittlerweile schon über 1000 klonierten Vertreter dieser Rezeptorklasse weisen alle gemeinsame Strukturmerkmale auf. Sie durchspannen die Cytoplasmamembran siebenfach, wobei der strukturell sehr variable N-terminale Abschnitt zur Bildung der extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne beiträgt und der C-Terminus cytosolisch lokalisiert ist (Unger et al., 1997). Im Gegensatz zu den Vertretern anderer Rezeptorklassen wirken G-Protein-gekoppelte Rezeptoren indirekt. Sie aktivieren ein trimeres Guaninnukleotid-bindendes Regulatorprotein (G-Protein), das dann seinerseits in der Lage ist, die Aktivität von Effektoren zu modulieren (Gudermann et al., 1995). Diese können sowohl membranständig, wie z.B. Ionenkanäle und Adenylylcyclasen, als auch cytosolisch lokalisiert sein, wie es für Phospholipase C- (PLC) oder Phosphatidylinositol-3-Kinase- (PI3K) Isoformen zutrifft (siehe Abb. 1A und Hamm, 1998). Die Modulation dieser Effektorproteine bewirkt dann eine Konzentrationsänderung der von ihnen gebildeten, intrazellulären Botenstoffen („*second messengers*“), die, wie z.B. das Ca²⁺, cyclische AMP (cAMP) oder Inositoltrisphosphat (IP₃), ins Cytoplasma diffundieren oder, wie z.B. das Diacylglycerol (DAG) oder Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI-3,4,5-P₃), in der Membran verbleiben. Dort können sie weitere zelluläre Reaktionen auslösen, die zur hormonal induzierten Zellantwort beitragen.

1.2 G-Protein-abhängige Signaltransduktion

1.2.1 Aufbau und Funktion von G-Proteinen

G-Proteine sind an der Innenseite der Cytoplasmamembran und auch auf intrazellulären Membranen lokalisiert. Ihre Funktion ist es, Signale von heptahelikalen Rezeptoren an Effektoren weiterzuleiten. Sie sind aus drei Untereinheiten aufgebaut, die entsprechend ihrer Molmasse mit α , β und γ bezeichnet werden. Während die G α -Untereinheit als Monomer isoliert werden kann und als solches auch eine funktionelle Aktivität zeigt, wurde der G $\beta\gamma$ -Komplex unter nicht-denaturierenden Bedingungen bisher als nicht dissoziierbar beschrieben (Clapham und Neer, 1997). Allerdings zeigt das jüngste Mitglied der G β -Familie, die G β_5 -Untereinheit, ein besonderes Verhalten, indem sie, neben ihrer Assoziation mit

$G\gamma$ -Untereinheiten, auch mit Vertretern der Familie der RGS-Proteine (*regulators of G protein signaling*) einen Komplex bilden kann (Cabrera et al., 1998, siehe auch 1.2.1.2).

Basierend auf der intrinsischen GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit werden heterotrimeren G-Proteine zu der Superfamilie der GTPasen gerechnet. Auf dieser Aktivität beruht auch das regulatorische Prinzip der Signalweiterleitung. In seinem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand liegt das G-Protein heterotrimer vor und ist mit dem Rezeptor assoziiert. Bindet nun ein Ligand an den Rezeptor, kommt es infolge einer Konformationsänderung des Rezeptors und des assoziierten G-Proteins zur Öffnung der Guaninnukleotid-Bindungstasche, was zu einem Austausch von GDP gegen GTP führt. Dies bewirkt eine verringerte Affinität von $G\alpha$ zu $G\beta\gamma$ und damit die Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in zwei funktionelle Einheiten, die GTP-gebundene $G\alpha$ -Untereinheit und ein $G\beta\gamma$ -Dimer. Die beiden Untereinheiten können nun unabhängig voneinander mit Effektoren wechselwirken und diese modulieren. Die Terminierung der Signalweitergabe erfolgt durch die Hydrolyse des GTP zu GDP durch die GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit. Dadurch schwingt $G\alpha$ in seine ursprüngliche, inaktive Konformation zurück, wodurch die Affinität zu den Effektoren sinkt und die zu $G\beta\gamma$ wieder steigt. $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ reassoziieren und gelangen so erneut in den heterotrimeren Zustand. Nach Bindung an den Rezeptor können nun weitere Zyklen durchlaufen werden. Dabei kann ein Agonist-besetzter Rezeptor mehrere G-Proteine aktivieren, wodurch es zu einer Signalverstärkung kommt (Nürnberg et al., 1995).

1.2.1.1 $G\alpha$ -Untereinheit

Ursprünglich erfolgte die Einteilung der G-Proteine nach ihrer Sensitivität gegenüber bakteriellen Toxinen. So wurden CTX-sensitive, PTX-sensitive und PTX-insensitive Formen voneinander abgegrenzt. Diese Nomenklatur dient bis heute der Charakterisierung G-Protein-vermittelter Signalwege. Zur Zeit basiert die Klassifizierung jedoch auf DNA-Sequenz-homologien der $G\alpha$ -Untereinheit des jeweiligen G-Proteins (Simon et al., 1991, Wilkie et al., 1992). Danach werden vier Familien unterschieden, die als G_s , G_i , G_q und G_{12} bezeichnet werden (Tab. 1). Die $G\alpha$ -Untereinheiten unterscheiden sich sowohl in ihrer molaren Masse (39-52 kDa) als auch in ihrer Rezeptor- und Effektorspezifität.

Für das zuerst entdeckte G-Protein, G_s , war die stimulierende Wirkung auf die Adenylylcyclase namensgebend. Es existiert in vier Spleißvarianten, die alle die für diese Familie typische CTX-Sensitivität zeigen. Eine gemeinsame Eigenschaft der G_s -Familie, einschließlich des nur im Riechepithel exprimierten G_{olf} , ist Stimulation der Adenylylcyclase (Jones und Reed, 1989, Sunahara et al., 1996, Belluscio et al., 1998).

Ein kurz danach gefundenes, die Adenylylcyclase inhibierendes G-Protein wurde als G_i bezeichnet. Die darauf begründete Familie der G_i -Proteine ist im wesentlichen PTX-sensitiv und umfaßt mittlerweile 11 Mitglieder. Zu ihr gehören neben drei G_i -Isoformen auch eine G_{i2} -Spleißvariante, drei G_o -Isoformen, G_z , zwei Transduzine ($G_{t(r)}$ und $G_{t(c)}$) und Gustduzin (Kaziro et al., 1991, Exner et al., 1999).

Tab. 1: Klassifizierung der heterotrimeren G-Proteine nach ihren $G\alpha$ -Untereinheiten

Familie	Subtyp¹	Vorkommen	Effektoren²	PTX-/CTX-Sensitivität³
G_s	$G_{s(s),s(l)}$	ubiquitär	AC ↑ Ca ²⁺ -Kanal ↑	CTX
	$G_{s(xl)}$?	AC ↑	CTX
	G_{olf}	olfaktorisches Epithel	AC ↑	CTX
G_i	$G_{t(r,c)}$ ⁴	Retina	cGMP-PDE ↑	CTX, PTX
	G_{gust}	Geschmacksknospen	cGMP-PDE ↑?	CTX, PTX
	G_{i1}	überwiegend neuronal	AC ↓ K ⁺ -Kanal ↑	PTX, (CTX)
	$G_{i2}, i2(l)$	ubiquitär	AC ↓, PI3K ↑ K ⁺ -Kanal ↑	PTX, (CTX)
	G_{i3}	überwiegend nicht-neuronal	AC ↓, PI3K ↑ K ⁺ -Kanal ↑	PTX, (CTX)
	$G_{o1}, o2, o3$	neuronal, endokrin	Ca ²⁺ -Kanal ↓ rap1GAP ↑	PTX, (CTX)
	G_z	neuronal, endokrin, Thrombozyten	AC ↓? rap1GAP (?)	
G_q	G_q	ubiquitär	PLC-β ↑	
	G_{11}	nicht-hämatopoetische Zellen	PLC-β ↑	
	G_{14}	Hoden, Milz, Nieren	PLC-β ↑	
	$G_{15/16}$ ⁵	hämatopoetische Zellen	PLC-β ↑	
G₁₂	G_{12}	ubiquitär	Rho-GEF ↑	
	G_{13}	ubiquitär	Rho-GEF ↑	

¹ (s) und (l) bezeichnen kurze bzw. lange Spleißvarianten der entsprechenden $G\alpha$ -Untereinheit, (xl) bezeichnet eine Variante von $G\alpha_s$ mit 74 kDa.

² AC: Adenylylcyclase; cGMP-PDE: cGMP-spaltende Phosphodiesterase; PLC-β: Phospholipase C-β; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; Rho-GEF: Guaninnukleotid-Austausch-Faktor der Ras-homologen monomeren GTPase Rho; ↑ = Stimulation; ↓ = Hemmung.

