

5 Diskussion

Die Rezeptor-regulierten Klasse I PI-3-Kinasen vermitteln eine Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, cytoskelettale Veränderungen, Zellmigration oder vesikuläre Transportvorgänge (siehe Abb. 5, Kapitel 1.3.5) (Rameh & Cantley, 1999; Cantley, 2002). Die Zahl der hierbei beteiligten Effektoren, für die eine Regulation über PI-3-Kinasen nachgewiesen wird, steigt ständig an. Die Klasse I PI-3-Kinasen wurden aber erst Mitte der 1980er Jahre entdeckt und ihre cDNAs erst in den 1990er Jahren kloniert (Wymann & Pirola, 1998). Ihre Regulationen und Funktionen sind daher erst unvollständig erforscht.

Bereits relativ gut charakterisiert ist die Regulation der Klasse I_A PI-3-Kinasen durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Kaplan et al., 1987; Whitman et al., 1988; Auger et al., 1989; Hawkins et al., 1992) (Abb. 41, linke Seite). Hierbei kommt es durch Interaktion der beiden SH2-Domänen der regulatorischen p85-Untereinheit der heterodimeren Klasse I_A PI-3-Kinasen mit phosphorylierten Tyrosinresten der aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen erstens zu einer Rekrutierung der PI-3-Kinase aus dem Cytosol an die Membran (und somit zu ihrem Substrat, dem Membranlipid PtdIns-4,5-P₂) und zweitens zu einer Aufhebung der inhibitorischen Wirkung der p85- auf die katalytische p110-Untereinheit. In Variation dieses Prinzips können die phosphorylierten Tyrosinreste auch in einem anderen Protein als dem Rezeptor selbst liegen, und die Phosphorylierung kann auch durch eine andere Kinase erfolgen. Weniger verstanden ist bisher die Regulation der Klasse I_A PI-3-Kinasen durch weitere Mechanismen wie z. B. über andere Protein-Interaktionsdomänen der regulatorischen p85-Untereinheit (vgl. Abb. 4) oder durch das direkt mit der katalytischen p110-Untereinheit interagierende Ras. Außerdem ist bislang unverstanden, worauf die beobachtete PI-3-Kinase-Isoformspezifität bei der Signaltransduktion verschiedener Rezeptoren beruht (Lu-Kuo et al., 2000; siehe auch Einleitung, Kapitel 1.3.5).

Die Gβγ-sensitive Klasse I_B PI-3-Kinase γ, die für die erstmals 1988 beschriebene fMLP-Rezeptor-vermittelte PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung (Traynor-Kaplan et al., 1988) verantwortlich ist, wurde erst 1994 isoliert (Stephens et al., 1994). Die cDNAs für ihre katalytische p110γ- und ihre nicht-katalytische p101-Untereinheit wurden erst 1995 bzw. 1997 kloniert (Stoyanov et al., 1995; Stephens et al., 1997). Die Regulation und Funktion der PI-3-Kinase γ sind daher erst unvollständig erforscht (siehe Abb. 41). So ist z. B. die Rolle ihrer nicht-katalytischen p101-Untereinheit ungeklärt.

Auch wurde die eigene Signalqualität von Gβγ-Komplexen erst viel später entdeckt als die der Gα-Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine (Logothetis et al., 1987; Gautam et al., 1998). Heute weiß man, daß Gβγ-Komplexe ihre Effektoren durch verschiedene Mechanismen aktivieren können: Die Membran-gebundenen Gβγ-Komplexe können als Membrananker zur Rekrutierung des Effektors aus dem Cytosol an die Membran fungieren, der hierdurch Zugang zu anderen Membran-lokalisierten Molekülen erhält. Andere Gβγ-

Effektoren sind aber bereits Membran-lokalisiert, so daß ihre Aktivierung durch $G\beta\gamma$ offenbar nicht auf einer Translokation, sondern auf einem allosterischen Effekt beruht.

Da die PI-3-Kinase γ - wie die anderen Klasse I PI-3-Kinasen auch - vorwiegend im Cytosol lokalisiert, ihr Substrat *in vivo* aber das Membranlipid PtdIns-4,5- P_2 ist, war zu vermuten, daß sie bei ihrer Aktivierung aus dem Cytosol an die Membran translozieren muß. Die Stimulation der PI-3-Kinase γ durch $G\beta\gamma$ könnte also eben hierauf beruhen. Bislang wurde die Regulation der PI-3-Kinase γ durch $G\beta\gamma$ aber vor allem *in vitro* unter Verwendung von künstlichen Lipidvesikeln und gereinigten Proteinen untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch $G\beta\gamma$ in lebenden Zellen untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation und die Rolle einer eventuellen Membrantranslokation des Enzyms.

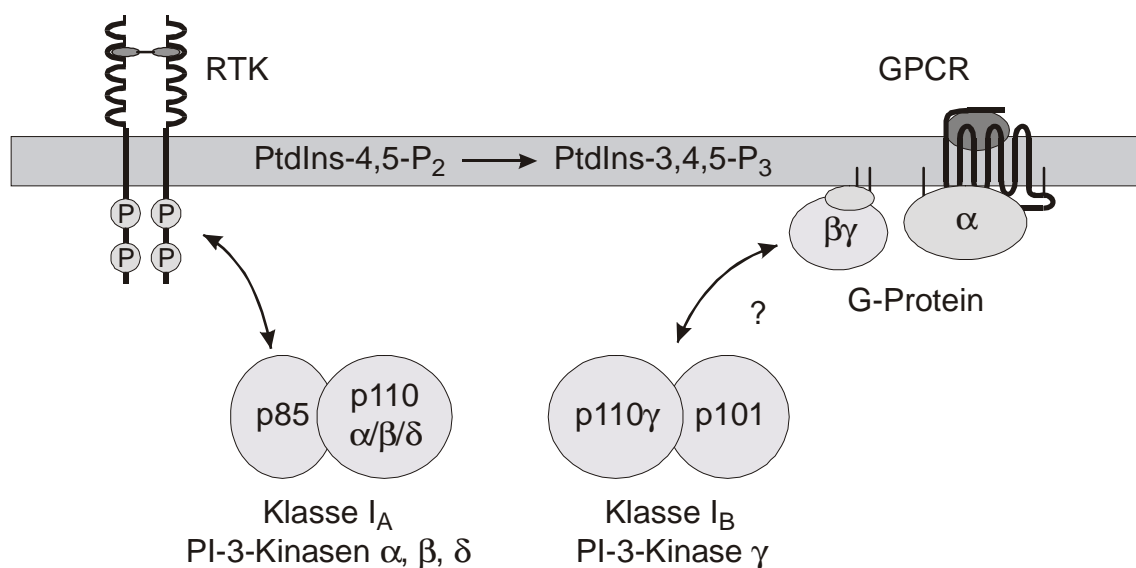


Abb. 41: Regulation der Klasse I PI-3-Kinasen durch Zelloberflächen-Rezeptoren. Die Klasse IA PI-3-Kinasen α , β und δ werden typischerweise durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert. Hierbei fungiert die regulatorische p85-Untereinheit als Adapter, der die Membrantranslokation der katalytischen p110-Untereinheit vermittelt. Die Klasse IB PI-3-Kinase γ wird typischerweise durch $G\beta\gamma$ -Komplexe aus heterotrimeren G-Proteinen aktiviert. Der hier zugrunde liegende Aktivierungsmechanismus ist aber noch unklar, insbesondere im Hinblick auf die Rolle einer möglichen Membrantranslokation sowie die Funktion der nicht-katalytischen p101-Untereinheit.

Eine Methode für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation und Translokation von Proteinen in lebenden Zellen ist die Fluoreszenz-mikroskopische Beobachtung von heterolog exprimierten Fusionsproteinen mit GFP (oder einer andersfarbigen Variante des GFP). Mit dieser Methodik sind in den letzten Jahren wichtige Erkenntnisse über verschiedenste zelluläre Prozesse erzielt worden, vor allem über ihre räumliche und zeitliche Koordination in lebenden Zellen (Tsien & Miyawaki, 1998; Chamberlain & Hahn, 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die subzelluläre Lokalisation und eventuelle Translokation der PI-3-Kinase γ in lebenden Zellen mit Hilfe von fluoreszierenden

Fusionsproteinen untersucht werden.

