

2 FRAGESTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus und die Spezifität der Aktivierung der Klasse I PI-3-Kinasen durch G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten näher zu untersuchen.

Die strukturelle Einteilung der Klasse I PI-3-Kinasen in p85-assoziierte und nicht-p85-assoziierte Formen wurde bisher mit der Sensitivität dieser Enzymklasse gegenüber Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bzw. $G\beta\gamma$ gleichgesetzt. Zellbiologische Untersuchungen und Ergebnisse mit nativ gereinigten Enzymen ließen jedoch vermuten, daß auch p85-assoziierte PI-3-Kinasen durch $G\beta\gamma$ aktiviert werden können. Deshalb sollten die vier bekannten Klasse I PI-3-Kinasen in gereinigter Form auf ihre Sensitivität gegenüber $G\beta\gamma$ untersucht werden. Gleichzeitig sollte geklärt werden, inwieweit die jeweiligen nicht-katalytischen Untereinheiten für die Stimulierbarkeit der Enzyme durch $G\beta\gamma$ notwendig sind. Da PI-3-Kinasen in nativem Gewebe nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen, sollte das Baculovirus/*Sf9*-Expressionssystem zur Isolierung ausreichender Mengen rekombinanter Proteine genutzt werden. Der Vorteil gegenüber einer Reinigung aus nativem Gewebe besteht auch darin, daß definierte PI-3-Kinase-Isoformen und Untereinheiten selektiv exprimiert und gereinigt werden können, wodurch eine spezifischere Untersuchung ihrer Funktion möglich sein sollte.

Die Rolle der p101-Untereinheit der PI-3-Kinase γ wird kontrovers diskutiert. Während sie von manchen Arbeitsgruppen als notwendiger Adaptor für die Stimulation der PI-3-Kinase γ durch $G\beta\gamma$ -Komplexe beschrieben wurde, hatte unsere Arbeitsgruppe eine $G\beta\gamma$ -Sensitivität der katalytischen p110 γ gefunden. Um diesen scheinbaren Widerspruch aufzuklären, sollte die Wirkung von $G\beta\gamma$ auf die monomere und heterodimere PI-3-Kinase γ untersucht werden. Hierbei sollte vor allem auf den Einfluß unterschiedlicher Lipid-Substrate sowie auf die Bedeutung der Mg^{2+} -Konzentration Wert gelegt werden.

Neben der Lipidkinase-Aktivität besitzen PI-3-Kinasen auch eine Ser/Thr-Proteinkinase-Aktivität. Diese scheint bei der PI-3-Kinase γ auch eine signalgebende Wirkung zu besitzen. Deshalb sollte geklärt werden, ob die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ ebenfalls durch $G\beta\gamma$ aktiviert werden kann. Dies wäre eine Voraussetzung dafür, daß die PI-3-Kinase γ über diese Enzymaktivität Rezeptor-abhängig Signale in die Zelle weiterleiten kann.

Zum besseren Verständnis der Spezifität der Interaktion von G β γ mit den Klasse I PI-3-Kinasen sollte untersucht werden, durch welche G β -Isoformen sie aktiviert werden können. Auch hier sollten zunächst definierte rekombinante G β γ -Isoformen gereinigt werden, um danach deren Fähigkeit zur spezifischen Stimulation der PI-3-Kinasen zu untersuchen. Besonders interessant schien hierbei die Untersuchung von G β ₅, dem jüngsten Mitglied der G β -Familie, da es nur eine relativ geringe Aminosäureidentität zu den anderen G β -Isoformen aufweist.