³ PTX = Pertussistoxin-sensitiv; CTX = Cholera toxin-sensitiv; (CTX) = CTX-sensitiv nur in Anwesenheit Agonist-besetzter Rezeptoren.

⁴ $G_{t(r)}$ und $G_{t(c)}$ bezeichnen Transduzine in Stäbchen- (engl.: „rod“) und Zapfenzellen (engl. „cone“) der Retina.

⁵ $G\alpha_{15/16}$ sind Speziesvarianten von Maus bzw. Mensch.

Eine Eigenschaft der G_i - und möglicherweise auch der G_z -Proteine ist die Hemmung der Adenylylcyclase (Taussig und Gilman, 1995). Die G_o -Subfamilie spielt eine Rolle bei der Hemmung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und des vesikulären Amintransporters (Kalkbrenner et al., 1996, Ahnert-Hilger et al., 1998). Interessanterweise führt die Aktivierung G_i -koppelter Rezeptoren zur Induktion mitogener Signale, wobei Enzyme wie MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinase*) und Phosphatidylinositol-3-Kinasen eine Schlüsselstellung einnehmen (Johnson et al., 1994, Dhanasekaran et al., 1995). Allerdings dürften für diese Effekte die aus den G_i -Proteinen freigesetzten $G\beta\gamma$ -Untereinheiten verantwortlich sein (Gutkind, 1998, Luttrell et al., 1999). Transduzin, das von Licht-aktiviertem Rhodopsin stimuliert wird, aktiviert seinerseits eine cGMP-abhängige Phosphodiesterase (Kaupp und Koch, 1992). Das nahe verwandte Gustduzin vermittelt in olfaktorischen Sinneszellen die Geschmacksqualitäten bitter und süß (Wong et al., 1996).

Die G_q -Familie besteht aus den PTX-insensitiven G-Proteinen G_q , G_{11} , G_{14} , G_{15} und G_{16} . Während G_{14} , G_{15} und G_{16} ein restriktives Expressionsmuster zeigen, kommen G_q und G_{11} nahezu ubiquitär vor (siehe Tab. 1). Allen gemeinsam ist die Fähigkeit, Phospholipasen vom C- β -Typ zu stimulieren. Daher wird angenommen, daß diese G-Protein-Familie für den PTX-insensitiven „PI-response“ verantwortlich ist, der durch IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern für einen schnellen Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle sorgt (Blank et al., 1991, Smrcka et al., 1991, Kozasa et al., 1993, Lee und Rhee, 1995b).

Die jüngste G-Protein-Familie ist die G_{12} -Familie. Beide Mitglieder, G_{12} und G_{13} , sind ebenfalls PTX-insensitiv und werden zwar ubiquitär, aber nur in geringen Mengen exprimiert (Strathmann und Simon, 1991, Spicher et al., 1994). Strukturell ist diese G-Protein-Familie sehr inhomogen. So weisen $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ untereinander lediglich eine Aminosäureidentität von 67 % auf, während die Ähnlichkeit zu allen übrigen $G\alpha$ -Untereinheiten mit ca. 50% noch geringer ausfällt. Funktionell bedeutend ist u.a. die Stimulation des Na^+/H^+ -Austauschers (Dhanasekaran et al., 1994). Wahrscheinlich kommt es bei $G_{12/13}$ -abhängigen Signalwegen auch zur Aktivierung von Rho-Proteinen, wobei zwischen spezifischen Effekten der beiden $G\alpha$ -Untereinheiten unterschieden werden kann (Gohla et al., 1997, 1998). Direkte Effektoren sind Guaninnukleotid-Austauschfaktoren des Rho (Rho-GEFs).

1.2.1.2 G β - und G γ -Untereinheit

G $\beta\gamma$ -Komplexe sind selbst nicht enzymatisch aktiv und wesentlich lipophiler als G α -Untereinheiten, weshalb sie zunächst nur als Membrananker für die heterotrimeren Form des G-Proteins angesehen wurden. Wie bei den G α -Untereinheiten werden auch bei den G β - und G γ -Untereinheiten verschiedene Isoformen unterschieden, die nach Subfamilien geordnet werden, aber bislang nicht zur weiteren Klassifizierung der G-Proteine herangezogen werden (Tab. 2).

Tab. 2: Bisher bekannte G β - und G γ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine

G β -Untereinheiten			G γ -Untereinheiten		
Subtyp ¹		Vorkommen	Subtyp ³		Vorkommen
Familie I:	G β_1	ubiquitär	Familie I:	G γ_1	Retina (Stäbchen)
	G β_2	ubiquitär		G γ_9	Retina (Zäpfchen)
	G β_3	ubiquitär		G γ_{11}	nicht-neuronal
	G $\beta_{3(s)}$?	Familie II:	G γ_5	Plazenta, Leber
	G β_4	neuronal, Lunge		G γ_{10}	ubiquitär
Familie II:	G β_5	neuronal, Pankreas, Herz, Leber, Niere ²	Familie III:	G γ_2	ubiquitär
	G $\beta_{5(l)}$	Retina		G γ_3	neuronal, Hoden
		G γ_4		verbreitet	
		G γ_7		weit verbreitet	
		G γ_8		neuronal, olf. Zilien	
		G γ_{12}		ubiquitär	
			Familie IV?	G γ_{13}	Geschmacksknospen

Die Einteilung in einzelne G β - und G γ -Familien beruht auf DNA-Sequenzhomologie-Untersuchungen.

¹ (s) und (l) bezeichnen kurze („short“) bzw. lange („long“) Spleißvarianten der entsprechenden G β -Untereinheit.

² Die Expression von G β_5 ist bei der Maus in neuronales Gewebe beschränkt (Jones et al., 1998).

³ Bei der Benennung der G γ -Untereinheiten ist die Bezeichnung G γ_6 ausgenommen.

Die G β -Untereinheiten weisen eine Molmasse von 35-39 kDa auf, während die G γ -Untereinheiten mit 6-8 kDa deutlich kleiner sind. Die G β -Familie umfaßt mittlerweile 7, die G γ -Familie 12 Mitglieder, wobei der jüngste Vertreter, G γ_{13} , erst kürzlich kloniert und charakterisiert wurde (Huang et al., 1999). Die ersten vier gefundenen G β -Isoformen weisen eine Aminosäureidentität von 79-90 % auf. Dieser hohe strukturelle Verwandtschaftsgrad äußert sich auch in der Einheitlichkeit ihrer funktionellen Eigenschaften. Bisher konnten keine signifikanten Unterschiede in der Wechselwirkung mit Effektoren, G α -Untereinheiten oder Rezeptoren festgestellt werden (Gautam et al., 1998). Das jüngste Familienmitglied,

G β_5 , zeigt mit nur 50 % Aminosäureidentität eine größere Abweichung in der Primärstruktur und im Expressionsmuster (Watson et al., 1994). Während es in der Maus nur neuronal exprimiert wird, findet man in menschlichem Gewebe auch Transkripte in Pankreas, Herz, Niere und Leber (Jones et al., 1998, Brunk et al., 1999). Strukturell bemerkenswert ist auch das Vorhandensein von 13 zusätzlichen Aminosäuren, von denen 8 eine N-terminale Insertion bilden. Dieser Bereich ist besonders wichtig für die Interaktion mit der G γ -Untereinheit (Sondek et al., 1996). In der Tat zeigt G β_5 eine veränderte Assoziation mit G γ , was sich in einer erhöhten Detergenz-Labilität von G β_5 G γ -Dimeren äußert (Jones et al., 1999). Darüber hinaus ist G β_5 in manchen Geweben, wie Retina oder ZNS, auch cytosolisch lokalisiert (Watson et al., 1996). Eine Erklärung für dieses G β G γ -untypische Verhalten könnte die Assoziation von G β_5 mit cytosolischen RGS-Proteinen sein (Cabrera et al., 1998). So ist G β_5 in der Lage, mit RGS6, 7, 9 und 11 heterodimere Komplexe zu bilden, wobei die Wechselwirkung über eine sog. GGL-Domäne (*G protein γ subunit like*) des RGS-Proteins erfolgt (Snow et al., 1998, Levay et al., 1999). Der erste Hinweis auf eine Funktion dieser Assoziation ist die Fähigkeit von G β_5 -RGS-Komplexen, die Kinetik der G β G γ -vermittelten Stimulation von K⁺-Kanälen (GIRKs) zu modulieren (Kovoor et al., 2000). Daneben zeigen G β_5 G γ -Komplexe aber auch ein für G β G γ -Dimere typisches Verhalten, indem sie bekannte G β G γ -Effektoren, wie die PLC- β , modulieren (Watson et al., 1994, Lindorfer et al., 1998).

