
5 DISKUSSION

Die vier Spleißvarianten der α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins ($G\alpha_s$) koppeln die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) an die Aktivität der Adenylylcyclase. Die Spleißvarianten unterscheiden sich in ihren intrinsischen enzymatischen Eigenschaften nur gering voneinander. In der vorliegenden Arbeit wurden ihre Interaktionen mit GPCR und Adenylylcyclase auf der Ebene des G-Proteins und der Adenylylcyclase miteinander verglichen.

5.1 Expression von $G\alpha_s$ -Spleißvarianten in Säugerzellen

5.1.1 Native Verhältnisse

Viele Analysen der Expression der $G\alpha_s$ -Spleißvarianten nutzen die natürlich vorkommenden Regulationen im Rahmen der Ontogenese und von Krankheitsmodellen. So werden beispielsweise die Spleißvarianten in der Entwicklung des Maushirns [Rius 1991] und des Kaninchenherzens [Kawai 1996] aber auch im Nierengewebe von hypertensiven Ratten [Michel 1994] in veränderlichen Verhältnissen exprimiert. Ein markantes Beispiel ist die Entwicklung des Rattenhirnes [Ihnatovych 2001]. Die Plasmamembran-Konzentration der langen und kurzen Spleißvarianten nimmt in Hirnrinde und Hippokampus zwischen dem ersten und 90. postnatalen Tag zu. Das Verhältnis der Proteinmengen von langen zu kurzen Spleißvarianten bleibt in der Hirnrinde relativ konstant um 2:1; im Hippokampus verschiebt sich unter diesen Bedingungen das Verhältnis von 5:1 auf 1:1. Es ist jedoch schwierig, in diesem System kausale Zusammenhänge zu erkennen, da während der Ontogenese neben der $G\alpha_s$ -Expression viele weitere Parameter variieren. Daraus ergab sich der Bedarf nach einem Modellsystem mit kontrollierter Expression bzw. Repression einzelner $G\alpha_s$ -Spleißvarianten.

5.1.2 Überexpression

Die Überexpression von einzelnen, nicht markierten $G\alpha_s$ -Spleißvarianten in Säugerzellen wird in der Literatur bereits beschrieben [Jones 1990]. In S49 cyc^- -Zellen kann $G\alpha_s$ vor einem Null-Hintergrund exprimiert werden [Ross 1978]. Eine Transfektion dieser Lymphom-Zelllinie ist jedoch nur mit geringer Transfektionseffizienz möglich, so dass

anstatt mit transient transfizierten mit stabil transfizierten Linien gearbeitet wurde. Diese besaßen jeweils ein diskretes Expressionsniveau von $G\alpha_s$. In diesem Modell verhielten sich eine lange und eine kurze Spleißvariante ähnlich in der Aktivierung der Adenylylcyclase durch den β_2 -adrenergen Rezeptor, wobei die kurze Spleißvariante schneller aktiviert wurde.

Neue Möglichkeiten eröffnete die Etablierung der 2B2-Fibroblasten-Zelllinie aus Embryonen der $G\alpha_s$ -defizienten Maus [Bastepe 2002]. In der vorliegenden Arbeit wurden die vier Spleißvarianten von $G\alpha_s$ in dieser Zelllinie exprimiert. $G\alpha_s$ -Konzentrationen im Bereich von 0,03 bis 25 ng/ μ g Plasmamembran konnten so transient exprimiert werden. Zum Vergleich sind in Tabelle 10 einige Beispiele für $G\alpha_s$ -Konzentrationen in nativen Plasmamembranen angegeben. In dieser Arbeit wurden sowohl niedrigere als auch höhere Konzentrationen abgedeckt.

Gewebe/ Zelllinie	Spleißvarianten	Konzentration	Meßmethode	Referenz
S49-Lymphom	alle	0,84 ng/ μ g	ELISA	[Ransnäs 1988]
Ratten-Myozyten	L1+L2	0,62 ng/ μ g	Immunoblot	[Post 1995]
Ratten-Myozyten	S3+S4	1,77 ng/ μ g	Immunoblot	[Post 1995]
Rattenhirn	L1+L2 ^a	0,6 ng/ μ g	Immunoblot	[Li 1996]
Rattenherz	S3+S4 ^a	0,3 ng/ μ g	Immunoblot	[Li 1996]
GH3	L1+L2 ^a	0,2 ng/ μ g	Immunoblot	[Li 1996]
NG108-15	S3+S4 ^a	0,42 ng/ μ g	Immunoblot	[Kim 1994]

Tabelle 10: Beispiele für $G\alpha_s$ -Konzentrationen in Plasmamembranen. Nur Bestimmungen durch ELISA oder Immunoblot wurden aufgeführt. Die Konzentrationsangaben in Post *et al.* und Kim *et al.* wurden unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes von 45 bzw. 43,5 kDa für lange bzw. kurze Spleißvarianten auf eine gemeinsame Einheit umgerechnet. Für Ransnäs *et al.* wurde der Mittelwert beider Molekulargewichte verwendet, da die getrennte Betrachtung der Spleißvarianten nicht möglich ist.

^a In diesen Geweben kommen fast ausschließlich entweder lange oder kurze Spleißvarianten vor.

Die Wachstumsgeschwindigkeit von 2B2-Zellen war unabhängig von der transfizierten $G\alpha_s$ -kodierenden Plasmidmenge und von der Konzentration der α -Untereinheit in der Plasmamembran (Abbildung 37). Damit wurde gezeigt, dass die Überexpression keine negativen Auswirkungen auf die Viabilität hatte.

