

---

# **1 EINLEITUNG**

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind für die Zellen vielzelliger Organismen Sensoren, um Botenstoffe anderer Zellen und äußere Reize wahrzunehmen. Ihre Aktivität steuert zelluläre Prozesse wie Metabolismus und Differenzierung. Für die Weiterleitung der Signale von Rezeptoren haben sich verschiedene Signalwege herausgebildet. Einer dieser Wege führt von der Rezeptoraktivierung über die Aktivierung der heterotrimeren stimulatorischen und inhibitorischen G-Proteine ( $G_S$  und  $G_I$ ) zur Adenylylcyclase [Simonds 1999].

Heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine („G-Proteine“) setzen sich aus einer  $\alpha$ -Untereinheit und dem Komplex der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten zusammen [Hamm 1996]. Von der  $\alpha$ -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins ( $G\alpha_S$ ) sind vier Spleißvarianten bekannt, deren relative Expression zwischen Geweben und zu verschiedenen Zeitpunkten in der Ontogenese variiert wird. Über die Bedeutung der Spleißvarianten existieren nur unvollständige und zum Teil widersprüchliche Untersuchungen.

Mit der Vielfalt ihrer Aktivatoren und der durch sie gesteuerten Prozesse sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auch wichtige Angriffspunkte für Arzneistoff-basierte Therapien. So sind mehr als 50 % der pharmazeutisch genutzten Wirkstoffe Liganden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [Flower 1999]. Es ist daher essentiell, ein detailliertes Verständnis der Physiologie der Rezeptoren und der von ihnen abhängigen Signaltransduktionskaskaden zu entwickeln. Im Folgenden werden die Elemente der Signalkaskade vom Rezeptor bis zur Adenylylcyclase näher beschrieben. Insbesondere werden bisherige Befunde über die Eigenschaften der Spleißvarianten dargestellt.

## **1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren**

Um auf ihre Umgebung reagieren zu können, ist die Erkennung extrazellulärer Signale (chemischer Signale wie Neurotransmitter, Cytokine und Peptidhormone, aber auch physikalischer Signale wie Licht) für Zellen von grundsätzlicher Bedeutung. Die Mehrzahl dieser Signale wird von Rezeptoren auf der Zelloberfläche aufgenommen. Für die Signalweiterleitung werden in der Natur zwei grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen gefunden. Ein Prinzip ist die direkte Kopplung des extrazellulären Ereignisses an Enzymaktivitäten, wie z. B. bei Rezeptortyrosinkinasen [Lowes 2002] und ligandgesteuerten Ionenkanälen [Dascal 2001]. Dem gegenüber stehen Signalkaskaden, welche die

---

ursprüngliche Information in Pegelveränderungen von sekundären Botenstoffen (*second messenger*) umsetzen. Dazu gehören G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), deren Signale über G-Proteine die Aktivität von Adenylylcyclasen [Sunahara 2002], Phospholipase C [McCudden 2005] und anderen Enzymen steuern. Ersteres Enzym produziert den *second messenger* zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP), letzteres Enzym produziert Diacylglycerol sowie Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>). Von der cAMP-Konzentration ist die Aktivität der Proteinkinase A abhängig, die IP<sub>3</sub>-Konzentration bestimmt die Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen.

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bilden vor den Rezeptortyrosinkinasen [Patel 2004] und den ligandgesteuerten Kanälen [Wickman 1995] die größte Gruppe von Plasmamembran-durchspannenden Rezeptoren. Etwa 800 mutmaßlich GPCR-kodierende Gene wurden im Rahmen des *Human Genome Project* [Lander 2001] identifiziert. Das entspricht etwa 2 % der insgesamt gefundenen Gene. Bei der Maus liegen Umfang und Anteil am Genom in der gleichen Größenordnung [Fredriksson 2005].

Neben der Fähigkeit zur Kopplung an heterotrimere G-Proteine ist ihre Tertiärstruktur ein gemeinsames Merkmal der GPCR. Aufgrund von Hydrophobizitätsanalysen der Primärstruktur wird davon angenommen, dass bei jedem GPCR die hydrophoben Bereiche sieben Transmembrandomänen bilden. Diese Annahme konnte mit der Aufzeichnung einer Kristallstruktur für Rhodopsin, dem Lichtrezeptor-Molekül der Stäbchen- und Zapfenzellen im Auge, unterstützt werden [Palczewski 2000].

Die Vielfalt der GPCR wird nach funktionellen und phylogenetischen Ähnlichkeiten klassifiziert. Es werden drei Hauptfamilien (auch Klans genannt) unterschieden. Entsprechend der von Bockaert und Pin [Bockaert 1999] vorgeschlagenen Nomenklatur werden diese Familien in der vorliegenden Arbeit mit arabischen Zahlen bezeichnet. Die Klassifikation von Attwood und Findlay verwendet Großbuchstaben des lateinischen Alphabets [Attwood 1994]. Zwischen den Rezeptoren aus verschiedenen Familien bestehen praktisch keine Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen. Es ist umstritten, ob die Evolution der GPCR ein Beispiel für molekulare Konvergenz darstellt [Bockaert 1999], oder ob eine sehr frühe Trennung in der Evolution zur heutigen hohen Diversität geführt hat [Perez 2003].

Aus der großen Anzahl von Rezeptoren sollen in diesem Abschnitt nur die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vertreter vorgestellt werden. Eine umfassende Übersicht

---

über die Klassifikation der GPCR bietet beispielweise die regelmäßig aktualisierte Datenbank GPCRDB [Horn 2003].

Die **Familie 1**, als deren Prototyp das Rhodopsin angesehen wird, hat mit Abstand die meisten Mitglieder. Die gemeinsame Abstammung dieser Rezeptoren wird durch konservierte Aminosäure-Motive (NSxxNPxxY in Transmembrandomäne 7 und DRY am Übergang zwischen Transmembrandomäne 3 und intrazellulärer Schleife 2) belegt [Fredriksson 2003]. Die Familie wird weiter unterteilt, die Unterfamilien unterscheiden sich insbesondere in den Domänen des Moleküls, die an der Ligandenbindung beteiligt sind:

- 1a** Diese Gruppe hat biogene Amine, wie z. B. Katecholamine, als Liganden. Diese binden innerhalb der Transmembrandomänen 3 bis 6 an den Rezeptor [Bockaert 1999]. Vertreter dieser Gruppe sind der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor und der Histamin- $H_2$ -Rezeptor.
- 1b** Eine weitere Gruppe von Rezeptoren wird durch kurze Peptide, wie Endotheline, Neurokinine und Opioide, aktiviert. Der Ligand wird bei dieser Gruppe im Bereich des N-Terminus und einer extrazellulären Schleife gebunden [Bockaert 1999]. Zu dieser Gruppe gehört der Vasopressin-Rezeptor.
- 1c** Die Liganden dieser Gruppe sind Glykoproteine von hohem Molekulargewicht. Der extrazellulär gelegene N-Terminus ist bei dieser Gruppe länger als in den Unterfamilien 1a und 1b und trägt Interaktionsstellen für die Glykoproteine. In der vorliegenden Arbeit wird der Luteinisierungshormon-(LH-)Rezeptor als Vertreter dieser Kategorie untersucht.

Die **Familie 2** besteht aus ca. 25 Mitgliedern, deren Liganden große Peptide wie die gastrointestinalen Peptidhormone (Secretin, Glucagon, vasoaktives intestinales Protein (VIP), Calcitonin) sind. Die Liganden binden ähnlich wie bei Gruppe 1c am etwa 60-80 Aminosäuren langen N-Terminus des Rezeptormoleküls [Pantaloni 1996].

Zur **Familie 3** gehören metabotrope Glutamatrezeptoren, der B-Subtyp der  $\gamma$ -Aminobuttersäure-(GABA<sub>B</sub>-)Rezeptoren und Pheromonrezeptoren. Ihre Ligandenbindungsdomäne ist mit 280-580 Aminosäuren sehr groß und zeigt Verwandtschaft zu bakteriellen periplasmatischen Aminosäure-Bindeproteinen [O'Hara 1993].