Durch alternatives Spleißen von G β_3 - und G β_5 -Transkripten entstehen zwei weitere G β -Isoformen. G $\beta_{5(1)}$ unterscheidet sich von G β_5 durch 40 weitere N-terminale Aminosäuren und ist bislang nur in den äußeren Segmenten von Photorezeptoren nachgewiesen worden (Watson et al., 1996). Obwohl G $\beta_{5(1)}$ mit G γ *in vitro* funktionell aktive Komplexe bilden kann, ist es *in vivo* vermutlich konstitutiv mit RGS9 assoziiert, da nach Gen-Inaktivierung von RGS9 in der Maus auch die Expression von G $\beta_{5(1)}$ unterbleibt (Chen et al., 2000). Bei der kürzeren Spleißvariante von G β_3 , G $\beta_{3(s)}$, fehlen 41 Aminosäuren im mittleren Teil des Moleküls, was der Deletion eines repetitiven Strukturmotivs entspricht (Siffert et al., 1998 und siehe Abb. 2). Obwohl man annehmen müßte, daß eine solche Strukturveränderung die Funktion der daraus aufgebauten G β G γ -Dimere stark beeinträchtigt, soll dieses Spleißprodukt aktiv sein und scheint, durch bislang noch ungeklärte Mechanismen, sogar zu einer Signalverstärkung zu führen (Virchow et al., 1999).

Die Familie der G γ -Untereinheiten zeigt eine höhere Strukturdiversität als die G β - und G α -Untereinheiten, wodurch sich die weitere Unterteilung in Subfamilien schwieriger gestaltet (Ray et al., 1995, Gautam et al., 1998). Derzeit erfolgt die Klassifizierung aufgrund von Aminosäurehomologien in drei Gruppen. Allerdings zeigt das erst Ende 1999 entdeckte G γ_{13} nur eine 30 %ige Aminosäureidentität zu allen anderen bekannten Formen, so daß dies der Prototyp einer vierten Subfamilie sein könnte (Huang et al., 1999, siehe Tab. 2). G γ -Untereinheiten sind an einem Cys-Rest an ihrem C-terminalen Ende isoprenyliert, worauf

sich die hohe Lipophilie der G β γ -Komplexe maßgeblich begründet. Die Art der posttranslationalen Modifikation wird durch eine vier Aminosäuren lange Erkennungssequenz am C-Terminus, dem sog. CAAX-Motiv, determiniert (Fukada et al., 1990, Casey und Seabra, 1996). C steht dabei für den zu modifizierenden Cys-Rest und A für eine beliebige Aminosäure. Handelt es sich bei X um ein Serin, so wird das entsprechende Cystein mit einem C15-Farnesylrest modifiziert, ist die letzte Aminosäure ein Leucin, wird die G γ -Untereinheit C20-geranylgeranyliert (Chen et al., 1991, Ray et al., 1995). Danach werden die G γ -Untereinheiten an der Plasmamembran weiter prozessiert, wodurch es zur proteolytischen Abspaltung des AAX-Restes und Methylierung des nun C-terminalen Cys-Restes kommt (Cook et al., 1998).

Zu den mit einem C15-Farnesylrest modifizierten G γ -Untereinheiten gehören, neben dem in Transduzin $\beta\gamma$ vorkommenden G γ_1 , auch G γ_9 und G γ_{11} . Alle anderen G γ -Untereinheiten tragen das C-terminale Erkennungsmotiv für eine Geranylgeranyltransferase. Obwohl die Isoprenylierung der G γ -Untereinheit für die Assoziation mit G β nicht erforderlich ist, scheint sie eine Rolle bei der Interaktion des G $\beta\gamma$ -Dimers mit dem Rezeptor zu spielen (Kisselev et al., 1994, 1995, Yasuda et al., 1996). Auch bei der Kopplung an G $\beta\gamma$ -regulierte Effektoren sind Unterschiede zu beobachten. So ist die Wirkung von G $\beta_1\gamma_1$ an verschiedenen Effektoren gegenüber G $\beta_1\gamma_2$ vermindert (Iñiguez-Lluhi, et al., 1992). Dabei trägt jedoch sowohl die Aminosäuresequenz der G γ -Untereinheit als auch die Länge der Isoprenylierung zu den veränderten Eigenschaften bei (Matsuda et al., 1998, Myung et al., 1999).

Das schnelle Anwachsen der Zahl der bekannten G β - und G γ -Untereinheiten warf die Frage nach der Spezifität der Wechselwirkung zwischen den beiden Bindungspartnern auf. Wenn alle theoretisch denkbaren G $\beta\gamma$ -Dimere gebildet werden könnten, würde dies die Zahl der bekannten G α -Untereinheiten um den Faktor drei übertreffen. In den verschiedensten methodischen Ansätzen, wie *in vitro*-Translation, Expression in bestimmten Zelllinien und native bzw. rekombinante Proteinreinigung, konnte jedoch nur eine geringe Isoformspezifität der Interaktion beobachtet werden. Als gesichert gilt, daß G β_1 die geringste Spezifität in der G γ -Interaktion aufweist, da es mit allen untersuchten G γ -Untereinheiten funktionell aktive Komplexe bilden kann, während die G γ_1 -Untereinheit die höchste Spezifität in der G β -Interaktion zeigt, da es nur mit G β_1 assoziiert (Clapham und Neer, 1997).

Die G γ -Untereinheit geht in einer ausgestreckten Konformation hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen mit der G β -Untereinheit ein (Abb. 2). Dabei wird die Affinität einerseits durch superspiralisierte, helikale Strukturen beider N-Termini und andererseits durch die Wechselwirkung einer weiteren helikalen G γ -Struktur mit C-terminalen Bereichen der G β -Untereinheit vermittelt. Die G β -Untereinheit ist, abgesehen von den 20 N-terminal gelegenen, helikal angeordneten Aminosäuren, aus einem repetitiven Sequenzmotiv aufgebaut. Die Anordnung erfolgt propellerartig, wobei jede der sieben

Wiederholungseinheiten ein „Propellerblatt“ bildet. Diese sog. „WD-repeats“ sind nicht spezifisch für G β -Untereinheiten, sondern ein allgemein verbreitetes strukturelles Motiv, das nicht unmittelbar auf ähnliche funktionelle Eigenschaften schließen läßt. Die Bezeichnung „WD-repeat“ begründet sich auf dem periodischen Auftreten zweier konservierter Aminosäuren, Tryptophan (W) und Asparaginsäure (D), was sich etwa alle 40 Aminosäuren wiederholt. Allerdings fällt der Beginn eines „Propellerblattes“ nicht mit der Lokalisation der beiden Aminosäuren zusammen.

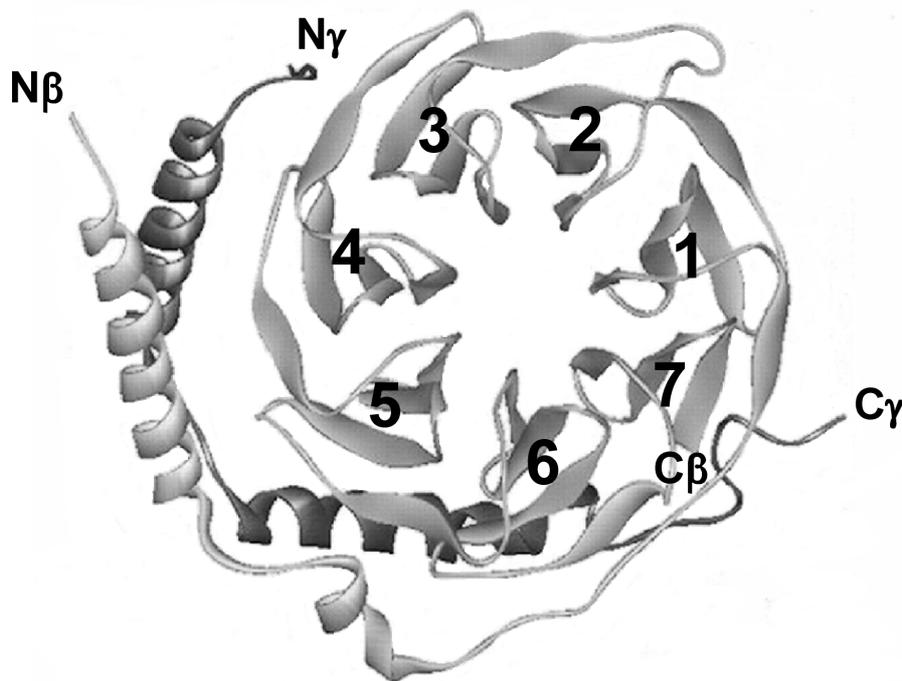


Abb. 2: Die Struktur des G β ₁ γ ₁-Komplexes

Die G β -Untereinheit (hellgrau) bildet eine 7-blättrige propellerartige Struktur, die in der Mitte eine wassergefüllte Pore besitzt. Die G γ -Untereinheit (dunkelgrau) bildet zwei helikale Domänen und schmiegt sich an den unteren Rand des „G β -Propellers“ an. Die N-Termini beider Untereinheiten interagieren über eine superspiralisierte sog. „coiled coil“-Struktur. Die einzelnen „Blätter“ sind so nummeriert, daß der erste „WD-repeat“ innerhalb des ersten Blattes liegt. (aus Hamm, 1998)

Interessanterweise scheint die Spezifität der Interaktion zwischen G β - und G γ -Untereinheit nicht nur durch die superspiralisierten N-Termini, sondern auch durch die im Bereich des „G β -Propellers“ interagierenden Aminosäuren bestimmt zu werden (Spring und Neer, 1994). So konnten für die G γ -Untereinheit Aminosäuren im mittleren Teil des Moleküls und für die G β -Untereinheit die „Propellerblätter“ 5 und 6 als wichtig für die Spezifität der Interaktion identifiziert werden (siehe Abb. 2, Lee et al., 1995a, Meister et al., 1995).