Zur Etablierung der Methodik und Bestätigung des Konzepts sollte aber zunächst die RTK-vermittelte Membranrekrutierung einer Klasse I_A PI-3-Kinase mit Hilfe von fluoreszierenden Fusionsproteinen in lebenden Zellen gezeigt werden.

5.1 Subzelluläre Lokalisation und RTK-vermittelte Membrantranslokation einer heterodimeren Klasse I_A PI-3-Kinase

Die subzelluläre Verteilung einer GFP-markierten p85 α -Untereinheit (GFP-p85 α) und ihre Rezeptor-Tyrosin-Kinase-vermittelte Translokation sind bereits kürzlich von Gillham und Mitarbeitern (1999) beschrieben worden. Demnach ist die GFP-p85 α in NIH-3T3-, A431- und MCF-7-Zellen vorwiegend im Cytosol verteilt. Zusätzlich wurde in diesen unstimulierten Zellen ein kleiner Anteil der GFP-p85 α in fleckenartigen Strukturen („*patches*“) an der Plasmamembran gefunden. Im Zellkern war die GFP-p85 α nicht nachweisbar. Nach Stimulation der Zellen mit EGF kam es zu einer leichten Zunahme der GFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran, mit einer fleckenförmigen diskontinuierlichen Anreicherung. Die GFP-p85 α war in diesen Flecken colocalisiert mit dem EGF-Rezeptor (nachgewiesen durch die Bindung von Fluoreszenz-markiertem EGF) und mit Vincullin (nachgewiesen durch Immunfluoreszenz mit einem anti-Vincullin-Antikörper), einem Marker für *focal adhesion complexes*. Die Translokation wurde gehemmt durch AG1478, einen Inhibitor von Tyrosin-Phosphorylierungen. Diese Befunde sprechen dafür, daß die p85 α -Untereinheit nach Stimulation und Auto-Tyrosin-Phosphorylierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen an diese bindet und hierdurch zumindest zu einem gewissen Ausmaß aus dem Cytosol an die Plasmamembran rekrutiert wird.

Unklar blieb bei den Untersuchungen von Gillham und Mitarbeitern hingegen, inwiefern ihre Befunde auch das Verhalten einer heterodimeren Klasse I_A PI-3-Kinase widerspiegeln, denn die GFP-p85 α wurde ohne p110-Untereinheit überexprimiert. Es wurde zwar gezeigt, daß endogene p110-Untereinheiten mit der GFP-p85 α copräzipitiert werden konnten; doch über die Stöchiometrie ist nichts bekannt. Es ist zu vermuten, daß der größte Teil der überexprimierten GFP-p85 α nicht in einem heterodimeren Komplex mit einer endogenen p110-Untereinheit vorlag. Das Verhalten einer monomeren p85-Untereinheit könnte sich aber signifikant von dem eines p85/p110-Dimers unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun die subzelluläre Lokalisation sowohl einer regulatorischen p85-Untereinheit (p85 α) als auch einer katalytischen p110-Untereinheit einer Klasse I_A PI-3-Kinase (p110 β) sowie die Lokalisation und Translokation des Heterodimers (PI-3-Kinase β) untersucht.

In der Tat stellte sich heraus, daß die subzelluläre Verteilung der heterodimeren PI-3-Kinase β nicht mit der Verteilung der monomeren $p85\alpha$ übereinstimmt (vgl. Abb. 9 und Abb. 10). Die monomere $p85\alpha$ war vorwiegend in Flecken an der Membran lokalisiert. Die beobachteten YFP- $p85\alpha$ -Flecken an der Membran der HEK293-Zellen (siehe Abb. 9, rechts) entsprechen vermutlich den von Gillham und Mitarbeitern beschriebenen GFP- $p85\alpha$ -Flecken an der Membran, wenngleich sie dort weniger ausgeprägt zu sehen waren. Der Unterschied könnte auf den unterschiedlichen verwendeten Mikroskopen (konfokal in der vorliegenden Arbeit gegenüber nicht-konfokal bei Gillham und Mitarbeitern) oder aber auch auf den unterschiedlichen verwendeten Zellen beruhen. Im Gegensatz zur Verteilung der monomeren $p85\alpha$ war die heterodimere PI-3-Kinase β hauptsächlich im Cytosol lokalisiert, und es waren kaum noch Flecken an der Membran zu erkennen (siehe Abb. 10). Die monomere $p110\beta$ war sogar ausschließlich im Cytosol und gar nicht an der Membran lokalisiert (zumindest nicht gegenüber dem Cytosol angereichert) (siehe Abb. 9). Eine heterodimere PI-3-Kinase β verhält sich also ganz anders eine monomer exprimierte $p85\alpha$. Die Befunde mit einer monomer exprimierten $p85\alpha$ lassen also keine Rückschlüsse auf das Verhalten einer heterodimeren Klasse I_A PI-3-Kinase zu.

Die subzelluläre Verteilung der monomeren $p85\alpha$ ist dennoch interessant, denn in jüngster Zeit wird zunehmend diskutiert, daß die $p85$ -Proteine neben ihrer Rolle als PI-3-Kinase-Untereinheiten auch $p110$ -unabhängige Funktionen haben könnten (Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2001; Kang et al., 2002). Die Ergebnisse von Gillham und Mitarbeitern (1999) deuten wie erwähnt darauf hin, daß die $p85\alpha$ mit dem EGF-Rezeptor in *focal adhesion complexes* colokalisiert ist. Man könnte spekulieren, daß $p85$ -Proteine dort über ihre multiplen Protein-Protein-Interaktionsdomänen (siehe Abb. 4) mit verschiedenen anderen Proteinen interagieren und hierüber physiologische Funktionen ausüben könnten. Ein erster Ansatz, um dieser interessanten Hypothese nachzugehen, wäre die Identifizierung der für die beobachtete subzelluläre Verteilung der $p85\alpha$ verantwortlichen Domänen des Proteins durch Untersuchung von Deletionsmutanten bzw. Vergleich mit den anderen, teilweise kürzeren $p85$ -Isoformen. Möglicherweise liegen funktionelle Unterschiede zwischen den einzelnen $p85$ -Isoformen gerade bei $p110$ -unabhängigen Funktionen.

Um nun die RTK-vermittelte Membranrekrutierung einer heterodimeren Klasse I_A PI-3-Kinase in lebenden Zellen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine fluoreszierende $p110\beta$ -Untereinheit mit einer nicht-markierten $p85\alpha$ -Untereinheit sowie dem EGF-Rezeptor coexprimiert. Nach Stimulation mit EGF zu einer deutlichen Translokation der fluoreszierenden PI-3-Kinase β aus dem Cytosol an die Membran (siehe Abb. 11). Die Translokation war wie erwartet nicht in Abwesenheit der $p85$ -Untereinheit zu beobachten. Somit wurde hier zum ersten mal die RTK-vermittelte Membranrekrutierung einer kompletten heterodimeren Klasse I_A PI-3-Kinase in lebenden Zellen gezeigt.

5.2 Subzelluläre Lokalisation und $G\beta\gamma$ -vermittelte Membran-translokation der Klasse I_B PI-3-Kinase γ

Wie die Klasse I_A PI-3-Kinasen ist auch die Klasse I_B PI-3-Kinase γ ein lösliches Enzym und überwiegend im Cytosol lokalisiert. So wurde beschrieben, daß die Permeabilisierung neutrophiler Granulocyten zum vollständigen Verlust der fMLP-induzierten PI-3-Kinase-Aktivität führt (Kular et al., 1997). Andererseits wurde berichtet, die PI-3-Kinase γ sei nach subzellulärer Fraktionierung zum Teil auch in der partikulären Fraktion nachweisbar (Stephens et al., 1994; Naccache et al., 2000). Bei der subzellulären Fraktionierung könnten allerdings die Zerstörung der Zellen und die gewählten Puffer-Bedingungen die Verteilung eines Proteins zwischen partikulärer Fraktion und löslichem Überstand beeinflussen. *In vitro* wurde gezeigt, daß die PI-3-Kinase γ an künstliche Lipidvesikel mit anionischen Phospholipiden bindet, offenbar hauptsächlich durch Interaktion ihrer C2-Domäne mit PtdIns-4,5- P_2 (Krugmann et al., 2002; Kirsch et al., 2001; Walker et al., 1999). *In vitro* lag sogar der größte Teil der PI-3-Kinase γ mit den künstlichen Lipidvesikeln assoziiert vor (Krugmann et al., 2002). Die Situation *in vitro* unterscheidet sich also deutlich von der Situation *in vivo* mit komplexen biologischen Membranen. Vermutlich spielt die Interaktion der PI-3-Kinase γ mit den Membran-Phospholipiden aber auch *in vivo* eine Rolle. Möglicherweise beeinflusst eine leicht unterschiedliche Zusammensetzung der Membran, insbesondere bezüglich ihrer anionischen Phospholipide, je nach Zelltyp die Interaktion des Enzyms mit der Membran. In den hier verwendeten HEK293-Zellen lag die heterolog exprimierte PI-3-Kinase γ klar zum ganz überwiegenden Teil im Cytosol vor; an der Membran war keine Anreicherung zu erkennen (siehe Abb. 16).