Die folgende Tabelle fasst die Gruppen zusammen, und stellt Rezeptoren vor, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Zusätzlich ist jeweils ein Beispiel für eine

physiologische Funktion im menschlichen Organismus, bei der die Rezeptoren eine zentrale Rolle spielen, angegeben.

Familie	Unterfamilie	Beispielrezeptor	Physiologische Bedeutung
1	1a	$\beta_2$ -adrenerger Rezeptor	Sympathische Erregung des Herzmuskels
		Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptor	Erhöhung der Magensaftsekretion durch die Magenschleimhaut
	1b	Vasopressin-V2-Rezeptor	Erhöhung der renalen Wasserretention
	1c	LH-Rezeptor	Steuerung von Follikelreifung und Ovulation
2		Secretin-Rezeptor	Aktivierung der Pankreassekretion
		Glucagon-Rezeptor	Steuerung der Glykogenolyse in der Leber (insulinantagonistische Wirkung)
		Calcitonin-Rezeptor	Steuerung der Calcium- und Phosphatkonzentration im Blut

**Tabelle 1: Einordnung der Rezeptoren, deren Interaktion mit  $G\alpha_s$  in dieser Arbeit untersucht wurde.** In der rechten Spalte ist jeweils ein typisches Beispiel für die physiologische Relevanz des Rezeptors angegeben.

Rezeptoren übertragen die Information über die Bindung eines Liganden von der Zellaußen- auf die Zellinnenseite. Mit Bindung des extrazellulären Liganden ändert das Rezeptormolekül auf der zytoplasmatischen Seite seine Konformation [Stenkamp 2005]. Ein Molekül eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors kann anschließend mehrere G-Protein-Moleküle aktivieren, und somit eine Signalverstärkung bewirken [Alousi 1991].

## **1.2 G-Proteine**

In der Signaltransduktion treten Guaninnukleotid-bindende Proteine als monomere und heterotrimere Formen auf. Ausschließlich heterotrimere G-Proteine sind an der Signalübertragung zwischen GPCR und der Adenylylcyclase beteiligt. Die heterotrimeren G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ -Untereinheit, welche die Guaninnukleotid-Bindungsstelle trägt, und dem Komplex der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheiten gehören zur Superfamilie der GTP-hydrolysierenden Enzyme (GTPasen), welche auch Faktoren der Proteinsynthese wie den Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) umfasst. Anhand von Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz und funktionellen Eigenschaften werden die 16 derzeit bekannten

$\alpha$ -Untereinheiten in vier Gruppen eingeteilt ([Simon 1991], Tabelle 2). Die meisten  $\alpha$ -Untereinheiten werden ubiquitär exprimiert. Ausnahmen davon sind die mit der Aufnahme von Sinnesreizen verbundenen Untereinheiten ( $G_{olf}$ ,  $G_{gust}$ ,  $G_{t1}$ ,  $G_{t2}$ ) und das nur im hämatopoetischen System vorkommende  $G_{15/16}$  [Downes 1999].

$\alpha$ -Untereinheit	Expression	Effektorbeispiel
<b>Unterfamilie <math>G_s</math></b>		
$G_s$	ubiquitär	Adenylylcyclase (Stimulation)
$G_{olf}$	Riechepithel	Adenylylcyclase (Stimulation)
<b>Unterfamilie <math>G_i</math></b>		
$G_{i1}$	weit verbreitet	Adenylylcyclase (Inhibition)
$G_{i2}$	ubiquitär	Adenylylcyclase (Inhibition)
$G_{i3}$	weit verbreitet	Adenylylcyclase (Inhibition)
$G_o$	vorwiegend im Hirn	Adenylylcyclase (Inhibition)
$G_z$	vorwiegend in Hirn und Blutplättchen	Adenylylcyclase (Inhibition)
$G_{t1}$	Stäbchenzellen der Retina	Phosphodiesterase
$G_{t2}$	Zapfenzellen der Retina	Phosphodiesterase
$G_{gust}$	Geschmacksknospen	Phosphodiesterase
<b>Unterfamilie <math>G_q</math></b>		
$G_q$	ubiquitär	Phospholipase C- $\beta$
$G_{11}$	ubiquitär	Phospholipase C- $\beta$
$G_{14}$	Niere, Lunge, Milz	Phospholipase C- $\beta$
$G_{15/16}$ <sup>a</sup>	hämatopoetisches Gewebe	Phospholipase C- $\beta$
<b>Unterfamilie <math>G_{12/13}</math></b>		
$G_{12}$	ubiquitär	p115RhoGEF
$G_{13}$	ubiquitär	p115RhoGEF

**Tabelle 2: Die Einteilung der  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine.** Die Gewebeverteilung wurde angegeben nach [Downes 1999]. Für die Effektoren wurde jeweils ein Vertreter ausgewählt [Malbon 2005].

<sup>a</sup> Die Variante wird artspezifisch bezeichnet:  $G_{15}$  bei der Maus,  $G_{16}$  beim Menschen [Offermanns 2000]

Die Vielfalt der  $\alpha$ -Untereinheiten spiegelt sich in der Vielfalt ihrer Effektoren wider (Übersichtsartikel [Malbon 2005]). Die G-Proteine der Gruppe  $G_i$  wurden ursprünglich als Inhibitoren der Adenylylcyclase identifiziert [Londos 1978]. Weitere Interaktionspartner sind  $K^+$ -Kanäle ( $G_i$  [Codina 1987]),  $Ca^{2+}$ -Kanäle ( $G_i$  [Yatani 1987],  $G_o$  [Hescheler 1987]) und cGMP-spezifische Phosphodiesterasen ( $G_{t1}$ ,  $G_{t2}$ ,  $G_{gust}$  [Wheeler 1977]). Viele Effekte der G-Proteine, wie die Regulation von Phospholipase C und Adenylylcyclasen, werden nicht nur durch die  $\alpha$ -Untereinheit, sondern auch durch die  $\beta\gamma$ -Komplexe vermittelt

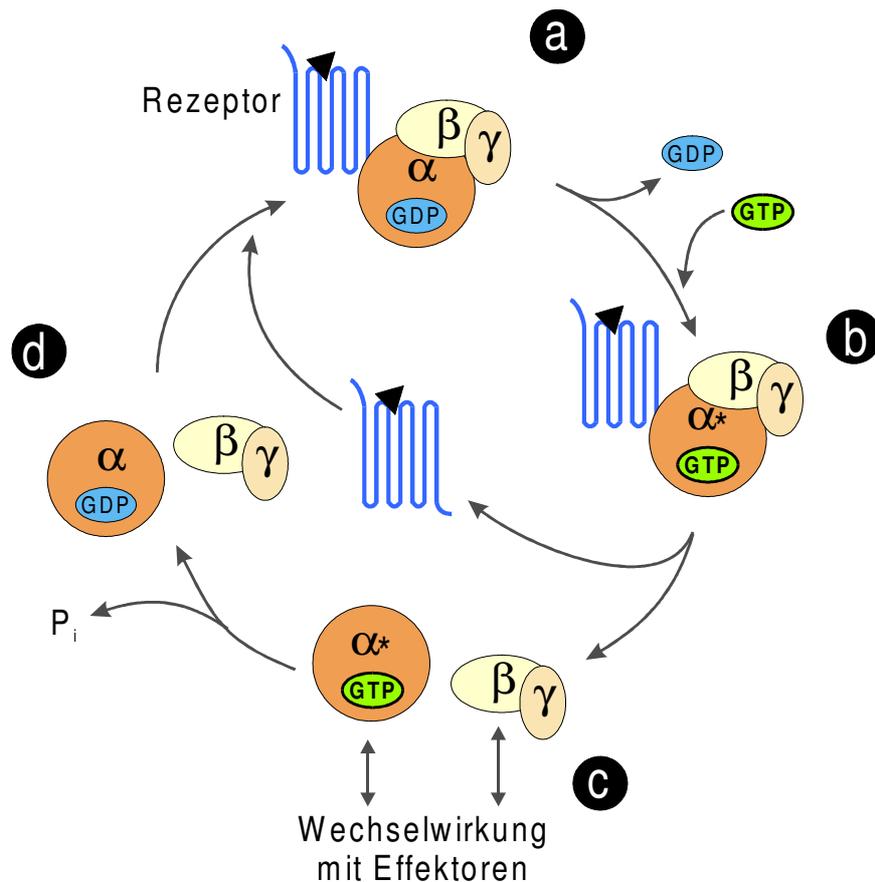
([Clapham 1997], vgl. Abschnitt 1.3). Die Gruppe der stimulatorischen G-Proteine ( $G_s$ ,  $G_{olf}$ ) wurde ursprünglich durch ihre Fähigkeit zur Stimulation der Adenylcyclase nachgewiesen [Rodbell 1971], daneben sind die Interaktionen dieser Gruppe mit weiteren Proteinen weit weniger gut charakterisiert. Sie werden im Abschnitt 5.4 diskutiert.