1.2.2 $G\beta\gamma$ -regulierte Effektoren

Lange Zeit wurde die $G\beta\gamma$ -Untereinheit lediglich als Membrananker für die heterotrimere Form des G-Proteins bzw. als negativer Regulator der $G\alpha$ -Untereinheit angesehen (Sternweis, 1986). Erste Hinweise, daß auch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit eigenständig Effektoren modulieren kann, ergaben sich durch Beobachtungen, wonach ein K^+ -Kanal (I_{KACH}) in atrialen Myocyten durch muskarinerge Agonisten aktiviert werden konnte (Breitwieser und Szabo, 1985, Kurachi et al., 1986) Der überzeugendste Beleg, daß es sich hierbei tatsächlich um die $G\beta\gamma$ -Untereinheit als stimulierendes Agens handelte, wurde von Logothetis und Mitarbeitern (1987) erbracht, indem sie die Rezeptor-vermittelte Stimulation des Kanals durch gereinigte, rekonstituierte $G\beta\gamma$ -Dimere reproduzierten. Seitdem ist die Zahl der Effektoren, die durch direkte Interaktion mit $G\beta\gamma$ -Dimeren moduliert werden, stetig angewachsen (Tab. 3).

Tab. 3: $G\beta\gamma$ -regulierte Effektoren

Effektor ¹	Modulation	Referenz
Adenylylcyclase ^{2,3}	↓, ↑	Sunahara et al., 1996
Phosphatidylinositol-3-Kinase	↑	Dekker und Segal, 2000
Phospholipase C-β	↑	Exton, 1997
Phospholipase A ₂	↑	Jelsema und Axelrod, 1987
β-adrenerge Rezeptorkinasen ⁴	↑	Pitcher et al., 1998
spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle	↓	Hofmann et al., 1997
K ⁺ -Kanäle (GIRKs) ⁵	↑	Jan und Jan, 1997
Na ⁺ -Kanäle	↑	Jan und Jan, 1997
Raf-1-Protein-Kinase	↑	Pumiglia et al., 1995
Ras-Austauschfaktor (p140 ^{Ras-GRF})	↑	Mattingly und Macara, 1996
Bruton-Tyrosinkinase (Btk)	↑	Tsukada et al., 1995
Tsk-Tyrosinkinase	↑	Langhans-Rajasekaran et al., 1995

↑ = Stimulation; ↓ = Hemmung

¹ Es wurden nur Effektoren berücksichtigt, die direkt mit $G\beta\gamma$ interagieren sollen.

² $G\beta\gamma$ inhibiert die $G\alpha_s$ -aktivierten Adenylylcyclase-Isoformen I, V und VI.

³ $G\beta\gamma$ stimuliert die $G\alpha_s$ -aktivierten Adenylylcyclase-Isoformen II und IV.

⁴ Zu den β-adrenergen Rezeptorkinasen gehören die G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) 2 und 3.

⁵ GIRK: (engl.) *G protein-gated inwardly rectifying K⁺-channel*; G-Protein-regulierter einwärts gerichteter K⁺-Kanal

1.2.2.1 Adenylylcyclasen

Die Familie der Adenylylcyclasen (AC) umfaßt derzeit 10 Mitglieder, von denen alle durch $G\alpha_s$ -Untereinheiten stimuliert und einige durch $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ und $G\alpha_z$ inhibiert werden können (Sunahara et al., 1996). Mindestens 8 werden zusätzlich durch $G\beta\gamma$, Ca^{2+} , Ca^{2+} -Calmodulin bzw. Phosphorylierungsreaktionen reguliert. Die Stimulation der AC II und IV durch $G\beta\gamma$ ist nur bei gleichzeitiger Aktivierung mit $G\alpha_s$ zu beobachten. Analog wirkt $G\beta\gamma$ nur dann inhibierend auf die AC I, V und VI, wenn die Enzyme mit $G\alpha_s$ oder Forskolin, einem niedermolekularen Adenylylcyclase-Aktivator, aktiviert werden (Taussig und Gilman, 1995). Wie bei der Untersuchung vieler anderer Enzyme ist auch bei der Adenylylcyclase eine Diskrepanz zwischen Ergebnissen aus Zelltransfektions-Untersuchungen und rekonstituierten, gereinigten Komponenten festzustellen. So konnte kotransfiziertes $G\beta_1\gamma_2$ die Forskolin-stimulierte AC V hemmen, während gereinigte, rekonstituierte $G\beta\gamma$ -Komplexe aktivierend wirkten (Bayewitch et al., 1998b, Posner et al., 1999). Gerade in Ganz-Zell-Untersuchungen könnten parallele Signalwege, wie z.B. die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als Folge einer $G\beta\gamma$ -Aktivierung von PLC- β -Isoformen, zur Inhibition der AC V führen, wie es schon von Cooper und Brooker (1993) beschrieben worden war.

1.2.2.2 Phospholipasen C- β

Diese Enzymklasse katalysiert die Spaltung von PI-4,5-P₂ in IP₃ und DAG (Exton, 1997). Durch DAG werden nachfolgend Proteinkinase C-Isoformen oder auch Ca^{2+} -permeable Kanäle aktiviert, während IP₃ eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch dessen Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt (Bootman und Berridge, 1995, Hofmann et al., 1999). Die Phospholipase C- β -Familie unterliegt einer dualen Regulation durch $G\alpha_q$ - bzw. $G\beta\gamma$ -Untereinheiten (Abb. 3). Die PTX-Sensitivität der $G\beta\gamma$ -vermittelten Stimulation deutet darauf hin, daß die $G\beta\gamma$ -Komplexe aus G_i -Proteinen freigesetzt werden. Prinzipiell werden alle vier Isoformen, PLC- β_{1-4} , durch $G\alpha_q$ -Untereinheiten stimuliert, obwohl sich die Ergebnisse aus Transfektions-Studien und Untersuchungen an gereinigten Proteinen teilweise widersprechen. Die Sensitivität gegenüber $G\beta\gamma$ -Dimeren unterscheidet sich deutlicher. Während die PLC- β_2 und PLC- β_3 stark durch $G\beta\gamma$ aktiviert werden können, ist die PLC- β_1 nur wenig sensitiv (Camps et al., 1992, Smrcka und Sternweis, 1993). Für die PLC- β_4 -Isoform konnte bisher noch keine Aktivierung durch $G\beta\gamma$ nachgewiesen werden (Jiang et al., 1994).