5.1.3 Inhibition der Expression

Um die Bedeutung von Proteinen im Kontext der zellulären Signalwege zu untersuchen, ist die Inhibition der Expression durch Techniken wie *antisense*-mRNA, Oligodeoxy-

nukleotide (ODN) oder RNA-Interferenz verbreitet [Kurreck 2003]. Nicht zuletzt durch diese Methoden ist es gelungen, die unterschiedliche Bedeutung von G-Protein α -Untereinheiten zu ermitteln (zur Übersicht vgl. [Kalkbrenner 1998]). Der *knock down* von $G\alpha_i$ und $G\alpha_q$ durch *antisense*-ODN zeigt, dass die Stimulation des Thyrotropin-Releasing Hormon-Rezeptors über die G-Proteine beider Unterfamilien vermittelt wird [Gollasch 1993]. Dort und in weiteren Arbeiten [Kalkbrenner 1998] wurde eine Repression des G-Proteins über veränderte Aktivität von Kanalproteinen, die durch hochempfindliche und relativ selektive Techniken wie *patch clamp* zugänglich sind, gemessen.

Die Repression der α -Untereinheit durch *antisense*-ODN auf der Ebene der Adenylylcyclase nachzuweisen gelang bisher nur einer Arbeit [de Mazancourt 1994]. Darin wurde gezeigt, dass $G\alpha_{i3}$ an der Inhibition der Adenylylcyclase durch den Galanin-Rezeptor beteiligt ist. Dagegen wurden häufiger *antisense*-mRNA gegen α -Untereinheiten angewandt, und die Repression als verminderte Adenylylcyclase-Aktivität nachgewiesen (z. B. [Paulssen 1992; Moxham 1993; Liu 1994]). Um einen Spleißvarianten-spezifischen *knock down* zu erreichen, muss exakt zwischen sehr geringen Sequenzunterschieden differenziert werden. Da dies mit *antisense*-mRNA nicht möglich ist, erschien in der vorliegenden Arbeit der Einsatz von Propin-modifizierten ODN am aussichtsreichsten. Inzwischen wurde der *knock down* von $G\alpha_s$ auch durch RNA-Interferenz beschrieben [Krumins 2006]. Die genutzte Zielsequenz liegt in einem Bereich, der allen Spleißvarianten gemeinsam ist.

Die Effektivität von Propin-modifizierten ODN wurde in der vorliegenden Arbeit an einem Modellsystem aus zwei Luziferasen demonstriert (Abschnitt 4.1.1). Die gewählten ODN inhibierten die Expression der *firefly*-Luziferase um bis zu 80 %, wobei an die Zielsequenz - abgesehen vom Vorhandensein der Basen Cytosin und Thymin - keine besonderen Anforderungen gestellt wurden. Mittels DNAzym und ODN, die abgesehen vom Phosphorthioat-Rückgrat nicht zusätzlich modifiziert waren, konnte dagegen nur eine Repression um 50 % erreicht werden.

In der $G\alpha_s$ -defizienten 2B2-Zelllinie wurde durch transiente Expression von $G\alpha_s$ die Stimulierbarkeit der Adenylylcyclase durch den β_2 -adrenergen Rezeptor wiederhergestellt. Bei gleichzeitiger Transfektion eines $G\alpha_s$ -spezifischen ODN war die Rezeptor-stimulierte Adenylylcyclase-Aktivität um 80 % vermindert (Abbildung 21). Im Gegensatz dazu war der Ansatz nicht erfolgreich bei der Repression von endogen exprimiertem $G\alpha_s$ in GH3- (Abbildung 22) und in CHO-K1-Zellen. ODN vermindern die Translation ihres Ziel-

proteins. Da bereits vorhandenes Protein nicht betroffen wird, ist die Sichtbarkeit der Inhibition abhängig von der Abbaugeschwindigkeit des Proteins. Die Wirksamkeit der ODN wird durch ihren eigenen Abbau durch Nukleasen und durch die Verdünnung im Laufe der Zellteilung zeitlich begrenzt, so dass ein Zeitfenster für den Nachweis des *knock down* beobachtet wird [Kleuss 1992]. In den verwendeten Zelllinien wurden die Proteinabbauraten untersucht (Abschnitt 4.1.2). Diese lagen in 2B2-Zellen bei 1,2 Stunden, hingegen wurde das endogen exprimierte $G\alpha_s$ in GH3-Zellen deutlich langsamer abgebaut (5,4 bzw. 9,2 Stunden für kurze bzw. lange Spleißvarianten). Die Proteinhalbwertszeiten in GH3-Zellen werden von der Gruppe um Neer mit ungefähr 13 Stunden angegeben und stehen mit den hier erhobenen Daten im Einklang [Li 1996]. Ein Funktionsverlust wäre damit im Zeitbereich 24 bis 60 Stunden zu erwarten gewesen. Das negative Ergebnis in GH3-Zellen lässt vermuten, dass die Repression nicht vollständig war und dadurch keine ausreichende Verringerung der $G\alpha_s$ -Konzentration erreicht wurde. In 2B2-Zellen dürfte die ungewöhnlich niedrige Halbwertszeit zu einer stärkeren Verminderung der $G\alpha_s$ -Konzentration im Vergleich zu GH3-Zellen geführt haben, so dass ein Funktionsverlust nachgewiesen werden konnte.

Ein Faktor, der den *knock down* von $G\alpha_s$ im Vergleich zu den α -Untereinheiten anderer G-Proteine erschwert, ist ein ungünstiges Verhältnis von mRNA und Protein. In GH3-Zellen ist die Proteinkonzentration von $G\alpha_s$ ca. 10fach höher als die von $G\alpha_o$, die mRNA-Konzentration dagegen 94fach höher [Li 1996]. In anderen Geweben (Hirn/ Herz) liegt das Verhältnis von $G\alpha_s$ -Proteinmenge zu $G\alpha_o$ niedriger (0,3fach/ 3fach). Auch in diesen Geweben gibt es 10-20-mal mehr $G\alpha_s$ -kodierende als $G\alpha_o$ -kodierende mRNA. Demzufolge existieren mehr Bindungsstellen im Vergleich zur Repression anderer α -Untereinheiten, die mit $G\alpha_s$ -spezifischen ODN hybridisieren können.