### **1.2.1 Der Aktivierungs- und Deaktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine**

Die  $\alpha$ -Untereinheit ist ein signalübertragendes Element zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Effektoren. Diese Funktion ist direkt mit ihrer Eigenschaft als GTPase verknüpft. Der im Folgenden beschriebene Aktivierungs-/ Deaktivierungszyklus trifft für alle  $\alpha$ -Untereinheiten ( $G\alpha$ ) heterotrimerer G-Proteine zu. Im transduktionsinaktiven Zustand bildet  $G\alpha$  ein Heterotrimer mit dem Komplex aus  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Aus funktioneller Sicht ist das G-Protein ein Dimer, da die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten nur unter denaturierenden Bedingungen dissoziieren [Sternweis 1986]. Die  $\alpha$ -Untereinheit hat im katalytischen Zentrum Guanosindiphosphat (GDP) gebunden (Abbildung 1a, Übersichtsartikel [Hamm 1998]). Die Aktivierung des G-Proteins wird durch den Kontakt mit einem aktivierten GPCR ausgelöst. Der Rezeptor bewirkt im ersten Schritt die Dissoziation des GDP von der  $\alpha$ -Untereinheit. Der verbleibende Komplex aus Rezeptor und nukleotidfreiem G-Protein bindet GTP, welches unter physiologischen Bedingungen im Überschuss gegenüber GDP vorliegt (Abbildung 1b). Der erste Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend für den gesamten Aktivierungsvorgang [Cassel 1978].

Durch den Nukleotid-Austausch vollzieht die  $\alpha$ -Untereinheit Konformationsänderungen, die sich besonders in den sogenannten Schalter- (*switch*-)Regionen auswirken (vgl. Abschnitt 1.2.2.3). Daraufhin sinkt die Affinität zum  $\beta\gamma$ -Komplex und die  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert von diesem Komplex [Lee 1992]. Sowohl die  $\alpha$ -Untereinheit als auch der  $\beta\gamma$ -Komplex können mit Effektoren interagieren und deren Aktivität modulieren (Abbildung 1c).

Die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit führt zur Hydrolyse des Guanin-nukleotids (Abbildung 1d). Durch den damit verbundenen Übergang in die inaktive Konformation nimmt die Affinität zum  $\beta\gamma$ -Komplex wieder zu, so dass wieder ein Heterotrimer gebildet wird. Damit sind sowohl die  $G\alpha$ - als auch die  $\beta\gamma$ -abhängige Signaltransduktion beendet.



**Abbildung 1: Aktivierungs- und Deaktivierungszyklus der heterotrimeren G-Proteine.** Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor befindet sich im agonistgebundenen Zustand (dargestellt durch „▼“). Die aktive Konformation der  $\alpha$ -Untereinheit ist mit „\*“ markiert.

Die Interaktion GPCR - G-Protein beeinflusst auch den Rezeptor. So werden am Beispiel des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors zwei Zustände unterschiedlich hoher Affinität zum Agonisten gefunden [De Lean 1980]. Der Kontakt des Rezeptormoleküls zu einem inaktiven G-Protein versetzt den Rezeptor in einen Zustand höherer Affinität zum Agonisten. Durch die mit der Bindung von GTP verbundene Aktivierung des G-Proteins dissoziiert dieses in  $\alpha$ -Untereinheit und  $\beta\gamma$ -Komplex, auch die Affinität des Rezeptors zum Agonisten sinkt wieder. Die Messung dieser Rückwirkung erlaubt die Bestimmung, ob GPCR und G-Protein in der Membran getrennt oder auch im inaktiven Zustand bereits gekoppelt vorliegen. Die von der Rezeptoraktivierung unabhängige Kopplung zwischen dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor und  $G_s$  wurde nachgewiesen [Lachance 1999]. Diese „Vor-Kopplung“ könnte die schnelle Aktivierung von Effektoren nach einer Rezeptor-Aktivierung erklären und gleichzeitig die Selektivität zwischen GPCR und bestimmten G-Proteinen sichern. Für den  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptor wurde dagegen eine Interaktion mit  $G_{\alpha_i}$  nach einem eher zufälligen „Kollisionsmechanismus“ nachgewiesen [Hein 2005]. Dieser Mechanismus

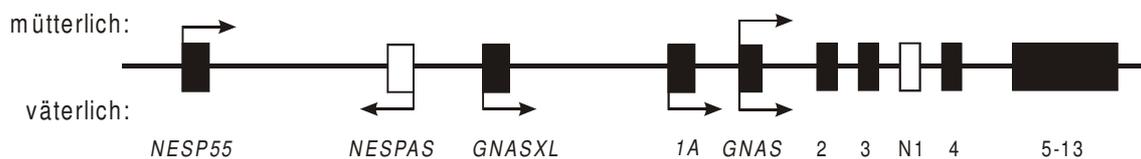
erklärt die beobachtete Signalverstärkung besser, wobei ein Rezeptormolekül mehrere G-Protein-Moleküle aktiviert. Die Anreicherung der beteiligten Moleküle in Subkompartimenten der Plasmamembran begünstigt ihre Interaktionen [Huang 1997].

## **1.2.2 Die $\alpha$ -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins ( $G\alpha_s$ )**

### **1.2.2.1 Das $G\alpha_s$ -kodierende Gen *GNAS***

Ende der 1970er Jahre wurde die Existenz eines GTP-abhängigen Enzyms, das die Aktivierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors auf die Adenylylcyclase weiterleitet, zur Gewissheit [Ross 1978]. Im Jahre 1986 konnte die cDNA der  $\alpha$ -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins ( $G\alpha_s$ ) isoliert werden [Bray 1986]; die genaue Lokalisation auf dem Chromosom 20 folgte 1991 [Rao 1991].  $G\alpha_s$  wird durch das Gen *GNAS* (früher als *GNAS1* bezeichnet) kodiert, das im menschlichen Genom in einer Kopie vorliegt.

Wie die Mehrzahl der Gene von Säugerorganismen, besteht *GNAS* aus einer abwechselnden Folge von kodierenden Abschnitten (Exons) und nicht kodierenden Abschnitten (Introns). Das  $G\alpha_s$ -kodierende Gen umfasst 13 Exons [Kozasa 1988]. Im  $G\alpha_s$ -kodierenden Bereich des Chromosoms überlappen mindestens vier Gene (*NESP55*, *GNASXL*, *1A*, *GNAS*), die jeweils einen eigenen Promotor und erstes Exon besitzen und gemeinsam die Exons 2-13 enthalten [Plagge 2004]. Dazu kommt ein *antisense*-Transkript (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Promotoren und Exons im Bereich des  $G\alpha_s$ -kodierenden Genes *GNAS*.** Mit Veränderungen entnommen aus [Beaudet 2004]. Transkripte des mütterlichen Allels sind oberhalb der waagerechten Linie durch Pfeile gekennzeichnet, Transkripte des väterlichen Allels unterhalb. Ausgefüllte Kästen repräsentieren Sequenzen, die translatiert werden, weiße Kästen repräsentieren nicht translatierte Sequenzen. Die Abstände auf dem Chromosom sind nicht maßstabsgerecht wiedergegeben.