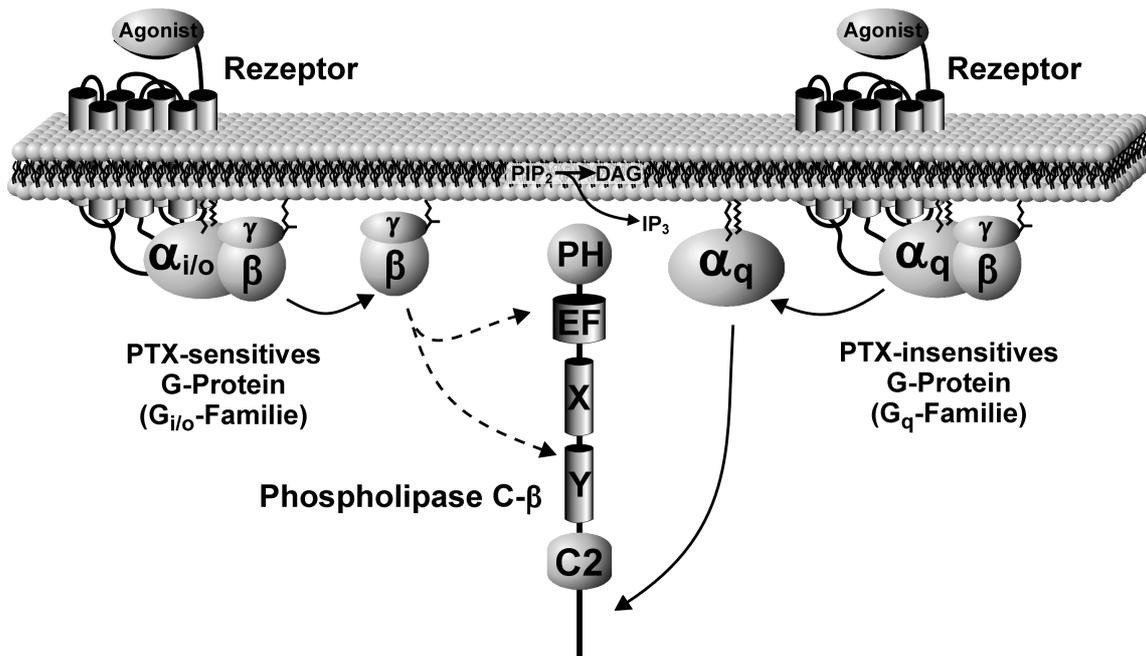


Abb. 3: Duale Regulation der Phospholipase C-β durch Gα- und Gβγ-Untereinheiten

Die Phospholipase C-β wird dual durch Gα- und Gβγ-Untereinheiten reguliert. Die PTX-insensitive Stimulation wird dabei durch Gα_q, die PTX-sensitive Stimulation durch vermutlich aus G_{i/o} freigesetzte Gβγ-Untereinheiten vermittelt. Die Bindungsstellen der G-Protein-Untereinheiten an der Phospholipase C-β liegen C-terminal (Gα_q) bzw. N-terminal und am Beginn der sog. Y-Region (Gβγ).

Basierend auf Sequenzhomologie-Untersuchungen können verschiedene Strukturelemente für die PLC-β-Familie postuliert werden. Während die N-terminale PH-Domäne nur bei den PLC-β-Isoformen gefunden wird, sind das „EF-hand-motif“, die sog. X- und Y-Region und die C-terminale C2-Domäne in der PLC-Superfamilie hoch konserviert. Die genauen Funktionen der Strukturmodule sind jedoch noch nicht ausreichend verstanden. Die Sensitivität gegenüber Gα_q bzw. Gβγ kann bestimmten Proteinabschnitten der PLC-β zugeordnet werden. So sind es vor allem C-terminale Bereiche, die für die Bindung und Aktivierung durch Gα_q sorgen (Kuang et al., 1996, Paulssen et al., 1996). Die Stimulationsfähigkeit durch Gβγ-Dimere bleibt auch dann erhalten, wenn diese Bereiche großzügig deletiert werden (Illenberger et al., 1997). Für die Bindung von Gβγ sind vermutlich sowohl größere N-terminale Bereiche als auch Regionen am Beginn der sog. Y-Domäne verantwortlich (Sankaran et al., 1998, Wang et al., 1999, Barr et al., 2000).

1.3 PI-3-Kinasen

1.3.1 Aufbau und Funktion von PI-3-Kinasen

Phosphatidylinositol-3-Kinasen sind eine Subfamilie der Lipidkinasen, die die Übertragung eines Phosphatrestes auf die 3'-Position des Inositolrings von Phosphoinositiden katalysieren (Abb. 4). Sie spielen eine wichtige Rolle bei zahlreichen zellulären Vorgängen wie z.B. Zellwachstums- und Differenzierungsvorgängen, der Steuerung von cytoskelettalen Veränderungen oder der Regulation intrazellulärer Transportvorgänge (Leevers et al., 1999, Rameh und Cantley, 1999, Dekker und Segal, 2000).

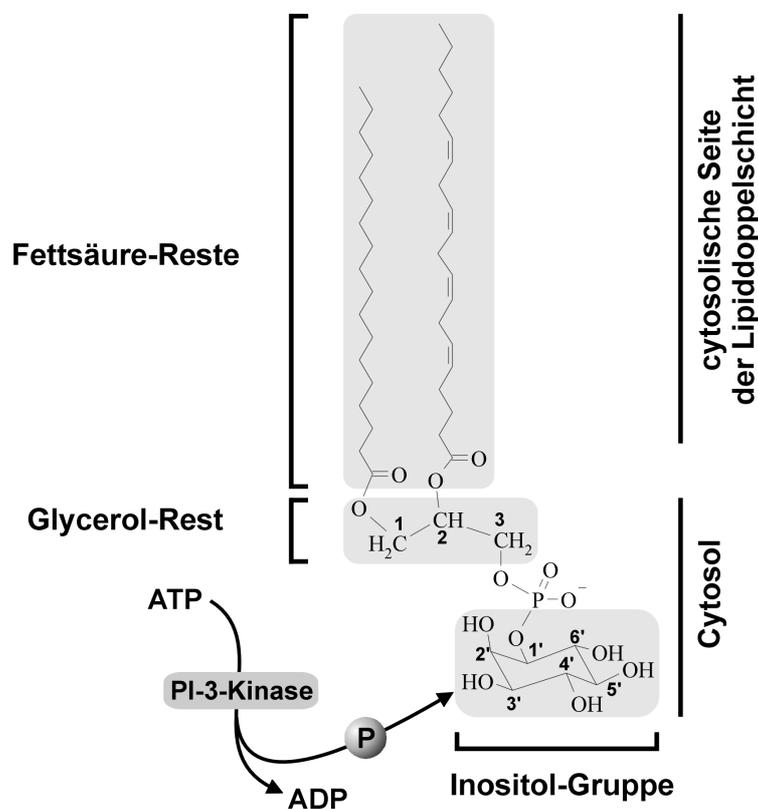


Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der PI-3-Kinase-katalysierten Phosphorylierung von Phosphoinositiden

Phosphoinositide bestehen aus einer Glyceroleinheit, die an allen Hydroxylgruppen substituiert ist. Position 1 und 2 sind mit Fettsäureresten (hier exemplarisch: Stearinsäure und Arachidonsäure), Position 3 mit Phosphorsäure verestert. Die polare Inositol-Kopfgruppe ist über den Phosphorsäureester an Position 3 verknüpft. Die Enzymklasse der PI-3-Kinasen katalysiert die Übertragung des terminalen Phosphatrestes von Adenosin-triphosphat (ATP) auf die 3'-Position des Inositolrings. Je nach Substrat kann dabei Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI-3-P), Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PI-3,4-P₂) oder Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI-3,4,5-P₃) gebildet werden.

Aufgrund ihrer *in vitro*-Spezifität für bestimmte Phosphoinositid-Substrate können die PI-3-Kinasen in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Tab. 4).

Tab. 4: PI-3-Kinase-Klassen und Strukturmerkmale ihrer katalytischen Untereinheiten

Klasse	strukturelle Merkmale der katalytischen Untereinheit	Untereinheiten		Lipid-Substrate	
		katalytisch	nicht-katalytisch	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
IA		p110α	p50α	PI	PI-4,5-P ₂
		p110β	p55α,γ		
IB		p110δ	p85α,β	PI-4-P	PI-4,5-P ₂
		p110γ	p101	PI-4,5-P ₂	
II		PI3K-IIα PI3K-IIβ PI3K-IIγ PI3K68D Cpk	?	PI PI-4-P	?
III		Vps34p	p150	PI	PI

● p85-Bindung ◆ Ras-Bindung ■ PIK ● Kinase-Domäne ■ C2
 nach Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999, modifiziert

Die Mitglieder der Rezeptor-regulierten Klasse I sind heterodimere Enzyme, die aus einer 110-120 kDa schweren katalytischen (p110) und einer 50-101 kDa schweren nicht-katalytischen Untereinheit (p50, p55, p85, p101) aufgebaut sind. Die katalytischen Untereinheiten können *in vitro* Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI-4-P) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI-4,5-P₂) phosphorylieren, während *in vivo* eine Präferenz für PI-4,5-P₂ besteht (Hawkins et al., 1992). Die am höchsten konservierte Region bei allen PI-3-Kinase-Klassen ist die C-terminal gelegene Kinase-Domäne (siehe Tab. 4). Sie weist Strukturmerkmale auf, die ebenfalls in den meisten bekannten Proteinkinasen zu finden sind (Zvelebil et al., 1996). Dazu gehören z.B. auch hochkonservierte Aminosäuren, die für die Koordination des ATP-Moleküls verantwortlich sind (Taylor et al., 1993). Ein für alle Lipidkinasen typisches Strukturmotiv ist die sog. PIK-Domäne, die zum ersten Mal in PI-4-Kinasen gefunden wurde (Flanagan et al., 1993).