Es wurde vermutet, daß die PI-3-Kinase γ bei ihrer Aktivierung durch $G\beta\gamma$ als Membrananker an die Membran rekrutiert wird, ähnlich der RTK-vermittelten Translokation der Klasse I_A PI-3-Kinasen (siehe Kapitel 5.1). Entsprechend wurde beschrieben, daß es nach Stimulation von G-Protein-koppelnden Rezeptoren in neutrophilen Granulocyten sowie in NK-Zellen zu einer Zunahme der PI-3-Kinase γ in der partikulären Fraktion kommen soll, wobei aber das Ausmaß ihrer Rekrutierung aus dem Cytosol an die Membran nicht ersichtlich wurde (al-Aouakty et al., 1999; Naccache et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde nun mit Hilfe von Fluoreszenz-markierter PI-3-Kinase γ in lebenden Zellen gezeigt, daß das Enzym tatsächlich durch $G\beta\gamma$ -Komplexe an die Membran rekrutiert wird (siehe Abb. 22).

Hierbei wurde die $G\beta\gamma$ -induzierte Membranrekrutierung der PI-3-Kinase γ über ihre nicht-katalytische p101-Untereinheit vermittelt. Monomer exprimierte p110 γ wurde nicht durch $G\beta\gamma$ an die Membran transloziert (siehe Abb. 19, oben). *In vitro* ist zwar eine direkte Interaktion von $G\beta\gamma$ -Komplexen sowohl mit der p101-, als auch mit der p110 γ -Untereinheit nachgewiesen worden; hierbei fiel aber bereits auf, daß die p101-Untereinheit stärker an $G\beta\gamma$ -Komplexe bindet als die p110 γ -Untereinheit (Stephens et al., 1997; Maier et al., 1999). Für die Situation *in vivo* ist also vermutlich die Affinität der p110 γ zu $G\beta\gamma$ zu gering, um direkt

durch $G\beta\gamma$ an die Membran rekrutiert zu werden. Außerdem könnte die komplexe Situation an der Plasmamembran *in vivo* die Interaktion zwischen $p110\gamma$ (bzw. $p101$) und $G\beta\gamma$ im Vergleich zur Situation *in vitro* mit immobilisierten bzw. solubilisierten Proteinen weiter beeinflussen. Auf jeden Fall scheint *in vivo* die nicht-katalytische $p101$ -Untereinheit der heterodimeren PI-3-Kinase γ die Rolle eines Adapters zu spielen, der durch seine hohe Affinität zu $G\beta\gamma$ -Komplexen die Membranrekrutierung des $p101/p110\gamma$ -Heterodimers vermittelt (Abb. 42). In dieser Hinsicht ist die Funktion der nicht-katalytischen $p101$ -Untereinheit der Klasse I_B PI-3-Kinase γ vergleichbar mit der Funktion der nicht-katalytischen $p85$ -Untereinheit der Klasse I_A PI-3-Kinasen: In beiden Fällen spielt die nicht-katalytische Untereinheit die Rolle eines Adapters, der die Rekrutierung des Enzyms aus dem Cytosol an die Membran vermittelt.

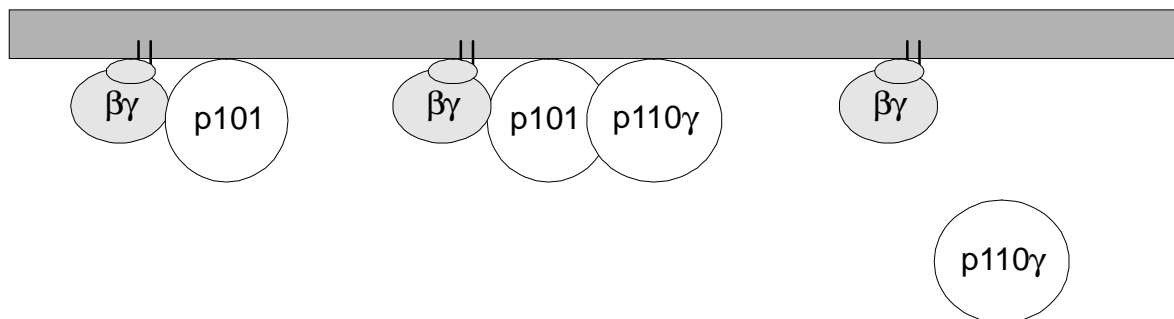


Abb. 42: Membranrekrutierung der PI-3-Kinase γ durch $G\beta\gamma$. Die monomere $p101$ -Untereinheit wird durch $G\beta\gamma$ -Komplexe an die Membran rekrutiert (links), nicht hingegen die monomere $p110\gamma$ -Untereinheit (rechts). Die katalytische $p110\gamma$ -Untereinheit wird aber im $p101/p110\gamma$ -Heterodimer durch $G\beta\gamma$ an die Membran rekrutiert, wobei also die nicht-katalytische $p101$ -Untereinheit als Adapter fungiert (Mitte).

Da die PI-3-Kinase γ im Cytosol keinen Zugang zu ihrem Substrat PtdIns-4,5-P_2 hat, war zu vermuten, daß die Membranrekrutierung des Enzyms bei seiner Aktivierung einen essentiellen Schritt darstellt (möglicherweise sogar den Aktivierungsmechanismus selbst). Im Einklang mit dieser Annahme war die für ihre $G\beta\gamma$ -vermittelte Membranrekrutierung erforderliche $p101$ -Untereinheit auch für die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ *in vivo* notwendig (siehe Abb. 26, Abb. 30, Abb. 32), wobei die Abwesenheit der $p101$ durch künstliche Membranassoziation der $p110\gamma$ ($p110\gamma$ -CAAX) kompensiert werden konnte (siehe Kapitel 4.4.2). Dies verdeutlicht indirekt auch nochmals, daß in den unstimulierten Zellen keine oder höchstens ein sehr geringer Anteil der PI-3-Kinase γ Membran-assoziiert vorlag, und zwar sowohl in den HEK293-, als auch in den VSM-Zellen (vgl. Kapitel 4.4.3).

Ein kleiner Anteil der heterodimeren PI-3-Kinase γ war in den HEK293-Zellen auch im Kern zu finden (siehe Abb. 16 - 17). Für die Lokalisation dieses Anteils des heterodimeren Enzyms im Zellkern war offenbar die nicht-katalytische $p101$ -Untereinheit verantwortlich:

Die monomer exprimierte p110 γ war ausschließlich im Cytosol lokalisiert, die monomere p101 hingegen deutlich auch im Kern (siehe Abb. 15, oben / unten). Hierfür könnte das Motiv RRR (Aminosäuren 499 - 501 der p101) verantwortlich sein, welches als Kern-Lokalisations-Sequenz beschrieben worden ist (Zhang et al., 2001). Interessanterweise gibt es Hinweise auf einen eigenen Phosphoinositid-Stoffwechsel im Zellkern, bei dem auch eine G-Protein-regulierte PI-3-Kinase eine Rolle spielen soll (Bacqueville et al., 2001). Von Metjian und Mitarbeitern wurde beschrieben, daß in bestimmten Zelllinien die monomere p110 γ in den Kern transloziert, woran noch nicht identifizierte „akzessorische Proteine“ beteiligt sein sollen (Metjian et al., 1999). Zum besseren Verständnis der Regulation und Funktion der nukleären PI-3-Kinase γ bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

5.3 Heterodimerisierung von p101 und p110 γ

Über die Interaktion der beiden Untereinheiten im PI-3-Kinase γ -Heterodimer ist erst wenig bekannt (siehe auch Abb. 44).

