

## **6 ZUSAMMENFASSUNG**

Das stimulatorische Guaninnukleotid-bindende Protein ( $G_S$ ) überträgt Signale von  $G_S$ -gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zu Adenylylcyclasen und erhöht dadurch die Produktion des *second messengers* cAMP. In Geweben von Säugerorganismen werden vier Spleißvarianten der  $\alpha$ -Untereinheit von  $G_S$  ( $G\alpha_S$ ) exprimiert. Die einzelnen Spleißvarianten sind in zahlreichen Untersuchungen charakterisiert worden, jedoch sind die Ergebnisse wegen unterschiedlicher Messparameter und -systeme weder einheitlich noch vergleichbar. Für heterolog exprimierte, aufgereinigte Spleißvarianten wurden Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften beschrieben, aber es ist nicht bekannt, ob diese Unterschiede über die gesamte Signalkaskade verstärkt oder abgeschwächt werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Effektivität der Signaltransduktion über die vier Formen des  $G\alpha_S$  anhand variantenspezifischer Repression (*knock down*) oder durch Rekonstitution unmodifizierter Spleißvarianten in  $G\alpha_S$ -defizienten Zelllinien verglichen.

Mehrere Methoden zur transienten Repression wurden mit Hilfe eines Luziferase-Reportersystems verglichen. Katalytisch aktive DNA (DNAzym) war wegen der geringen Aktivität bei physiologischen Magnesiumkonzentrationen ungeeignet. Dagegen wurde eine bis zu 90 %ige Inhibition der Luziferase-Expression durch die Verwendung von Propin-modifizierten Oligodeoxynukleotiden oder durch intrazelluläre Expression von *small interfering RNA* erreicht. Aufgrund ihrer größeren Flexibilität bei der Wahl der Zielsequenz wurden Propin-modifizierte Oligodeoxynukleotide zur Repression von  $G\alpha_S$  ausgewählt. Sie verminderten die Expression von transient transfiziertem, aber nicht von endogenem  $G\alpha_S$ .

In Sf9-Insektenzellen wurden  $G\alpha_S$ -Spleißvarianten mit unterschiedlichen GPCR ko-exprimiert. Die Wechselwirkung zwischen GPCR und  $G\alpha_S$  wurde mit Hilfe von ligandenabhängigen Bindungskinetiken des GTP-Analogs [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S an Plasmamembranen analysiert. Die Spleißvarianten wurden mit vergleichbaren Nukleotid-Bindungskonstanten durch die  $\beta_2$ -adrenergen, Glucagon-, Histamin- und Secretin-Rezeptoren aktiviert ( $k_{app} \approx 0,1 \text{ min}^{-1}$ ).

In der  $G\alpha_S$ -defizienten Maus-Fibroblastenzelllinie 2B2 wurde die Signaltransduktionskaskade GPCR –  $G\alpha_S$  – Adenylylcyclase durch transiente Expression der  $G\alpha_S$  Spleiß-

---

varianten rekonstituiert und auf der Ebene der Adenylylcyclase untersucht. Die Interaktion der Spleißvarianten mit der Adenylylcyclase wurde durch direkte Aktivierung des G-Proteins in Plasmamembranen verglichen. Die vier Spleißvarianten aktivierten die Adenylylcyclase mit halbmaximal wirksamen Konzentrationen von 0,24-0,31 nM und waren vergleichbar effizient. Weil diese Werte äquivalent waren, konnte die Adenylylcyclase-Aktivität als Maß für die Interaktion zwischen GPCR und  $G\alpha_s$  verwendet werden. Die Spleißvarianten waren vergleichbar potent in der Adenylylcyclase-Aktivierung durch  $\beta_2$ -adrenergen, Glucagon-, Histamin-, Secretin-, Vasopressin- und Luteinisierungshormon-Rezeptor. Zusammenfassend zeigte diese Arbeit, dass sich die  $G\alpha_s$ -Spleißvarianten in der GPCR-vermittelten Adenylylcyclase-Aktivierung vergleichbar verhalten. Daher muss der Grund für die Expression der vier Spleißvarianten noch gefunden werden; die bisher wenig untersuchten Interaktionen mit weiteren Signalmolekülen, wie Tubulin oder den Src-Kinasen, werden diskutiert.