Ein allgemeines Problem der Anwendung von *antisense*-ODN und RNA-Interferenz ist die Nukleotid-genaue Auswahl einer Sequenz innerhalb der Ziel-mRNA, die immer noch von empirischen Methoden geprägt ist [Smith 2000]. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei Variation der Lage der Zielsequenzen um einzelne Basen ODN erhalten werden, die bei erhaltener Spezifität eine höhere Repression erlauben. Eine elegante Möglichkeit für weitere Versuche ist neben dem *knock down* die Beeinflussung des Spleißvorganges durch ODN. So wird eine Form der β -Thalassämie von einer aberranten Spleißstelle im β -Globin-Gen und daraus folgendem β -Globin-Mangel verursacht. Durch Applikation von

ODN, die mit der Spleißstelle hybridisieren, kann die korrekte Expression wiederhergestellt werden [Sierakowska 1996].

5.1.4 Einfluss von Lipidmodifikationen und der subzellulären Verteilung von $G\alpha_s$ auf seine Detektion

Um die $G\alpha_s$ -vermittelte Adenylylcyclase-Aktivität bewerten zu können, ist die Bestimmung der $G\alpha_s$ -Konzentration in Plasmamembranen unverzichtbar. Dazu werden verschiedene Methoden angewandt, die zum Teil auf GTPase-spezifischen Eigenschaften beruhen. So kann die Bindung des Guaninnukleotids durch Bindung schwer hydrolysierbarer Analoga genutzt werden [Northup 1982]. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie nur intaktes G-Protein erfasst. Da sie nicht zwischen verschiedenen GTP-bindenden Proteinen unterscheidet, ist sie vor allem zur Quantifizierung von gereinigten Proteinen geeignet. Selektiver ist die Markierung mit ADP-Ribose durch Cholera toxin, welches $G\alpha_s$, $G\alpha_t$ und $G\alpha_{olf}$ modifiziert [Hepler 1992]. Diese Methode liefert jedoch systematisch um den Faktor 20 zu niedrige Konzentrationen und wird zudem von den Konzentrationen von $\beta\gamma$ -Komplexen und Peptiden der ADP-Ribosylierungs-Faktor-(ARF)-Familie beeinflusst [Kim 1994].

In dieser Arbeit wurden ELISA (vgl. Abschnitt 4.3.1.1) und Immunoblot (Abschnitt 4.3.1.2) zum Nachweis von $G\alpha_s$ verwendet. Beide Methoden beruhen auf dem selben $G\alpha_s$ -spezifischen Antikörper und liefern keine Information über die funktionelle Integrität der detektierten Proteine. Die Erfassungsgrenze des ELISA lag bei 50 ng $G\alpha_s$, einer Menge, die bei endogener Expression in 200 μ g Plasmamembranen zu finden ist (Tabelle 10). Da diese Gesamtproteinmenge für den ELISA zu hoch ist bzw. weitere Aufkonzentrierungsschritte verlangt, war diese Methode nicht geeignet für die Messung an Plasmamembranen. In der von Ransnäs und Insel beschriebenen Ausführung der Methode wurde eine Erfassungsgrenze um 5 ng $G\alpha_s$ erreicht [Ransnäs 1988]. Der Empfindlichkeitsunterschied zur vorliegenden Arbeit wurde wahrscheinlich durch den Antikörper verursacht. So sind in der Veröffentlichung große Affinitätsunterschiede zwischen Antikörpern von vier immunisierten Tieren beschrieben. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper war polyklonal. Damit können Affinitätsunterschiede nivelliert werden, die sowohl innerhalb eines Tieres zwischen den Klonen Antikörper-produzierender Zellen als auch zwischen einzelnen Tieren bestehen. Eine prinzipielle Gefahr des kompetitiven ELISA-

Ansatzes liegt in der ungleichen Konkurrenz zwischen immunogenem Protein und dem zur Antikörperherstellung verwendeten Peptid. Wenn der Anti-G α_s -Antikörper das - sterisch gut zugängliche - Peptid mit höherer Affinität bindet, als die gleiche Aminosäuresequenz innerhalb des gesamten Proteins, würde das Peptid nur von stöchiometrisch höheren Mengen Protein verdrängt werden können. Prinzipiell besser als ein kompetitiver Ansatz geeignet wäre ein *sandwich*-ELISA: Das Antigen wird durch einen immobilisierten Antikörper gebunden und anschließend mit einem zweiten Antikörper, der ein anderes Epitop erkennt, markiert. Der zweite Antikörper wird durch Bindung eines sekundären Antikörpers quantifiziert, weshalb beide G α_s -bindenden Antikörper in unterschiedlichen Spezies erzeugt worden sein müssen. Diese Voraussetzung ist für die erhältlichen G α_s -spezifischen Antikörper nicht erfüllt.