Stephens und Mitarbeiter hatten beschrieben, die p101- und die p110 γ -Untereinheit der PI-3-Kinase γ würden fest aneinander binden (Stephens et al., 1997). Diese Aussage stützt sich auf den Befund, daß p110 γ an immobilisierter p101 etwa im Verhältnis 1:1 retiniert wurde, wobei die freie p110 γ -Untereinheit in etwa zehnfachem Überschuß eingesetzt worden war. In der vorliegenden Arbeit wurde nun mittels Gelfiltration gezeigt, daß nach Cotransfektion der beiden Plasmide für p101 und p110 γ im Verhältnis 1:1 die beiden PI-3-Kinase γ -Untereinheiten praktisch vollständig als Heterodimere vorliegen (siehe Abb. 13). Die p101- und die p110 γ -Untereinheit der PI-3-Kinase γ binden also tatsächlich fest aneinander.

Die Untersuchung der p101/p110 γ -Heterodimere mittels FRET (siehe Abb. 12) hat interessante Hinweise auf die Anordnung der beiden Untereinheiten zueinander im Dimer ergeben. Da die FRET-Effizienz eine Funktion des Abstands der beiden Fluorophoren ist (Stryer, 1978; van Roessel & Brand, 2002), läßt sich aus den je nach Position der CFP- bzw. YFP-Markierungen am jeweiligen N- oder C-Terminus der p101- bzw. p110 γ -Untereinheit unterschiedlichen gemessenen FRET-Effizienzen ableiten, daß im p101/p110 γ -Heterodimer einerseits die beiden C-Termini und andererseits die beiden N-Termini der beiden Untereinheiten jeweils relativ dicht beieinander liegen, während jeweils der N-Terminus der einen Untereinheit relativ weit vom C-Terminus der anderen Untereinheit entfernt ist. Dies ist interessant, da bislang erst wenig über die Anordnung der beiden Untereinheiten im p101/p110 γ -Heterodimer zueinander bekannt ist. Mit Hilfe von trunkierten p101- und p110 γ -Mutanten wurde bislang nur gezeigt, daß die p101-Untereinheit an die N-terminale Hälfte der p110 γ -Untereinheit bindet, und daß an der Bindung der p101- an die p110 γ -Untereinheit weite Teile der p101-Untereinheit inklusive N- und C-Terminus beteiligt sind (Krugmann et al., 1999). Leider existiert weder eine Kristallstruktur der p101-Untereinheit noch des

p101/p110 γ -Heterodimers.

5.4 Mechanismus der Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$

In Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Frage nach dem Mechanismus, wie die PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ -Komplexe *in vivo* aktiviert wird. Die Ergebnisse zur Notwendigkeit der nicht-katalytischen p101-Untereinheit sowohl für die Membranrekrutierung als auch für die Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ stünden im Einklang mit der Annahme, daß G $\beta\gamma$ das Enzym eben durch die Rekrutierung zu seinem membranären Substrat aktiviert. Ein solcher Mechanismus ist z. B. für die Aktivierung der β -Adrenorezeptor-Kinasen durch G $\beta\gamma$ -Komplexe nachgewiesen worden (Pitcher et al., 1992). Andererseits können G $\beta\gamma$ -Komplexe aber auch als allosterische Aktivatoren wirken, z. B. bei den K⁺-Kanälen der GIRK-Familie, die ja bereits membranär lokalisiert sind (Logothetis et al., 1987; Yi et al., 2001; Sadjja et al., 2001). Es wäre also ebenso vorstellbar, daß die Rekrutierung der PI-3-Kinase γ aus dem Cytosol an die Membran zwar Voraussetzung für die Aktivierung des Enzyms ist, die eigentliche Aktivierung aber auf einer allosterischen Regulation beruht.

Hier konnte nun gezeigt werden, daß die Stimulation der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ sowohl auf ihrer Rekrutierung aus dem Cytosol an die Membran, als auch auf einer zusätzlichen Aktivierung an der Membran beruht. So produziert eine künstlich Membran-assoziierte PI-3-Kinase γ bereits PtdIns-3,4,5-P₃, jedoch wird diese basale Enzymaktivität durch G $\beta\gamma$ weiter aktiviert. Diese Befunde stehen im Einklang mit kürzlich publizierten *in vitro*-Befunden, nach denen die PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert wird, obwohl das Enzym bereits mit den Lipidvesikeln assoziiert ist (Krugmann et al., 2002).

Darüber hinaus wurde hier gezeigt, daß die nicht-katalytische p101-Untereinheit für die Aktivierung der PI-3-Kinase γ an der Membran nicht notwendig ist: Die künstlich Membran-verankerte p110 γ -CAAX wird auch in Abwesenheit der p101 durch G $\beta\gamma$ stimuliert. Somit ist die p101-Untereinheit deshalb für die Stimulation der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ *in vivo* notwendig ist, weil sie die Membranrekrutierung des Enzyms vermittelt. In Anbetracht der Befunde, nach denen die PI-3-Kinase γ bereits von sich aus an künstliche Lipidvesikel bindet (Krugmann et al., 2002), wird also auch verständlich, weshalb die p101-Untereinheit zwar *in vivo* als Vermittler der Membrantranslokation für die Stimulation der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ notwendig ist, in Versuchen mit künstlichen Lipidvesikeln *in vitro* aber auch die monomere p110 γ in Abwesenheit der p101-Untereinheit durch G $\beta\gamma$ stimuliert wird (Stoyanov et al., 1995; Leopoldt et al., 1998; Maier et al., 1999).

Somit läßt sich ein Zwei-Schritt-Modell für die Stimulation der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ postulieren (Abb. 43): In einem ersten Schritt rekrutiert G $\beta\gamma$ die PI-3-Kinase γ über Bindung an ihre nicht-katalytische p101-Untereinheit aus dem Cytosol an die Membran. An der Membran wird dann die katalytische p110 γ -Untereinheit direkt durch G $\beta\gamma$ allosterisch

aktiviert. Die PI-3-Kinase γ ist somit der erste $G\beta\gamma$ -Effektor, für den eine direkte Stimulation durch $G\beta\gamma$ sowohl durch Membranrekrutierung als auch durch einen allosterischen Mechanismus beschrieben ist. Ein ähnlicher Zwei-Schritt-Mechanismus aus Membrantranslokation und allosterischer Aktivierung ist für die Btk beschrieben worden (Lowry & Huang, 2002). Hierbei erfolgt aber nur die allosterische Aktivierung durch direkte Interaktion mit $G\beta\gamma$, während die Membranrekrutierung indirekt über PI-3-Kinase-Aktivität und Interaktion der PH-Domäne der Btk mit PtdIns-3,4,5-P_3 erfolgt.

