

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Prinzipien der Signalverarbeitung in lebenden Systemen

Die Integrität einer Zelle wird durch eine Barriere gewährleistet, die das „Innen“ und „Außen“ definiert und sie vor den schädlichen Einwirkungen der Umwelt schützt. Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Funktion einer Zelle in einem Verband ist die Wahrnehmung der Umgebung und eine angemessene und zeitgerechte Reaktion auf die Veränderungen der Umwelt. Dies setzt allerdings einen Mechanismus voraus, der die Veränderungen der Umgebung feststellt und die Information darüber ins Zellinnere weiterleitet. Die Aufgabe eines solchen Mechanismus besteht grundsätzlich darin, ein Signal zu erkennen (Rezeptorfunktion), dieses dann in ein inneres Signal umzuwandeln (Transduktorfunktion) und schließlich eine spezifische zelluläre Antwort auszulösen (Effektorfunktion). Die extrazellulären Signalmoleküle, auch Liganden genannt, sind unterschiedlicher chemischer Natur. Einige wie Steroidhormone können aufgrund ihrer Lipophilie die Zellmembran passieren und dort mit spezifischen intrazellulären Rezeptoren wechselwirken (Evans, 1988). Für die meisten Liganden jedoch ist die Zellmembran undurchlässig. Sie interagieren daher mit Rezeptoren, die sich an der Zelloberfläche befinden. Solche Rezeptoren durchspannen die Zellmembran und bestehen somit aus extrazellulären, transmembranären und intrazellulären Bereichen. Je nach dem Mechanismus ihrer Signalübertragung werden Rezeptoren in verschiedene Klassen eingeteilt. So unterscheidet man z. B. Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, Enzym-gekoppelte- oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

1) Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind Proteine oder Proteinkomplexe, die in der Zellmembran Poren bilden. Während sie im inaktiven Zustand geschlossen sind, führt die Bindung von spezifischen Liganden (z.B. Acetylcholin, Serotonin, GABA (γ -Aminobuttersäure)) zur Öffnung des Kanals für bestimmte Ionen und ändert dadurch das Membranpotential. Solche Rezeptoren sind z. B. an den schnellen Prozessen der synaptischen Signalübertragung beteiligt (Jentsch et al., 2002).

2) Allen Enzym-gekoppelten Rezeptoren ist gemeinsam, dass ihre intrazellulären Bereiche Domänen besitzen, die enzymatisch aktiv sind. Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zur Stimulation dieser enzymatischen Aktivität, und die Signalweiterleitung erfolgt durch Modifikation der nachgeschalteten Substratmoleküle bzw. generierten Enzymprodukte. Zu dieser Klasse gehören neben Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (zu ihnen gehören viele Wachstumsfaktor-Rezeptoren) und Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen, die

spezifische Proteinsubstrate phosphorylieren, auch Rezeptoren, die eine Phosphatase-Aktivität besitzen (wie Cdc-25) und entsprechende Substrate dephosphorylieren (Hunter, 1995). Weitere Vertreter dieser Rezeptorklasse sind Rezeptor-Guanylylcyclasen, die im aktivierten Zustand die Bildung von cGMP katalysieren (Garbers, 1990).

3) Im Gegensatz zu den Vertretern der vorher genannten Rezeptorklassen wirken G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) indirekt. Durch Liganden-induzierte Konformationsänderungen aktivieren sie ein trimeres Guaninnukleotid-bindendes Regulatorprotein (G-Protein), das dann seinerseits in der Lage ist, die Aktivität von Effektoren zu modulieren (Dohlman et al., 1991). Diese können sowohl membranständig, wie z.B. Adenylylcyclasen oder Ionenkanäle, als auch cytosolisch lokalisiert sein, wie es für die Phospholipase C- (PLC) oder Phosphatidylinositid-3-Kinase- (PI3K) Isoformen zutrifft (Hamm, 1998). Die Modulation dieser Effektorproteine führt dann zu einer Konzentrationsänderung der von ihnen gebildeten intrazellulären Botenstoffe („*second messenger*“), die weitere zelluläre Reaktionen auslösen und zur hormonal induzierten Zellantwort beitragen. Die mit GPCRs interagierenden Liganden umfassen unter anderem neben biogenen Aminen (z.B. Histamin), Aminosäuren (z.B. Glutaminsäure), Zuckern (z.B. Glukose), 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 (Gudermann et al., 1995, Ji et al., 1998).

Obwohl unser Kenntnisstand über die Wechselwirkungen der Liganden mit ihren Rezeptoren und den unmittelbar nachgeschalteten signalübertragenden Molekülen gut untersucht sind, bleibt dennoch in vielen Fällen die Frage unbeantwortet, wie ein bestimmter Agonist eine bestimmte Reaktion in der Zelle auslöst. Dies liegt vor allem an der Diversität intrazellulärer Moleküle, die ein Netzwerk von Signalübertragungskaskaden bilden. Allgemein geht man davon aus, dass die Selektivität der Signaltransduktion unter anderem durch spezifische Interaktion der Komponenten der Signalkaskaden, durch selektives Gewebeexpressionsmuster und eine subzelluläre Kompartimentierung gewährleistet wird.