Der am weitesten strangaufwärts gelegene Promotor steuert die Generierung des Transkripts für das Chromogranin-ähnliche Protein *NESP55* [Ischia 1997]. Dieses besitzt im Exon 1 ein Stoppcodon, so dass Exons 2-13 bei diesem Transkript nicht translatiert werden. Der nächste strangabwärts gelegene Promotor steuert die Expression des Genes *GNASXL* mit dem Produkt  $XL\alpha_s$ . In diesem Transkript sind die Exons 2-13 des Genes *GNAS* enthalten, der N-Terminus dieses Proteins ist gegenüber  $G\alpha_s$  verlängert [Kehlenbach 1994].  $XL\alpha_s$  ist in der Lage,  $\beta\gamma$ -Komplexe zu binden [Klemke 2000] und nach Aktivierung von

G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die Adenylylcyclase zu stimulieren [Bastepe 2002]. Ein weiterer Promotor mit eigenem Exon 1 (bezeichnet als *IA*) existiert 2,5 kb strangaufwärts des  $G\alpha_s$ -spezifischen Promotors, und generiert ubiquitär verbreitete Transkripte, die wahrscheinlich nicht translatiert werden [Ishikawa 1990]. Der mit dem geringsten Abstand strangaufwärts der Exons 2-13 liegende Promotor, der ein separates Exon 1 besitzt, steuert die Expression von  $G\alpha_s$ . Die Proteine NESP55 und  $XL\alpha_s$  werden vorwiegend in neuroendokrinen Geweben exprimiert [Ischia 1997; Pasolli 2000], jedoch ist wenig über ihre biologische Funktion bekannt.

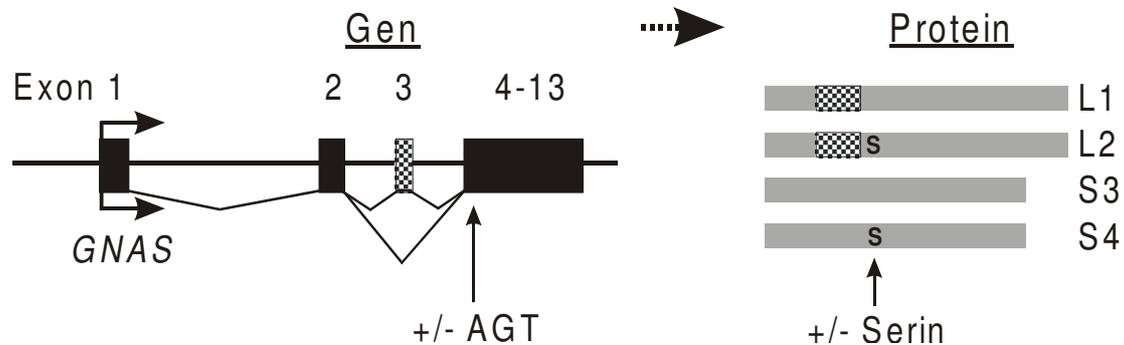
Die Transkription der Gene *NESP55*, *GNASXL*, *IA* und zum Teil *GNAS* unterliegt dem seltenen *Imprinting*-Phänomen [Hayward 1998]. Bei diesem Prozess wird die Transkription eines Gens durch Methylierung des Promotors verhindert. Die Methylierung kann am mütterlichen, väterlichen oder beiden Allelen bestehen.  $G\alpha_s$  wird im Gegensatz zu den anderen Produkten dieses Chromosomenabschnittes ubiquitär im Organismus und überwiegend biallelisch exprimiert. Ausnahmen wurden für einzelne Gewebe beschrieben. So wird  $G\alpha_s$  vorwiegend mütterlicherseits im Nierentubulus [Yu 1998], in der Schilddrüse [Mantovani 2002] und in der Hypophyse [Hayward 2001] exprimiert. Das *Imprinting* führt dazu, dass bei Erkrankungen wie Pseudohypoparathyreoidismus Typ IA in der Niere eine Hormonresistenz auftritt, die auch durch ein intaktes väterliches Allel nicht kompensiert wird [Hayward 1998].

### **1.2.2.2 Bildung der $G\alpha_s$ -Spleißvarianten**

Während der Transkription der chromosomalen DNA entsteht eine prä-mRNA genannte Vorstufe der mRNA, in der Exons und Introns enthalten sind. Durch Spleißen werden die nicht kodierenden Abschnitte entfernt, so dass die reife mRNA entsteht. Durch alternatives Spleißen kann dabei der Verbleib bestimmter Exons im Transkript gesteuert werden.

Von den 13 Exons, die  $G\alpha_s$  kodieren, kann das 15 Aminosäuren kodierende Exon 3 im Verlauf des Spleißens entfernt werden [Kozasa 1988]. Daraus ergeben sich auf Proteinebene „kurze“ und „lange“ Spleißvarianten (Abbildung 3). Als 3'-Spleißakzeptorstelle im Exon 4 kann statt der AG-Konsensus-Sequenz eine seltener vorkommende TG-Sequenz verwendet werden. Die Folge davon ist die Aufnahme von drei zusätzlichen Basen. Im Protein kodieren diese ein Serin, so dass die langen und kurzen Spleißvarianten jeweils mit und ohne Serin auftreten. In dieser Arbeit werden die vier möglichen Spleißvarianten in

Übereinstimmung mit der Literatur als lang (L) und kurz (S) bezeichnet. Zur weiteren Unterscheidung dient eine zusätzliche Ziffer (L1, S3) für die Varianten ohne Serin bzw. (L2, S4) mit Serin.



**Abbildung 3: Möglichkeiten des alternativen Spleißens während der Expression von  $G\alpha_s$ .** Exons 4-13 werden durch einen gemeinsamen Kasten symbolisiert. Es wurden nur die Spleißpfade der in dieser Arbeit untersuchten Spleißvarianten dargestellt. Die kürzeste Spleißvariante S3 umfasst 379 Aminosäuren, die längste Variante L2 besteht aus 395 Aminosäuren. Das Exon 3 kodiert die Aminosäuren 72 bis 86 nach der Sequenz  $G\alpha_s$ -1 (eine L1-Variante) von [Kozasa 1988]. Das einzelne Serin liegt vom Exon 3 um eine Aminosäure entfernt.

Auf dem Chromosom befindet sich darüber hinaus zwischen den Exon 3 und 4 ein Exon N1 genannter Bereich, der sowohl in  $G\alpha_s$  als auch in  $XL\alpha_s$  die Exons 4-13 ersetzen kann [Pasolli 2000]. Die resultierenden Proteine  $G\alpha_s$ N1 bzw.  $XL\alpha_s$ N1 wurden vorwiegend in neuroendokrinen Geweben gefunden, ihre Funktion ist bisher nicht bekannt.

Zur Frage, wie beim alternativen Spleißen die Verteilung der möglichen Spleißprodukte gesteuert wird, sind bereits Studien angefertigt worden (Übersicht in [Smith 2005]). Die Steuerung geschieht durch Zusammenwirken von *trans*-wirkenden Spleißfaktoren und *cis*-wirkenden Sequenzen [Chabot 1996]. Kritische Punkte im Ablauf stellen die Erkennung der 5'- und 3'- Spleißstellen sowie des Verzweigungspunktes dar. Daran sind das U1 *small nuclear ribonucleoprotein* (snRNP) und der U2 *auxilliary factor* (U2AF) sowie Serin-Arginin-reiche (SR-) Proteine beteiligt [Hastings 2001]. Für die Steuerung des Spleißvorganges der  $G\alpha_s$ -kodierenden prä-mRNA wurde ein möglicher Mechanismus beschrieben [Pollard 2002]. Ein Überwiegen des SR-Proteins SF2/ASF gegenüber dem snRNP hnRNPA1 führt zur Bevorzugung der 5' gelegenen alternativen Spleißstelle, demzufolge Exon 3 in die reife mRNA aufgenommen wird. Die Anlagerung dieser Faktoren an die prä-mRNA wirkt als Signal zur ATP-abhängigen Formierung des Spleißosoms. Dieser Multienzymkomplex katalysiert die Umesterungsreaktionen, die zur Freisetzung von Introns führen.