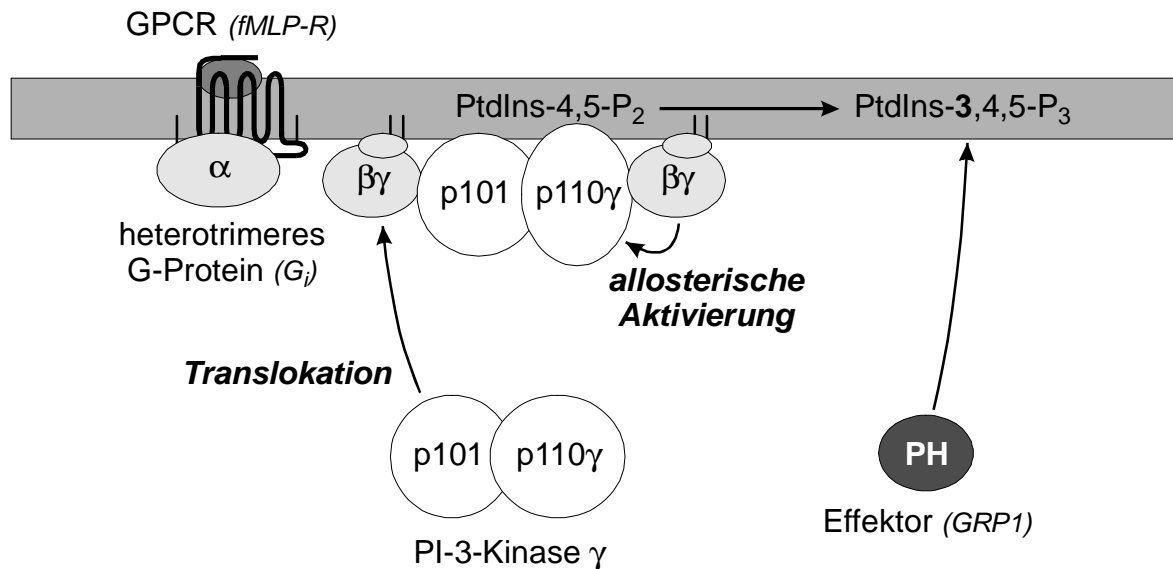


Abb. 43: Modell der Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch $G\beta\gamma$ *in vivo*. Die Stimulation von G-Protein-koppelnden Rezeptoren, z. B. des G_i -koppelnden fMLP-Rezeptors, führt zur Freisetzung von $G\beta\gamma$ -Komplexen aus heterotrimeren G-Proteinen. $G\beta\gamma$ rekrutiert die heterodimere PI-3-Kinase γ aus dem Cytosol an die Membran, und zwar durch Interaktion mit ihrer nicht-katalytischen p101-Untereinheit. Bereits die Translokation der Lipidkinase zu ihrem Substrat, dem Membranlipid PtdIns-4,5-P_2 , führt aufgrund ihrer basalen Enzymaktivität zur Bildung von PtdIns-3,4,5-P_3 . An der Membran wird die PI-3-Kinase γ noch zusätzlich von $G\beta\gamma$ aktiviert, und zwar durch direkte Interaktion mit der katalytischen p110 γ -Untereinheit. Das von der PI-3-Kinase γ (wie von allen Klasse I PI-3-Kinasen) gebildete Membranlipid PtdIns-3,4,5-P_3 rekrutiert seinerseits verschiedene Proteine aus dem Cytosol an die Membran, und zwar durch Interaktion mit deren PtdIns-3,4,5-P_3 -bindenden PH-Domänen, was wiederum zur Aktivierung dieser PI-3-Kinase-Effektoren führt. Hierzu gehört z. B. der General Receptor for Phosphoinositides 1, GRP1.

Wie aber wird die PI-3-Kinase γ bzw. p110 γ durch $G\beta\gamma$ allosterisch aktiviert? Untersuchungen der PI-3-Kinase γ *in vitro* hatten ergeben, daß durch $G\beta\gamma$ vor allem der V_{\max} -Wert für die PtdIns-3,4,5-P_3 -Bildung erhöht wird (etwa zehnfach) (Tang & Downes, 1997). Über die Interaktion der PI-3-Kinase γ bzw. ihrer p110 γ -Untereinheit mit $G\beta\gamma$ ist erst wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, daß $G\beta\gamma$ an den N-terminalen sowie auch an den C-terminalen Teil der p110 γ bindet (Leopoldt et al., 1998) (siehe auch Abb. 44). Letzterer enthält die katalytische Domäne. Es ist also vorstellbar, daß die Bindung von $G\beta\gamma$ an die p110 γ eine Konformationsänderung in der katalytischen Domäne bewirkt, die zur

beschriebenen Erhöhung von V_{\max} führt.

Besser untersucht ist die Interaktion der p110 γ mit Ras, die miteinander co-kristallisiert wurden (Pacold et al., 2000). Ras bindet nicht nur an die Ras-Bindungs-Domäne der p110 γ , sondern interagiert auch mit der C-terminalen Subdomäne der katalytischen Domäne (siehe auch Abb. 3). Die Interaktion mit Ras verändert nicht die Grundstruktur der p110 γ , führt aber in weiten Teilen der p110 γ zu leichten Konformationsänderungen, und zwar am deutlichsten eben in der C-terminalen Subdomäne der katalytischen Domäne. Diese enthält die Bindungsstelle für das Phosphoinositid-Substrat. Man könnte also vermuten, daß Ras die p110 γ dadurch aktiviert, daß durch die Konformationsänderung in der C-terminalen Subdomäne der katalytischen Domäne die Bindung des Substrats PtdIns-4,5-P₂ erleichtert, also der K_m -Wert für PtdIns-4,5-P₂ erniedrigt wird. Im Einklang mit dieser Annahme konnte gezeigt werden, daß Ras die PI-3-Kinase γ bei niedriger PtdIns-4,5-P₂-Konzentration stärker stimuliert als bei hoher (Suire et al., 2002).

Daß die PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ vor allem über eine Erhöhung des V_{\max} -Werts, durch Ras hingegen vor allem über eine Erniedrigung des K_m -Werts für PtdIns-4,5-P₂ allosterisch aktiviert werden soll, paßt gut zur berichteten synergistischen Stimulation der PI-3-Kinase γ durch beide Stimuli (Pacold et al., 2000).

Wenngleich die p101-Untereinheit für die allosterische Aktivierung der PI-3-Kinase γ bzw. p110 γ durch G $\beta\gamma$ -Komplexe an der Membran oder an künstlichen Lipidvesikeln nicht notwendig ist, so wurde doch beschrieben, daß bei der G $\beta\gamma$ -stimulierten PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung *in vitro* die p101-Untereinheit die PI-3-Kinase γ sensitiver gegenüber G $\beta\gamma$ macht (Stephens et al., 1997; Maier et al., 1999). Dies spricht dafür, daß die nicht-katalytische p101-Untereinheit der PI-3-Kinase γ zusätzlich zu ihrer Funktion als notwendiger Vermittler der Membranrekrutierung des Enzyms *in vivo* auch noch die Aktivierung der katalytischen p110 γ -Untereinheit an der Membran durch G $\beta\gamma$ verstärken könnte, wenngleich sie für diesen zweiten Schritt nicht unbedingt notwendig ist. In der vorliegenden Arbeit wurden aber keine Hinweise hierauf gefunden (vgl. Abb. 30, Abb. 33 – 36). Eine mögliche Ursache hierfür könnte die begrenzte Quantifizierbarkeit der Membrantranslokation der fluoreszierenden PH-Domänen als Nachweis für PtdIns-3,4,5-P₃-Bildung sein. Allerdings wurden auch bei unterschiedlichen Konzentrationen des Stimulus (fMLP) sowie bei unterschiedlichen Mengen des transfizierten p110 γ -CAAX-Plasmids jeweils zwischen den Ansätzen mit oder ohne co-exprimierter p101-Untereinheit keine signifikanten Unterschiede in der fMLP-induzierten Membrantranslokation der GFP-GRP1_{PH} beobachtet (nicht gezeigt).

Ein möglicherweise bedeutsamer Unterschied zwischen den Versuchsansätzen *in vitro* und *in vivo* ist die Verwendung der künstlich Membran-assoziierten p110 γ -CAAX zur Untersuchung der *in vivo*-Aktivierung der PI-3-Kinase γ an der Membran unabhängig von ihrer Translokation (siehe Kapitel 4.4.3): Die p110 γ -CAAX wird posttranslational farnesyliert und ist daher an der Membran verankert (siehe Abb. 27). *In vitro* hingegen ist die PI-3-

Kinase γ ohne Lipidmodifikation bereits mit den künstlichen PtdIns-4,5-P₂-haltigen Lipidvesikeln assoziiert (Krugmann et al., 2002). Es wäre vorstellbar, daß die p110 γ -CAAX (bzw. das p101/p110 γ -CAAX-Heterodimer) durch die Farnesylierung in einer ganz bestimmten Orientierung an die Membran gebunden ist, die möglicherweise nicht der Orientierung der nicht-modifizierten p110 γ (bzw. heterodimeren PI-3-Kinase γ) an den Lipidvesikeln entspricht. Man könnte somit spekulieren, daß die *in vitro* beobachtete stärkere Stimulation der heterodimeren PI-3-Kinase γ gegenüber der monomeren p110 γ darauf beruht, daß G $\beta\gamma$ das Enzym zusätzlich zur p101-unabhängigen allosterischen Aktivierung noch durch eine p101-abhängige Reorientierung gegenüber den Lipidvesikeln, also dem Substrat, stimuliert, wohingegen ein solcher Reorientierungs-Effekt bei der *in vivo* verwendeten farnesylierten PI-3-Kinase γ nicht zum Tragen kommt, weil deren Orientierung gegenüber der Membran durch den Farnesylanker fixiert ist. Hierzu paßt, daß sich die PtdIns-4,5-P₂-Bindungsstelle in der C-terminalen Subdomäne der katalytischen Domäne der p110 γ befindet, also in der Nähe des C-Terminus, wo die p110 γ -CAAX farnesyliert wird. Der Vergleich mit einer N-terminal modifizierten p110 γ (+/- p101) könnte zur Überprüfung der Hypothese der p101-vermittelten Reorientierung der p110 γ durch G $\beta\gamma$ beitragen, ebenso die Untersuchung von gereinigter p110 γ -CAAX (+/- p101) mit künstlichen Lipidvesikeln *in vitro*.