1.2 G-Protein-abhängige Signaltransduktion

1.2.1 Aufbau und Funktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und G-Proteinen

GPCRs werden wahrscheinlich durch etwa 1% der Säugergene kodiert. Sie stellen damit eine der größten Proteinfamilien dar. Alle GPCRs bestehen aus sieben transmembranären

Helices, die durch drei unterschiedlich lange intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen verbunden sind (Bockaert und Pin, 1999). Die extrazellulären und transmembranären Bereiche des Rezeptors sind in die Bindung des Liganden involviert, während die intrazellulären Regionen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des G-Proteins spielen (Wess, 1997).

Die Bezeichnung „G-Protein“ leitet sich von der Affinität dieses Proteinkomplexes zu Guanosindiphosphat (GDP) bzw. Guanosintriphosphat (GTP) ab. G-Proteine sind vorwiegend an der Innenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert und aus drei Untereinheiten aufgebaut. (Neer, 1995, Nürnberg et al., 1995). Die $G\alpha$ -Untereinheit ist die größte Untereinheit (39-52 kDa). Sie bindet GDP bzw. GTP und katalysiert die Abspaltung des γ -Phosphats von GTP (GTPase-Aktivität). Aufgrund dieser Eigenschaft werden $G\alpha$ -Untereinheiten zu der Superfamilie der GTPasen gerechnet. Die $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten (35-40 kDa bzw. 6-8 kDa) bilden einen festen heterodimeren Komplex und werden daher als funktionelle Monomere angesehen (Clapham und Neer, 1997).

In seinem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand liegt das G-Protein als Heterotrimer vor und ist mit dem Rezeptor assoziiert. Die Wechselwirkung des Rezeptors mit seinem Liganden führt zu einer Konformationsänderung und Steigerung seiner GEF-Aktivität (guanine nucleotide exchange factor), was zu einem Austausch von GDP gegen GTP an $G\alpha$ 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 das $G\beta\gamma$ -Dimer (Logothetis et al., 1987, De Vries et al., 2000). Die beiden Moleküle können nun unabhängig voneinander mit Effektoren wechselwirken und diese modulieren. Die Terminierung der Signalweitergabe erfolgt durch die GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit durch Hydrolyse des GTPs zu GDP. Dadurch schwingt $G\alpha$ in seine ursprüngliche, inaktive Konformation zurück, wodurch seine Affinität zu 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.

Ein aktivierter Rezeptor kann mehrere G-Proteine aktivieren, was zu einer Signalverstärkung führt. Die Divergenz bzw. Konvergenz von Signalwegen wird dadurch beeinflusst, dass ein Rezeptor an verschiedene G-Proteintypen koppeln kann, bzw. verschiedene Rezeptorklassen nur eine bestimmte G-Proteinfamilie aktivieren (Gudermann et al., 2000). Die G-Proteine verbinden also Rezeptoren mit Effektoren und verstärken bzw. verteilen eingehende Signale.

1.2.2 $G\alpha$ -Untereinheit

Heterotrimere G-Proteine werden nach ihrer $G\alpha$ -Untereinheit bezeichnet. Mindestens 20 $G\alpha$ -Isoformen werden in Säugerzellen exprimiert. Ihre Klassifikation basiert auf Aminosäuren-Sequenzhomologien (Simon et al., 1991, Wilkie et al., 1992). Danach werden vier Subfamilien unterschieden, die als $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$ bezeichnet werden (Tab. 1). Neben dieser Nomenklatur werden die $G\alpha$ -Untereinheiten nach ihrer Sensitivität gegenüber bakteriellen Toxinen in Cholera-toxin-, Pertussis-toxin-sensitive und Pertussis-toxin-insensitive Formen voneinander abgegrenzt (Nürnberg, 2000).

Eine Analyse der Evolution der $G\alpha$ -Untereinheiten lässt einen Zusammenhang zwischen der wachsenden Zahl der G-Proteine und der Entstehung von neuen Zelltypen vermuten (Downes und Gautam, 1999). Diese Hypothese wird auch durch die hohe funktionelle Spezialisierung der $G\alpha$ -Untereinheiten unterstützt (Tab.1). Während $G\alpha_s$ ein spezifischer Aktivator von Adenylcyclasen ist, wirken $G\alpha_i$ -Proteine hemmend auf dieses Enzym. Die $G\alpha_q$ -Proteine sind als Aktivatoren von Phospholipasen des $C\beta$ -Typs bekannt.