Im Immunoblot wurde die Detektion von G α_s in der vorliegenden Arbeit mit einer unteren Erfassungsgrenze von ca. 4 ng G α_s erreicht. Die Auftrennung der Proben durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglichte ein höheres Signal-Hintergrund-Verhältnis. Das in Plasmamembranen quantifizierte G α_s muss nicht zwangsläufig an der Signaltransduktion beteiligt sein, wie an der Adenylylcyclase-Aktivität nach G α_s -Transfektion gezeigt wurde (Abbildung 39). Die im Immunoblot gemessene G α_s -Konzentration erreichte ihr Maximum nach 2 Tagen und sank bis zum Tag 4 auf ca. 10 % des Maximums ab. Gleichzeitig blieb die über G α_s stimulierbare Adenylylcyclase-Aktivität praktisch konstant. Daraus wurde gefolgert, dass entweder an Tag 2 und 3 auch G α_s -Populationen von der immunologischen Detektion erfasst wurden, die nicht zur Stimulation der Adenylylcyclase beitragen, oder Modifikationen am G α_s aufgetreten sind, die seine Fähigkeit zur Interaktion mit der Adenylylcyclase erhöhten. Die Assoziation von Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine an die Plasmamembran wird durch kovalente Lipidmodifikationen bestimmt [Chen 2001]. G α_s kann ein oder zwei Palmitat-Reste tragen [Kleuss 2003]. Der Modifikationszustand von G α_s kann durch hydrophil/ hydrophobe Verteilungen zwischen einer wässrigen und einer TX114-Detergens-Phase bestimmt werden. Im Experiment an 2B2-Zellen wurde festgestellt, dass unabhängig von der Expressionsdauer ca. 10 % des immunologisch messbaren G α_s lipidmodifiziert waren (nicht gezeigt). Damit erschien ein unterschiedliches Ausmaß der Lipidmodifikation bei Überexpression in 2B2-Zellen unwahrscheinlich.

Während der größte Anteil von $G\alpha_s$ an der Plasmamembran lokalisiert ist, wird $G\alpha_s$ auch an Membranen im Zellinneren gefunden. Verschiedene Berichte legen nahe, dass $G\alpha_s$ dort an der Regulation endozytotischer Signalwege beteiligt ist [Colombo 1994]. In Zellhomogenaten von S49-Lymphom-Zellen kommt das Protein in drei Fraktionen unterschiedlicher Dichte vor [Svoboda 1992]. Unter den untersuchten Ruhebedingungen befindet sich der überwiegende Teil (60-70 %) in der Plasmamembran, 10-20 % im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und 20-30 % zusammen mit Indikatorproteinen des Golgi-Apparates in Membranen niedriger Dichte. Das $G\alpha_s$ aus allen drei Kompartimenten besitzt vergleichbare spezifische Aktivität bei der Rekonstitution der Adenylylcyclase-Aktivität in S49 cyc^- -Plasmamembranen. Die Anteile im ER und Golgi-Apparat stehen jedoch in der intakten Zelle nicht zur Signaltransduktion von GPCR zu Verfügung. Die in dieser Arbeit angewandte Isolierung von Plasmamembranen unterscheidet nicht zwischen den beschriebenen Kompartimenten. Die an der Adenylylcyclase wirksamen Konzentrationen sind damit tendenziell niedriger. Ein Anteil von 30-40 % $G\alpha_s$ abseits der Plasmamembran erklärt jedoch nicht allein die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahme um 90 %. Wahrscheinlich lag durch die hohe Expressionsaktivität nach der transienten Transfektion ein höherer Anteil außerhalb der Plasmamembran vor, der sich bis zum Tag 4 in Richtung der zitierten Verhältnisse verschob. Um die $G\alpha_s$ -Populationen differenzieren zu können, wäre die Aufreinigung der Proben zum Beispiel über Sucrosegradienten denkbar. Diese Methode ist jedoch nicht mit der großen Probenzahl der in dieser Arbeit durchgeführten Titrationen durchführbar.

5.2 Interaktion zwischen $G\alpha_s$ und der Adenylylcyclase

Die GPCR-abhängige Aktivierung der Adenylylcyclase ist untergliedert in die Interaktionen GPCR – G-Protein und G-Protein – Adenylylcyclase. In der vorliegenden Arbeit wurde die zweite Interaktion an isolierten Plasmamembranen durch die direkte Aktivierung des G-Proteins untersucht.

Die Adenylylcyclase ist ein integrales Membranprotein mit 12 Transmembran-Domänen. Sie kann nicht aus der Plasmamembran extrahiert werden, ohne ihre Aktivität zu verlieren. Stattdessen werden G-Proteine nach heterologer Expression oder aus G-Protein-haltigen Geweben isoliert und mit Adenylylcyclase-haltigen Plasmamembranen gemischt [Sternweis 1979]. Diese Empfängermembranen müssen frei von endogener $G\alpha_s$ -Expression sein. Zum

einen werden Säugerzellmembranen (S49 cyc^-) verwendet, die Adenylylcyclasen verschiedener Isoformen exprimieren. Zum anderen kommen Zelllinien wie die Sf9-Insektenzellen in Frage, die endogen eine geringe Adenylylcyclase-Aktivität besitzen, und in denen Adenylylcyclasen einzelner Isoformen überexprimiert werden können. Eine dritte Möglichkeit, die in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, ist die Überexpression der α -Untereinheit in der $G\alpha_s$ -defizienten Zelllinie 2B2.

In Tabelle 11 werden Untersuchungen aufgeführt, bei denen $G\alpha_s$ in einer der beschriebenen Rekonstitutionsmethoden titriert und eine Sättigung der Adenylylcyclase-Aktivierung erreicht wurde. In allen aufgeführten Publikationen wurde die α -Untereinheit durch ein schlecht hydrolysierbares GTP-Analog daueraktiviert. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde stattdessen Aluminiumfluorid (AlF_4) eingesetzt. In der Wirkung auf die Adenylylcyclase bestehen zwischen beiden Methoden keine Unterschiede.