Unklar ist bislang die Stöchiometrie der Interaktion der heterodimeren PI-3-Kinase γ mit G $\beta\gamma$. Einerseits wäre es prinzipiell denkbar, daß es derselbe G $\beta\gamma$ -Komplex ist, der gleichzeitig sowohl mit der p101- als auch mit der p110 γ -Untereinheit interagiert. Genauso wäre es aber möglich, daß die heterodimere PI-3-Kinase γ mit ihren beiden Untereinheiten gleichzeitig mit zwei separaten G $\beta\gamma$ -Komplexen interagiert. Eine Gelfiltration mit gereinigter PI-3-Kinase γ und G $\beta\gamma$ erbrachte leider kein eindeutiges Ergebnis hierzu (A. Shimanets & B. Nürnberg, persönliche Mitteilung) Die heterodimere PI-3-Kinase γ mit einem gebundenen G $\beta\gamma$ -Komplex ist bereits so groß, daß der Größenunterschied durch einen zweiten hieran gebundenen G $\beta\gamma$ -Komplex durch Gelfiltration nicht sicher aufzulösen ist. Außerdem schien die Affinität zwischen G $\beta\gamma$ und der p110 γ -Untereinheit ja nur relativ gering zu sein, so daß fraglich ist, ob sich der ggfs. an die p110 γ -Untereinheit gebundene G $\beta\gamma$ -Komplex nicht bei der Präparation ablösen würde.

Abbildung 44 zeigt ein spekulatives Modell der Interaktionen von G $\beta\gamma$, p101 und p110 γ an der Membran aufgrund der hierzu Literatur-bekanntes sowie in der vorliegenden Arbeit erhaltenen, insgesamt aber noch unvollständigen Ergebnisse.

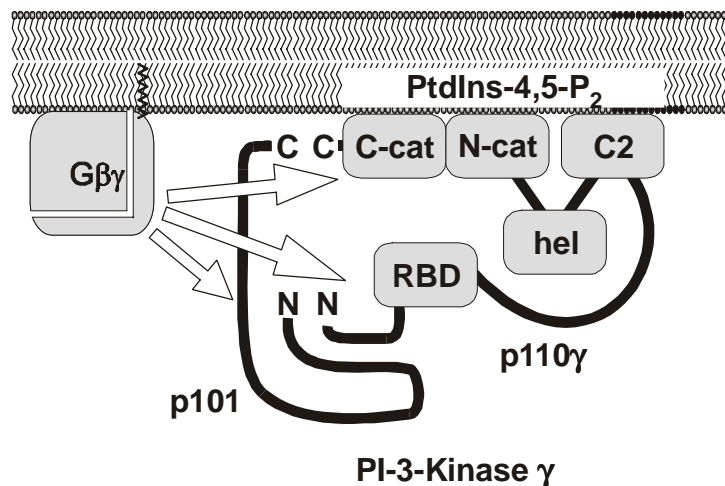


Abb. 44: Interaktion von Gβγ, p101 und p110γ an der Membran. Die Kristallstruktur der p110γ ist weitgehend bekannt (Walker et al., 1999; siehe auch Kapitel 1.3.2, Abb. 3). Sie zeigt deutlich einen modularen Aufbau aus mehreren Domänen. Die sogenannte helikale Domäne (hel) bildet das „Rückgrat“ der p110γ, um das herum die anderen Domänen angeordnet sind. Die in unmittelbarer Nähe des C-Terminus liegende katalytische Domäne besteht aus zwei Subdomänen („lobes“), die nach ihrer relativen Nähe zum C- und N-Terminus bezeichnet werden (C-cat, N-cat). Die Bindung des ATP erfolgt zwischen den beiden Subdomänen, die Bindung des PtdIns-4,5-P₂ in der C-terminalen Subdomäne der katalytischen Domäne. Die C2-Domäne unterstützt vermutlich durch Interaktion mit Phospholipiden die Membranassoziation der p110γ (Walker et al., 1999). Ras bindet nicht nur an die (der RBD anderer Ras-Effektoren wie Raf ähnlichen) Ras-Bindungsdomäne (RBD) der p110γ, sondern interagiert auch mit der C-terminalen Subdomäne der katalytischen Domäne (Pacold et al., 2000). Dort löst es eine Konformationsänderung aus, die vermutlich die Bindung des PtdIns-4,5-P₂ erleichtert. Gβγ bindet im C-terminalen Drittel der p110γ, interagiert also vermutlich ebenfalls direkt mit der katalytischen Domäne (Leopoldt et al., 1998). Es ist zu vermuten, daß die Bindung von Gβγ ähnlich wie die Bindung von Ras eine allosterische Konformationsänderung im aktiven Zentrum des Enzyms bewirkt. Während die Interaktion mit Ras aber in erster Linie zur Verringerung des K_m-Werts für PtdIns-4,5-P₂ führt (Suire et al., 2002), bewirkt Gβγ vor allem eine Erhöhung des V_{max}-Werts (Tang & Downes, 1997). Außerdem bindet Gβγ auch an N-terminale Bereiche der p110γ (Leopoldt et al., 1998). Die Struktur der N-terminalen 143 (von insgesamt 1102) Aminosäuren der p110γ ist aber nicht bekannt, da zur Kristallisation eine trunkierte Mutante verwendet wurde. Die p110γ ist als Monomer stabil (siehe Kapitel 4.4.3) und soll auch als Monomer vorkommen (Baier et al., 1999). Sie wird aber meist als katalytische Untereinheit der heterodimeren PI-3-Kinase γ im Komplex mit der nicht-katalytischen p101-Untereinheit gefunden (Stephens et al., 1997). Im Gegensatz zur p110γ ist die p101 als Monomer nicht stabil (siehe Kapitel 4.4.3). Die Struktur der p101 ist nicht bekannt. Sie weist keinerlei Ähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinen auf (Stephens et al., 1997). p110γ und p101 bilden ein festes Heterodimer (Stephens et al., 1997; siehe auch Kapitel 4.3.1.1). Hierbei sollen weite Bereiche der p101 vor allem mit der N-terminalen Hälfte der p110γ interagieren (Krugmann et al., 1999). Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten FRET-Daten (siehe Kapitel 4.3.1.1) sprechen dafür, daß der N-Terminus der p101 in der Nähe des N-Terminus der p110γ liegt, sowie der C-Terminus der p101 in der Nähe des C-Terminus der p110γ. Gβγ bindet stärker an die p101 als an die p110γ (Stephens et al., 1997; Maier et al., 1999). Die Gβγ-Bindungsstelle(n) der p101 ist/sind nicht bekannt. Die Affinität zwischen Gβγ und p110γ alleine reicht nicht aus, um sie aus dem Cytosol an die Membran zu rekrutieren (siehe Kapitel 4.3.4). Die p101 spielt in der heterodimeren PI-3-Kinase γ die Rolle eines Adapters,

der die Membranrekrutierung des Enzyms durch $G\beta\gamma$ vermittelt (siehe Kapitel 4.3.4). Die p101 beeinflusst zusätzlich die Interaktion der PI-3-Kinase γ mit Phospholipiden, möglicherweise im Sinne einer Verringerung spontaner Membranassoziation (Krugmann et al., 2002; Maier et al., 1999). Die Stöchiometrie der Interaktion zwischen $G\beta\gamma$ und der heterodimeren PI-3-Kinase γ ist unklar. Als Monomere haben sowohl die p101 als auch die p110 γ offenbar eigene $G\beta\gamma$ -Bindungsstellen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß sie im PI-3-Kinase γ -Heterodimer eine (oder mehrere) gemeinsame $G\beta\gamma$ -Bindungsstelle(n) bilden.

