
4 ERGEBNISSE

Die Untersuchung der Signaltransduktionskaskade zwischen den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und der Adenylylcyclase gliedert sich entsprechend der aufgestellten Ziele in Systeme mit verringerter Proteinexpression (Abschnitt 4.1) und die Rekonstitution von $G\alpha_s$, welche auf der Ebene des G-Proteins (4.2) und der Adenylylcyclase untersucht wurde (4.3). Als Teil des Projektes wurden Plasmide kloniert, die Spleißvarianten und Rezeptoren kodierten und zur Expression in Säuger- bzw. Insektenzellen geeignet waren. Ihre Erstellung ist als Teil der Methoden im Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

4.1 Untersuchung der Rezeptor-abhängigen Adenylylcyclase-Aktivierung an Systemen mit verminderter $G\alpha_s$ -Expression

Die Funktion eines Proteins kann durch Repression und Messung des daraus resultierenden Funktionsverlustes charakterisiert werden. Es werden die Inhibition auf genomischer Ebene (*knock out*) und auf posttranskriptionaler Ebene (*knock down*) unterschieden. Beim *knock out*-Ansatz wird das Zielgen in embryonalen Stammzellen inaktiviert, in eine Blastozyste transferiert und in eine scheinchwangere Leihmutter übertragen. Durch geeignete Auswahl der Wurfgeschwister können in folgenden Generationen für das Zielgen homozygote *knock out*-Tiere erhalten werden. Dieser Ansatz erzeugt für das $G\alpha_s$ -kodierende Gen *Gnas* der Maus keine lebensfähigen homozygoten Tiere [Yu 1998].

Im Gegensatz dazu wird ein *knock down* somatisch durchgeführt. Die Zielstruktur ist die vom Gen transkribierte mRNA. Durch spezifisch hybridisierende RNA oder DNA wird die Translation der mRNA verhindert oder ihr Abbau beschleunigt. Da die zelluläre Konzentration jedes Proteins ein Fließgleichgewicht zwischen Neusynthese und Abbau darstellt, sinkt bei verringerter Translation die Konzentration. Im Gegensatz zum *knock out* sinkt die zelluläre Konzentration der mRNA häufig nur um wenige Prozent, nur selten kann die Expression unter die Nachweisgrenze vermindert werden. Die Effektivität des *knock down* wird zum einen durch Faktoren auf Seite der Zelle bestimmt, wie z. B. der Transkriptionsrate des Gens und der Sekundärstruktur der mRNA, welche die Zugänglichkeit für RNA- und DNA-Konstrukte bestimmt. Zum anderen sind auf Seite der hybridisierenden Nukleinsäuren die Stabilität gegenüber Nukleasen, die Affinität zur Ziel-mRNA und die Effizienz des Transfers in die Zelle zu nennen.

Zur transienten Verminderung der Proteinexpression gibt es eine Vielzahl an Methoden. Daher wurden ausgewählte Methoden zuerst innerhalb eines Modellsystems hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit miteinander verglichen.

4.1.1 Vergleich von Methoden zur transienten Repression am Luziferase-Modellsystem

Die Methoden zur transienten Inhibition der Expression umfassen die Applikation von *antisense*-mRNA, *antisense*-Oligodeoxynukleotide (ODN), katalytisch aktiver RNA (Ribozym) und DNA (DNAzym) sowie die RNA-Interferenz (Tabelle 5).

Zur Transfektion werden häufig lipidbasierte Methoden oder die Calciumphosphat-Präzipitation eingesetzt. Bei diesen Methoden ist die Transfektionseffizienz unter anderem von der chemischen Natur der transfizierten Nukleinsäuren abhängig. Um davon unabhängig Substanzen in Zellen zu transfizieren, wurde die Mikroinjektion gewählt. Da mit der Mikroinjektion nur geringe Zellzahlen bearbeitet werden können, wurde als Nachweissystem die Luziferase des nordamerikanischen Leuchtkäfers (*firefly*, *Photinus pyralis*) gewählt. Luziferasen katalysieren eine Oxidationsreaktion des Substrates, bei der Energie als Lichtquanten freigesetzt wird [Hastings 1983]. Das Licht wird mit Wellenlängen im sichtbaren Bereich abgestrahlt und kann mit Sekundärelektronenvervielfachern sehr empfindlich und mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis gemessen werden, so dass die Expression bereits an wenigen Dutzend Zellen quantifizierbar ist.

Verfahren	spezielle Eigenschaften	Wirkmechanismus	Selektivität ^a
<i>antisense</i> mRNA	wird meist durch Transkription von einem Plasmid in der Zelle erzeugt	Inhibition der Ribosomen-Bindung [Baker 1999]	niedrig
modifizierte <i>antisense</i> -Oligodeoxynukleotide	Phosphorthioat-Modifikation des Rückgrates erhöht Stabilität in der Zelle [Fisher 1993]; Ersatz von Cytosin und Thymin gegen C ₅ -Propin-modifizierte Basen erhöht die Schmelztemperatur des Hybrids [Flanagan 1996]	Inhibition der Ribosomen-Bindung; Abbau des RNA-DNA-Hybrids durch RNase H [Baker 1999]	hoch
Ribozyme, DNAzyme	eine intrinsisch katalytisch aktive Struktur (<i>loop</i>) wird von Sequenzen flankiert, welche die Spezifität für ein Ziel-mRNA garantieren; beschrieben für RNA und -DNA [Santoro 1997]	Spaltung der mRNA	hoch
<i>small interfering RNA</i> (siRNA)	kurze RNA-Duplizes verursachen den mRNA-Abbau durch den zelleigenen Mechanismus der RNA-Interferenz [Brantl 2002]	mRNA-Spaltung durch zelleigenen RNA <i>induced silencing complex</i>	hoch

Tabelle 5: Vergleich von Verfahren zur transienten Inhibition der Proteinexpression.

^a Als Selektivität soll in diesem Zusammenhang die Fähigkeit des Verfahrens verstanden werden, zwischen verwandten mRNA zu unterscheiden. Sie wird von der Länge der mit der mRNA hybridisierenden Sequenz bestimmt.

Bei der Mikroinjektion können die injizierte DNA-Menge zwischen den Zellen und die Zellzahl zwischen verschiedenen Proben nicht konstant gehalten werden. Daher wurde die Expression einer weiteren Luziferase als interner Standard genutzt. Die Luziferase der Seefeder (*Renilla reniformis*) wird von einer entwicklungsgeschichtlich nicht mit dem Leuchtkäfer verwandten Art exprimiert, was sich auch in nicht verwandten Substraten äußert [Hastings 1983]. Beide Luziferase-Aktivitäten können an derselben Probe gemessen werden.

Die mRNA der *firefly*-Luziferase wurde als Ziel für die Repression genutzt. Die gemessenen Signale wurden auf die Aktivität der gleichzeitig transfizierten *Renilla*-Luziferase normiert. Die normierte *firefly*-vermittelte Lumineszenz stieg proportional zur injizierten *firefly*-kodierenden Plasmidmenge (Abbildung 9). Eine Verminderung der

Expression der *firefly*-Luziferase durch die zu vergleichenden *knock down*-Verfahren würde als Verminderung im Lumineszenzsignal sichtbar.

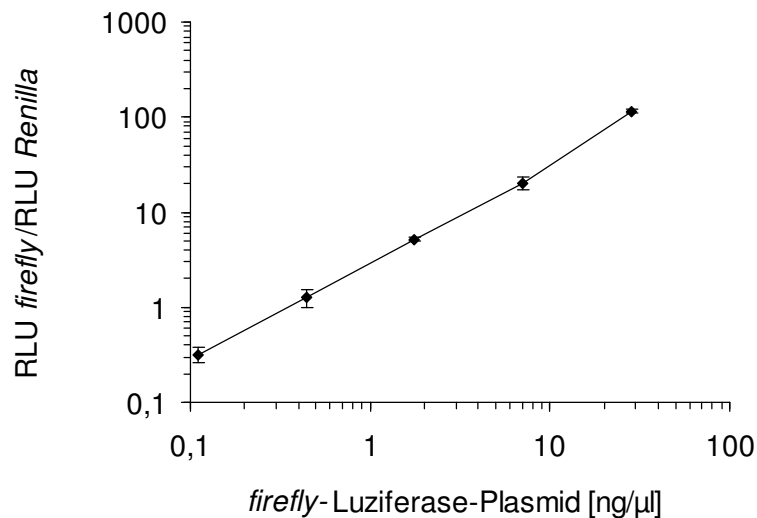


Abbildung 9: Die gemessene Luziferase-Aktivität in Abhängigkeit von der injizierten Plasmidmenge. Auf Mikroträgern wachsende CHO-K1-Zellen wurden mit einer Lösung von *firefly*- (variable Konzentration) und *Renilla*-Luziferase (0,11 ng/μl) kodierenden Plasmiden in destilliertem Wasser mikroinjiziert. 24 Stunden nach der Mikroinjektion wurden die Aktivitäten beider Luziferasen bestimmt (vgl. Abschnitt 3.2.4.7). Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung von Doppelwerten. RLU: *relative light units*, Lichtmenge in gerätespezifischer Einheit

In den folgenden Experimenten wurden die Luziferasen gleichzeitig mit den zu untersuchenden Substanzen in CHO-K1-Zellen injiziert. Die Methode der Expression von *antisense*-mRNA wurde nicht berücksichtigt, da sie für den angestrebten Spleißvariantenspezifischen *knock down* nicht hinreichend zwischen den verwandten Sequenzen unterscheiden kann.