Allerdings konnte bis jetzt keine detaillierte Funktion für diese Region bestimmt werden, außer, daß bei Deletion dieser Domäne die Lipidkinase-Aktivität verloren geht (Molendijk und Irvine, 1998). Ein weiteres, bei allen PI-3-Kinasen konserviertes Strukturmotiv ist die in der N-terminalen Hälfte gelegene C2-Domäne, die wahrscheinlich für eine Bindungsfähigkeit der Enzyme an Phospholipid-Membranen sorgt (MacDougall et al., 1995, Misawa et al., 1998). Wie anhand der erst kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur der katalytischen p110 γ -Untereinheit gezeigt werden konnte, ordnen sich die beschriebenen Teilstrukturen um eine als Rückgrat dienende helikale Domäne an (Walker et al., 1999). Die Kinase-Domäne ist dabei im Zentrum des Enzyms lokalisiert. Interessanterweise finden sich zwei Bindungsstellen für Metallionen in unmittelbarer räumlicher Nähe. Vermutlich ist dies notwendig, um die hohe negative Ladung des ATP-Moleküls und des ebenfalls negativ geladenen PI-4,5-P₂ zu kompensieren. Alle Klasse I Mitglieder sollen monomere GTPasen vom Ras-Typ über eine konservierte Ras-Bindungsdomäne binden können, wobei die physiologische Bedeutung dieser Interaktion im Moment noch unklar ist (Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999, Rubio et al., 1999).

Drei der vier Mitglieder der Klasse I PI-3-Kinasen assoziieren konstitutiv mit einer 50-85 kDa schweren Adaptor-Untereinheit, von denen p85 der Prototyp ist. Die Interaktion erfolgt dabei über die sog. p85-Bindungsdomäne, die auf den katalytischen Untereinheiten der PI-3-Kinase α , β und δ zu finden ist. Die drei Formen werden aufgrund dieses strukturellen Merkmals zur Klasse I_A zusammengefaßt. Die katalytische Untereinheit der PI-3-Kinase γ , p110 γ , assoziiert statt dessen mit einem 101 kDa schweren regulatorischen Protein, das als p101 bezeichnet wird. Sie bildet – bis jetzt als einziges Mitglied – die Klasse I_B der PI-3-Kinasen.

Klasse II PI-3-Kinasen sind *in vitro* auf die Phosphorylierung von PI und PI-4-P beschränkt. Es handelt sich um 170-210 kDa schwere Proteine, die eine für diese Klasse charakteristische, zusätzliche C-terminale C2-Domäne besitzen. Eine nicht-katalytische Untereinheit als regulatorischer Bindungspartner ist bisher nicht bekannt. Dennoch gibt es Hinweise, daß auch diese PI-3-Kinase-Klasse in verschiedene Signalwege involviert ist. So konnte gezeigt werden, daß die Stimulation von Adipocyten durch Insulin zu einer erhöhten Aktivität der PI-3-Kinase II α führt (Brown et al., 1999). Darüber hinaus können auch Chemokine wie das MCP-1 (*monocyte chemotactic peptide 1*) in THP-1 Zellen neben p85-assoziierten Klasse I PI-3-Kinasen auch zu einer Stimulation der Klasse II PI-3-Kinase II α führen (Turner et al., 1998).

Der Archetyp der Klasse III PI-3-Kinasen ist das *Saccharomyces cerevisiae*-Genprodukt Vps34p (Schu et al., 1993). Orthologe Proteine wurden auch in *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, Algen, einigen Pflanzen und auch Säugern gefunden (Wurmser et al., 1999). Alle Vertreter sind auf PI als Substrat beschränkt,

so daß PI-3-P das einzige von dieser Enzymklasse gebildete Phosphoinositid darstellt. Diese Klasse von PI-3-Kinasen spielt bei allen Spezies eine Rolle bei Vesikel-vermittelten Transportprozessen (De Camilli et al., 1996). Die Hefeform Vps34p assoziiert mit Vps15p, von dem auch ein Säugerorthologes existiert. Beide besitzen eine intrinsische Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität und sind N-terminal myristoyliert. Diese Lipidmodifikation von Vps15p spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Assoziation von Vps34p mit Golgi-Membranen. Eine analoge Funktion für das säugerorthologe Protein wird angenommen (Stack et al., 1995).

1.3.2 Regulation der Klasse I PI-3-Kinasen durch Zelloberflächen-Rezeptoren

Die intrazelluläre Bildung von PI-3,4,5-P₃ wurde Ende der 80er Jahre zum ersten Mal von Traynor-Kaplan und Mitarbeitern (1988) beschrieben. Sie beobachteten die Produktion dieses bis dahin noch nicht als „*second messenger*“ bekannten Phosphoinositids als Folge der Aktivierung von Neutrophilen mit dem chemotaktischen Peptid fMLP (*N-formyl-Met-Leu-Phe*), dessen Rezeptor G-Protein-gekoppelt ist. Etwa zur gleichen Zeit gab es Berichte, wonach es auch in PDGF (*platelet-derived-growth-factor*)-stimulierten Fibroblasten, Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK)- vermittelt, zur Bildung des identischen Lipidproduktes kam (Auger et al., 1989). Daß hier offensichtlich durch zwei grundsätzlich verschiedene Signalwege der gleiche „*second messenger*“ gebildet wird, konnte erst später durch die Identifizierung verschiedener PI-3-Kinase-Isoformen erklärt werden. So existieren neben Isoformen, die durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert werden können, auch Enzyme, die an heptahelikale Rezeptoren koppeln (Abb. 5).

1.3.2.1 Klasse I_A PI-3-Kinasen

Zur Gruppe der RTK-sensitiven PI-3-Kinasen zählen die PI-3-Kinase-Isoformen α , β und δ . Sie sind mit einer Adaptor-Untereinheit assoziiert, die zwischen 50 und 85 kDa schwer sein kann und selbst keine enzymatische Aktivität aufweist. Die verschiedenen Isoformen dieser nicht-katalytischen Untereinheiten (siehe Tab. 4) sind variabel aus mehreren, zu anderen Proteinen homologen Regionen aufgebaut, darunter zwei sog. SH2 (*src homology 2*)-, eine SH3 (*src homology 3*)- und eine BH-Domäne (*breakpoint cluster region homology*). Diese Domänen erlauben es der p85-Untereinheit, mit bestimmten Strukturen anderer Proteine zu interagieren und auf diese Weise als Adaptormolekül für die katalytische p110-Untereinheit

zu dienen. SH2-Domänen sind z.B. in der Lage, spezifisch mit Proteinen zu interagieren, die über ein Y(P)XXM Motiv verfügen (Nolte et al., 1996, Breeze et al., 1996). Dabei steht Y(P) für einen phosphorylierten Tyrosin-Rest und X für eine beliebige Aminosäure. Genau diese Wechselwirkung ist es, die die Sensitivität der p85-assoziierten Klasse I_A PI-3-Kinasen gegenüber Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bedingt.

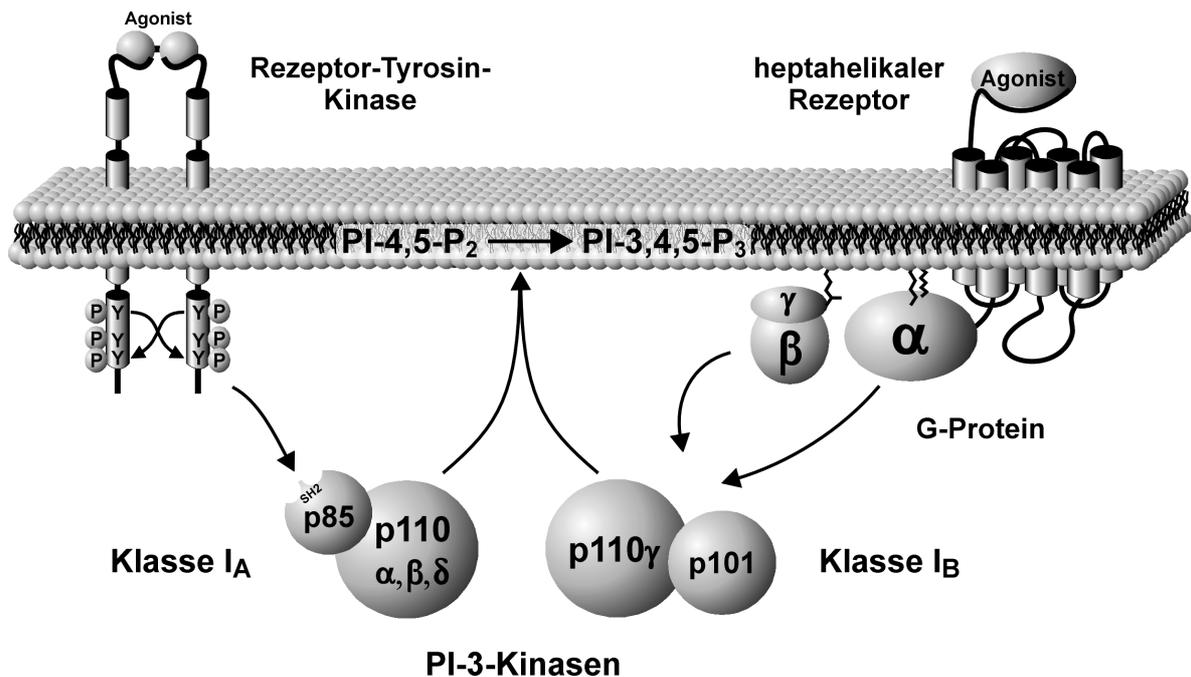


Abb. 5: Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Klasse I PI-3-Kinasen

Die Aktivierung der Klasse I PI-3-Kinasen durch extrazelluläre Stimuli wird durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Tyrosin-Kinase assoziierte Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Die Sensitivität gegenüber Tyrosin-Kinasen wird durch SH2-Domänen der regulatorischen p85-Untereinheit der PI-3-Kinase α , β und δ bedingt. Die PI-3-Kinase γ wird von heptahelikalen Rezeptoren über $G\beta\gamma$ - und wahrscheinlich auch über $G\alpha$ -Untereinheiten aktiviert. Als Folge der Aktivierung wird in beiden Fällen durch 3'-Phosphorylierung von PI-4,5-P₂ der „second messenger“ PI-3,4,5-P₃ gebildet.