Die Dauer des jeweiligen stimulierenden bzw. inhibierenden Signals und damit die Signalstärke wird hauptsächlich auf der Ebene der $G\alpha$ -Untereinheit reguliert bzw. der Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse durch die $G\alpha$ -Untereinheit. Zum einen zeichnen sich verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten durch unterschiedliche Kinetiken der GTP-Hydrolyse aus. Während z.B. $G\alpha_i$ - und $G\alpha_s$ -Familien eine hohe intrinsische GTPase Aktivität ($2-4 \text{ min}^{-1}$) *in vitro* zeigen, gehören die $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{12}$ -Familien mit einer GTP-Hydrolyserate von $0,012 \text{ min}^{-1}$ zu den "langsamen" GTPasen (Gilman, 1987, Linder et al., 1990, Berstein et al., 1992, Mukhopadhyay und Ross, 1999). Zum anderen kann die GTPase Aktivität der jeweiligen $G\alpha$ -Untereinheit durch RGS-Proteine oder Effektoren wie die PLC- β auf das Vielfache verstärkt werden (Arschavsky und Bownds, 1992, Ross und Wilkie, 2000).

Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass während eines Hydrolysezyklus $G\alpha$ -Untereinheiten mehrere Konformationszustände einnehmen, die vereinfacht in der folgenden Gleichung dargestellt sind (Sprang, 1997).



Bei dem ersten Schritt entsteht ein niedrigaffiner $G\alpha$ -GTP Komplex, der in Anwesenheit von Mg^{2+} Ionen in eine aktive Form $G\alpha^*$ -GTP übergeht. In diesem Zustand kann $G\alpha$ einige Effektoren modulieren und besitzt eine reduzierte Affinität zu $G\beta\gamma$. Die Hydrolyse des gebundenen GTP erfolgt über einen Übergangszustand $G\alpha^{**}$ -GTP, der die größte freie

Familie	Subtyp ¹	Vorkommen	Effektoren ²	Zelluläre Effekte ⁵
G_s	G _{s(s),s(l)}	ubiquitär	AC ↑ Ca ²⁺ -Kanal ↑	[cAMP] ↑ [Ca ²⁺] ↑
	G _{s(xl)}	?	AC ↑	[cAMP] ↑
	G _{olf}	olfaktorisches Epithel	AC ↑	[cAMP] ↑
G_i	G _{t(r,c)} ³	Retina	cGMP-PDE ↑	[cGMP] ↓
	G _{gust}	Geschmacksknospen	cGMP-PDE ↑	?
	G _{i1}	überwiegend neuronal	AC ↓ K ⁺ -Kanal ↓	[cAMP] ↓ ?
	G _{i2, i2(l)}	ubiquitär	AC ↓	[cAMP] ↓
	G _{i3}	überwiegend nicht-neuronal	AC ↓ K ⁺ -Kanal ↓	[cAMP] ↓ ?
	G _{o1, o2, o3}	neuronal, endokrin,	Ca ²⁺ -Kanal ↓	[Ca ²⁺] ↓
			DGK	[DAG] ↓
			rap1GAP ↑	?
	G _z	neuronal, endokrin, Thrombozyten	AC ↓? rap1GAP (?)	[cAMP] ↓ ?
G_q	G _q	ubiquitär	PLC-β ↑	[Ca ²⁺] ↑
	G ₁₁	nicht-hämatopoetische Zellen	PLC-β ↑	s.o.
	G ₁₄	Hoden, Milz, Nieren	PLC-β ↑	s.o.
	G _{15/16} ⁴	hämatopoetische Zellen	PLC-β ↑	s.o.
G₁₂	G ₁₂	ubiquitär	Rho-GEF ↑	↑Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
			Cadherin ↓	Inhibiert Zelladhesion
	G ₁₃	ubiquitär	Rho-GEF ↑	↑Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
			ASK-1 ↑	Induktion von Apoptosis

Tab. 1: Klassifizierung der heterotrimeren G-Proteine nach ihren Gα-Untereinheiten (nach Offermanns und Schultz, 1994, aktualisiert)

¹ (s) und (l) bezeichnen kurze bzw. lange Spleißvarianten der entsprechenden Gα-Untereinheit, (xl) bezeichnet eine Variante von Gα_s mit 74 kDa.

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

³ G_{t(r)} und G_{t(c)} bezeichnen Transduzine in Stäbchen- (engl.: „rod“) und Zapfenzellen (engl. „cone“) der Retina.

⁴ Gα_{15/16} sind Speziesvarianten von Maus bzw. Mensch.

⁵ cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; DAG: Diacylglycerol.

Energie aufweist. Diese Konformation zeichnet sich auch durch eine reduzierte Affinität zu Gβγ aus und die ausgeprägte Fähigkeit der Gα-Untereinheit, mit Effektoren bzw. RGS-

Proteinen (siehe 1.2.6.) zu interagieren. Der Nachweis der Existenz dieses Zustandes wurde durch die Kokristallisation von $G\alpha$ -GDP- AlF_4^- erbracht (Tesmer et al, 1997). Dabei besetzt das AlF_4^- -Ion die Stelle, die normalerweise die γ -Phosphatgruppe des GTP einnimmt. Die Hydrolyse und Dissoziation des γ -Phosphats erfolgt gleichzeitig im nächsten Schritt.