4.1.1.1 Oligodeoxynukleotide

Es wurden zwei Bereiche aus der DNA-Sequenz der *firefly*-Luziferase ausgewählt, zu denen ODN in *antisense*-Orientierung synthetisiert wurden [Hamel 1999]. Die terminalen Basen der verwendeten ODN waren zum Schutz vor Degradation durch zelleigene Nukleasen mit Phosphorthioat-Bindungen verknüpft [Fisher 1993]. Zusätzlich wurde die Wirkung der Propin-Modifikation untersucht: Anstelle der Basen Cytosin und Thymin wurden C₅-Propin-Cytosin und C₅-Propin-Uracil eingesetzt. Diese Modifikationen können die Schmelztemperatur des DNA-mRNA-Hybrids (T_m) um bis zu 2 °C je Modifikation erhöhen [Wagner 1993]. Die Propin-modifizierten ODN inhibierten die Expression der *firefly*-Luziferase stärker als die nicht substituierten ODN (Abbildung 10). Die beiden

untersuchten Regionen waren unterschiedlich anfällig für die Inhibition der Expression durch Propin-modifizierte ODN.

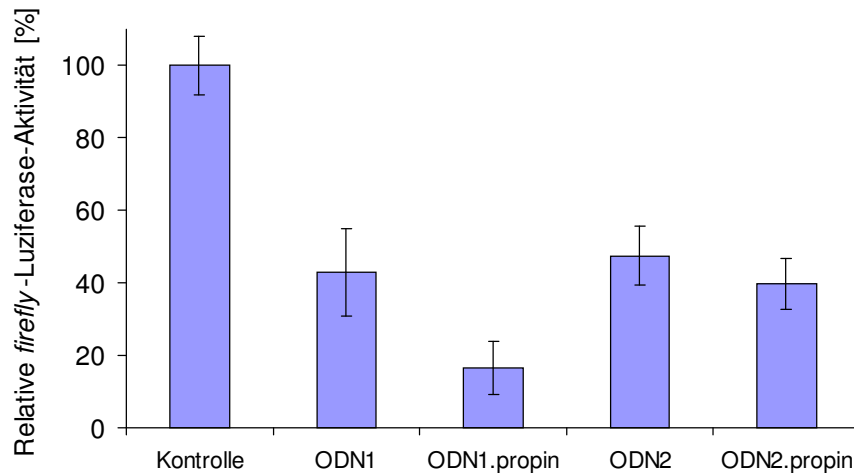


Abbildung 10: Vergleich der inhibitorischen Aktivität von modifizierten Oligodeoxynukleotiden. Auf Mikroträgern wachsende CHO-K1-Zellen wurden mit einer Lösung von *firefly*- und *Renilla*-Luziferase kodierenden Plasmiden (entsprechend 1,12 ng/ μ l und 2,2 ng/ μ l) sowie ODN (5 μ M) in destilliertem Wasser mikroinjiziert. 24 Stunden nach der Mikroinjektion wurden die Aktivitäten beider Luziferasen bestimmt (vgl. Abschnitt 3.2.4.7). Die Daten zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten mit zwei mikroinjizierten Proben je Konstrukt. Die Luziferase-Aktivitäten wurden relativ zum Signal in Anwesenheit eines nicht mit Luziferase-mRNA hybridisierenden Kontroll-ODN angegeben. Die Sequenzen der Oligodeoxynukleotide sind in Abschnitt 3.1.4.2 angegeben. ODN1.propin enthält 10 C5-Propin-dC bzw. C5-Propin-dU, ODN2.propin enthält 8 Substitutionen.

4.1.1.2 DNA-Konstrukte mit enzymatischer Aktivität

Oligodeoxynukleotide können ihre inhibierende Wirkung auf die Expression nur entfalten, solange sie an die mRNA gebunden vorliegen. Sie müssen daher in mindestens stöchiometrischer Konzentration in der Zelle vorliegen. Wünschenswert wären Konstrukte, die einen Abbau spezifizierbarer Zielsequenzen katalysieren und anschließend für erneute Reaktionen zur Verfügung stehen.

Ähnlich zur katalytischen Aktivität von bestimmten RNA-Sequenzen („Ribozyme“) wurden vor einigen Jahren auch DNA-Sequenzen identifiziert, die im DNA-RNA-Hybrid eine RNA-hydrolysierende Aktivität aufweisen. Durch das sogenannte „10-23“-DNAzym können Phosphodiester-Bindungen hydrolysiert werden, die zwischen einem Purin- und einem Pyrimidin-Nukleotid bestehen [Santoro 1997]. Das DNAzym besteht aus der zentralen katalytischen Struktur, die von Sequenzen flankiert wird, welche spezifisch mit der Ziel-mRNA hybridisieren können (Abbildung 11).

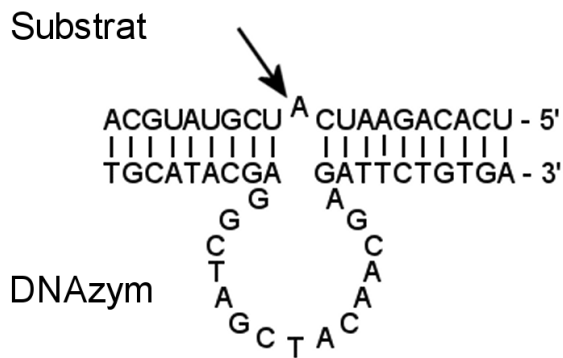


Abbildung 11: Sequenz und angenommene Struktur des verwendeten „10-23“-DNAzyms. Der Pfeil markiert die Spaltposition [Santoro 1997].

Es wurden DNAzyme gegen dieselben Regionen der *firefly*-Luziferase getestet, die von Oligodeoxynukleotiden erfolgreich inhibiert werden konnten. Die Inhibition der *firefly*-Luziferase-Expression war im Modellsystem niedriger als die durch Phosphorthioat-modifizierte ODN (Abbildung 12).

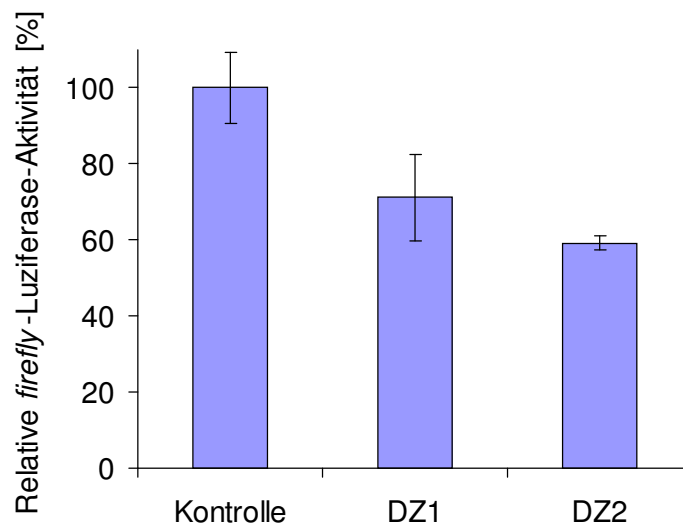


Abbildung 12: Vergleich der inhibitorischen Aktivität von DNAzymen. Auf Mikroträgern wachsende CHO-K1-Zellen wurden mit einer Lösung von *firefly*-Luziferase und *Renilla*-Luziferase kodierenden Plasmiden (entspr. 1,12 und 2,2 ng/ μ l) sowie DNAzymen (5 μ M) in destilliertem Wasser mikroinjiziert. Die DNAzyme DZ1/DZ2 hybridisierten an denselben Positionen wie ODN1/ODN2 (Abbildung 10, Abschnitt 3.1.4.2). 24 Stunden nach der Mikroinjektion wurden die Aktivitäten beider Luziferasen bestimmt (vgl. Abschnitt 3.2.4.7). Die Daten zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten mit zwei mikroinjizierten Proben je Konstrukt. Die Luziferase-Aktivitäten wurden relativ zum Signal in Anwesenheit eines nicht mit Luziferase-mRNA hybridisierenden Kontroll-ODN angegeben.

Die Fähigkeit zur Repression wird sowohl durch die Aktivität der katalytischen Region als auch durch die Länge der flankierenden Sequenzen beeinflusst, für die ein Optimum existiert [Santoro 1997]. Unterhalb einer bestimmten Anzahl von hybridisierenden Basen liegt die Schmelztemperatur für die Verhältnisse in lebenden Zellen zu niedrig, so dass kein zur Katalyse ausreichend langer Kontakt zustande kommt. Oberhalb einer bestimmten Länge ist die Hybridisierung dagegen so stabil, dass die Dissoziation der Spaltprodukte

verlangsamend wirkt. Daher wurde die Länge der hybridisierenden Sequenzen variiert (Abbildung 13).