Ein RTK-Ligand, wie z.B. ein Wachstumsfaktor, kann durch seine C2-Symmetrie zwei Rezeptormonomere überbrücken und so in räumliche Nähe zueinander bringen (siehe Abb. 5). Dadurch kommt es zur Transphosphorylierung von spezifischen Tyr-Resten in intrazellulären Domänen des Rezeptordimers. Diese Tyr-phosphorylierten Bereiche dienen nun als Bindungsstelle für die SH2-Domänen der p85-Untereinheit. Zur Gesamtaktivierung des Enzyms tragen wahrscheinlich zwei verschiedene Mechanismen bei. Zum einen bewirkt die Bindung der p85-Untereinheit an das Y(P)XXM-Motiv des Rezeptors eine Konformationsänderung, welche die vorherige Hemmung der katalytischen Untereinheit durch p85 aufhebt (Yu et al., 1998a,b). Zum anderen wird die katalytische Untereinheit durch

die Assoziation des Holoenzym mit dem aktivierten Rezeptor in die Nähe der Membran und somit ihrer Substrate gebracht (Klippel et al., 1996).

Klasse I_A PI-3-Kinasen können darüber hinaus auch durch nicht unmittelbar Rezeptor-abhängige Mechanismen stimuliert werden. So führt die Interaktion der BH-Domäne der p85-Untereinheit mit kleinen GTPasen der Rho-Familie, z.B. Rac oder Cdc42, zur Stimulation der Enzymaktivität (Zheng et al., 1994, Tolia et al., 1995). Ebenso kann Ras die PI-3-Kinase α durch direkte Interaktion stimulieren, wobei die Bindung von GTP und die Farnesylierung von Ras essentiell für die Aktivierung sind (Rodriguez-Viciano et al., 1994).

1.3.2.2 Klasse I_B PI-3-Kinasen

Das einzige bis jetzt identifizierte Mitglied der Klasse I_B PI-3-Kinasen ist die PI-3-Kinase γ . Obwohl schon seit 1988 bekannt war, daß die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zur Bildung von 3'-phosphorylierten Phosphoinositiden führt (Traynor-Kaplan et al., 1988), dauerte es bis 1995, bis die Struktur der katalytischen Untereinheit dieser G-Protein-regulierten PI-3-Kinase aufgeklärt werden konnte (Stoyanov et al., 1995). Im Vergleich zu den bis dahin bekannten p110 α und p110 β weist die p110 γ -Isoform keine Bindungsregion für eine p85-Untereinheit auf. Sie assoziiert statt dessen mit einem Regulatorprotein, das aufgrund seiner elektrophoretischen Mobilität als p101 bezeichnet wird (Stephens et al., 1997). Interessanterweise zeigt diese nicht-katalytische p101-Untereinheit keinerlei Homologie zu anderen bekannten Proteinen (Krugmann et al., 1999).

Die Aktivierung der PI-3-Kinase γ erfolgt durch eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli, die an heptahelikale Rezeptoren binden. Neben dem bereits erwähnten *fMLP* sind dies vor allem Liganden G_q- und G_i-koppelnder Rezeptoren wie z.B. muskarinerge Rezeptoren vom M₁- und M₂-Typ (Murga et al., 1998). Bei der G_i-vermittelten Aktivierung sind es hauptsächlich die freigesetzten G $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die für die Stimulation des Enzyms und damit für die Bildung von PI-3,4,5-P₃ sorgen, da die ebenfalls beschriebene Aktivierung durch G α_i im Vergleich zu G $\beta\gamma$ eher gering ausfällt (Stoyanov et al., 1995). Wie erst kürzlich berichtet wurde, spielt die G $\beta\gamma$ -induzierte PI-3-Kinase γ -Stimulation auch eine Rolle bei der Bluthochdruck-bedingten Hypertrophie des Herzens. Die zur Stimulation benötigten G $\beta\gamma$ -Dimere werden dabei vermutlich aus G_q-Proteinen freigesetzt (Prasad et al., 2000).

Der molekulare Mechanismus der G $\beta\gamma$ -vermittelten Aktivierung der PI-3-Kinase γ wird kontrovers diskutiert. Während Stephens und Mitarbeiter (1997, Krugmann et al., 1999) der p101-Untereinheit eine Adaptorfunktion für G $\beta\gamma$ zuschrieben, fanden andere Arbeitsgruppen eine direkte Aktivierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit durch G $\beta\gamma$ -Komplexe

(Stoyanov et al., 1995, Tang und Downes, 1997, Leopoldt et al., 1998). Durch Deletionsstudien konnte gezeigt werden, daß G β γ über mindestens zwei Bereiche an die katalytische Untereinheit bindet, wobei der eine N-terminal und der andere C-terminal gelegen ist (Leopoldt et al., 1998).

1.3.3 *Proteinkinase-Aktivität der Klasse I PI-3-Kinasen*

Neben ihrer Lipidkinase-Aktivität besitzen die Klasse I PI-3-Kinasen auch eine intrinsische Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität (Hunter, 1995). Bei der PI-3-Kinase α führt dies zur Phosphorylierung der p85-Untereinheit an Ser⁶⁰⁸ (Dhand et al., 1994a,b). Die Folge ist eine Blockierung der p110 α -Lipidkinase-Aktivierung durch RTK. Die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase δ bewirkt ebenfalls eine autoregulatorische Hemmung der Stimulierbarkeit ihrer Lipidkinase-Aktivität. Hier kommt es allerdings zur Autophosphorylierung der katalytischen p110 δ -Untereinheit an dem C-terminal gelegenen Ser¹⁰³⁹ (Vanhaesebroeck et al., 1999). Der Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ scheint ein anderer Regulationsmechanismus zugrunde zu liegen. So wird zwar ebenfalls die Autophosphorylierung an einer bislang noch nicht identifizierten Aminosäure der katalytischen p110 γ -Untereinheit beschrieben, die jedoch nicht zur Beeinflussung der Lipidkinase-Aktivität führt (Stoyanova et al., 1997).

Daneben können PI-3-Kinasen, zumindest *in vitro*, auch zelluläre Substrate phosphorylieren und so Signale in die Zelle weiterleiten. Sowohl nach Stimulation von Adipocyten mit Insulin als auch nach Behandlung von lymphoiden Zellen mit Interferon- α konnte eine PI-3-Kinase α -abhängige Phosphorylierung von IRS-1 (*insulin-receptor-substrate 1*) beobachtet werden (Lam et al., 1994, Tanti et al., 1994, Uddin et al., 1997). Auch die PI-3-Kinase γ kann durch ihre Proteinkinase-Aktivität bestimmte zelluläre Signalwege induzieren. Während die „wild-typ“-p110 γ -Untereinheit nach Transfektion in COS7-Zellen sowohl die Proteinkinase B (PKB) als auch ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) stimuliert, zeigt eine Lipidkinase-defiziente Mutante nur noch die Aktivierung des MAPK-Signalwegs (Bondeva et al., 1998). Zum Verlust der Lipidkinase-Aktivität führt dabei der Austausch einer putativen, C-terminal der ATP-Bindungsstelle gelegenen, Lipidbindungsdomäne gegen eine homologe Region von FRAP (*FKBP-rapamycin associated protein*), einem Mitglied der TOR (*target of rapamycin*)-Familie. Diese Proteinfamilie wird aufgrund ihrer Homologie zu der Kinase-Domäne von PI-3-Kinasen (siehe Tab. 4) mitunter auch als 4. Klasse der PI-3-Kinasen bezeichnet, obwohl sie keine Lipidkinase-Aktivität besitzt. Neben FRAP und TOR gehören hierzu auch noch eine DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) sowie ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*), ein mutiertes Genprodukt, dessen Expression mit dem Auftreten der Krankheit „Ataxia teleangiectasia“ in Zusammenhang

gebracht wird (Zakian, 1995). Alles deutet darauf hin, daß diese Enzyme nur über ihre Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität signalisieren können (Hartley et al., 1995).