Die oben genannten Konformationsänderungen spielen sich hauptsächlich in drei Bereichen von $G\alpha$, in den sog. Switch-Regionen, ab. Durch gerichtete Mutagenese wurde bestätigt, dass selbst Punktmutationen in diesen Bereichen mit ausgeprägten spezifischen Funktionsänderungen verbunden sind. So führt z. B. ein Austausch von Arg 183 gegen Cys bei $G\alpha_q$ (R183C) oder Glu 205 gegen Ala bei $G\alpha_o$ (Q205A) zu einer deutlichen Reduktion der intrinsischen GTPase Aktivität, was in einer Daueraktivität und einer Insensitivität der $G\alpha$ -Untereinheiten gegenüber RGS-Regulation resultiert (Hajdu-Cronin et al, 1999, Ross und Wilkie, 2000).

Zusätzlich kann die Funktion von $G\alpha$ -Untereinheiten durch posttranslationale, kovalente Modifikationen reguliert werden. So werden z.B. einige $G\alpha$ -Untereinheiten wie $G\alpha_{i2}$ oder $G\alpha_z$ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* phosphoryliert. Diese strukturellen Veränderungen scheinen analog zu anderen Proteinen eine wichtige Rolle in der Organisation von regulatorischen Komplexen zu spielen (Fields und Casey, 1995; Aragay und Quick, 1999;) Weiterhin verfügen viele $G\alpha$ -Untereinheiten über kovalente Lipidmodifikationen. Je nachdem ob sie reversibler (z.B. Palmitoylierung) oder irreversibler (z.B. Myristoylierung) Natur sind, tragen diese Lipidmodifikationen zu einer Dauer- bzw. Kurzzeitregulation der Funktionen der $G\alpha$ -Untereinheiten bei (Chen and Manning, 2001).

1.2.3 $G\beta$ -Untereinheit

Strukturell bestehen $G\beta$ -Untereinheiten aus zwei unterschiedlichen Regionen. Am N-Terminus befindet sich eine etwa 20 Aminosäuren lange amphipathische α -Helix, die vermutlich eine superspiralisierte sekundäre Struktur (sog. coiled-coil) bilden kann (Lupas et al., 1992). Es folgen sieben Einheiten, die ein Wiederholungsmotiv (sog. WD-repeat) aufweisen. Dabei handelt es sich um ein etwa 23-41 Aminosäuren langes Segment, das meistens zwischen konservierten Glycin(G)-Histidin(H)- und Tryptophan(W)-Aspartat(D)-Tandems liegt (Watson et al., 1994).

Kristallographische Untersuchungen zeigen, dass jedes der insgesamt sieben WD40-Wiederholungsmotive ein β -Faltblatt bildet und diese wiederum zu einer Art Propeller zusammengefügt werden (Abb. 1). Es wird angenommen, dass die Spezifität der Interaktion

zwischen G β -Untereinheiten und anderen Proteinen dadurch gewährleistet wird, dass immer mehr als ein WD-repeat an der Wechselwirkung beteiligt ist (Neer, 1995).

