

Bedeutung der Spleißvarianten des
stimulatorischen G α -Proteins für die Rezeptor-
abhängige Adenylylcyclase-Aktivierung

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
HENDRIK FALK
aus Halle/ Saale

August 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus
Institut für Biochemie
Freie Universität Berlin
Thielallee 63, 14195 Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Burghardt Wittig
Institut für Molekularbiologie und BioInformatik
Campus Benjamin Franklin
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Arnimallee 22, 14195 Berlin

Disputation am: 28.11.2007

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	V
1	Einleitung	1
1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	1
1.2	G-Proteine	4
1.2.1	Der Aktivierungs- und Deaktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine	6
1.2.2	Die α-Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins ($G\alpha_s$)	8
1.2.2.1	Das $G\alpha_s$ -kodierende Gen <i>GNAS</i>	8
1.2.2.2	Bildung der $G\alpha_s$ -Spleißvarianten	9
1.2.2.3	Differentielle Expression der $G\alpha_s$ -Spleißvarianten.....	11
1.2.2.4	Subzelluläre Lokalisation von $G\alpha_s$	11
1.2.2.5	Molekulare Struktur von $G\alpha_s$	12
1.2.2.6	Biochemische Eigenschaften der $G\alpha_s$ -Spleißvarianten.....	15
1.2.2.6.1	Verbreitete Modellsysteme	15
1.2.2.6.2	Eigenschaften von $G\alpha_s$ als Protein und Enzym.....	16
1.2.2.6.3	Interaktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit $G\alpha_s$	16
1.2.2.6.4	Die Rezeptor-aktivierte Stimulation der Adenylylcyclase.....	17
1.3	Die Adenylylcyclasen als Effektoren von $G\alpha_s$	18
2	Zielstellung	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Chemikalien	25
3.1.2	Antikörper, immunogene Peptide und Kopplungsreagenzien	27
3.1.3	Radioaktiv markierte Substanzen	27
3.1.4	Oligodeoxynukleotide	27
3.1.4.1	PCR-Primer	27
3.1.4.2	Oligodeoxynukleotide zur Transfektion in Säugerzellen.....	28
3.1.4.3	Oligodeoxynukleotide zur Ligation in pSUPER	29
3.1.5	Verbrauchsmaterialien	30

3.1.6	Geräte.....	30
3.1.7	Lösungen und Puffer	31
3.2	Methoden	33
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	33
3.2.1.1	Klonierung von $G\alpha_s$ -Spleißvarianten kodierenden Plasmiden	33
3.2.1.1.1	$G\alpha_s$ -L2-kodierendes Plasmid	34
3.2.1.1.2	$G\alpha_s$ -L1-, -S3- und -S4-kodierende Plasmide	35
3.2.1.2	Rezeptor-kodierende Plasmide zur Expression in Säugerzellen	36
3.2.1.2.1	Klonierung eines Plasmids zur Expression des Glucagon- und β_2 - adrenergen Rezeptors in Säugerzellen	36
3.2.1.2.2	Weitere Rezeptor-kodierende Plasmide.....	37
3.2.2	Zellbiologische Methoden	38
3.2.2.1	Heterologe Expression in der Insektenzelllinie Sf9.....	38
3.2.2.1.1	Kultivierung von Sf9-Zellen.....	38
3.2.2.1.2	Herstellung rekombinanter Baculoviren.....	39
3.2.2.1.3	Amplifikation rekombinanter Baculoviren.....	40
3.2.2.1.4	Titerbestimmung von Baculovirus-haltigen Zellkulturüberständen	40
3.2.2.1.5	Infektion von Sf9-Zellen mit Baculoviren.....	41
3.2.2.2	Kultivierung von Säugerzellen	42
3.2.2.2.1	Transfektion der Zelllinie 2B2 durch Elektroporation.....	42
3.2.2.2.2	Generierung stabiler Zelllinien	43
3.2.3	Biochemische Methoden.....	44
3.2.3.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	44
3.2.3.2	Präparation von Plasmamembranen	44
3.2.3.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	46
3.2.3.4	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (<i>Western blot</i>)	47
3.2.3.5	Immunologische Detektion und Quantifizierung	47
3.2.3.5.1	Detektion von auf Nitrozellulosemembranen immobilisiertem $G\alpha_s$	47
3.2.3.5.2	Quantifizierung von $G\alpha_s$ im <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	48
3.2.3.5.3	Standard zur Quantifizierung von $G\alpha_s$	49
3.2.4	Methoden zur funktionellen Analyse von Enzymen.....	50
3.2.4.1	Adenylylcyclase-Aktivität an isolierten Plasmamembranen	50
3.2.4.2	Adenylylcyclase-Aktivität an intakten Zellen.....	51
3.2.4.3	Adenylylcyclase-Aktivität an mikroinjizierten Zellen.....	52
3.2.4.4	Bindungskinetik von [35 S]GTP γ S an Plasmamembranen.....	52
3.2.4.5	Messung der Aktivierung von Proteinkinase A mittels Fluoreszenz- Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	53
3.2.4.6	Metabolische Markierung	54