### **1.2.2.3 Differentielle Expression der $G\alpha_s$ -Spleißvarianten**

Die Expression der Spleißvarianten wird gewebespezifisch reguliert. In den meisten untersuchten Geweben überwiegen die langen Spleißvarianten [Mumby 1986; Kawai 1996]. Beispielsweise wurde mit Immunoblots von Plasmamembranen aus Hirn, Nierenmark, Nierenrinde und glatter Lungenmuskulatur des Rindes ein Überwiegen der langen Spleißvarianten nachgewiesen, dagegen überwogen die kurzen Spleißvarianten im Herzsarkolemm.

Während der Ontogenese wird die differentielle Expression der Spleißvarianten in bestimmten Geweben reguliert. So wurde für braunes Fettgewebe von Ratten innerhalb von 4 Tagen vor der Geburt eine Verdreifachung des Gehaltes sowohl langer als auch kurzer Spleißvarianten beobachtet [Chaudhry 1991]. Nach der Geburt sanken die Expressionsspiegel der kurzen Varianten innerhalb von 4 Tagen wieder auf das Ausgangsniveau ab und stiegen nach 12 Tagen abermals an; der Gehalt der langen Spleißvarianten blieb nach der Geburt praktisch konstant. Die Adenylylcyclase-Aktivitäten, welche nach Stimulation adrenerger Rezeptoren bzw. direkter Stimulation der G-Proteine gemessen wurden, erreichten ihre Maxima ca. 7 Tage nach der Geburt. Eine mögliche Erklärung ist, dass mit der Expression der  $G\alpha_s$ -Spleißvarianten die Aktivierbarkeit der Adenylylcyclase durch extrazelluläre Reize moduliert wird.

Weitere Befunde wurden bei der postnatalen Reifung von Hirnregionen beschrieben [Ihnatovych 2001]. Bei insgesamt zunehmender Expression von  $G\alpha_s$  innerhalb von 90 Tagen nach der Geburt änderte sich das Expressionsverhältnis zwischen den Spleißvarianten. Das Verhältnis langer zu kurzer Varianten sank in den Plasmamembranen des Hippokampus von fünffach auf etwa gleichstarke Expression der Varianten. Hingegen blieb das Expressionsverhältnis im Thalamus über denselben Zeitraum praktisch konstant. Es bleibt die Frage bestehen, welchen Einfluss die Änderung der Spleißvariantenexpression auf physiologische Prozesse hat. Insgesamt legen diese Daten eine unterschiedliche Bedeutung der Spleißvarianten für die Signaltransduktion nahe.

### **1.2.2.4 Subzelluläre Lokalisation von $G\alpha_s$**

Entsprechend seiner Funktion als Vermittler zwischen membrandurchspannenden Proteinen muss  $G\alpha_s$  vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert sein. Die Analyse der Hydrophobizität der Aminosäuresequenz von  $G\alpha_s$  weist jedoch auf ein lösliches Protein hin. Die

Rekrutierung an die Plasmamembran findet durch die Assoziation mit dem  $\beta\gamma$ -Komplex statt, dessen  $\gamma$ -Untereinheit isoprenyliert und dadurch an der Plasmamembran verankert ist. Darüber hinaus wurde schon früh eine zusätzliche Erhöhung der Lipophilie von  $G\alpha_s$  durch Lipidmodifikationen vermutet [Graziano 1989].  $G\alpha_s$  kann eine reversible Palmitoylierung am Cystein-3 tragen, die durch ihre Lipophilie die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Proteins an der Plasmamembran erhöht [Mumby 1994]. Daneben wurde eine weitere, unter physiologischen Bedingungen praktisch irreversible Palmitoylierung am Glycin-2 gefunden [Kleuss 2003]. Diese erhöht die Potenz von  $G\alpha_s$  als Aktivator der Adenylylcyclase.

Nach Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird eine Umverteilung des  $G\alpha_s$  von der Plasmamembran ins Zytosol beschrieben [Ransnäs 1989]. Diese resultiert einerseits aus der Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit vom lipophileren  $\beta\gamma$ -Komplex [Sternweis 1986]. Andererseits wird mit der Aktivierung von  $G\alpha_s$  ein Austausch der Palmitoylierung beobachtet, was auf einen zumindest vorübergehenden Verlust der Lipidmodifikation schließen lässt [Mumby 1994]. Dieser Vorgang ist nicht von der Aktivierung der Adenylylcyclase abhängig [Wedegaertner 1994]. Die Bedeutung der dynamischen Depalmitoylierung von  $G\alpha_s$  ist noch nicht hinreichend geklärt: Neben der oben beschriebenen Translokation ins Zytosol wird die Bewegung zwischen unterschiedlich lipophilen Subdomänen der Membran vermutet, wo  $G\alpha_s$  weiterhin für die Signaltransduktion zur Verfügung steht [Chen 2001].

#### **1.2.2.5 Molekulare Struktur von $G\alpha_s$**

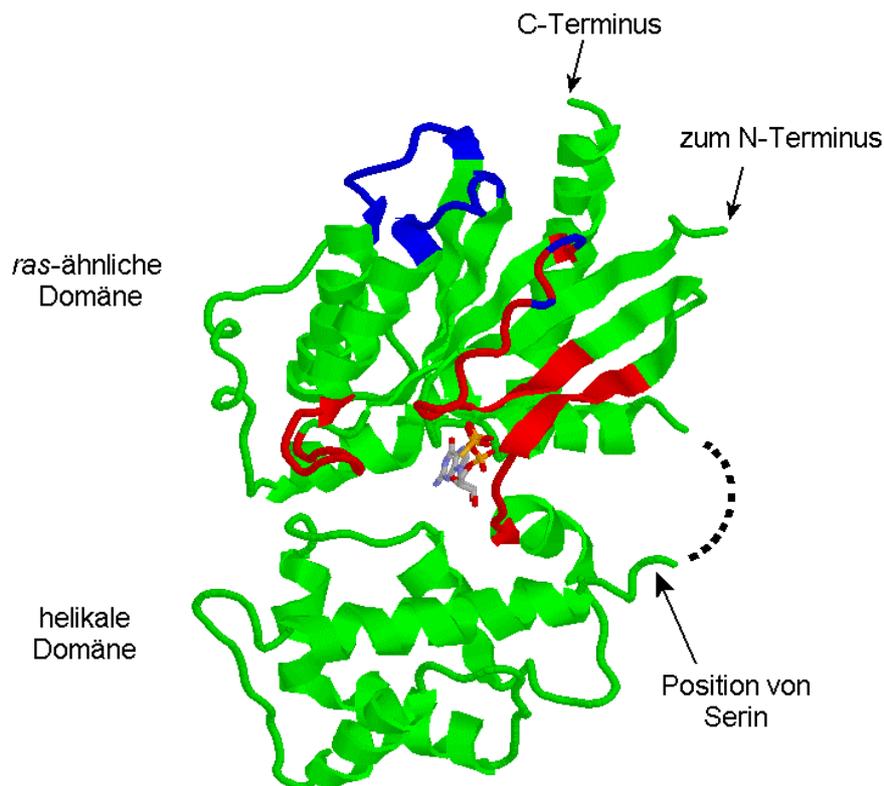
Biochemische Eigenschaften, wie die Aktivierungszustände eines Enzyms, sind auf molekularer Ebene als Konformationen beschreibbar. Durch Röntgenkristallografie konnten die  $\alpha$ -Untereinheiten mehrerer heterotrimerer G-Proteine in verschiedenen Konformationen abgebildet werden. Insbesondere das Transduzin ( $G\alpha_t$ ) besitzt in dieser Hinsicht Modellcharakter: es wurde in den signaltransduktorisch relevanten Konformationen dargestellt (GDP-gebunden [Lambright 1994],  $GTP\gamma S$ -gebunden [Noel 1993] und  $AlF_4^-$ -gebunden [Sondek 1994]). Vom  $G\alpha_s$  sind bisher Abbildungen des  $GTP\gamma S$ -gebundenen Zustands publiziert worden [Sunahara 1997]. Die kritischen Aminosäuren für die Nukleotid-Interaktion sind zwischen den  $\alpha$ -Untereinheiten aller heterotrimeren G-Proteine konserviert [Lambright 1994]. Daher wird davon ausgegangen, dass die am Beispiel des  $G\alpha_t$  erhaltenen Erkenntnisse auf andere  $\alpha$ -Untereinheiten übertragen werden können.