Für heterolog exprimiertes, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -aktiviertes $G\alpha_s$ werden EC_{50} zur Aktivierung der Adenylylcyclase von ca. 3-50 nM berichtet. Für das aus Geweben gereinigte $G\alpha_s$ liegen die EC_{50} im Bereich von 0,1-3,6 nM. Anschaulich ist der Vergleich zwischen $G\alpha_s$ aus beiden Quellen: Deutlich sichtbar ist eine niedrigere Potenz des in *E. coli* exprimierten $G\alpha_s$ im Vergleich zum Protein, das aus Geweben von Säugern gereinigt wurde [Graziano 1989; Kleuss 1997]. Aus Säugerzellen isoliertes $G\alpha_s$ ist um Faktoren von 26- bis über 100fach potenter in der Stimulation der Adenylylcyclase [Graziano 1989; Kleuss 1997; Kleuss 2003]. Die Ursache dafür ist das Vorhandensein von Lipidmodifikationen (vgl. Abschnitt 1.2.2.4). Vergleiche zwischen den Spleißvarianten werden dadurch eingeschränkt, dass Plasmamembranen mit verschiedenen Adenylylcyclase-Isoformen verwendet wurden bzw. in keinem System mehr als zwei Spleißvarianten verglichen wurden.

Herkunft der AC	AC-Isoform(en)	Quelle von $G\alpha_s$	Spleißvariante(n)	EC_{50} bzw. K_d von $G\alpha_s$	Referenz
S49 cyc^-	Gemisch	Kaninchenleber	Gemisch	3,4 nM	[Graziano 1989]
S49 cyc^-	Gemisch	heterolog (<i>E. coli</i>)	L1	166 nM	[Graziano 1989]
S49 cyc^-	Gemisch	heterolog (<i>E. coli</i>)	S3	89 nM	[Graziano 1989]
S49 cyc^-	Gemisch	Kaninchenleber	Gemisch	0,7 nM	[Sternweis 1981]
Expression in Sf9	AC I	Rinderhirn	Gemisch	0,1-0,3 nM	[Kleuss 2003]
Expression in Sf9	AC I	heterolog (<i>E. coli</i>)	S4	10-50 nM	[Kleuss 2003]
Expression in Sf9	AC I	heterolog (<i>E. coli</i>)	S ^a	8 nM	[Tang 1991]
Expression in Sf9	AC II	heterolog (<i>E. coli</i>)	- ^b	3 nM	[Feinstein 1991]
Expression in Sf9	AC II	heterolog (<i>E. coli</i>)	- ^b	≈ 50 nM	[Taussig 1994]
Expression in Sf9	AC IV	heterolog (<i>E. coli</i>)	- ^b	≈ 40 nM	[Gao 1991]
Expression in Sf9	AC V	Kaninchenleber	Gemisch	0,1 nM	[Kleuss 1997]
Expression in Sf9	AC V	heterolog (<i>E. coli</i>)	S ^a	50 nM	[Kleuss 1997]
Expression in Sf9	AC I	<i>in vitro</i> -Translation	S3	0,9 nM	[Harry 1997]
Expression in Sf9	AC II	<i>in vitro</i> -Translation	S3	0,9 und 15 nM ^c	[Harry 1997]
Expression in Hi-5	AC VI	<i>in vitro</i> -Translation	S3	0,6-0,8 und 8-22 nM ^c	[Harry 1997]

Tabelle 11: Beispiele für die Regulation von Adenylylcyclase-Isoformen durch $G\alpha_s$. Erfasst sind Veröffentlichungen, bei denen $G\alpha_s$ in einer Adenylylcyclase-Präparation rekonstituiert und die Sättigung mit $G\alpha_s$ erreicht wurde. $G\alpha_s$ wurde in allen Beispielen durch ein schlecht hydrolysierbares GTP-Analog daueraktiviert.

^a kurze Spleißvariante, nicht weiter differenziert

^b Spleißvariante nicht genauer spezifiziert

^c Die Daten der Veröffentlichung weisen auf zwei Interaktionsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten hin

In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration der vier $G\alpha_s$ -Spleißvarianten durch transiente Expression in 2B2-Zellen titriert und ihre Fähigkeit zur Aktivierung der Adenylylcyclase gemessen. Die dabei ermittelten Konzentrationen von $G\alpha_s$ in der Plasmamembran können nicht direkt mit den Daten aus *in vitro*-Rekonstitutionen (Tabelle 11) verglichen werden. Vielmehr ist das Volumen während der Bestimmung der Adenylylcyclase-Aktivität zu berücksichtigen (Abschnitt 3.2.4.1). In den Plasmamembranen gemessene Konzentrationen von $G\alpha_s$ (1,23-2,14 ng/ μ g, Tabelle 8) entsprechen im Volumen des Reaktionsansatzes 0,24-0,31 nM. Diese Konzentrationen liegen am unteren Ende des in der Literatur gezeigten Bereichs und zeigen, dass die Interaktion des in 2B2-Zellen exprimierten $G\alpha_s$ mit rekonstituiertem Protein vergleichbar ist. Auch wenn eine homogene Verteilung des $G\alpha_s$ im Reaktionsvolumen nicht angenommen werden kann, dürften gerade darin die Messungen der vorliegenden Arbeit mit den beschriebenen Rekonstitutionen von isoliertem $G\alpha_s$ aus Säugergewebe übereinstimmen.