1.3.4 Zelluläre Funktionen der Lipidprodukte von Klasse I PI-3-Kinasen

Klasse I PI-3-Kinasen sind in ruhenden Zellen nahezu inaktiv. Nach Stimulation von bestimmten Rezeptoren mit den entsprechenden Stimuli (siehe oben) kommt es aber zur schnellen Konzentrationserhöhung von PI-3,4,5-P₃ und – mit zeitlicher Verzögerung – auch von PI-3,4-P₂ (Rameh und Cantley, 1999). Das zweifach phosphorylierte PI-3,4-P₂ wird wahrscheinlich erst sekundär durch den Abbau von PI-3,4,5-P₃ mittels 5'-Inositol-Phosphatasen gebildet (Woscholski und Parker, 1997). Beide Phosphoinositide können nun zahlreiche Effektoren modulieren und so das initiale Signal der PI-3-Kinase-aktivierenden Zelloberflächenrezeptoren in die Zelle weitergeben (Abb. 6). Die dadurch ausgelösten zellulären Antworten sind vielfältig und beinhalten u.a. eine Hemmung der Apoptose und Förderung des Zellwachstums genauso wie die Steuerung der Zell-Migration und Vesikel-Bildung. Obwohl alle vier Klasse I PI-3-Kinasen zur Bildung von PI-3,4,5-P₃ in der Lage sind, übernehmen doch einzelne Isoformen spezifische Funktionen. So führt die Gen-Inaktivierung der p110 α - bzw. p110 β -Untereinheit in der Maus zur embryonalen Letalität. Die p110 α ^{-/-}-Tiere zeigen dabei starke proliferative Defekte, während apoptotische Vorgänge unbeeinflusst bleiben (Bi et al., 1999). Bei Ausschaltung des p110 γ -Gens sind die Mäuse lebensfähig, weisen aber Defekte in typischen Entzündungs-abhängigen Prozessen, wie der T-Zell-Bildung und -Aktivierung, der Chemotaxis von Neutrophilen und der O₂⁻-Produktion auf (Sakaki et al., 2000, Li et al., 2000, Hirsch et al., 2000).

Das am besten untersuchte Effektorsystem von Phosphoinositiden ist die Ser/Thr-Kinase Akt/PKB (Downward et al., 1998). Die beiden Begriffe Akt und PKB sind synonym, wobei die Bezeichnung „Akt“ aus der Homologie zu dem viralen Onkoprotein v-Akt resultiert und der Name „Proteinkinase B“ die Ähnlichkeit zur Proteinkinase A und C-Familie andeuten soll. PKB besitzt eine N-terminale PH-Domäne, die eine Bindungsspezifität für Phosphoinositide in der Reihenfolge PI-3,4-P₂ > PI-3,4,5-P₃ >> PI-4,5-P₂ besitzt (Franke et al., 1997b, Frech et al., 1997). Die Folge einer PI-3,4-P₂-Konzentrationserhöhung ist die Translokation von PKB an die Cytoplasmamembran, wo sie durch die Phosphorylierung zellulärer Substrate die Signale weiterleitet. Zur vollen Aktivierung muß sie allerdings noch an zwei spezifischen Aminosäureresten, Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸, phosphoryliert werden, wobei die Thr-Phosphorylierung durch PDK1 erfolgt. Der Name PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) resultiert daraus, daß auch dieser Schritt der PKB-Aktivierung von PI-3,4,5-P₃ abhängig ist (Stokoe et al., 1997, Stephens et al., 1998). Wodurch die Phosphorylierung des

Ser-Restes erfolgt, ist derzeit noch nicht geklärt. Erste Befunde deuten auf ILK (*intergrin-linked kinase*) bzw. einen Komplex aus PDK1 mit PRK2 (*PKC related kinase 2*) hin.

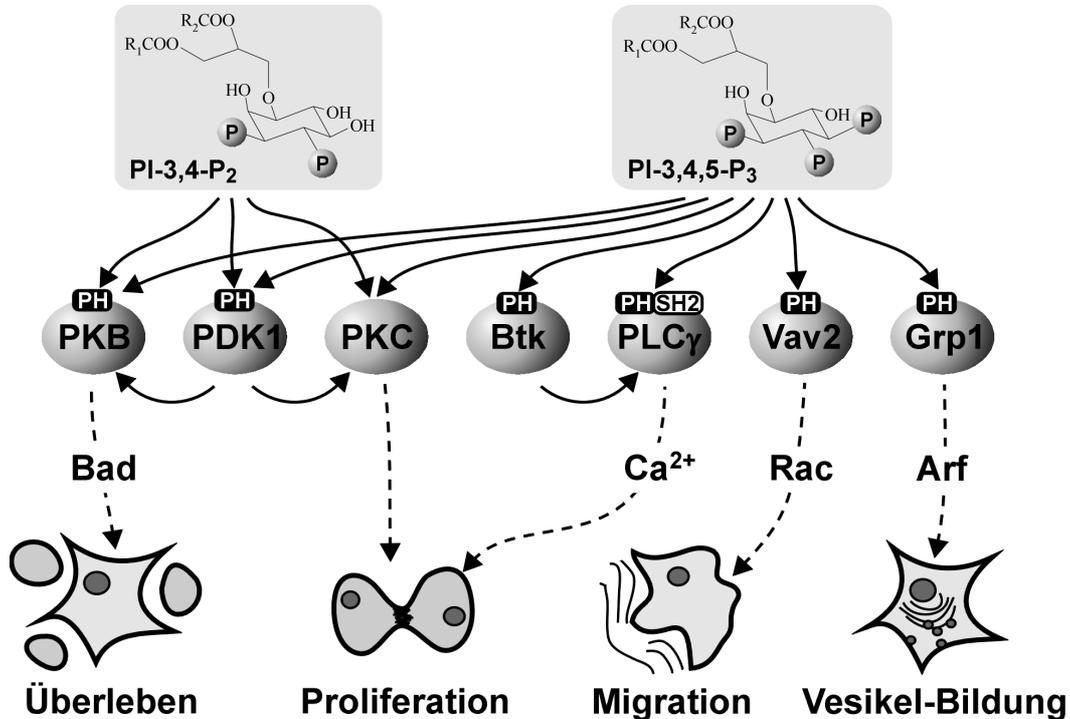


Abb. 6: Die Lipidprodukte der Klasse I PI-3-Kinasen und ihre zellulären Funktionen

PI-3,4-P₂ und PI-3,4,5-P₃ können an zahlreiche Effektoren binden und diese modulieren (graue Ovale). Die Bindung erfolgt dabei häufig über spezifische Phosphoinositid-Bindungsdomänen (PH, SH2). Die modulierten Effektoren können dann ihrerseits entweder direkt oder über weitere Proteine bestimmte Zellantworten auslösen. Im einzelnen sind: PKB (*Proteinkinase B*), PDK (*phosphoinositide dependent kinase*), PKC (*Proteinkinase C*), Btk (*bruton tyrosine kinase*), PLC (*Phospholipase C*), Vav (Guaninnukleotid-Austauschfaktor; Protoonkogen der Vav-Familie), Grp (*general receptor for phosphoinositides*), Rac (kleine GTPase), Arf (*ADP-ribosylation factor*). (nach Rameh und Cantley, 1999)

Für die Zelle bedeutet eine PKB-Aktivierung, das Signal zu „überleben“. Das geschieht unter anderem durch die Phosphorylierung und Inaktivierung der Kinase Bad (*Bcl-2 antagonist, causing cell death*), die an der Induktion der Apoptose beteiligt ist (Franke und Cantley, 1997a). Aufgrund der erwähnten Homologie von PKB mit den Ser/Thr-Kinasen der AGC-Familie kann PDK1 auch PKC-Isoformen oder p70 S6-Kinase phosphorylieren und dadurch aktivieren, was ein proliferatives Signal für die Zelle darstellt (Chung et al., 1994). Die gleiche Wirkung hat auch die PI-3,4,5-P₃-induzierte Aktivierung von PLC- γ -Isoformen, die entweder direkt oder indirekt über die Stimulation von Btk (*Bruton tyrosine kinase*) erfolgen kann (Bae et al., 1998, Scharenberg, 1998).

Weitere wichtige zelluläre Effekte von PI-3,4,5-P₃ sind die Auslösung von cytoskelettalen Veränderungen und die Steuerung der Vesikel-Bildung. Dabei spielen vor

allem kleine GTPasen, wie Rac und Arf, und deren Guaninnukleotid-Austauschfaktoren Vav bzw. Grp eine große Rolle (siehe Abb. 6). Von Ma und Mitarbeitern (1998) konnte eine Signalsequenz vom fMLP-Rezeptor über PI-3-Kinase γ , Vav2 bis hin zur kleinen GTPase Rac als Auslöser von Cytoskelett-Umlagerungen identifiziert werden.