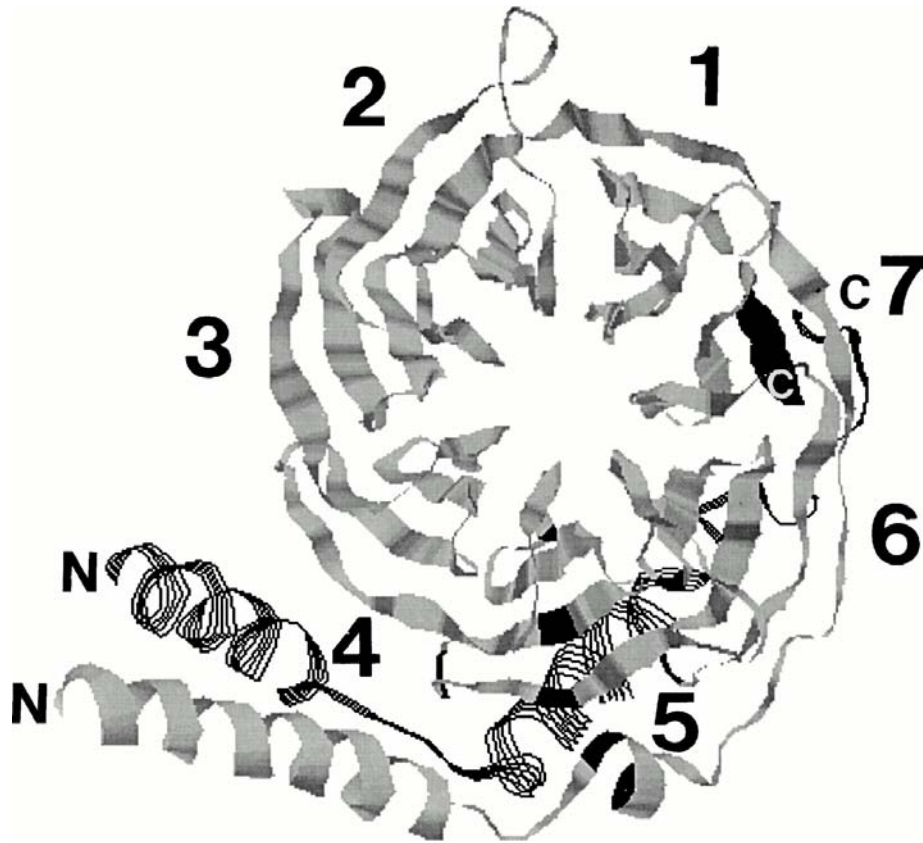


Abb. 1: Die Struktur des G $\beta_1\gamma_1$ -Komplexes

Die G β -Untereinheit (hellgrau) bildet eine 7-blättrige propellerartige Struktur, die in der Mitte eine wassergefüllte Pore besitzt. Die G γ -Untereinheit (gestreift) bildet zwei helikale Domänen und schmiegt sich an den „G β -Propeller“ an. Die N-Termini beider Untereinheiten interagieren über eine superspiralisierte sog. coiled coil-Struktur. Die Kontaktstellen beider Untereinheiten sind für die G β -Untereinheit schwarz markiert. (aus Clapham und Neer, 1997)

So scheint die Interaktion mit G γ -Untereinheit durch die superspiralisierten N-Termini und auch durch die im Bereich der „Propellerblätter“ 5 und 6 liegenden Aminosäuren bestimmt zu werden (Spring und Neer, 1994). Für die Interaktion mit der G α -Untereinheit sind die „Propellerblätter“ 1, 2 und 6 essentiell. Noch mehr als hundert weitere Säuger-Proteine beinhalten solche WD-Wiederholungsmotive und werden deshalb zu einer Superfamilie zusammengefasst. Obwohl sie an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind, scheinen sie jedoch eine Gemeinsamkeit zu haben. Sie bauen multimere Komplexe mit anderen Proteinen auf und verbinden Moleküle, die sonst nicht miteinander wechselwirken könnten (Clapham und Neer, 1997).

Die G β -Proteinfamilie umfaßt mittlerweile 7 Mitglieder und wie bei den G α -Untereinheiten werden auch G β -Untereinheiten auf Grund der DNA-Sequenzhomologien klassifiziert (Tab. 2). 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 etwa 50 % Aminosäureidentität eine größere Abweichung in der Primärstruktur (siehe 1.3).

G β -Untereinheiten			G γ -Untereinheiten		
<i>Subtyp</i> ¹		<i>Vorkommen</i>	<i>Subtyp</i> ⁴		<i>Vorkommen</i>
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 γ_{14}	nicht-neuronal ⁵
	G $\beta_{3(s)}$	ubiquitär ²	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 ³	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 neuronal

Tab. 2: G β - und G γ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine (nach Nürnberg, 1994, aktualisiert)

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 einer verkürzten Isoform von G β_3 , die durch alternatives Spleissing entsteht, wurde in Fibroblasten demonstriert (Siffert et al., 1998).

³ Die Expression von G β_5 ist bei der Maus nur auf neurales Gewebe beschränkt (Jones et al., 1998).

⁴ Bei der Benennung der G γ -Untereinheiten ist die Bezeichnung G γ_6 ausgenommen.

⁵ G γ_{11} und G γ_{14} gehören zu einer neuen Untergruppe von farnesylierten G γ -Untereinheiten, die sich an Phototransduktion nicht beteiligen (Balcueva et al., 2000).

1.2.4 *G γ -Untereinheit*

Die G γ -Familie umfaßt mittlerweile 12 Mitglieder, wobei der jüngste Vertreter, G γ_{13} , erst kürzlich kloniert und charakterisiert wurde (Huang et al., 1999). Obwohl die G γ -Untereinheiten mit 6-8 kDa deutlich kleiner sind, zeigt diese Familie 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) (Tab. 2). 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).

G γ -Untereinheiten sind an einem Cys-Rest an ihrem C-terminalen Ende isoprenyliert, worauf sich die Lipophilie der G $\beta\gamma$ -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 aliphatische 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). Wird Cystein durch eine andere Aminosäure (z. B. G γ_2 (C68S)) ersetzt, findet keine Isoprenylierung statt. Die nicht modifizierte G γ -Untereinheiten kann einen stabilen Dimer mit G β bilden, der im Gegensatz zu modifizierten G $\beta\gamma$ -Komplexen nicht membranassoziiert ist (Dietrich et al., 1992).

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 Rezeptor und Effektor zu spielen (Kisselev et al., 1994, Kisselev et al., 1995, Yasuda et al., 1996). Bei der Kopplung an G $\beta\gamma$ -regulierte Effektoren sind Unterschiede zu beobachten, je nachdem, ob G γ einen Farnesyl- oder Geranyl-Geranylrest trägt. 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 scheint jedoch sowohl die Aminosäuresequenz der G γ -Untereinheit als auch die Länge der Isoprenylierung zu den veränderten Eigenschaften beizutragen (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).