3.2.4.7	Aktivitätsbestimmung von Luziferasen.....	55
3.2.5	Verwendete Computerprogramme.....	55
4	Ergebnisse	57
4.1	Untersuchung der Rezeptor-abhängigen Adenylylcyclase- Aktivierung an Systemen mit verminderter $G\alpha_s$-Expression.....	57
4.1.1	Vergleich von Methoden zur transienten Repression am Luziferase-Modellsystem	58
4.1.1.1	Oligodeoxynukleotide.....	60
4.1.1.2	DNA-Konstrukte mit enzymatischer Aktivität.....	61
4.1.1.3	RNA-Interferenz	65
4.1.2	Stabilität der $G\alpha_s$-Spleißvarianten in Säugerzellen	66
4.1.3	Messung der Adenylylcyclase-Aktivierung an geringen Zellzahlen	69
4.1.3.1	Messung der Rezeptor-abhängigen Adenylylcyclase-Aktivierung mit Fluoreszenz-markierter Proteinkinase A	70
4.1.3.2	Messung der Rezeptor-abhängigen Adenylylcyclase-Aktivierung im cAMP-spezifischen <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	72
4.1.4	Inhibition der $G\alpha_s$-Expression	74
4.2	Messung der Interaktion zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und $G\alpha_s$ auf der Ebene des G-Proteins in über- exprimierenden Systemen	77
4.2.1	Adaptierung der Messung von Nukleotid-Bindungskinetiken.....	77
4.2.2	Kinetiken der Rezeptor-abhängigen Bindung von [35S]GTPγS an $G\alpha_s$	81
4.3	Signalübertragung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zur Adenylylcyclase in überexprimierenden Systemen.....	86
4.3.1	Quantifizierung der $G\alpha_s$-Konzentration in Plasmamembranen.....	86
4.3.1.1	Quantifizierung von $G\alpha_s$ im <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	87
4.3.1.2	Quantifizierung von $G\alpha_s$ auf Nitrozellulosemembranen.....	90
4.3.2	Rezeptor-stimulierte Adenylylcyclase-Aktivität in Plasma- membranen.....	91
4.3.3	$G\alpha_s$-abhängige Signaltransduktion in Maus-Fibroblasten	95
4.3.3.1	Rekonstitution der Signaltransduktion in $G\alpha_s$ -defizienten Zellen	95
4.3.3.2	Kinetik der transienten Expression von $G\alpha_s$	99
4.3.3.3	Einfluss der inhibitorischen G-Proteine auf die Adenylylcyclase- Aktivierung in Maus-Fibroblasten.....	100
4.3.3.4	Interaktion $G\alpha_s$ -Adenylylcyclase	101

4.3.3.5	Bedeutung von $G\alpha_s$ bei der Rezeptor-vermittelten Stimulation der Adenylylcyase	103
5	Diskussion	109
5.1	Expression von $G\alpha_s$-Spleißvarianten in Säugerzellen	109
5.1.1	Native Verhältnisse	109
5.1.2	Überexpression	109
5.1.3	Inhibition der Expression	110
5.1.4	Einfluss von Lipidmodifikationen und der subzellulären Verteilung von $G\alpha_s$ auf seine Detektion	113
5.2	Interaktion zwischen $G\alpha_s$ und der Adenylylcyase	115
5.3	Interaktion zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und $G\alpha_s$	119
5.4	Weitere Signalwege unter Beteiligung von $G\alpha_s$	122
6	Zusammenfassung	125
7	Summary	127
8	Literaturverzeichnis	129

Anhang

Eigene Veröffentlichungen

Erklärung

Danksagungen

ABKÜRZUNGEN

2B2	G α_s -defiziente Fibroblasten-Zelllinie der Maus (<i>mus musculus</i>)
AC	Adenylylcyclase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B0	maximale Bindungskapazität im ELISA
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3'-5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CFP	Cyan Fluoreszierendes Protein
cpm	registrierte Zerfallsereignisse pro Minute
CSP	<i>Cystein String Protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Essential Medium</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Konzentration von Liganden bzw. G α_s , die einen halbmaximalen Effekt hervorruft
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-2-aminoethyl-N,N, N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Epac	ein Nukleotid-Austauschfaktor (<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>)
FCS	Fötales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GNAS bzw. <i>Gnas</i>	Symbol für das G α_s -kodierende Gen bei Mensch bzw. Maus
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-O-(3-thio)-triphosphat

hCG	Humanchoriongonadotropin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hnRNPA1	ein <i>small nuclear ribonucleoprotein</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IP	Immunpräzipitation
IRES	Cap-unabhängiges Ribosomen-Bindemotiv einer mRNA (<i>Internal ribosome entry site</i>)
k_{app}	scheinbare Nukleotid-Bindungskonstante
LH	Luteinisierungshormon
MOI	Überschuss der Infektion (Verhältnis Viren pro Zelle)
M_r	relative Molekülmasse
NESP55	Neuroendokrines sekretorisches Protein, $M_r = 55$ kDa
OD	Optische Dichte (Absorption)
ODN	Oligodeoxynukleotid
OPD	o-Phenylendiamin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
R	Rezeptor
RGS	Regulator der G-Protein-Signaltransduktion
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RLU	<i>relative light units</i> ; Lichtmenge in Einheit des Messgerätes
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
S49 cyc ⁻	G α_s -defiziente Lymphom-Zelllinie der Maus (<i>mus musculus</i>)
S49	Lymphom-Zelllinie der Maus (<i>mus musculus</i>)
Sf9	Zelllinie von <i>Spodoptera frugiperda</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein</i>
SR-Proteine	Serin-Arginin-reiche Proteine
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanlaurat
U2AF	U2 <i>auxilliary factor</i>
wt	Wildtyp
XL α_s	Expressionsprodukt des komplexen Lokus GNAS
YFP	Gelb Fluoreszierendes Protein
Y_{max}	Asymptote der Bindung (Gleichgewichtszustand)