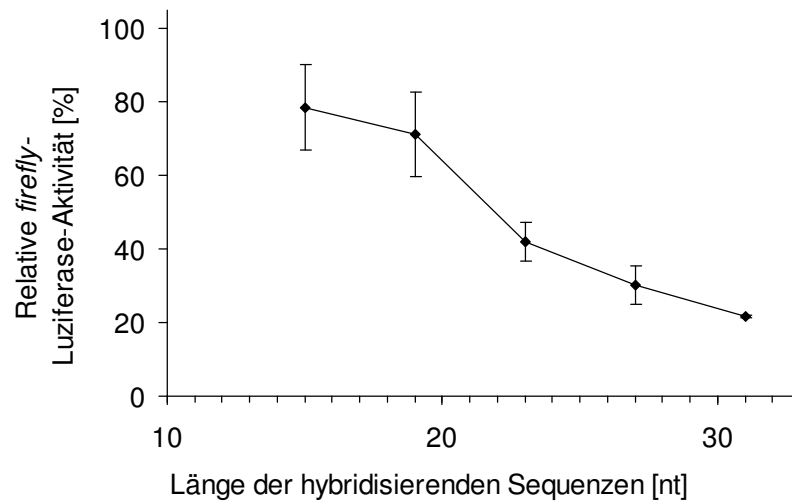


Abbildung 13: Inhibition der *firefly*-Luziferase-Expression in Abhängigkeit von der Länge der hybridisierenden Sequenzen beim DNAzym. CHO-K1-Zellen wurden mit einer Lösung von *firefly*- und *Renilla*-Luziferase kodierenden Plasmiden (entspr. 1,12 und 2,2 ng/μl) sowie DNAzymen (5 μM) in destilliertem Wasser mikroinjiziert. 24 Stunden nach der Mikroinjektion wurden die Aktivitäten beider Luziferasen bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwert ± Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten mit zwei mikroinjizierten Proben je Konstrukt. Die Luziferase-Aktivität in DNAzym-Proben wurde auf die Aktivität in Anwesenheit eines Kontroll-ODN bezogen. Die Hybridlänge ist angegeben als Anzahl der Basen in beiden Armen.

Das DNAzym verursachte mit zunehmender Länge eine höhere Inhibition der Expression. Offensichtlich war die katalytische Aktivität unter physiologischen Bedingungen weniger bedeutend als die Inhibition durch Hybridisierung. Daher wurde die Repression zwischen dem DNAzym und einer Mutante, deren katalytische Struktur durch Austausch der zentralen Basen inaktiv war, verglichen (Abbildung 14).

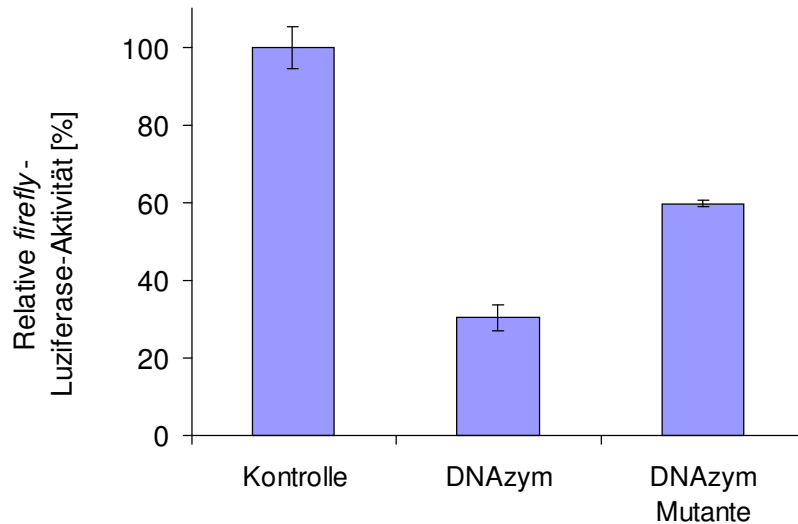


Abbildung 14: Vergleich der inhibitorischen Aktivität des DNAzyms mit einem Konstrukt, dessen katalytisches Zentrum inaktiviert wurde. CHO-K1-Zellen wurden mit einer Lösung von *firefly*- und *Renilla*-Luziferase kodierenden Plasmiden (entspr. 1,12 und 2,2 ng/ μ l) sowie DNAzymen (5 μ M) in destilliertem Wasser mikroinjiziert. Die hybridisierenden Sequenzen beider DNAzym-Konstrukte waren identisch (Länge 27 nt). 24 Stunden nach der Mikroinjektion wurden die Aktivitäten beider Luziferasen bestimmt. Die Luziferase-Aktivitäten wurden relativ zum Signal in Anwesenheit eines nicht mit Luziferase-mRNA hybridisierenden Kontroll-ODN angegeben. Die Daten zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten mit zwei mikroinjizierten Proben je Konstrukt.

Die Inhibition durch das DNAzym setzte sich aus der katalytischen Aktivität um 30 % und einer Inhibition durch die Hybridisierung in der gleichen Größenordnung zusammen. Dieser unerwartet niedrige Anteil der Katalyse wurde an *in vitro*-transkribierter RNA bestätigt: Dabei wurden die physiologischen Bedingungen mit den für das DNAzym optimalen Bedingungen verglichen (Abbildung 15).

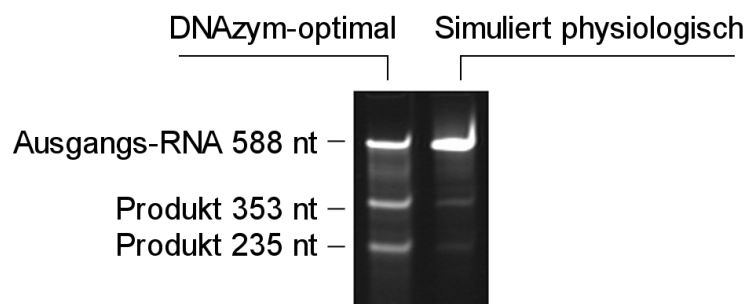


Abbildung 15: *in vitro* Aktivität des DNAzyms. Die Ausgangs-RNA wurde durch *in vitro*-Transkription hergestellt. Dazu wurde die *firefly*-Luziferase mit PCR mit den Primern P11 und P12 (vgl. Abschnitt 3.1.4.1) isoliert und über die damit eingeführten Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *HindIII* in den Vektor LITMUS 28i (Ambion, Austin, TX, USA) überführt. Von diesem wurde mit MEGAscript (Ambion, Austin, TX, USA) eine 588 Basen lange RNA generiert. Davon wurden 1 μ g RNA mit DNAzym (final 20 μ M) in verschiedenen Puffern bei 37°C für 180 Minuten inkubiert. Zur Pufferzusammensetzung nach [Santoro 1997] vgl. Abschnitt 3.1.7. Die Reaktionsansätze wurden auf Polyacrylamid-Gelen (6 % PAA, 7 M Harnstoff) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

Das DNAzym hatte unter optimalen Bedingungen eine wesentlich höhere katalytische Aktivität als unter annähernd physiologischen Bedingungen. Beide unterscheiden sich neben einer geringen Konzentration an Detergens vor allem in der Magnesium-Konzentration (optimal: 300 mM MgCl₂, simuliert physiologisch: 2 mM), von dessen Vorhandensein die Katalyse durch das DNAzym abhängig ist. Unter dieser Voraussetzung war das „10-23“-DNAzym nicht für den angestrebten Einsatz zur Inhibition der G α _S-Expression geeignet.

4.1.1.3 RNA-Interferenz

Das erst gegen Ende der 1990er Jahre beschriebene Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) hat die Methoden zur Inhibition der Proteinexpression maßgeblich bereichert [Fire 1998]. Die RNAi wird inzwischen als zelleigener Mechanismus angesehen, mit dem die Expression von Genen nicht nur auf der Ebene der Transkription genomischer DNA sondern zusätzlich über die Lebensdauer der mRNA reguliert wird (zur Übersicht vgl. [Lavorgna 2004]).

Ursprünglich über die repressive Wirkung doppelsträngiger RNA (dsRNA) entdeckt, wurde bald gezeigt, dass dsRNA in der Zelle weiter prozessiert wird [Elbashir 2001a]. Ein Mitglied der Superfamilie der RNase III (*Dicer*) spaltet dsRNA in 21 Nukleotide lange Duplices, die 3'-Überhänge besitzen (*small interfering RNA*, siRNA). Diese werden in einen Ribonukleoprotein-Komplex (*RNA induced silencing complex*, RISC) aufgenommen (524). Dieser Komplex identifiziert die Ziel-mRNA und katalysiert deren Spaltung. Jedoch sind nicht alle möglichen Abschnitte von 21 Nukleotiden Länge zur Induktion der RNAi geeignet [Elbashir 2001b]. Vorhersagen über die Effizienz einer siRNA sind inzwischen anhand ihrer thermodynamischen Eigenschaften möglich [Schwarz 2003; Khvorova 2003]. Die interne Stabilität bestimmt auch darüber, welcher der beiden Stränge der siRNA als Suchmuster für Ziel-mRNA verwendet wird.