Die Arbeit von Graziano *et al.* untersuchte die Bedeutung der Spleißvarianten bereits durch Rekonstitution von gereinigten α -Untereinheiten in Plasmamembranen [Graziano 1989]. Heterolog exprimiertes $G\alpha_s$ -S3 hatte eine um den Faktor 1,9 höhere Potenz zur Stimulation der Adenylylcyclase-Aktivität als entsprechendes $G\alpha_s$ -L1. In der vorliegenden Arbeit waren diese beiden Spleißvarianten bei transienter Expression ca. 200fach potenter als in der zitierten Veröffentlichung (Tabelle 8). Die EC_{50} von $G\alpha_s$ -S3 ist um den Faktor 1,7 geringer als die von $G\alpha_s$ -L1, in den Experimenten wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. Auch die in der vorliegenden Arbeit darüber hinaus untersuchten Spleißvarianten $G\alpha_s$ -L2 und -S4 waren vergleichbar potent wie $G\alpha_s$ -L1 bzw. -S3.

In 2B2-Zellen wurden die Adenylylcyclase-Isoformen II, VI, VII und VIII durch RT-PCR nachgewiesen (Susanne Diel und Hendrik Falk, unveröffentlicht). Diese Isoformen gehören allen drei funktionellen Gruppen der Adenylylcyclasen (Abschnitt 1.3) an. Damit ist es in 2B2-Zellen nicht möglich, die Isoform-spezifische Interaktion von $G\alpha_s$ -Spleißvarianten analysieren. Eine Alternative stellt die Expression von Adenylylcyclase in Sf9-Zellen dar. Die in Tabelle 11 genannten Studien lassen zum Beispiel eine bessere Aktivierbarkeit von AC I durch $G\alpha_s$ in diesen Zellen vermuten. Da diese Isoform vor allem im Hirn exprimiert wird [Defer 2000], wurde der Umstand eine höhere Empfindlichkeit von Hirnzellen im

Vergleich zu anderen Körpergeweben gegenüber Stimuli bedeuten, die über G_S -koppelnde Rezeptoren vermittelt werden.

5.3 Interaktion zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und $G\alpha_S$

In der Literatur finden sich einzelne Berichte über deutliche Unterschiede in der Kopplungseffizienz der $G\alpha_S$ -Spleißvarianten mit GPCR. So zeigt Yagami die differentielle Interaktion der langen und kurzen Spleißvarianten mit Glucagon- und β_2 -adrenergem Rezeptor [Yagami 1995]. Die Messung erfolgte durch limitierten Verdau durch Trypsin (*trypsin protection*, Abschnitt 1.2.2.6.3). Während der Glucagon-Rezeptor durch Aktivierung beider Spleißvarianten die Anfälligkeit für den proteolytischen Abbau erhöht, hat der β_2 -adrenerge Rezeptor nur auf die lange Spleißvariante eine vergleichbare Wirkung. Dieser qualitative Unterschied konnte in der vorliegenden Arbeit widerlegt werden: In Insekten- und Säugerzellmembranen wurden alle vier Spleißvarianten vom β_2 -adrenergen Rezeptor aktiviert. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten erscheinen gesicherter, da sie sowohl auf dem Wege der [^{35}S]GTP γ S-Bindung (Abschnitt 4.2.2) als auch der Rezeptor-vermittelten Adenylylcyclase-Aktivierung (Abschnitt 4.3.3.5) erhoben wurden.

Die Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen durch GPCR setzt einen Zyklus aus Nukleotid-Austausch, Dissoziation der Untereinheiten, Interaktion mit Effektoren, Hydrolyse des Nukleotids und Wiedervereinigung des Heterotrimers in Gang (detaillierte Beschreibung im Abschnitt 1.2.1). Einzelne Schritte des Zyklus können mit Nukleotid-basierten Methoden verfolgt werden: Die Dissoziation des Dinukleotids nach Beladung des G-Proteins mit [^3H]GDP oder [α - ^{32}P]GDP [Cassel 1978], die Aufnahme des Trinukleotids mit [^{35}S]GTP γ S [Wieland 1994] und die Hydrolyse über die Abspaltung des γ -Phosphats von [γ - ^{32}P]GTP [Gierschik 1994].

GPCR wirken auf G-Proteine als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF), sie beschleunigen die Dissoziation des GDP-Moleküls von der α -Untereinheit [Cassel 1978]. An Plasmamembran-Präparationen kann die Nukleotid-Dissoziation nur schlecht gemessen werden, da zahlreiche zelleigene GDP-bindende Proteine – inklusive G-Proteine – eine hohe Hintergrundbindung verursachen. Bei der Messung der [^{35}S]GTP γ S-Bindung wird dagegen eine Zunahme des Signals ausgehend von der niedrigen, unspezifischen Hintergrundbindung gemessen. Die Nukleotid-Dissoziation ist geschwindigkeitsbestimmend für den Aktivierungsvorgang, so dass die Messung der [^{35}S]GTP γ S-Bindung eine

Aussage über die vorangegangene Dissoziation und damit über die Interaktion zwischen GPCR und G-Protein erlaubt [Cassel 1978].

Zur Untersuchung der Interaktion GPCR - $G\alpha_s$ auf der Ebene des G-Proteins wurden die Rezeptoren zusammen mit den $G\alpha_s$ -Spleißvarianten und $\beta_2\gamma_2$ -Untereinheiten in Sf9-Zellen exprimiert, Plasmamembranen isoliert und [^{35}S]GTP γ S-Bindungskinetiken bestimmt. Die Rezeptor-abhängige Nukleotid-Bindung konnte in Gegenwart besonders niedriger Substratkonzentrationen mit besserem Signal-Hintergrund-Verhältnis gemessen werden (optimal bei 1 nM [^{35}S]GTP γ S, vgl. Abschnitt 4.2.1). Diese Konzentration des Nukleotid-Analogs ist niedrig im Vergleich zum physiologischen Gehalt an GTP. Die intrazelluläre GTP-Konzentration wird mit Ganzzell-Quantifizierungen mit 0,3-2 mM angegeben [Kleineke 1979; Geisbuhler 1984], wobei nicht zwischen freiem und gebundenem GTP unterschieden werden kann. Mit der *patch clamp*-Technik wurden an intakten Herzmiozyten freie Nukleotid-Konzentrationen am G-Protein von 25-106 μM gemessen [Breitwieser 1988]. Kompetitionen von GTP γ S mit GTP an gereinigtem $G\alpha_s$ zeigen halbmaximale inhibierende Konzentrationen um 1 μM , an Plasmamembranen lagen sie noch darunter [Northup 1982]. Diese Daten weisen auf die höhere Affinität von $G\alpha_s$ zum GTP-Analog GTP γ S im Vergleich zu anderen zellulären GTP-Bindungsstellen hin. Durch Absenkung der Substratkonzentration wurde der Rezeptor-unabhängige Anteil der [^{35}S]GTP γ S-Bindung gegenüber dem spezifischen Anteil verkleinert.

