

7 ZUSAMMENFASSUNG

Klasse I PI-3-Kinasen sind wichtige „second messenger“-bildende Enzyme, die an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Zellwachstums- und Differenzierungsvorgängen, cytoskelettalen Veränderungen oder der Steuerung von vesikulären Transportvorgängen beteiligt sind. Allerdings ist wenig über ihre Regulation und den Mechanismus ihrer Aktivierung bekannt. Insbesondere die G-Protein-Sensitivität dieser Enzymklasse ist nur unzureichend verstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Mechanismus und die Spezifität der G $\beta\gamma$ -vermittelten Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen besser zu verstehen.

Zu diesem Zweck wurden die vier heterodimeren Klasse I PI-3-Kinasen als rekombinant gereinigte Enzyme auf ihre Sensitivität gegenüber G $\beta\gamma$ untersucht. Die PI-3-Kinase β und γ wurden durch nanomolare Konzentration von G $\beta\gamma$ stimuliert. Dabei blieb die Stimulierbarkeit durch G $\beta\gamma$ auch ohne die Assoziation mit der jeweiligen nicht-katalytischen Untereinheit p85 bzw. p101 erhalten. Interessanterweise war die Sensitivität von p110 β und p110 γ mit einem EC₅₀-Wert von ca. 100 nM G $\beta\gamma$ nahezu gleich. Folglich stimmt die strukturelle Einteilung der Klasse I PI-3-Kinasen in p85- und nicht p85-assoziierte Formen nicht, wie bisher angenommen, mit der Sensitivität gegenüber Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und G $\beta\gamma$ überein.

Um die Rolle der p101-Untereinheit bei der G $\beta\gamma$ -vermittelten Aktivierung genauer zu analysieren, wurden G $\beta\gamma$ -Stimulationsversuche mit der monomeren (p110 γ) und der heterodimeren (p101/p110 γ) PI-3-Kinase γ durchgeführt. Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener Substrate auf die Stimulierbarkeit der Enzyme untersucht. Dabei zeigte sich, daß die p101-Untereinheit die Substratspezifität der G $\beta\gamma$ -stimulierten PI-3-Kinase γ beeinflusst. Einerseits wurde durch die p101 die G $\beta\gamma$ -Stimulation der PI-Phosphorylierung gehemmt, andererseits wurde die Sensitivität der p110 γ für G $\beta\gamma$ in Anwesenheit von PI-4,5-P₂ stark erhöht. So war für PI-4,5-P₂ als Substrat der EC₅₀-Wert für die G $\beta\gamma$ -Stimulation des heterodimeren Enzyms im Vergleich zur katalytischen p110 γ -Untereinheit um Faktor 20 zu kleineren Konzentrationen verschoben. Dieser Mechanismus könnte teilweise eine Erklärung dafür sein, daß es nach Stimulation G $\beta\gamma$ -sensitiver PI-3-Kinasen *in vivo* zur selektiven Phosphorylierung von PI-4,5-P₂ und damit zur Bildung von PI-3,4,5-P₃ kommt, obwohl auch PI und PI-4-P *in vitro*-Substrate für Klasse I PI-3-Kinasen sind.

Die Untersuchung der Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ ergab, daß es nur zu einer Autophosphorylierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit, nicht aber der p101-Untereinheit kommt. Auch diese Enzymqualität zeigte eine Sensitivität gegenüber G $\beta\gamma$, wobei die Assoziation der p110 γ mit der p101 zu einer verstärkten Stimulierbarkeit der

Proteinkinase-Aktivität führte. Allerdings unterschieden sich die jeweils benötigten G $\beta\gamma$ -Konzentration zur halb-maximalen Stimulation kaum und lagen im einem Bereich, der auch für die Stimulation der PI-4,5-P₂-Phosphorylierung gefunden wurde. Dies spricht dafür, daß die Lipid- und Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ parallel ablaufen können.

Um die Spezifität der Interaktion von G $\beta\gamma$ mit PI-3-Kinasen zu analysieren, wurden G $\beta\gamma$ -Komplexe, bestehend aus definierten G β - und G γ -Untereinheiten, mit Hilfe des Baculovirus/*Sf9*-Expressionssystems gereinigt und auf ihre Fähigkeit zur Stimulation der PI-3-Kinase β und γ untersucht. Dabei zeigte sich, daß sowohl die G β - als auch die G γ -Untereinheit die Interaktion mit den PI-3-Kinasen beeinflusst. Während G $\beta_1\gamma_2$, G $\beta_2\gamma_2$ und G $\beta_3\gamma_2$ mit fast identischer Potenz (10 nM) und Effizienz die PI-3-Kinase γ stimulierten, war der EC₅₀-Wert (500 nM) für Transduzin- $\beta\gamma$ (T_D $\beta\gamma$), das hauptsächlich aus G $\beta_1\gamma_1$ besteht, um den Faktor 50 zu höheren Konzentrationen verschoben. Interessanterweise zeigte G $\beta_5\gamma_2$ keine stimulatorische Aktivität an den getesteten PI-3-Kinase-Isoformen. Dies umfaßte sowohl die Lipid- und Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ als auch die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase β , mit und ohne Kostimulation durch ein Tyr-phosphoryliertes p85-Bindungspeptid. Der Grund für die fehlende Stimulierbarkeit durch G $\beta_5\gamma_2$ war die fehlende Interaktionsfähigkeit zwischen G $\beta_5\gamma_2$ und der PI-3-Kinase β bzw γ . Hieraus kann geschlossen werden, daß Klasse I PI-3-Kinasen nicht durch G β_5 reguliert werden. Dessen ungeachtet war G $\beta_5\gamma_2$ in der Lage, die Pertussistoxin-vermittelte ADP-Ribosylierung von G α_{i1} zu unterstützen und darüber hinaus die Aktivität der Phospholipase C- β_2 zu stimulieren. Dies belegte, daß es sich bei den eingesetzten G $\beta_5\gamma_2$ -Komplexen um funktionell aktive Proteine handelte, die sowohl mit G α als auch mit Effektoren interagieren können.

Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, daß die Spezifität G-Protein-abhängiger PI-3-Kinase-Signale auf verschiedenen Ebenen determiniert ist. Auf Rezeptorebene, indem nur bestimmte PI-3-Kinase-Isoformen aktiviert werden, auf G-Protein-Ebene, da PI-3-Kinasen nur von bestimmten G $\beta\gamma$ -Untereinheiten stimuliert werden können, und auf der PI-3-Kinase-Ebene selbst, wo die selektive Bildung von 3'-phosphorylierten Lipidprodukten die Vielfalt der auslösbaren Effekte einschränkt.