In dieser Arbeit wurde ein Plasmid (pSUPER) genutzt, mit dessen Hilfe siRNA intrazellulär generiert werden können [Brummelkamp 2002]. Unter Kontrolle des Promotors der H1-RNA-Polymerase wurde eine selbst-komplementäre Sequenz transkribiert. Diese faltet sich spontan zu dsRNA und wird durch *Dicer* auf die Länge der siRNA verkürzt [Brummelkamp 2002].

Zum einen wurde eine siRNA gewählt, die gegen die gleiche Sequenz wie die zuvor untersuchten ODN gerichtet war. Zum anderen wurde eine Sequenz gewählt, die den von

Tuschl vorgeschlagenen Bedingungen entsprach [Elbashir 2001b]. Das bedeutete insbesondere die Wahl einer mit Doppel-Adenin beginnenden Sequenz. Die Sequenzen der siRNA wurden in pSUPER kloniert, und pSUPER anschließend zusammen mit dem Nachweissystem der Luziferasen mikroiinjiziert. Die siRNA an der dem ODN entsprechenden Position wies eine zum Propin-modifizierten ODN vergleichbare Inhibition um 70 % gegenüber der Kontrolle auf (Abbildung 16). Noch effizienter war die optimierte siRNA, bei der die *firefly*-Luziferase-Expression um 90 % verringert wurde.

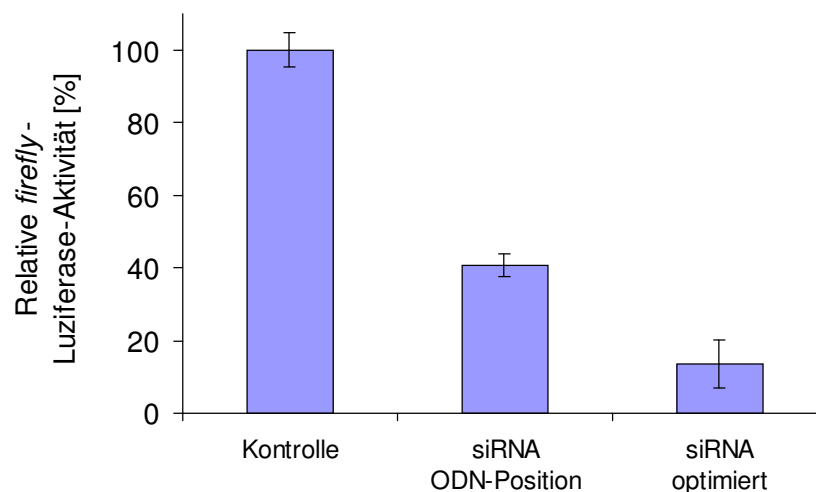


Abbildung 16: Vergleich von *in vivo* generierten siRNA, die gegen verschiedene Zielsequenzen gerichtet waren. CHO-K1-Zellen wurden mit einer Lösung von *firefly*- und *Renilla*-Luziferase kodierenden Plasmiden (entspr. 1,12 und 2,2 ng/ μ l) sowie siRNA-kodierenden pSUPER (20 ng/ μ l) in destilliertem Wasser mikroiinjiziert. Die Klonierung von pSUPER erfolgte durch Ligation von phosphorylierten, hybridisierten Primern in das mit *Bgl*III und *Hind*III verdaute Plasmid (vgl. Abschnitt 3.1.4.3). 24 Stunden nach der Mikroiinjektion wurden die Aktivitäten beider Luziferasen bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten. Die Luziferase-Aktivitäten wurden relativ zum Signal in Anwesenheit eines nicht mit Luziferase-mRNA hybridisierenden Kontroll-ODN angegeben.

Aus den durchgeführten Untersuchungen wurde gefolgert, dass RNAi ein höheres Potential zur Expressionsminderung besitzen, wobei die Wahl der Zielsequenzen eingeschränkt ist. Für Propin-modifizierte ODN kommen dagegen alle Sequenzen in Frage, die Cytosine oder Thyminen enthalten. Für die anvisierten $G\alpha_s$ -*knock down*-Experimente erschienen die Propin-modifizierten ODN demnach besser geeignet, da die zwischen den Spleißvarianten differierenden Bereiche sehr begrenzt sind.

4.1.2 Stabilität der $G\alpha_s$ -Spleißvarianten in Säugerzellen

In lebenden Zellen stellt sich die zelluläre Konzentration von Proteinen als Fließgleichgewicht aus Proteinsynthese und Abbau ein. Die Zellen steuern das Gleichgewicht über

Transkription, Transport und Proteolyse. Das Ziel eines *knock down* ist die (möglichst weitgehende) Inhibition der Expression. In der Folge wird die zelluläre Konzentration des Zielproteins vor allem durch die Geschwindigkeit seines Abbaus bestimmt. Die Abbauraten erlauben die Abschätzung des Zeitfensters, in welchem eine Wirkung auf die zelluläre Proteinkonzentration zu erwarten ist.

Für die Spleißvarianten von $G\alpha_s$ wurden die Abbauraten mittels metabolischer Markierung und Verfolgung bestimmt. Dazu wurden für eine Markierungszeit radioaktiv markierte Aminosäuren vorgelegt. Diese werden in alle während dieser Zeit synthetisierten Proteinmoleküle inkorporiert. Nach dem Ende der Markierungszeitspanne wurden die Zellen mit einem Überschuss an unmarkierten Aminosäuren versorgt, so dass ab diesem Zeitpunkt keine weiteren markierten Proteine mehr gebildet werden. Der Abbau der markierten Proteine konnte damit als Abnahme des markierten Vorrats gemessen werden. Um aus der Vielfalt der markierten Proteine $G\alpha_s$ spezifisch zu verfolgen, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die im Experiment eingesetzten radioaktiv markierten Aminosäuren sind Cystein und Methionin, in der Sequenz des $G\alpha_s$ sind unabhängig von der Spleißvariante acht Cystein- und sieben Methionin-Aminosäuren enthalten.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression individueller $G\alpha_s$ -Spleißvarianten in endogen $G\alpha_s$ -exprimierenden Zellen inhibiert werden. Anhand des jeweiligen Funktionsverlustes in der Signaltransduktion können die Beiträge der Spleißvarianten abgeleitet werden. Als Modellsystem bieten sich GH3-Zellen an, die von einem Ratten-Hypophysen-Tumor abstammen: In diesen wurde der *knock down* von α -Untereinheiten der Unterfamilien G_i und G_o bereits demonstriert [Kleuss 1994]. Auch eine nicht Spleißvariantenspezifische Repression von $G\alpha_s$ durch Expression von *antisense*-mRNA in GH3 wurde beschrieben [Paulssen 1992].

In Vorversuchen wurde die für die Markierung notwendige Zeitspanne bestimmt. Dazu wurden Zellen für variable Zeitspannen mit den ^{35}S -haltigen Aminosäuren inkubiert, gefolgt von Aufschluss und Immunpräzipitation. Die Präzipitate wurden auf Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und mittels der in $G\alpha_s$ inkorporierten Radioaktivität detektiert. Nach 45-minütiger Markierung wurde das maximale Signal von $G\alpha_s$ beobachtet, bei dem noch keine Radioaktivität von immunpräzipitierbaren $G\alpha_s$ -Abbauprodukten sichtbar war (nicht gezeigt).

Es wurden Abbaukinetiken angefertigt, in dem zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Ende der Markierung Proben lysiert und immunpräzipitiert wurden. Abbildung 17A zeigt eine Autoradiografie des Abbaus der Spleißvarianten. In GH3-Zellen wurden die kurzen Spleißvarianten schwächer exprimiert, so dass ihr Abbau an einer länger exponierten Autoradiografie gemessen wurde. Die Intensität der Banden wurde quantifiziert (Abbildung 17B).

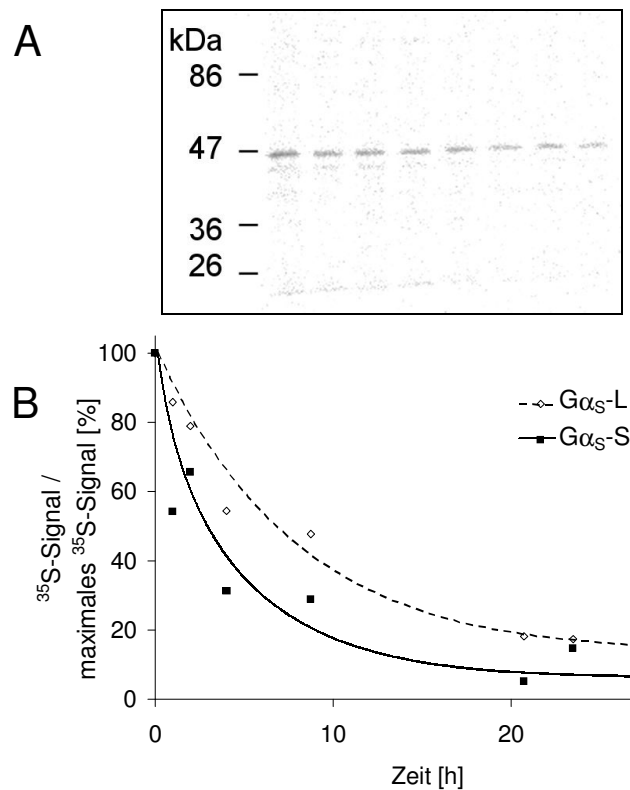


Abbildung 17: Abbau-Kinetik von $G\alpha_s$ in GH3-Zellen. GH3-Zellen wurden metabolisch markiert (vgl. Abschnitt 3.2.4.6). Nach Austausch des Kulturmediums gegen Medium, das einen Überschuss an unmarkiertem Cystein und Methionin enthielt, wurden die Inkubationen einzelner Proben durch Zugabe von RIPA-Puffer zu folgenden Zeitpunkten gestoppt: $t=0$; 1; 2; 4; 9; 21; 24 und 31 Stunden. Die Proben wurden immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die Bildplatte des Isotopen-Dokumentationssystems wurde 10 min für die Detektion der langen Spleißvarianten bzw. 60 min für die kurzen Spleißvarianten der Membran exponiert. Die Banden der langen Spleißvarianten waren nach 60 min überbelichtet. **A:** Autoradiografie **B:** Quantifizierung des Abbaus (vgl. Abschnitt 3.2.5)