---

An die GDP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit ist die Anlagerung des komplexen Anions  $\text{AlF}_4^-$  möglich, das im katalytischen Zentrum ein  $\gamma$ -Phosphat entsprechend dem des GTP vortäuscht [Bigay 1985]. Die  $\alpha$ -Untereinheit wird in einem Übergangszustand stabilisiert, der während der Hydrolyse von GTP auftritt [Coleman 1994].  $\text{G}\alpha_s$  wirkt gegenüber der Adenylylcyclase in dieser Konformation stimulierend [Sternweis 1982].

Das Protein  $\text{G}\alpha_s$  besteht aus zwei Domänen (Abbildung 4). Die Guaninnukleotid-bindende Domäne besitzt hohe strukturelle Ähnlichkeit zu *ras*-GTPasen [Sunahara 1997]. Die zweite Domäne besteht vollständig aus  $\alpha$ -Helices und kommt nur bei den heterotrimeren G-Proteinen vor. Auf der *ras*-ähnlichen Domäne befinden sich alle bisher erkannten Interaktionsstellen mit weiteren Proteinen. Der (in der Kristallstruktur nicht abgebildete) N-Terminus ist der Bereich der Interaktion mit der  $\beta$ -Untereinheit [Wall 1995]. Am C-Terminus findet die Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren statt [Neer 1994]. Der Kontakt zur Adenylylcyclase findet benachbart zum C-Terminus statt [Lambright 1994]. Die Domänen sind durch zwei Aminosäureketten verbunden, von denen eine den Bereich enthält, der von Exon 3 des Genes *GNAS* kodiert wird. Dieser für die vorliegende Arbeit sehr interessante Bereich konnte bisher mit der Röntgenkristallografie nicht abgebildet werden, da er anscheinend zu flexibel ist. Die einzelne Serin-Aminosäure, welche den Unterschied zwischen  $\text{G}\alpha_s$ -L1/L2 und S3/S4 bildet, ist in der kristallisierten Spleißvariante nicht enthalten, jedoch sind die benachbarten Aminosäuren am Übergang zwischen beiden Domänen abgebildet.

An der Grenzfläche zwischen beiden Domänen von  $\text{G}\alpha_s$  befindet sich das katalytische Zentrum, welches in der unten angegebenen Kristallstruktur durch das gebundene Guaninnukleotid-Analog sichtbar ist. Die helikale Domäne ist nach bisherigen Erkenntnissen nicht an der Interaktion mit weiteren Proteinen beteiligt, sondern verdeckt das katalytische Zentrum und unterstützt dadurch die Nukleotid-Bindung [Hamm 1996].



**Abbildung 4: Kristallstruktur der aktiven Konformation von G $\alpha_s$ .** Die Abbildung beruht auf der von Tesmer *et al.* [Tesmer 1997] veröffentlichten Struktur einer G $\alpha_s$ -S4 Spleißvariante (Swiss-Prot-Datenbankeintrag 1AZS, Quellorganismus: Hund) und wurde mit ProteinExplorer Version 1.982 [Martz 2002] dargestellt. Die nicht eingezeichnete Plasmamembran liegt in dieser Abbildung oberhalb des Moleküls. In der Röntgenkristallografie nicht aufgelöst sind 19 Aminosäuren, welche die zweite Verbindung zwischen den Domänen bilden, darunter den von Exon 3 kodierten Bereich (symbolisiert durch eine gestrichelte Linie). Ebenfalls nicht dargestellt sind 35 Aminosäuren des N-Terminus. Kontaktstellen mit der Adenylylcyclase sind blau gefärbt, die Schalterregionen (*switch*) sind rot dargestellt. Im Zentrum ist das Guaninnukleotid-Analog GTP $\gamma$ S in Ball-Stock-Darstellung abgebildet. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Die Übergänge zwischen den Aktivierungszuständen sind vor allem durch Veränderungen von drei Schalterregionen (*switch* I, II, III) gekennzeichnet. Die als *switch* I bezeichnete Region bildet eine der Verbindungen zwischen *ras*-ähnlicher und helikaler Domäne, die beiden anderen *switch*-Regionen liegen auf der *ras*-ähnlichen Domäne. Im aktiven Zustand liegen der Ordnungsgrad und die Rigidität dieser Elemente deutlich höher als im GDP-gebundenen Zustand [Lambright 1994]. Durch NMR-Studien an halbsynthetischem G $\alpha_s$ -Protein konnte gezeigt werden, dass auch der mit Rezeptoren interagierende C-Terminus im aktivierten Zustand eine erhöhte Rigidität aufweist [Anderson 2005].

### **1.2.2.6 Biochemische Eigenschaften der G $\alpha_s$ -SpleiBvarianten**

#### **1.2.2.6.1 Verbreitete Modellsysteme**

Zur Untersuchung der Eigenschaften von heterotrimeren G-Proteinen und insbesondere G $\alpha_s$  werden verschiedene Modellsysteme verwendet. Die Isolierung von G $\alpha_s$  aus nativen Geweben wie Leber-Plasmamembranen erlaubte die ursprüngliche biochemische Charakterisierung, jedoch ist eine Auftrennung der SpleiBvarianten im präparativen Maßstab nicht möglich. Seit der Verfügbarkeit der cDNA wird G $\alpha_s$  heterolog exprimiert. In Bakterien können große Mengen der SpleiBvarianten exprimiert werden. An den gereinigten Proteinen können biochemische Eigenschaften wie die Hydrolyse-Geschwindigkeit und die Nukleotid-Bindungsgeschwindigkeit bestimmt werden. Die Interaktion der Proteine mit Adenylylcyclasen ist jedoch durch fehlende kovalente Lipidmodifikationen im Vergleich zu solchen aus nativen Geweben vermindert. In Insektenzellen können ebenfalls große Mengen Protein exprimiert werden, wobei co- und posttranslationale Modifikationen durchgeführt werden.

Eine besondere Rolle bei der Erforschung des G $\alpha_s$  spielt die Maus-Lymphom-Zelllinie S49. Die von ihnen abgeleitete Linie S49 cyc<sup>-</sup> wurde ursprünglich nach der fehlenden Adenylylcyclase-Aktivierung nach GPCR-Stimulation benannt [Bourne 1975]. Erst später wurde nachgewiesen, dass der Verlust im vermittelnden G $\alpha_s$  besteht [Ross 1977b]. Plasmamembranen dieser Zelllinie bieten eine gute Möglichkeit zur *in vitro*-Rekonstitution von isoliertem G $\alpha_s$  in einen Null-Hintergrund. Eine transiente Überexpression von G $\alpha_s$  in S49 cyc<sup>-</sup>-Zellen ist wegen ihrer schlechten Transfizierbarkeit nicht praktikabel.

Untersuchungen zur Interaktion zwischen GPCR und G-Proteinen wurden auch an Fusionsproteinen durchgeführt [Bertin 1994], bei denen die kodierenden Sequenzen beider Proteine zu einem Leserahmen vereinigt sind. Die exprimierte  $\alpha$ -Untereinheit ist über ihren N-Terminus an den intrazellulär liegenden C-Terminus des GPCR gekoppelt. Die Fusionsproteine besitzen eine definierte, wenn auch von den physiologischen Verhältnissen deutlich abweichende, 1:1-Stöchiometrie. In nativen Geweben wird im Gegensatz dazu ein ca. 200facher Überschuss von G $\alpha_s$ -Protein gegenüber dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor gefunden [Ransnäs 1988]. In den Fusionsproteinen ist darüber hinaus die räumliche Nähe beider Partner erzwungen und G $\alpha_s$  fest an die Plasmamembran gebunden [Seifert 1999]. Diese Umstände schränken die Aussagekraft von Daten aus diesem System ein.