5.5 Stabilität der monomeren Klasse I PI-3-Kinase-Untereinheiten

Die Untersuchung der PI-3-Kinase γ und ihrer einzelnen Untereinheiten in der vorliegenden Arbeit hat gezeigt, daß die katalytische p110 γ -Untereinheit auch als Monomer ohne die nicht-katalytische p101-Untereinheit stabil ist, nicht aber umgekehrt (siehe Abb. 17). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die monomere p101-Untereinheit in Abwesenheit der p110 γ im Cytosol abgebaut wird. Diese Befunde passen gut zu den Beobachtungen von Stephens und Mitarbeitern, nach denen bei der Reinigung von p101 oder p110 γ aus Sf9-Zellen die Ausbeute an p101 etwa zehnfach geringer war als die an p110 γ (Stephens et al., 1997). Interessanterweise konnten Baier und Mitarbeiter zeigen, daß die Behandlung von leukämischen U937-Zellen mit dem Retinoid ATRA (*all-trans retinoic acid*) zu einer selektiven Erhöhung der Expression der p110 γ , nicht aber der p101 führt. Es wäre also vorstellbar, daß die p110 γ nicht nur als Untereinheit im PI-3-Kinase γ -Heterodimer, sondern auch unabhängig von der p101-Untereinheit als monomere p110 γ Funktionen haben könnte, die sich möglicherweise von den Funktionen des p101/p110 γ -Heterodimers unterscheiden.

Interessanterweise sind die nicht-katalytischen p85-Untereinheiten der Klasse I_A PI-3-Kinasen auch als Monomere ohne p110-Untereinheiten stabil. Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß p85-Proteine neben ihrer Rolle als regulatorische Untereinheiten der heterodimeren Klasse I_A PI-3-Kinasen auch als Monomere bestimmte Funktionen haben könnten, insbesondere bei der Regulation cytoskelettaler Veränderungen (Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2001). Außerdem könnte ein Überschuß an freien p85-Untereinheiten zur Begrenzung der PI-3-Kinase-Signaltransduktion dienen, indem die freien p85-Untereinheiten mit den p85/p110-Heterodimeren um die Bindungsstellen der entsprechenden Stimuli konkurrieren (Ueki et al., 2002). Hingegen sind die katalytischen p110-Untereinheiten der Klasse I_A PI-3-Kinasen - ganz im Gegensatz zur p110 γ - als Monomere ohne eine p85-Untereinheit instabil (Yu et al., 1998a; Maier et al., 1999). Hingegen wurden bei den hier vorgestellten Experimenten keine Anzeichen auf eine Instabilität der monomeren YFP-p110 β gefunden (siehe Abb. 9). Vermutlich hat die am N-Terminus der p110 β angebrachte YFP-Markierung eine ähnliche protektive Wirkung wie eine an den N-Terminus einer p110-Untereinheit gebundene p85-Untereinheit.

5.6 Membranrekrutierung von heterodimerer PI-3-Kinase γ und monomerer p110 γ durch Ras

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die nicht-katalytische p101-Untereinheit der PI-3-Kinase γ für die Membranrekrutierung des Enzyms durch G β γ -Komplexe notwendig ist (siehe Kapitel 5.2, Abb. 42). Es gibt aber Hinweise darauf, daß die katalytische p110 γ -Untereinheit auch als Monomer ohne die nicht-katalytische p101-Untereinheit vorkommt (Baier et al., 1999). Über mögliche physiologische Funktionen einer monomeren p110 γ ist nichts bekannt. Wenn die monomere p110 γ wie eine heterodimere PI-3-Kinase durch Phosphorylierung von PtdIns-4,5-P₂ zu PtdIns-3,4,5-P₃ als *second messenger* wirken soll, muß sie also ebenfalls zunächst aus dem Cytosol an die Membran zu ihrem Substrat gelangen. Daher stellte sich die Frage, ob es einen Mechanismus gibt, durch den eine monomere p110 γ unabhängig von der für die Membranrekrutierung der PI-3-Kinase γ durch G β γ notwendigen p101-Untereinheit an die Membran gelangen kann. Man könnte spekulieren, daß die Zusammensetzung der Plasmamembran, insbesondere bezüglich ihrer anionischen Phospholipide, in bestimmten Zelltypen eine basale Membranassoziation der p110 γ ermöglichen könnte (siehe auch Kapitel 5.2). Eine weitere Möglichkeit wäre die Membranrekrutierung der p110 γ durch ein anderes Protein als G β γ . Hierfür käme das Membran-verankerte monomere GTP-bindende Protein Ras in Frage. Es war bekannt, daß die p110 γ - wie die p110-Untereinheiten der anderen Klasse I PI-3-Kinasen auch - eine der RBD des Raf ähnliche Ras-Bindungs-Domäne aufweist, über die sie mit GTP-gebundenem Ras interagieren kann, und daß die Klasse I PI-3-Kinasen auch durch GTP-gebundenes Ras aktiviert werden können (Rodriguez-Viciana et al., 1994; Pacold et al., 2000).

Hier wurde nun zum ersten Mal gezeigt, daß die PI-3-Kinase γ tatsächlich durch GTP-gebundenes Ras an die Membran rekrutiert wird, und zwar sowohl die heterodimere PI-3-Kinase γ , als auch die monomere p110 γ (siehe Abb. 38, Abb. 40). Somit könnte auch die monomere p110 γ indirekt über Ras durch Zelloberflächen-Rezeptoren reguliert werden. Ras wird wie erwähnt typischerweise über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (siehe Einleitung, Kapitel 1.2.1), kann aber auch über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und G β γ aktiviert werden (Gutkind et al., 1998). Interessanterweise war die durch Ras an die Membran rekrutierte heterodimere PI-3-Kinase γ gleichmäßig, die monomere p110 γ hingegen eher in Flecken an der Membran verteilt. Dieses unterschiedliche Verteilungsmuster deutet darauf hin, daß an der Membran möglicherweise noch weitere Moleküle spezifisch nur mit der monomeren p110 γ oder nur mit der heterodimeren PI-3-Kinase γ interagieren könnten. Es wäre vorstellbar, daß eine monomer vorkommende p110 γ nicht nur anders reguliert wird als eine heterodimere PI-3-Kinase γ , sondern möglicherweise auch andere Funktionen ausübt. Die physiologische Relevanz der Regulation der Klasse I PI-3-Kinasen durch Ras ist aber überhaupt noch relativ unklar. So wird z. B. auch diskutiert, daß Klasse I PI-3-Kinasen nicht nur Effektoren, sondern auch Regulatoren von Ras sein könnten (Wymann et al., 1998). Z. B. könnte das Ras durch

seine Bindung an die PI-3-Kinase vor dem Zugriff GTPase-aktivierender Protein geschützt werden und dadurch selbst länger aktiviert bleiben (Feig & Schaffhausen, 1994).

Im Widerspruch zu den hier vorgestellten Befunden haben Suire und Mitarbeiter kürzlich berichtet, daß sie überraschenderweise keine Membranrekrutierung der PI-3-Kinase γ durch Ras gefunden haben (Suire et al., 2002). Der Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse ist unklar. Im Unterschied zur hier vorgestellten Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung der subzellulären Lokalisation und Translokation der PI-3-Kinase γ in lebenden Zellen haben Suire und Mitarbeiter subzelluläre Fraktionierungen durchgeführt und die p110 γ -Immunoblot-Signale in den Membranfraktionen verglichen. Außerdem erscheinen die bei diesen Versuchen transfizierten Mengen an Ras- und PI-3-Kinase γ -Plasmiden relativ hoch (wenngleich natürlich der direkte Vergleich wegen der unterschiedlichen Transfektionsprotokolle schwierig ist). Eine theoretisch vorstellbare Fehlerquelle bei den Versuchen von Suire und Mitarbeitern wäre, daß jeweils die Zellen, die erfolgreich Ras und p110 γ coexprimierten, sich infolge unphysiologischer Dauerstimulation entsprechender Signalwege abgelöst haben (ähnlich wie bei der Coexpression der PI-3-Kinase γ mit freien G $\beta\gamma$ -Komplexen beobachtet; siehe Abb. 22), so daß bei der subzellulären Fraktionierung schließlich nur die Zellen verwendet wurden, die Ras und die PI-3-Kinase γ eben nicht coexprimierten.