Die Proteinabbauraten wurden durch Anpassen der Parameter eines einphasigen Zerfalls (Gleichung 3) aus der Intensität der $G\alpha_s$ -spezifischen Signale ermittelt.

$$Y = Y_{\max} \cdot e^{-k \cdot t} + Y_0 \quad ; \quad t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{k}$$

Y	^{35}S -Signal [willkürliche Einheit]
Y_{\max}	^{35}S -Signal zum Zeitpunkt $t = 0$ [willkürliche Einheit]
Y_0	basales ^{35}S -Signal [willkürliche Einheit]
k	Abbaukoeffizient [1/min]
t	Zeit [min]
$t_{\frac{1}{2}}$	Halbwertszeit [min]

Gleichung 3: Zur Beschreibung eines einphasigen Zerfalls verwendete Gleichung.

Mit dieser Methode wurden die Proteinhalfwertszeiten von endogenem $\text{G}\alpha_{\text{S}}$ in GH3-Zellen bestimmt (Tabelle 6). In GH3-Zellen wäre daher bei vollständiger Inhibition der Translation innerhalb von 20-36 Stunden eine Verringerung der Proteinkonzentration um 75 % zu erwarten. Da die vollständige Inhibition unrealistisch ist, dürfte der erreichbare Effekt geringer ausfallen bzw. später auftreten.

Mit der Absicht, für *knock down*-Experimente ein Modellsystem mit steuerbarer Expression von $\text{G}\alpha_{\text{S}}$ zu nutzen, wurden darüber hinaus die Halbwertszeiten von transient exprimierten $\text{G}\alpha_{\text{S}}$ -Spleißvarianten in $\text{G}\alpha_{\text{S}}$ -defizienten 2B2-Zellen bestimmt. Die gemessenen Halbwertszeiten waren mit rund einer Stunde in transient transfizierten Zellen deutlich kürzer als die von endogen exprimiertem $\text{G}\alpha_{\text{S}}$.

Zelllinie	Spleißvariante	Abbaurrate als Halbwertszeit [h]	Versuchszahl (n)
2B2	L1	1,13±0,32	3
2B2	S3	1,21±0,26	3
GH3	lange (L1+L2)	9,2±2,6	2
GH3	kurze (S3+S4)	5,4±1,5	2

Tabelle 6: Halbwertszeiten der $\text{G}\alpha_{\text{S}}$ -Spleißvarianten. Die Abbaukinetiken wurden in Experimenten, wie in Abbildung 17 beschrieben, gemessen und die Halbwertszeiten unter Verwendung von Gleichung 3 ermittelt. Die Daten zeigen Mittelwert ± Standardabweichung der angegebenen Versuchszahl.

4.1.3 Messung der Adenylylcyclase-Aktivierung an geringen Zellzahlen

Da die Mikroinjektion nur geringe Zellzahlen bearbeiten kann, wurden eine Möglichkeiten untersucht, die GPCR-stimulierte Adenylylcyclase-Aktivierung an Dutzenden bis wenigen Hundert Zellen zu messen.

4.1.3.1 Messung der Rezeptor-abhängigen Adenylylcyclase-Aktivierung mit Fluoreszenz-markierter Proteinkinase A

Von Zaccolo *et al.* wurde eine Methode vorgestellt, bei welcher die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) als Meßsystem genutzt wird [Zaccolo 2000]. Es blieb jedoch offen, ob sich die dort gezeigte Modulation des Messsignals durch Agonisten von β -adrenergen Rezeptoren auf weitere Zelllinien und Rezeptoren anwenden ließe, um das System zur Messung der Adenylylcyclase-Aktivierung zu nutzen.

Das Enzym PKA besteht aus zwei Untereinheiten, die individuell mit Varianten des Grün Fluoreszierenden Proteins fusioniert wurden (Abbildung 18). Die katalytische Untereinheit (C) ist mit dem Gelb Fluoreszierenden Protein (YFP), die regulatorische Untereinheit (RII) mit dem Cyan Fluoreszierenden Protein (CFP) fusioniert. Werden die Untereinheiten gemeinsam exprimiert, liegen sie bei basalen cAMP-Konzentrationen als Heterotetramer vor. Die Fluorophore kommen sich dabei so nahe, dass bei optischer Anregung des CFP ein Teil des emittierten Lichtes strahlungslos auf YFP übertragen wird. Dieses Phänomen wird als *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) bezeichnet (Übersicht in [Jares-Erijman 2003]). Der Energietransfer findet nur statt, wenn sich das Emissionsspektrum des Donors (CFP) mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (YFP) überschneidet und solange beide Moleküle sehr eng benachbart sind. Der Energietransfer findet praktisch nur bei Abständen unter 10 nm statt, da die übertragene Strahlungsmenge mit der sechsten Potenz des Abstands zwischen den Chromophoren sinkt [Stryer 1978]. Die PKA-Untereinheiten dissoziieren bei Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration, was als Verringerung der übertragenen Strahlungsmenge (FRET-Effizienz) messbar ist.

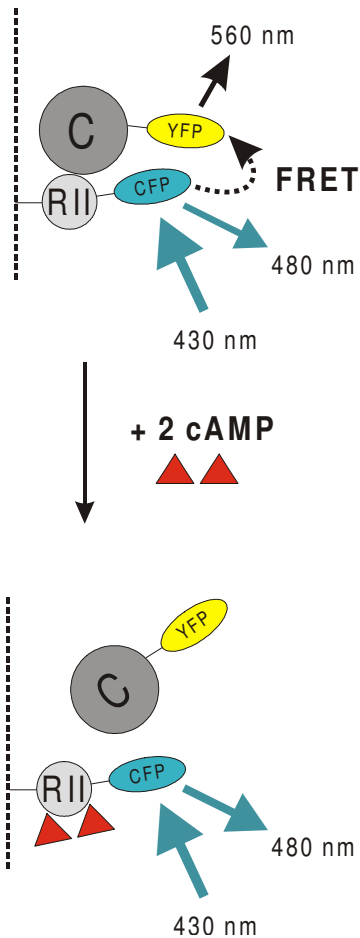


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers am PKA-System. Zur Erhöhung der Übersichtlichkeit wurde die Darstellung auf je eine regulatorische und katalytische Einheit beschränkt (Halbierung an der gestrichelten Linie). In Abwesenheit von cAMP liegt Proteinkinase A als Heterotetramer von zwei regulatorischen Untereinheiten (RII, CFP-markiert) und zwei katalytischen Untereinheiten (C, YFP-markiert) vor. Bei Anregung der CFP-Reste mit Licht der Wellenlänge 430 nm wird ein Teil des absorbierten Lichtes strahlungslos auf die räumlich eng benachbarten YFP-Reste übertragen. Dieser Anteil wird im Emissionsspektrum von YFP (um 560 nm) abgestrahlt. Eine Bindung von cAMP durch die regulatorischen Untereinheiten führt zur Konformationsänderung, so dass die katalytischen Untereinheiten dissoziieren. Durch den vergrößerten räumlichen Abstand findet dann keine messbare Energieübertragung von CFP auf YFP mehr statt.

Das Verfahren wird robust durch eine ratiometrische Messung: Der Energietransfer wird durch Anregung des CFP-Restes und Filterung des emittierten Lichtes auf das Emissionsspektrum des YFP-Restes gemessen. Diese Fluoreszenz wird Signal bei Anregung des CFP-Restes und Filterung auf das CFP-Spektrum ins Verhältnis gesetzt. Nach Transfektion der PKA-kodierenden Plasmide in CHO-K1-Zellen wurde die FRET-Effizienz im Ruhezustand zu 5-7 % der auf RII-CFP eingestrahlichten Energie bestimmt (Abbildung 19) und lag damit in der beschriebenen Größenordnung [Zaccolo 2000]. Bei Stimulation der Adenylylcyclase mit dem direkten Aktivator Forskolin fiel die übertragene Energiemenge ab.