### 1.2.2.6.2 Eigenschaften von $G\alpha_s$ als Protein und Enzym

Die Spleißvarianten von  $G\alpha_s$  haben Molekulargewichte von ca. 43,5 kDa (kurze Formen) oder 45 kDa (lange Formen), das Vorhandensein der einzelnen Serin-Aminosäure führt zur Veränderung um 0,1 kDa. Die Laufgeschwindigkeit der langen Formen ist in Polyacrylamid-Gelen anormal niedrig, daher fällt die Differenz der scheinbaren Molekulargewichte (45 bzw. 52 kDa) größer aus, als nach den berechneten Aminosäure-Molekulargewichten erwartet werden würde [Graziano 1987]. Der Laufgeschwindigkeitsunterschied zwischen Varianten mit und ohne Serin ist in der eindimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nicht sichtbar, jedoch erlaubt eine zusätzliche isoelektrische Fokussierung (IEF) die Auftrennung auch dieser Varianten [Matousek 2004].

Beim Vergleich von zwei heterolog exprimierten und isolierten Spleißvarianten (L1, S4) hydrolysieren beide das GTP im Gleichgewicht mit der gleichen Geschwindigkeit ( $k_{cat} \approx 3,5 \text{ min}^{-1}$  bei 20 °C). Hingegen bestehen Unterschiede in der Dissoziationsrate von GDP ( $k_{off} \approx 0,34 \text{ min}^{-1}$  für L1 bzw.  $0,13 \text{ min}^{-1}$  für S4) [Graziano 1989]. Da die Dissoziationsrate geschwindigkeitsbestimmend für eine nachfolgende Bindung von GTP ist, unterscheiden sich auch die gemessenen Bindungskonstanten ( $k_{app}$ ) für GTP(-Analoge) entsprechend.

### 1.2.2.6.3 Interaktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit $G\alpha_s$

Veränderungen in der Tertiärstruktur der Schalterregion *switch* II (vgl. Abschnitt 1.2.2.4) sind die Ursache für eine bemerkenswerte Eigenschaft des  $G\alpha_s$ . Das Protein zeigt in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand unterschiedliche Resistenz gegenüber einem begrenzten Verdau durch Proteasen (*trypsin protection*).  $G\alpha_s$ -GDP wird von Trypsin unter anderem an Arginin<sup>204</sup> und von Chymotrypsin an Tryptophan<sup>207</sup> gespalten, beide Aminosäuren sind jedoch schwerer zugänglich in der aktiven, GTP-gebundenen Form [Fung 1983]. Wenn der aktive Zustand durch schlecht hydrolysierbare GTP-Analoga (z. B. GTP $\gamma$ S) fixiert wird, kann diese Eigenschaft zur Bestimmung des Aktivierungszustandes durch begrenzten Verdau herangezogen werden [Yagami 1994]. Von Yagami wurde diese Eigenschaft zur Charakterisierung der Interaktion mit dem  $\beta_2$ -adrenergen und dem Glucagon-Rezeptor genutzt [Yagami 1995]. Dabei wurden deutliche Unterschiede gefunden: Während der Glucagon-Rezeptor lange und kurze Spleißvarianten aktiviert, interagiert der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor nur mit den langen Spleißvarianten.

---

Weniger deutliche Unterschiede in der Aktivierung der Spleißvarianten durch GPCR wurden in einer Reihe von Untersuchungen an Fusionsproteinen gefunden. So wurden Vergleiche der langen und kurzen Spleißvarianten (L1 und S3) in ihrem Zusammenwirken mit dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor durchgeführt [Seifert 1998]. Das Fusionsprotein aus langer Spleißvariante und Rezeptor zeigt im Gegensatz zum Fusionsprotein der kurzen Spleißvariante Charakteristika eines konstitutiv aktiven Rezeptors. So besitzen partielle Agonisten eine erhöhte Potenz und erhöhte intrinsische Aktivität für die Fusionsproteine gegenüber den einzeln exprimierten Proteinen, in der Folge ist die basale GTPase-Aktivität erhöht. Im Vergleich zwischen den Spleißvarianten sind Agonisten in diesem Modell in der Aktivierung des Fusionsproteins der langen Spleißvariante mit dem Rezeptor potenter. Ein ähnliche Untersuchung an Fusionsproteinen des Glucagon-Rezeptors zeigte dagegen praktisch keine Unterschiede zwischen den Spleißvarianten [Unson 2000], wobei im Gegensatz zum oben beschriebenen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor bei Fusionsproteine konstitutiv aktiv sind. Sowohl die Potenz partieller Agonisten zur Aktivierung des Rezeptors, als auch die Geschwindigkeitskonstanten bei der Rezeptor-vermittelten Guaninnukleotid-Bindung sind zwischen den Fusionsproteinen des Glucagon-Rezeptors vergleichbar. Die bei Experimenten an Fusionsproteinen gefundenen Unterschiede in der Interaktion der Spleißvarianten mit Rezeptoren sind verbunden mit Agonist-unabhängiger Aktivität des Rezeptors. Damit bleibt die Frage offen, ob die am Beispiel des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors gefundenen Unterschiede zwischen den Spleißvarianten tatsächlich Auswirkungen einer niedrigeren Affinität einer langen  $G\alpha_s$ -Spleißvariante zum GDP sind oder eine konstitutiv aktiven  $\alpha$ -Untereinheit im Fusionsprotein darstellen.

#### **1.2.2.6.4 Die Rezeptor-aktivierte Stimulation der Adenylylcyase**

Ein Ansatz zur Untersuchung der Interaktion von heterolog exprimierten  $\alpha$ -Untereinheiten mit GPCR und Adenylylcyase ist die Rekonstitution von  $G\alpha_s$  in Plasmamembranen von S49 cyc<sup>-</sup>-Zellen. Dabei erreicht heterolog exprimiertes  $G\alpha_s$  eine ca. 20fach niedrigere spezifische Adenylylcyase-Aktivität im Vergleich zu  $G\alpha_s$  aus Kaninchenleber [Graziano 1989]. Durch Rekonstitution in einen Überschuss gereinigter Adenylylcyase kann dieser Unterschied aufgehoben werden, was darauf hinweist, dass fehlende Lipidmodifikationen die Interaktion mit der Plasmamembran und damit die Fähigkeit zur Aktivierung der Adenylylcyase verringern.

Die Aktivierung einer langen und kurzen Spleißvariante (L1, S4) durch den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor wurde durch stabile Expression in S49 cyc<sup>-</sup> und Messung der Rezeptor-abhängigen Adenylylcyclase-Aktivierung untersucht. Dabei wurden nur geringe Unterschiede zwischen den Spleißvarianten gefunden [Jones 1990; O'Donnell 1991]. Die Belastbarkeit der Ergebnisse wird dadurch beeinträchtigt, dass keine vergleichbaren Konzentrationen der  $G\alpha_s$ -Spleißvarianten erreicht wurden.

Walseth *et al.* fanden bei Experimenten an Inselzellen des syrischen Hamsters (Zelllinie HIT T-15) Hinweise darauf, dass die kurzen Spleißvarianten eine höhere Effizienz in der Rezeptor-vermittelten Stimulation der Adenylylcyclase-Aktivität besitzen [Walseth 1989]. Zusammenfassend fehlen Untersuchungen über die Aktivität aller vier Spleißvarianten nach Expression in Säugerzellen. Die aus getrennten Untersuchungen einzelner Varianten bekannten Daten widersprechen einander zum Teil. Darüber hinaus sind über die Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren nur lückenhafte Daten bekannt.

### **1.3 Die Adenylylcyclasen als Effektoren von $G\alpha_s$**

Das G-Protein  $G_s$  wurde durch seine Fähigkeit zur Stimulation der eukaryotischen Adenylylcyclasen (AC) entdeckt. Sie katalysieren die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Ende der 1950er Jahre entdeckten Sutherland und Mitarbeiter das cAMP und seine Rolle als *second messenger* bei der Übertragung von Informationen innerhalb von Zellen.

Adenylylcyclasen sind entwicklungsgeschichtlich sehr alte Enzyme und in vielen Organismen in sehr unterschiedlichen Molekülformen vorhanden. Beispiele sind gram-negative fakultative Anaerobier (lösliche Adenylylcyclase), Hefen (membranassoziiertes Molekül), Protozoen (Molekül mit einer Transmembranhelix) und Säugetiere (membran-integrales Protein) [Defer 2000]. Bei den Säugetieren wird in Spermien auch ein lösliche Form exprimiert, deren katalytisches Zentrum eine Ähnlichkeit zu bakteriellen Adenylylcyclasen aufweist [Zippin 2001].