Für die Wechselwirkung zwischen G β_1 - und G γ_1 -Untereinheit scheinen die ersten 15 N-terminalen Aminosäuren und fünf weitere Aminosäuren innerhalb des Triplets Glu38-Glu39-Phe40 und Cys36-Cys37-Glu38 an der G γ_1 -Untereinheit wichtig zu sein. Ist der Komplex einmal gebildet, dissoziiert er nur unter denaturierenden Bedingungen, weshalb man bislang G $\beta\gamma$ -Dimere als funktionelle Monomere betrachtete (Clapham und Neer, 1997).

1.2.5 Die G $\beta\gamma$ -regulierten Effektoren

Nach der Entdeckung der G-Proteine konzentrierte sich das Interesse hauptsächlich auf die G α -Untereinheiten, die als die eigentlichen Signalüberträger angesehen wurden (siehe 1.2.2). Der erste Beleg, dass auch der G $\beta\gamma$ -Komplex die Effektormoleküle modulieren kann, wurde von Logothetis und Neer (Logothetis et al, 1987) erbracht, indem sie die Rezeptor-vermittelte Stimulation des K⁺-Kanals (I_{KACH}) durch gereinigte, rekonstituierte G $\beta\gamma$ -Dimere reproduzierten. Seitdem ist die Zahl der bekannten Effektoren, die durch G $\beta\gamma$ -Dimeren direkt moduliert werden, stetig angewachsen (Tab 3).

Jeder Effektor scheint seine spezifische Bindungsstelle an der Oberfläche der G β -Untereinheiten zu haben. Dabei, wie die Kristallstrukturanalysen und Mutagenesestudien zeigen, überlappen die Bindungsstellen von Effektoren mit denen von G α -Untereinheit (Sondek et al., 1996; Ford et al., 1998). Das erklärt warum die G α -Untereinheiten *in vivo* und *in vitro* die G $\beta\gamma$ -vermittelte Modulation mehrerer Effektoren blockieren können. Dabei entsteht offensichtlich ein Komplex, in dem G $\beta\gamma$ gleichzeitig mit Effektor und G α -Untereinheit interagiert (Runnels und Scarlata, 1998).

Effektor ¹	Modulation	Referenz
P-Rex1	↑	Welch et al., 2002
Phospholipase C-ε	↑	Wing et al., 2001
Phosphoinositid-3-Kinase ²	↑	Dekker und Segal, 2000
β-adrenerge Rezeptorkinasen ³	↑	Pitcher et al., 1998
Phospholipase C-β	↑	Exton, 1997
spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle	↓	Hofmann et al., 1997
K ⁺ -Kanäle (GIRKs) ⁴	↑	Jan und Jan, 1997
Na ⁺ -Kanäle	↑	Jan und Jan, 1997
Adenylylcyclase ⁵	↓, ↑	Sunahara et al., 1996
Ras-Austauschfaktor (p140 ^{Ras} -GRF)	↑	Mattingly und Macara, 1996
Raf-1-Protein-Kinase	↑	Pumiglia et al., 1995
Bruton-Tyrosinkinase (Btk)	↑	Tsukada et al., 1995
Tsk-Tyrosinkinase	↑	Langhans-Rajasekaran et al., 1995
Phospholipase A ₂	↑	Jelsema und Axelrod, 1987

Tab. 3: Gβγ-regulierte Effektoren ↑ = Stimulation; ↓ = Hemmung

¹Es wurden nur Effektoren berücksichtigt, die direkt mit Gβγ interagieren.

²Gβγ stimuliert die PI3Kβ- und PI3Kγ-Isoformen

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

⁴GIRK: (engl.) *G protein-gated inwardly rectifying K⁺-channel*; G-Protein-regulierter einwärts gleichrichtender K⁺-Kanal

⁵Gβγ inhibiert die Gα_s-aktivierten Adenylylcyclase-Isoformen I, V und VI und stimuliert die Gα_s-aktivierten Adenylylcyclase-Isoformen II und IV.

1.2.6 G-Protein Regulatoren

Die intrinsische Enzymaktivität monomerer GTPasen ist sehr gering und wird durch andere Proteine reguliert. Zu den wichtigsten zählen die Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (GEF: **g**uanine **n**ucleotide **e**xchange **f**actor) und die GTPase-aktivierenden Proteine (GAP: **G**TPase **a**ctivating **p**rotein). Während die GEFs monomere GTPasen durch Katalyse des GDP-GTP-Austausches in einen aktiven Zustand versetzen und somit die Signalweiterleitung ermöglichen, trägt die Stimulation der GTPase-Aktivität durch GAPs zur Abschaltung der Signaltransduktion bei. Die Suche nach der analogen Regulation bei heterotrimeren G-Proteinen führte zur Identifizierung von AGS-(**a**ctivators of **G**-protein **s**ignaling) und RGS-Proteinen (**r**egulators of **G**-protein **s**ignaling), sowie zur Eingrenzung des sog. GPR-Motifs (**G**-Protein **R**egulator), das für die Proteine charakteristisch ist, die mit Gα interagieren oder

es regulieren (Arshavsky et al., 1992, Siderovski et al., 1996, Druey et al., 1996, Cismowski et al., 1999, Takesono et al., 1999).