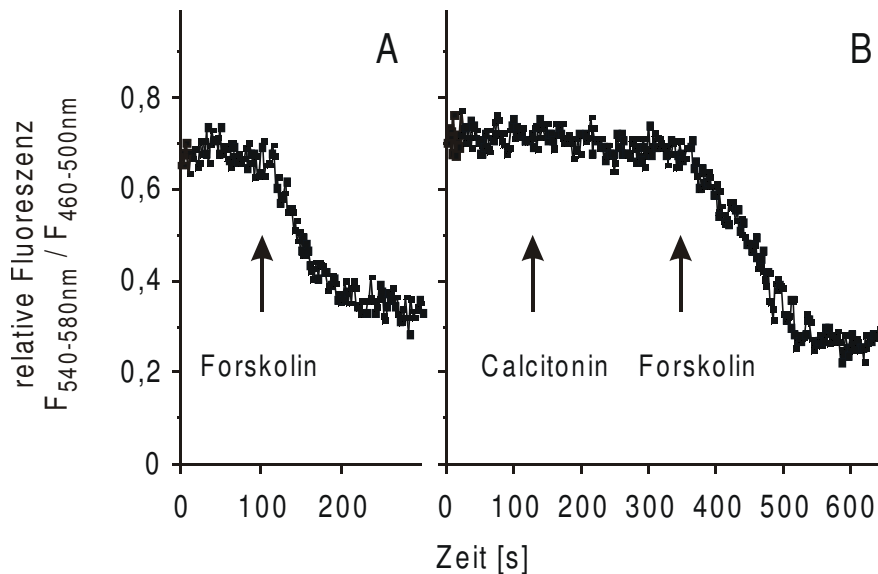


Abbildung 19: Messung des cAMP-abhängigen FRET in CHO-K1-Zellen, Abbildung modifiziert aus Falk und Kleuss [Falk 2003]. Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesetzt und bis 70 % Konfluenz wachsen gelassen. 24 Stunden vor der Messung wurden die Zellen mit 2,5 μg Plasmiden, kodierend für RII-CFP und C-YFP, im Verhältnis 1:3 mit 15 μl Polyfect pro 60 mm-Schale transfiziert. 20 min vor der Messung wurden die Zellen in Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) mit 100 μM IBMX überführt. Die Fluoreszenz wurde entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.4.5 aufgenommen. Calcitonin (finale Konzentration 10 μM) und Forskolin (final 10 μM) wurden zur Badlösung zu den Zeitpunkten zugegeben, die durch Pfeile angezeigt sind. Die gezeigten Daten entstammen einem von drei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen. **A:** relative Fluoreszenz nach Stimulation durch Forskolin **B:** Zellen wurden nacheinander mit Calcitonin und Forskolin stimuliert.

Jedoch war nach Stimulation durch Calcitonin, dem Agonisten eines $G\alpha_s$ -koppelnden Rezeptors, keine Minderung der FRET-Effizienz messbar, obwohl das Signal auf eine direkte Stimulation der Adenylylcyclase reagierte (Abbildung 19B). Die Aktivierbarkeit der Adenylylcyclase über den Calcitonin-Rezeptor in der verwendeten CHO-K1-Zelllinie wurde an Plasmamembranen nach der unter Abschnitt 3.2.4.1 beschriebenen Methode verifiziert (nicht gezeigt). Die wahrscheinliche Ursache für die Diskrepanz zwischen der Stimulation des Rezeptors und der direkten Aktivierung der Adenylylcyclase ist die höhere zelluläre Konzentration von cAMP im letzteren Fall. Damit erwies sich das PKA-System als nicht geeignet zur Messung der Rezeptor-vermittelten Aktivierung der Adenylylcyclase. Alternativ dazu wurde ein ELISA zur Bestimmung von cAMP ausgewählt.

4.1.3.2 Messung der Rezeptor-abhängigen Adenylylcyclase-Aktivierung im cAMP-spezifischen enzyme-linked immunosorbent assay

Die Quantifizierung von cAMP mit einem *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) nutzt cAMP-spezifische Antikörper [Pradelles 1989]. Das aus den Proben extrahierte cAMP wird durch den spezifischen Antikörper gebunden. Die Quantifizierung wird durch

Kompetition des cAMP in den Proben mit konstanten Mengen von markiertem cAMP ermöglicht. Dieses markierte cAMP ist mit Acetylcholinesterase gekoppelt. Das Enzym produziert bei Inkubation mit Ellman's Reagenz (Acetylthiocholin und 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)) einen gelben Farbstoff, dessen Absorption bei 412 nm gemessen werden kann. Anhand einer Kalibriergerade können aus den Absorptionen absolute cAMP-Konzentrationen ermittelt werden.

Zur Handhabung geringer Zellzahlen wurden diese auf Mikroträger von ca. 1 mm² Fläche ausgesät und alle auf einem Träger wachsenden Zellen mikroinjiziert. Im Gegensatz zur Mikroinjektion der Luziferase-kodierenden Plasmide, bei der die exprimierte *Renilla*-Luziferase als interner Standard diente, ist die Zählung der auf dem Träger wachsenden Zellen nötig. Es wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl an Zellen und der gemessenen cAMP-Konzentration festgestellt, was darauf schließen lässt, dass die Unterschiede im cAMP-Gehalt zwischen den Zellen hinreichend klein und die Kollektivgrößen hinreichend groß waren (Abbildung 20). In unstimulierten GH3-Zellen wurde mit diesem Verfahren ein cAMP-Gehalt von $(2,92 \pm 0,66)$ fmol/100 Zellen gemessen (3 Bestimmungen mit 130-200 Zellen). Die Stimulation des endogen exprimierten Vasoaktiven-Intestinalen-Peptid-Rezeptors erhöhte den cAMP-Gehalt der Zellen auf $(17,3 \pm 3,4)$ fmol/100 Zellen.

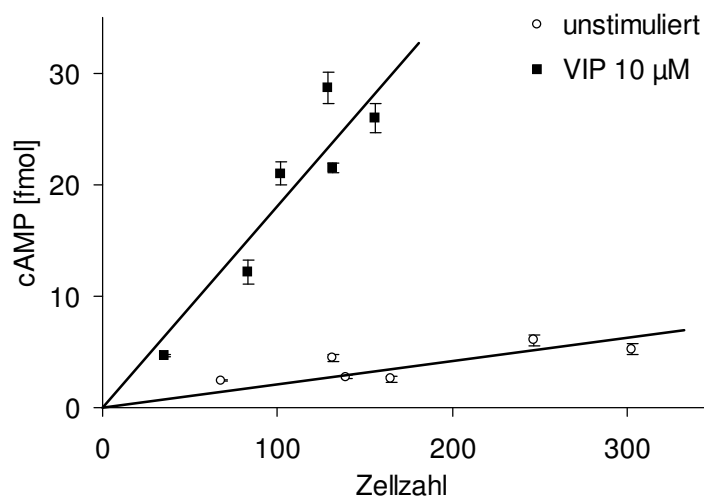


Abbildung 20: Korrelation zwischen Zellzahl und cAMP-Menge, gemessen mit einem cAMP-spezifischen ELISA, aus Falk und Kleuss [Falk 2003]. GH3-Zellen wurden auf Mikroträgern kultiviert, gezählt und in Mikroakkumulationsmedium mit oder ohne 10 µM Vasoaktiven Intestinalen Peptid (VIP) für 15 Minuten inkubiert. Der cAMP-Gehalt jeder Population wurde mit einem cAMP-spezifischen ELISA in Doppelbestimmungen gemessen (3.2.4.3).

Die Bestimmung von cAMP mit einem ELISA war damit zur Detektion der GPCR-vermittelten Adenylylcyclase-Aktivierung an geringen Zellzahlen geeignet.

4.1.4 Inhibition der $G\alpha_s$ -Expression

Mit den gezeigten Vorarbeiten wurden Propin-modifizierte Oligodeoxynukleotide (ODN) als erfolgversprechende Technik zur Inhibition der Expression identifiziert. Die Bestimmung der Abbauraten von $G\alpha_s$ erlaubte eine grobe Abschätzung des zu erwartenden Zeitrahmens. Mit der Adaption einer Methode zur Messung der GPCR-stimulierten Adenylylcyclase-Aktivierung für mikroinjizierte Zellpopulationen war auch das Meßsystem etabliert.

Zuerst wurde die Eignung einer nicht Spleißvarianten-spezifischen Oligonukleotid-Sequenz ($G\alpha_s$.propin, vgl. Abschnitt 3.1.4.2) zur Inhibition der $G\alpha_s$ -Expression am Beispiel von transient exprimiertem $G\alpha_s$ untersucht. Dazu wurde ein $G\alpha_s$ -kodierendes Plasmid zusammen mit dem ODN in 2B2-Zellen injiziert (Abbildung 21). Die Zelllinie 2B2 exprimiert selbst kein $G\alpha_s$ und war stabil mit einem den β_2 -adrenergen Rezeptor kodierenden Plasmid transfiziert worden (zur Zelllinie vgl. Abschnitt 4.3.3.1, zur stabilen Transfektion 3.2.2.2.2). Nach Transfektion von $G\alpha_s$ konnte damit eine Rezeptor-abhängige Adenylylcyclase-Aktivierung in diesen Zellen gemessen werden. Die Rezeptor-vermittelte Aktivierung wurde um ca. 80 % vermindert, wenn gleichzeitig mit dem $G\alpha_s$ -kodierenden Plasmid das zur $G\alpha_s$ -mRNA komplementäre ODN transfiziert wurde. In Zellen, die mit einem ODN nicht verwandter Sequenz transfiziert wurden, blieb die Signaltransduktion dagegen erhalten. Daraus wurde gefolgert, dass das ODN zur effektiven Hybridisierung mit $G\alpha_s$ -spezifischer mRNA in der Lage ist.