In Säugetieren werden vom Grundtyp der membranintegralen Adenylylcyclase neun Isoformen exprimiert, die mit römischen Ziffern bezeichnet werden (Tabelle 3). Ihnen gemeinsam ist eine Topologie von zweimal sechs Transmembrandomänen und zwei katalytischen Domänen. Nur eines der beiden katalytischen Zentren bindet das Substrat ATP. Das zweite katalytische Zentrum kann Forskolin binden [Tesmer 1997]. Dieses

Diterpen aus der Wurzel der Pflanze *Coleus forskohlii* [Seamon 1981] aktiviert alle Isoformen der Säuger-Adenylylcyclasen außer Isoform IX [Hanoune 2001]. Ein endogener Ligand für diese Bindungsstelle wurde bisher nicht identifiziert.

Isoform	Aktivatoren				Inhibitoren		
AC I	G $\alpha_s$	Forskolin	Ca <sup>2+</sup> /CaM	PKC	G $\alpha_o$	G $\beta\gamma$	CaM-Kinase
AC III	G $\alpha_s$	Forskolin	Ca <sup>2+</sup> /CaM	PKC	G $\beta\gamma$		
AC VIII	G $\alpha_s$	Forskolin	Ca <sup>2+</sup> /CaM	PKC	G $\beta\gamma$	CaM-Kinase	
AC II	G $\alpha_s$	Forskolin	G $\beta\gamma^a$	PKC			
AC IV	G $\alpha_s$	Forskolin	G $\beta\gamma^a$	PKC			
AC VII	G $\alpha_s$	Forskolin	G $\beta\gamma^a$	PKC			
AC V	G $\alpha_s$	Forskolin	PKC		Ca <sup>2+</sup>	G $\alpha_{i,o,z}$	PKA
AC VI	G $\alpha_s$	Forskolin			Ca <sup>2+</sup>	G $\alpha_{i,o,z}$	PKA PKC
AC IX	G $\alpha_s$				Ca <sup>2+</sup> <sup>b</sup>		

**Tabelle 3: Die Isoformen der Säugtier-Adenylylcyclasen und ihre Regulation (nach [Sunahara 2002]).**  
Abkürzungen: CaM: Calmodulin; PKA: Proteinkinase A; PKC: Proteinkinase C; CaM-Kinase: Isoformen der Calmodulin-abhängigen Kinase

<sup>a</sup> Stimulation durch  $\beta\gamma$  setzt die Co-Stimulation durch G $\alpha_s$  voraus.

<sup>b</sup> Der Ca<sup>2+</sup>-Effekt wird durch Calcineurin vermittelt [Paterson 2000].

Nach funktionellen Gemeinsamkeiten werden die Isoformen in drei Gruppen zusammengefasst. Die Gruppe der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin(CaM)-aktivierten Adenylylcyclasen umfasst AC I, III und VIII. Deren Aktivität wird sämtlich durch G $\beta\gamma$ -Komplexe inhibiert [Defer 2000; Diel 2006]. Die Inhibition beruht auf einer allosterischen Interaktion zwischen G $\beta\gamma$  und der Adenylylcyclase, nicht auf einer Kompetition um Bindungsstellen für G $\alpha_s$ . Die Isoformen AC II, IV und VII werden durch G $\beta\gamma$ -Komplexe dagegen stimuliert, was nur bei gleichzeitiger Stimulation mit G $\alpha_s$  beobachtet wird [Defer 2000]. Für diese Gruppe waren lange Zeit keine inhibierenden Interaktionspartner bekannt, jedoch vermindert die Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC) die G $\alpha_s$ -vermittelte Aktivierung von AC IV [Zimmermann 1996]. AC V und VI werden sowohl durch submikromolare Konzentrationen von Calcium-Ionen als auch durch viele  $\alpha$ -Untereinheiten der G<sub>i</sub>-Gruppe (G $\alpha_i$ , G $\alpha_o$ , G $\alpha_z$ ) inhibiert [Cooper 1998]. Die Isoformen der anderen beiden Gruppen werden erst bei unphysiologisch hohen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen im millimolaren Bereich inhibiert.

Funktionelle und strukturelle Untersuchungen zeigen übereinstimmend, dass inhibitorisch und stimulatorisch wirkende Interaktionspartner gleichzeitig an Adenylylcyclasen binden können [Dessauer 1998]. Adenylylcyclasen können daher Informationen aus verschiedenen Signalwegen integrieren.

Die Expression der Isoformen wird gewebespezifisch reguliert. Eine Übersicht geben Hanoune und Defer [Hanoune 2001]. So werden alle Isoformen in Hirnzellen gefunden, wobei die Expression individueller Isoformen auf diskrete Regionen, die überlappen können, beschränkt ist [Cali 1994]. Der Anteil der Adenylylcyclasen am Membranprotein ist in allen Geweben sehr gering und beträgt ca. 0,001-0,01 %.

Über die Konzentration des *second messengers* cAMP ist die Aktivität anderer Enzyme von der Adenylylcyclase-Aktivität abhängig (vgl. Tabelle 4). Die meisten Effekte von cAMP werden durch die ubiquitär exprimierte Proteinkinase A (PKA) vermittelt. Sie phosphoryliert Proteine, welche unter anderem zelluläre Prozesse wie Differenzierung [Lowes 2002], Ionentransport [Dascal 2001] und Transkription [Mayr 2001] steuern.

Enzym	gesteuerte physiologische Prozesse	Referenz
Proteinkinase A	Lernprozesse	[Defer 2000]
cAMP-gesteuerte Ca <sup>2+</sup> -Kanäle	Geruchswahrnehmung	[Nakamura 1987]
Austauschfaktor Epac	Zelldifferenzierung	[York 1998]
cAMP-spezifische Phosphodiesterasen	Hydrolyse von cAMP	[Houslay 1997]

**Tabelle 4: cAMP-bindende Enzyme in Säugetieren.**

Die Steuerung von Ionenkanälen durch cAMP ist – im Vergleich zur Steuerung durch cGMP – ein seltener beschriebenes Phänomen. Ein Beispiel ist die Öffnung von nicht selektiven Kationenkanälen in olfaktorischen sensorischen Neuronen [Kaupp 2002]. Dort werden nach Aktivierung von Geruchsrezeptoren G-Proteine der Gruppe G<sub>olf</sub> aktiviert, welche wiederum Adenylylcyclasen stimulieren. Die folgende Zunahme der cAMP-Konzentration führt über die Öffnung von cAMP-abhängigen Kanälen zur Depolarisation der Neuronenmembran.

Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) Epac wird durch die Bindung von cAMP aktiviert. Er aktiviert die monomere GTPase Rap1 [de Rooij 1998]. Die davon ausgelösten Effekte werden gleichzeitig PKA-vermittelt übertragen. Es wurde daher vorgeschlagen, dass Epac zur „Feinsteuerung“ von Stoffwechselwegen wie Insulinsekretion [Holz 2004] bzw. Wachstumsvorgängen wie dem Axon-Wachstum [Kopperud 2003] beiträgt.

---

cAMP-spezifische Phosphodiesterasen katalysieren die Spaltung von cAMP zu Adenosinmonophosphat und beenden dadurch cAMP-abhängige Signalprozesse in der Zelle. Eine cAMP-Sekretion in den extrazellulären Raum, die von *E. coli* bis zu Säugerzellen entwicklungsgeschichtlich konserviert ist, spielt dagegen eine untergeordnete Rolle [Brunton 1988]. Die wirksame Konzentration an intrazellulärem cAMP wird im Zusammenspiel der Synthese durch Adenylylcyclasen und des Abbaus durch Phosphodiesterasen gesteuert [Houslay 1997]. Durch Kompartimentierungen, welche die freie Diffusion von cAMP innerhalb der Zelle begrenzen, sind lokal unterschiedliche Konzentrationen möglich [Zaccolo 2002].