Zur Zeit besteht die vor kurzem entdeckte AGS-Proteinfamilie nur aus drei Mitgliedern. Ihre Expression in der Zelle führt zu der Aktivierung G-Protein abhängiger Signalwege. Dies erfolgt prinzipiell über verschiedene Mechanismen. Während AGS-1 eine GEF-Aktivität für die $G\alpha_{i/o}$ -Subfamilie aufweist, stabilisiert AGS-3 $G\alpha_i$ -Untereinheiten in ihrer GDP-gebundenen Form und entfaltet dabei eine sog. GDI- (guanin dissociation inhibitors) Aktivität. AGS-2 interagiert nicht mit $G\alpha$ -Untereinheiten, bindet aber $G\beta\gamma$ Komplexe (Natochin et al, 2000, Cismowski et al., 2001).

Die Entdeckung von AGS-Proteinen unterstützt die Hypothese, dass heterotrimere G-Proteine sich unabhängig von heptahelikalen Rezeptoren an der Signaltransduktion beteiligen können (Peterson et al., 2000).

Die Entdeckung von RGS-Proteinen und die Erkenntnis, dass sie die intrinsische GTPase-Aktivität von $G\alpha$ -Untereinheiten stimulieren, kann die Diskrepanz zwischen der schnellen Deaktivierung von Signalkaskaden *in vivo* und der langsamen Hydrolyse des GTP durch die $G\alpha$ -GTPase-Aktivität *in vitro* erklären. Alle RGS-Proteine beinhalten eine konservierte RGS-Domäne, die für die GAP-Aktivität (GTPase activating protein) *in vitro* essentiell und ausreichend ist. Ihr Substrat ist die GTP-gebundene $G\alpha$ -Untereinheit und ihre biologische Rolle besteht in der Verkürzung der Dauer eines Signals in den G-Protein-abhängigen Signalwegen. *In vitro*-Rekonstitutionsexperimente deuten darauf hin, dass RGS-Proteine multimere Komplexe mit $G\alpha$ -Untereinheiten und Effektoren bilden, wobei die Spaltung des GTPs, d.h. die Termination des Zykluses, erst nach der Interaktion mit dem Effektor und damit erst nach der Signalweiterleitung erfolgt. Interessanterweise besitzen manche Effektoren selbst eine GAP-Aktivität oder verstärken die Wirkung von RGS-Proteinen (Ross und Wilkie, 2000).

Der Mechanismus der GAP-Aktivität beruht auf der Erniedrigung der Gibbs'schen freien Aktivierungsenergie, was über die Stabilisierung des Übergangszustandes der GTP-gebundenen $G\alpha$ -Untereinheit ($G\alpha^{**}$ -GTP) erreicht wird (siehe 1.2.2). *In vitro* können viele RGS-Proteine mit mehreren Subfamilien von $G\alpha$ -Untereinheiten wechselwirken. Diese geringe Substratspezifität scheint nicht mit der immer wachsenden Zahl der entdeckten RGS-Proteinen zu korrelieren. Man geht davon aus, dass die Selektivität durch Anwesenheit von weiteren Faktoren wie Proteinen oder Phospholipiden entscheidend mitbeeinflusst wird (Arshavsky und Bownds, 1992).

Basierend auf DNA-Sequenzhomologie-Untersuchungen werden RGS-Proteine in Subfamilien aufgeteilt. Über die RGS-Domäne hinaus besitzen viele Familienmitglieder

weitere konservierte Bereiche, die eine spezifische Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen (Hepler, 1999).

1.3 Das G-Protein β_5

Bei der Klonierung von $G\beta_4$ -Untereinheit aus einer murinen cDNA-Bank wurde ein zunächst unbekanntes Fragment isoliert, das eine auffallende Homologie zu den bereits bekannten $G\beta$ -Untereinheiten aufwies. Die komplette cDNA von 1059 Basenpaaren, die das genannte Fragment enthielt und das korrespondierende ~38,7 kDa große Protein wurden aufgrund seiner Ähnlichkeit zu $G\beta$ -Untereinheiten $G\beta_5$ genannt (Watson, et al., 1994).

Da $G\beta_5$ der Subfamilie von $G\beta$ -Proteinen angehört, lag bei dessen Entdeckung die Vermutung nahe, dass es ähnliche funktionelle Eigenschaften wie die bisher bekannten Vertreter dieser Proteinfamilie aufweisen könnte. So fand man bei den Untersuchungen tatsächlich bei $G\beta_5$ grundlegende biochemische Eigenschaften, die es als $G\beta$ -Untereinheit qualifiziert. Es bildete einerseits heterotrimere Komplexe mit $G\gamma_2$ und $G\alpha_{i2}$, andererseits modulierte es in Komplex mit $G\gamma$ -Untereinheit die klassischen $G\beta\gamma$ -Effektoren wie PLC- β_2 und Adenyllylcyclasen (Watson A., et al., 1994, Bayewitch et al., 1998).