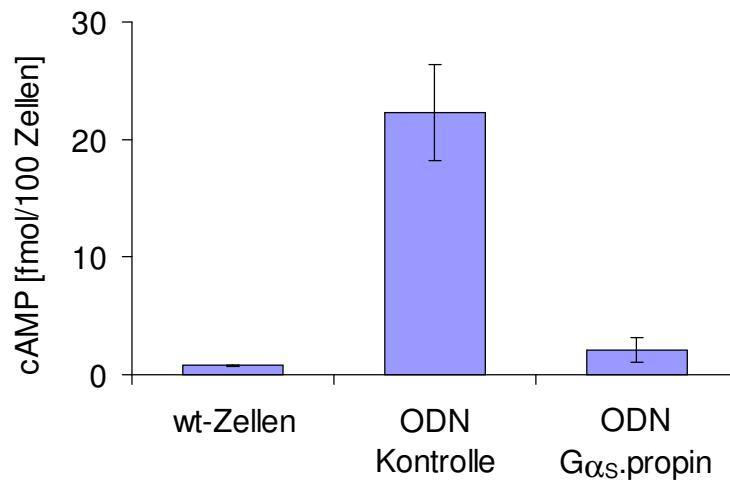


Abbildung 21: Knock down von Gα_s, das transient in 2B2-Zellen exprimiert wurde, durch ODN. Ein Gα_s-L1 kodierendes Plasmid (3 ng/μl in destilliertem H₂O) wurde zusammen mit einem Gα_s-spezifischen (Sequenz vgl. Abschnitt 3.1.4.2, 50 μM) oder einem unverwandten ODN (ODN1.propin, 50 μM) mikroinjiziert. „wt-Zellen“ wurden nur mit H₂O mikroinjiziert. 48 Stunden später wurde die cAMP-Akkumulation in Antwort auf die Stimulation des stabil exprimierten β₂-adrenergen Rezeptors mit 10 μM Isoprenalin gemessen (vgl. Abschnitt 3.2.4.3). Die Daten zeigen Mittelwert ± Standardabweichung aus einem repräsentativen von drei Experimenten mit zwei mikroinjizierten Proben je Bedingung.

Anschließend wurde das ODN in endogen Gα_s exprimierende GH3-Zellen injiziert. In diesem System wurde jedoch keine Inhibition der Rezeptor-abhängigen Signaltransduktion durch das Gα_s-spezifische ODN auf nachgewiesen werden (Abbildung 22). Die Experimente wurden mit vergleichbarem Ergebnis auch in CHO-K1-Zellen durchgeführt (nicht gezeigt). Messungen im Bereich von 24 bis 60 Stunden nach der Injektion der zeigten keine Repression.

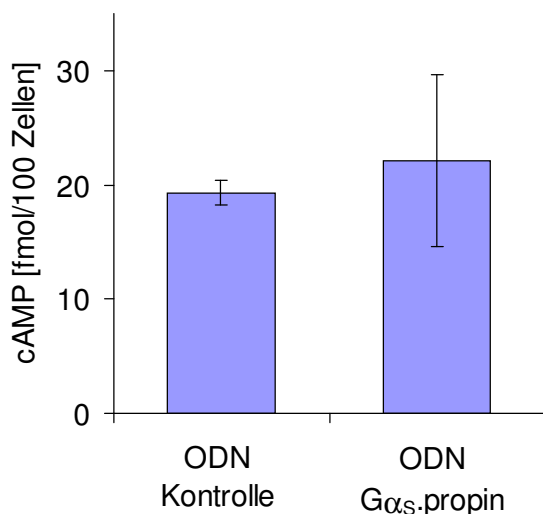


Abbildung 22: Mikroinjektion eines mit allen Gα_s-Spleißvarianten hybridisierenden ODN in GH3-Zellen. GH3-Zellen wurden mit Lösungen von ODN in destilliertem Wasser mikroinjiziert. Als Kontrolle diente ODN1.propin (spezifisch für Luziferase), Sequenzen der ODN vgl. Abschnitt 3.1.4.2. 48 Stunden nach der Mikroinjektion wurden die Zellen 15 min mit 10 μM VIP stimuliert und der cAMP-Gehalt der Zellen bestimmt (3.2.4.3). Die Daten zeigen Mittelwert ± Standardabweichung aus einem repräsentativen von zwei Experimenten mit jeweils zwei mikroinjizierten Proben je Bedingung.

In Erweiterung des Spleißvarianten-unspezifischen *knock down* von $G\alpha_s$ wurde in der vorliegenden Arbeit der Spleißvarianten-spezifische *knock down* angestrebt. Die Transfektion von ODN, die selektiv für beide Spleißvarianten oder spezifisch für jeweils eine der Varianten waren, erbrachte in den beschriebenen Zelllinien keine Repression (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wurde die ODN-vermittelte Repression von transient exprimiertem $G\alpha_s$ in 2B2-Zellen gezeigt. Die Applikation dieses ODN in Zellen mit endogener Expression von $G\alpha_s$ bewirkte jedoch keine Expressionsminderung.

4.2 Messung der Interaktion zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und $G\alpha_s$ auf der Ebene des G-Proteins in überexprimierenden Systemen

Die Übertragung stimulatorischer Signale zur Adenylylcyclase erfolgt durch die α -Untereinheiten stimulatorischer G-Proteine, welche zyklische Aktivierung/ Inaktivierung durchlaufen. Bei Kontakt mit einem aktivierten GPCR kommt es zu Konformationsänderungen in der α -Untereinheit, durch die GDP gegen GTP ausgetauscht wird (vgl. Abschnitt 1.2.1). Die Qualität der Interaktion zwischen dem Ligand-aktivierten Rezeptor und dem G-Protein bestimmt die Wahrscheinlichkeit, dass beim Kontakt das G-Protein aktiviert wird. Für den Übergang in den aktiven Zustand ist die Dissoziation des GDP der geschwindigkeitsbestimmende Schritt [Cassel 1978]. Dieser Schritt ist gleichzeitig die Voraussetzung für die Aufnahme des GTP-Nukleotides und die Aktivierung der α -Untereinheit. Durch den Einsatz eines schlecht hydrolysierbaren GTP-Analogs wie GTP γ S kann die Akkumulation von aktivierten α -Untereinheiten verfolgt werden. Die Akkumulationsgeschwindigkeit ist damit ein Maß für die Qualität der Kopplung [Northup 1982]. Zur Expression von G-Proteinen und der mit ihnen koppelnden Rezeptoren werden seit Ende der 1980er Jahre Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda* (Sf9, aus dem Ovar der Puppe des „fall army worm“ [Vaughn 1977]) verwendet. Der *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* der Familie *Baculoviridae* infiziert Sf9-Zellen und kann als Überträger für nahezu beliebige kodierende Sequenzen genutzt werden. Die Sf9-Zellen bieten gegenüber bakterieller Expression den Vorteil, dass post- und kotranslationale Modifikationen von den Insektenzellen durchgeführt werden [Bouvier 1998].

4.2.1 Adaptierung der Messung von Nukleotid-Bindungskinetiken

Bei der Messung der [35 S]GTP γ S-Bindung an Plasmamembranen setzt sich das Messsignal aus der Bindung an die α -Untereinheit des überexprimierten heterotrimeren G-Proteins und einem basalen Anteil zusammen. Dieser basale Anteil ist auf die Bindung des Substrates an zelleigene Proteine wie monomere G-Proteine, endogene heterotrimere G-Proteine sowie GTP-bindende Proteine ohne Signaltransduktionsfunktion zurückzuführen [Kleymann 1993]. Eine Unterscheidung zwischen beiden Anteilen ist durch Vergleich der Bindung an Plasmamembranen mit und ohne $G\alpha_s$ -Überexpression möglich (Abbildung 23). Sf9-Zellen wurden mit Histamin- H_2 -Rezeptor- und $G\alpha_s$ -S4-exprimierenden Baculoviren infiziert. Im

Kontrollansatz wurde der $G\alpha_s$ -kodierende Virus durch einen β -Galaktosidase-exprimierenden Virus ersetzt, um die Expressionsbedingungen vergleichbar zu halten.