Bezüglich der Stimulation der PI-3-Kinase-Aktivität der monomeren p110 γ durch Ras hatten Pacold und Mitarbeiter beschrieben, daß die monomere p110 γ durch GTP-gebundenes Ras alleine sowie synergistisch mit G $\beta\gamma$ stimuliert wird (Pacold et al., 2000). Dies konnte mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ansatz der Membranrekrutierung einer fluoreszierenden PtdIns-3,4,5-P₃-bindenden PH-Domäne als Nachweis für PI-3-Kinase Aktivität nicht bestätigt werden. Vermutlich beruht dies darauf, daß die Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch Ras nur relativ schwach und die Membrantranslokation der fluoreszierenden PH-Domäne nur begrenzt quantifizierbar ist, wobei die Aktivität der PI-3-Kinase γ noch von der Aktivität der in den HEK293-Zellen endogen exprimierten Klasse I_A PI-3-Kinasen überlagert wird, die ja ebenfalls durch Ras stimuliert werden.

5.7 Klasse I PI-3-Kinasen als mögliche Angriffspunkte für Pharmaka

Klasse I PI-3-Kinasen sind an der Regulation zahlreicher wichtiger zellulärer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung oder cytoskelettalen Veränderungen beteiligt - um nur einige zu nennen (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.3.5, Abb. 5). Fehler in PI-3-Kinase-vermittelten Signalwegen können somit zu verschiedenen pathologischen Veränderungen führen und konnten tatsächlich bei verschiedenen Erkrankungen nachgewiesen werden. Als Beispiel sind hier Tumorerkrankungen zu nennen. Klasse I PI-3-Kinasen selbst sind Proto-Onkogene, und

entsprechende Mutationen wurden in zahlreichen Tumoren gefunden (Vivanco & Sawyers, 2002). Der PI-3-Kinase-Effektor Akt/PKB war bereits als retrovirales Onkogen (v-Akt) bekannt, bevor seine Aktivierung durch die Lipidprodukte der Klasse I PI-3-Kinasen entdeckt wurde, und Mutationen seines zellulären Homologs werden ebenfalls in zahlreichen Tumoren gefunden (Vivanco & Sawyers, 2002). Die für die Begrenzung und Abschaltung der Signaltransduktion über die Lipidprodukte der Klasse I PI-3-Kinasen verantwortliche 3'-Phosphoinositid-Phosphatase PTEN ist ein Tumor-Suppressor (Cantley & Neel, 1999).

Klasse I PI-3-Kinasen stellen also einen möglichen Angriffspunkt für Pharmaka gegen Tumor- sowie verschiedene andere Erkrankungen dar. Ein großes Problem stellt hier allerdings die mangelnde Spezifität dar. Die meisten Kinase-Inhibitoren setzen an der ATP-Bindungsstelle der Enzyme an und blockieren die Bindung des ATP. Dies ist auch der Wirkungsmechanismus der bekannten PI-3-Kinase-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 (Walker et al., 2000). In höherer Konzentration hemmt Wortmannin z. B. aber auch unspezifisch nicht nur PI-3-Kinasen, sondern auch verschiedene andere Kinasen. Aber selbst ein Wirkstoff, der tatsächlich mit hoher Spezifität nur Klasse I PI-3-Kinasen und keine anderen Kinasen inhibiert, wäre als Pharmakon nicht geeignet, denn da Klasse I PI-3-Kinasen in allen Zellen vorkommen und an der Regulation verschiedenster wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt sind, hätte ihre Hemmung verheerende Folgen. Ein als Pharmakon einsetzbarer PI-3-Kinase-Hemmstoff müßte zumindest spezifisch für nur eine PI-3-Kinase-Isoform sein und möglichst nur in bestimmten Zellen wirken.

In diesem Zusammenhang gesehen wäre es vorstellbar, daß ein Pharmakon entwickelt werden könnte, das spezifisch nur die PI-3-Kinase γ (nicht aber die anderen Klasse I PI-3-Kinasen) hemmt, und das potentiell als Entzündungs-hemmendes Arzneimittel eingesetzt werden könnte. Denn erstens unterscheidet sich die Klasse I_B PI-3-Kinase γ ja in ihrer Struktur und Funktion deutlich von den Klasse I_A PI-3-Kinasen, und zweitens kommt die PI-3-Kinase γ nicht ubiquitär sondern vorwiegend in Leukozyten vor, wo sie wesentlich an der Regulation von entzündlichen und allergischen Prozessen beteiligt ist (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.3.5): Chemotaktische Migration und Superoxid-Produktion von neutrophilen Granulozyten (Sasaki et al., 2000; Li et al., 2000; Hirsch et al., 2000; Hannigan et al., 2002), Chemotaxis von Makrophagen (Hirsch et al. 2000), sowie Degranulation von Mastzellen (Laffargue et al., 2002). Die PI-3-Kinase γ kommt aber dennoch auch in einigen weiteren Geweben vor und übt dort andere wichtige Funktionen aus, z. B. bei der Kontrolle der Kontraktilität des Herzens (Crackower et al., 2002).

Ein einzigartiges strukturelles Merkmal der PI-3-Kinase γ ist ihre nicht-katalytische p101-Untereinheit, die keinerlei Ähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinen aufweist (Stephens et al., 1997). Die p101-Untereinheit könnte daher einen geeigneten Angriffspunkt für einen selektiven PI-3-Kinase γ -spezifischen Wirkstoff darstellen. Allerdings war bislang umstritten, welche Rolle die nicht-katalytische p101-Untereinheit für die Funktion der PI-3-Kinase γ spielt, zumal zumindest *in vitro* die katalytische p110 γ -Untereinheit auch als

Monomer ohne die p101-Untereinheit durch $G\beta\gamma$ stimuliert werden kann (Stoyanov et al., 1995; Leopoldt et al., 1998). Die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen *in vivo* sprechen dafür, daß die p101-Untereinheit für die G-Protein-vermittelte Stimulation der PI-3-Kinase γ in lebenden Zellen notwendig ist (siehe auch Kapitel 5.4). Die G-Protein-vermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase γ ließe sich also durch ein Molekül hemmen, das an der p101-Untereinheit angreift und entweder ihre Interaktion mit der p110 γ -Untereinheit einerseits oder mit $G\beta\gamma$ andererseits blockiert.

Während für die p110 γ -Untereinheit bereits die Kristallstruktur aufgeklärt ist (Walker et al., 1999), ist aber leider über die Struktur der p101-Untereinheit bzw. die Struktur des p101/p110 γ -Heterodimers erst wenig bekannt. Es wurde bislang lediglich beschrieben, daß die p101-Untereinheit an die N-terminale Hälfte der p110 γ -Untereinheit bindet, und daß an der Bindung der p101- an die p110 γ -Untereinheit weite Teile der p101 inklusive N- und C-Termini beteiligt sind (Krugmann et al., 1999). Im Einklang hiermit und darüber hinaus gehend sprechen die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Befunde zum Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen an den jeweiligen N- bzw. C-Termini der p101- und p110 γ -Untereinheit angebrachten Fluorophoren (siehe Abb. 12) für eine relative Nähe jeweils der beiden N-Termini sowie der beiden C-Termini der beiden Untereinheiten im p101/p110 γ -Heterodimer. Die $G\beta\gamma$ -Bindungsstelle der p101-Untereinheit ist leider nicht bekannt. Für ein rationales Design von Molekülen, die an die p101-Untereinheit binden und dadurch ihre Interaktion mit der p110 γ -Untereinheit oder mit $G\beta\gamma$ blockieren, gibt es also leider kaum eine Grundlage. Für die Identifizierung eines solchen Wirkstoffs müßten also eher Screening-Verfahren eingesetzt werden. Grundlage für ein entsprechendes Testsystem könnte die in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal beschriebene FRET-Messung zum Nachweis der Interaktion zwischen der p101- und der p110 γ -Untereinheit sein (siehe Abb. 12). Auf FRET basierende Verfahren werden bereits in der pharmazeutischen Industrie für das Screening von Wirkstoff-Banken eingesetzt. Alternativ zum willkürlichen Screening verschiedenster Moleküle im Hinblick darauf, ob sie die Interaktion zwischen p101 und p110 γ blockieren können (meßbar als Unterbinden des FRET zwischen den beiden Fluoreszenz-markierten Untereinheiten), könnten Peptid-Bibliotheken mit Peptiden aus der Sequenz der p101-Untereinheit getestet werden. Durch solche Untersuchungen ließe sich gleichzeitig mehr Information über die p110 γ -Bindungsstelle(n) der p101 ableiten. Als pharmazeutische Wirkstoffe wären natürlich Peptide weniger geeignet, sie könnten aber Grundlage für das Design von entsprechenden Peptid-ähnlichen Molekülen (Peptidomimetika) sein.