Gewebeexpressionsuntersuchungen zeigten, dass $G\beta_5$ vorwiegend neuronal vorkommt, während die klassischen $G\beta$ -Untereinheiten ein eher ubiquitäres Expressionsmuster aufweisen (Watson et al., 1994 und Tab.3). Später wurde das $G\beta_5$ spezifische m-RNA auch in weiteren Organen wie Herz, Nieren, Pankreas und Leber nachgewiesen (Jones et al., 1998).

Die Sequenzvergleichsanalyse zeigt, dass $G\beta_5$ den geringsten Verwandtschaftsgrad unter den bekannten $G\beta$ -Untereinheiten aufweist (Abb. 2). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass $G\beta_5$ einer neuen Klasse von $G\beta$ -Proteinen angehören könnte (Watson, et al., 1994). $G\beta$ -Proteine stammen entwicklungsgeschichtlich von einem Gen ab, das für die einzige $G\beta$ -Untereinheit bei einzelligen Organismen (z.B. STE4-Gen in Hefe) kodiert. Die erste genetische Divergenz innerhalb der $G\beta$ -Proteinfamilie lässt sich schon bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* feststellen, dessen Genom zwei $G\beta$ -Proteine beinhaltet: GPB1 (Orthologes für $G\beta_1$) und GPB2 (Orthologes für $G\beta_5$) (Downes und Gautam, 1999). Bemerkenswerterweise weisen sowohl niedere als auch höhere Organismen mindestens zwei Spleißvarianten des $G\beta_5$ auf (Watson et al., 1996; Robatzek et al., 2001).

Ungewöhnlich für eine $G\beta$ -Untereinheit ist die subzelluläre Verteilung von $G\beta_5$. Im Hirn wird z.B. neben dem membrangebundenen Anteil etwa 30-40% der Gesamtmenge von $G\beta_5$ in der cytosolischen Fraktion gefunden (Watson et al., 1994), während $G\beta_{1-4}$ -immunoreaktives Signal ausschließlich membranassoziiert vorliegt.

Die wachsende Zahl von $G\beta$ -Isoformen und der von ihnen regulierten Effektoren wirft

die Frage der Selektivität ihrer Interaktionen auf. Durch die *in vitro* Rekonstitutionsexperimente konnten nur geringfügige funktionelle Unterschiede zwischen G β -Isoformen gezeigt werden (Iñíguez-Lluhi et al., 1992; Clapham und Neer, 1997), während G α -Untereinheiten unter ähnlichen Bedingungen eine familienspezifische Selektivität bei der Effektormodulation aufweisen (1.2.2).



Abb. 2: Analyse der Proteinsequenzen von G β -Untereinheiten.

Von den abgeleiteten Proteinsequenzen von rG β 1 (Genbank # P54311), mG β 2 (Genbank # P54312), m β 3 (Genbank # Q61011), mG β 4 (Genbank # P29387), mG β 5 (Genbank # P54314) und STE4 (Genbank # P18851) wurde im Programm-Modul Megalign des Programmes DNASTAR nach Clustal-Methode die dargestellte phylogenetische Verwandtschaft und die Ähnlichkeit/Divergenz der Proteinsequenzen berechnet.

Die Untersuchungen von Schultz, Wittig und Mitarbeiter erlauben den Schluss, dass die Selektivität der Effektormodulation durch G β -Untereinheiten *in vivo* über den Rezeptor definiert wird, an dem sie koppeln (Kleuss et al., 1992). Da die Kopplung der G β -Untereinheiten an Rezeptor über die Interaktion mit G α und G γ zu erfolgen scheint, könnten die strukturell sehr ähnlichen G β 1-4-Untereinheiten nur Module darzustellen, deren Effektorselektivität letztendlich durch G α und G γ festgelegt wird. Der erste Hinweis auf eine G α - und G γ -unabhängige Effektorselektivität von G β -Untereinheiten konnte dadurch geführt werden, dass funktionell aktive G β 5 γ 2-Komplexe nicht in der Lage waren, den G β γ -abhängigen MAP-Kinase und Jun-Kinase Signalweg zu regulieren (Zhang et al, 1996). Diese Selektivität deutete auf ein neues, von den klassischen G β -Untereinheiten abweichendes Spektrum der Funktionen von G β 5 in der Signaltransduktion hin.

Die Entdeckung von G β 5 warf erneut die Frage der biologischen Bedeutung der Vielfalt von G β -Proteinen auf und bot gleichzeitig ein Vergleichsobjekt bei den Untersuchungen der Spezifität der Interaktionen von G β -Untereinheiten im Rahmen zellulärer Signaltransduktion.

Als Abgrenzung zu G β 5 werden G β 1-4 oft als klassische G β -Untereinheiten bezeichnet. Diese Bezeichnung wird auch hier verwendet.