Die niedrigen Substratkonzentrationen hatten daneben zur Folge, dass nur ein Teil des in den Plasmamembranen enthaltenen $G\alpha_s$ an der Reaktion teilnahm. Die Asymptoten der Rezeptor-abhängigen [^{35}S]GTP γ S-Bindungen lagen bei 3 fmol/ μg umgerechnet 130 pg/ μg (Abbildung 27B). Im Immunoblot wurden dagegen $G\alpha_s$ -Konzentrationen bis zu 10 ng/ μg in diesen Plasmamembranen gemessen, d. h. um 1 % der $G\alpha_s$ -Moleküle banden [^{35}S]GTP γ S. In einem typischen Experiment wurden 1 μg Plasmamembran pro Probe eingesetzt, demnach bis zu 230 fmol $G\alpha_s$. Bei einer Substratkonzentration von 1 nM lagen im gleichen Volumen 200 fmol [^{35}S]GTP γ S vor. Damit lag das Substrat gegenüber der α -Untereinheit nicht in hohem Überschuss vor. Wie oben dargelegt, waren die niedrigen Substratkonzentrationen jedoch die Voraussetzung zur robusten Messung der Rezeptor-abhängigen [^{35}S]GTP γ S-Bindung vor dem Hintergrund der Plasmamembranen.

Bestimmungen der Interaktion von GPCR mit den $G\alpha_s$ -Spleißvarianten über Nukleotidbindungskinetiken an Plasmamembranen sind bisher nur für Fusionsproteine publiziert worden. So zeigten Wenzel-Seifert *et al.* geringe Unterschiede zwischen einer langen bzw. kurzen Spleißvariante in Fusion mit dem β_2 -adrenergen Rezeptor in Plasmamembranen von Sf9-Zellen [Wenzel-Seifert 2000]. Die Konstanten der Rezeptor-abhängigen [35 S]GTP γ S-Bindung liegen bei $0,16 \text{ min}^{-1}$ für $G\alpha_s$ -L und $0,08 \text{ min}^{-1}$ für $G\alpha_s$ -S, wobei das Fusionsprotein der langen Spleißvariante mit dem Rezeptor konstitutiv aktiv ist. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Bindungskonstanten (k_{app}) der β_2 -adrenerg stimulierten Nukleotid-Bindung lagen für alle vier Spleißvarianten um $0,1 \text{ min}^{-1}$ (Abbildung 29). Diese Messung an diskreten Proteinen ist eine bessere Annäherung des Modells an die Verhältnisse in Säugerzellen als die Arbeit mit Fusionsproteinen.

Deutliche Unterschiede bestanden in der vorliegenden Arbeit zwischen den Bindungskonstanten, die bei Aktivierung durch verschiedene Rezeptoren gemessen wurden (Abbildung 29). Die Aktivierung des Secretin- oder Histamin-Rezeptors führte zu schnellerer Bindung des Nukleotids an das G-Protein als die Aktivierung des β_2 -adrenergen oder Glucagon-Rezeptors. Der Unterschied kann sowohl in intrinsischen Unterschieden der Rezeptor-G-Protein-Interaktion als auch in unterschiedlich hoher Rezeptorexpression beruhen. Eine Unterscheidung der Ursachen könnte durch Quantifizierung der Rezeptorbesatzes in Ligand-Bindungsstudien erfolgen.

Die Interaktion von GPCR mit $G\alpha_s$ -Spleißvarianten wurde in der vorliegenden Arbeit auch durch Messung der Adenylylcyclase-Aktivität betrachtet. Obwohl Adenylylcyclase in nativen Geweben nur in geringen Konzentrationen gefunden wird [Kim 1994; Post 1995], kann die enzymatische Aktivität zur Signalverstärkung führen und könnte geringe Unterschiede der Rezeptor-G-Protein-Kopplung nachweisbar machen. Die Messung der Adenylylcyclase-Aktivität erfasst Signalmodulationen bei den Interaktionen zwischen GPCR – $G\alpha_s$ sowie $G\alpha_s$ – Adenylylcyclase. Da, wie oben dargestellt, die Interaktion der vier Spleißvarianten mit der Adenylylcyclase im genutzten Modellsystem vergleichbar waren, erlaubt die Rezeptor-abhängige Adenylylcyclase-Aktivität Rückschlüsse auf die davor liegende Interaktion. Bei der Stimulation der Adenylylcyclase durch GPCR waren die vier Spleißvarianten vergleichbar potent und effizient. Deutliche Unterschiede bestanden zwischen der Aktivierung durch verschiedene Rezeptoren (Tabelle 9). Die hier gezeigten Untersuchungen in zwei Systemen zeigen, dass die vier $G\alpha_s$ -Spleißvarianten zu

vergleichbarer Kopplung mit den untersuchten GPCR und Adenylylcyclasen in der Lage sind.

5.4 Weitere Signalwege unter Beteiligung von $G\alpha_s$

Die vorangehenden Kapitel haben gezeigt, dass die $G\alpha_s$ -Spleißvarianten vergleichbare Eigenschaften in der Signaltransduktionskaskade von GPCR zur Adenylylcyclase aufweisen. Da während der Ontogenese in vielen Geweben reproduzierbare Veränderungen im Expressionsmuster der Spleißvarianten beobachtet werden, ist anzunehmen, dass die Regulation des Spleißverhaltens des Gens *GNAS* für Säugerzellen von Bedeutung ist. Demnach müssen weitere Interaktionspartner des $G\alpha_s$ für eine Spleißvarianten-spezifische Interaktion in Erwägung gezogen werden. Hierzu zählen die Regulatoren der G-Protein-Signaltransduktion (RGS), das Tubulin und die Kinasen der Src-Familie, die im Folgenden vorgestellt werden.

Für die α -Untereinheiten der Unterfamilien G_i , G_q und $G_{12/13}$ sind RGS bekannt (zur Übersicht siehe [Hollinger 2002]). Jedoch gibt es bisher nur eine Veröffentlichung, die ein $G\alpha_s$ -spezifisches GAP mit Namen RGS-PX1 beschreibt [Zheng 2001]. Da die GAP-Aktivität seitdem nicht reproduziert werden konnte, kann über eine Bedeutung dieser Interaktion nur spekuliert werden. Als GAP können auch Effektoren von G-Proteinen wirken. Beschrieben wurde das bereits an der Wirkung von Phospholipase β_1 auf $G\alpha_q$ [Berstein 1992] und einer cGMP-abhängigen Phosphodiesterase auf $G\alpha_t$ [Arshavsky 1992]. Für $G\alpha_s$ wurde eine GAP-Wirkung durch die Adenylylcyclase-Isoform AC V beschrieben [Scholich 1999]. Mit den in der vorliegenden Arbeit genutzten Modellen kann sich diese Wirkung prinzipiell in der Rezeptor-stimulierten Adenylylcyclase-Aktivierung in 2B2-Zellen zeigen (Abschnitt 4.3.3.5). Von einer GAP-Wirkung betroffene Spleißvarianten wären weniger potent in der Rezeptor-abhängigen Stimulation der Adenylylcyclase. Dem entgegen steht jedoch das Vorhandensein mehrerer Adenylylcyclase-Isoformen in dieser Zelllinie (Abschnitt 5.2), die eine GAP-Wirkung einer einzelnen Isoform maskieren dürfte. Besser geeignet wäre ein System, in dem lediglich eine AC-Isoform exprimiert wird. Darüber hinaus ist die Messung der GTP-Hydrolyse-Geschwindigkeit unverzichtbar, um eine Wirkung auf die GTPase-Aktivität von anderen Möglichkeiten zu unterscheiden. Die Interaktion zwischen $G\alpha_s$ (und anderen G-Proteinen) und Tubulin wird seit Mitte der 1980er Jahre wiederholt beschrieben [DoKhac 1983; Leiber 1993; Jasper 1995]. Tubulin

ist der Baustein der Mikrotubuli und besitzt selbst GTPase-Aktivität. Eine Spaltung der Mikrotubuli stimuliert die Signalübertragung von GPCR in unterschiedlichen Systemen [DoKhac 1983; Nishigaki 1998]. Eine interessante Interaktion zwischen Tubulin und $G\alpha_s$ ist der direkte Nukleotid-Transfer vom Tubulin- zum $G\alpha_s$ -Molekül. Tubulin bindet selektiv an $G\alpha_s$, $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_q$, nicht jedoch an andere α -Untereinheiten [Wang 1990]. Die physiologische Bedeutung dieser Interaktion ist noch nicht klargestellt. Die *in vitro* gezeigte Trans-Aktivierung von $G\alpha_s$ [Yan 2001] würde die Modulation der G_s -vermittelten Erregbarkeit in Abhängigkeit vom Zustand des Zytoskeletts erklären, wie sie bereits gezeigt wurde [Leiber 1993].

Erst jüngst beschriebene Interaktionspartner von $G\alpha_s$ sind die Kinasen der Src-Familie [Ma 2000], die in die Kontrolle des Zellwachstums involviert sind. Interessant ist daran vor allem, dass eine Aktivierung des β -adrenergen Rezeptors über $G\alpha_s$ unabhängig von der Adenylylcyclase zur Aktivierung von Src-Kinasen führt. *In vitro* führt diese Aktivierung zur Apoptose [Gu 2000]. Inwieweit dieser Mechanismus *in vivo* Bedeutung besitzt, ist nicht bekannt. Jedoch wurde der Zusammenhang einer Adenylylcyclase-unabhängigen Förderung der Apoptose bereits für den Thrombin-Rezeptor in Neuronen und Astrozyten beschrieben [Donovan 1997]. Der Einfluss der $G\alpha_s$ -Spleißvarianten könnte durch Rekonstitution in 2B2-Zellen und Messung der Apoptose untersucht werden.

Für die oben beschriebenen Interaktionspartner wurde eine differentielle Involvierung der Spleißvarianten von $G\alpha_s$ noch nicht untersucht. Es besteht im Moment keine Möglichkeit, Voraussagen zu treffen, da die molekularen Interaktionsstellen der Moleküle mit dem G-Protein noch nicht bekannt sind. Ein Ansatz zur gezielten Manipulation des Expressionsverhältnisses der Spleißvarianten ist die Überexpression von Spleißfaktoren [Pollard 2002]. Mit diesem Werkzeug könnten die relative Expression der $G\alpha_s$ -Spleißvarianten beeinflusst und messbare Veränderungen in den beschriebenen Signalwegen provoziert werden.