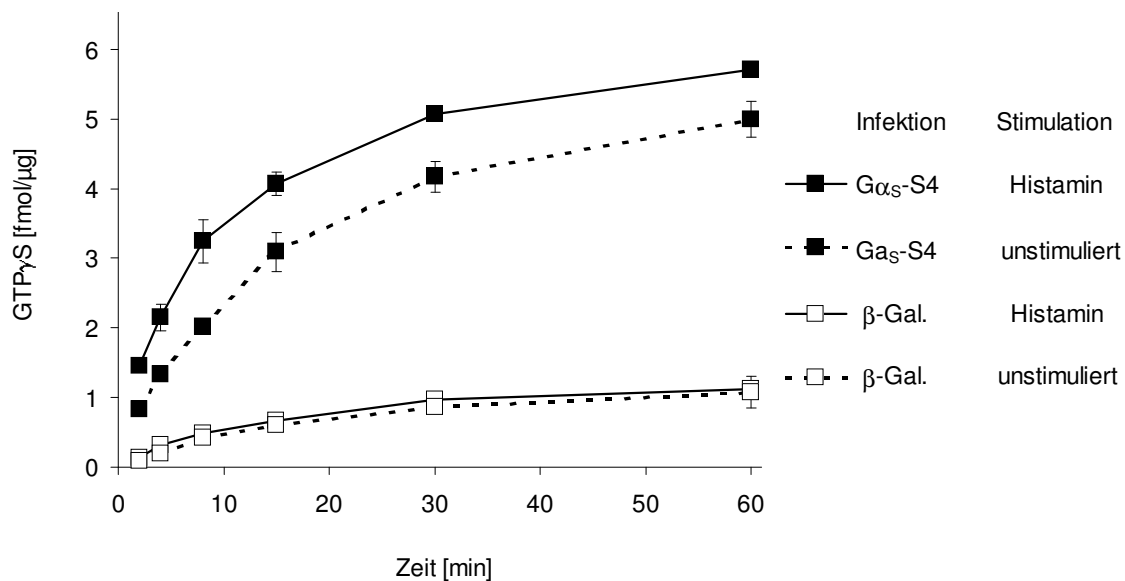


Abbildung 23: Vergleich der [35 S]GTP γ S-Bindung an Plasmamembranen mit bzw. ohne überexprimiertes $G\alpha_s$. Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren, die $G\alpha_s$ -S4 (gefüllte Quadrate) bzw. β -Galaktosidase (offene Quadrate) exprimieren, infiziert. Ergänzt wurde die Infektion durch Baculoviren für den Histamin- H_2 -Rezeptor, $G\beta_2$ und $G\gamma_2$. Die Zellen wurden 48 Stunden inkubiert, ihre Plasmamembranen isoliert und [35 S]GTP γ S-Bindungskinetiken gemessen. Die Ansätze wurden mit 100 μ M Histamin stimuliert (durchgezogene Linien) bzw. nicht stimuliert (gestrichelte Linien). Die Daten zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung eine repräsentativen von zwei Experimenten mit Doppelbestimmungen.

Sichtbar war eine basale Bindung von [35 S]GTP γ S an Plasmamembranen, die kein überexprimiertes $G\alpha_s$ enthielten. In diesen erhöhte die Stimulation des Histamin- H_2 -Rezeptors die Menge des gebundenen Nukleotids praktisch nicht. An Plasmamembranen, in denen $G\alpha_s$ überexprimiert wurde, trat ohne Rezeptorstimulation bereits eine basale [35 S]GTP γ S-Bindung auf, die ca. fünfmal so hoch wie an Plasmamembranen der Kontrollzellen war. Die Stimulation des Rezeptors an $G\alpha_s$ -enthaltenden Plasmamembranen erhöhte die anfängliche [35 S]GTP γ S-Bindungsgeschwindigkeit. In den folgenden Experimenten wurde die Abhängigkeit der [35 S]GTP γ S-Bindung von der Rezeptoraktivierung genutzt, um den GPCR-vermittelten Anteil zu messen. Die basale Bindung des heterotrimeren G-Proteins und zelleigene GTP-bindende Proteine wurden nicht getrennt betrachtet.

Die für eine Bestimmung der Rezeptor-abhängigen Bindung notwendige [35 S]GTP γ S-Konzentration wurde an Plasmamembranen von Zellen optimiert, die den β_2 -adrenergen Rezeptor und $G\alpha_s$ -S4 überexprimierten. Die GTP γ S-Konzentration wurde bei konstanter spezifischer Aktivität zwischen 0,6 nM und 40 μ M variiert (Abbildung 24A). Mit

zunehmender Konzentration von GTP γ S nahm der Anteil der Rezeptor-abhängigen Bindung am Gesamtsignal ab (Abbildung 24B).

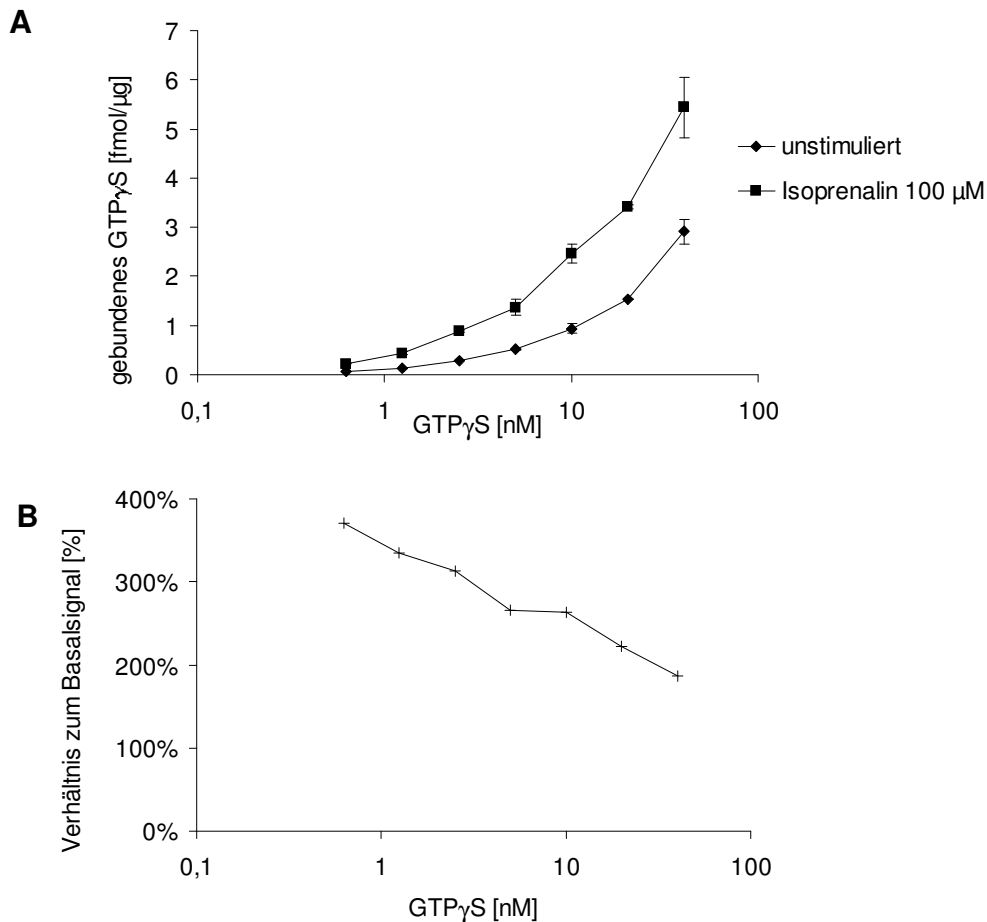


Abbildung 24: Zusammenhang zwischen der [35 S]GTP γ S-Konzentration und der Rezeptor-abhängigen [35 S]GTP γ S-Bindung in Sf9-Plasmamembranen. Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren, die den β_2 -adrenergen Rezeptor, G α_s -S4, G β_2 und G γ_2 kodieren, infiziert (Infektionsbedingungen entsprechend Abschnitt 3.2.2.1.5). Von den präparierten Plasmamembranen wurden je 10 μ g für die [35 S]GTP γ S-Bindung eingesetzt. Das Bindungsexperiment wurde bei 30 °C in 200 μ l Volumen für 10 min durchgeführt. **A:** Protein-gebundenes [35 S]GTP γ S mit und ohne 100 μ M Isoprenalin. Die Daten zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung zwischen Doppelbestimmungen. **B:** Verhältnis der Rezeptor-abhängigen zur basalen Bindung.

Für die folgenden Kinetiken wurde ein Kompromiss zwischen einer möglichst weit über dem Hintergrundsignal liegender [35 S]GTP γ S-Bindung und einem hohen Rezeptor-abhängigen Anteil gewählt. Beide Parameter standen bei einer Substratkonzentration von 1 nM im ausgeglichenen Verhältnis. Die niedrigsten Messwerte betragen in allen Experimenten mindestens das Dreifache des Hintergrundsignals.

Eine wichtige Voraussetzung für die mathematische Auswertung einer Kinetik ist die konstante Substratkonzentration über den Experimentzeitraum. Nur unter dieser Bedingung ist die Geschwindigkeit der Bindung allein von der intrinsischen Affinität zwischen G α_s

und [^{35}S]GTP γ S abhängig. In den durchgeführten Experimenten wurde diese Bedingung erreicht durch Einsatz eines Substratüberschusses gegenüber den in der Probe vorhandenen Bindungsstellen. Die [^{35}S]GTP γ S-Konzentration wurde bereits optimiert, daher wurde das Ansatzvolumen vergrößert (Abbildung 25).

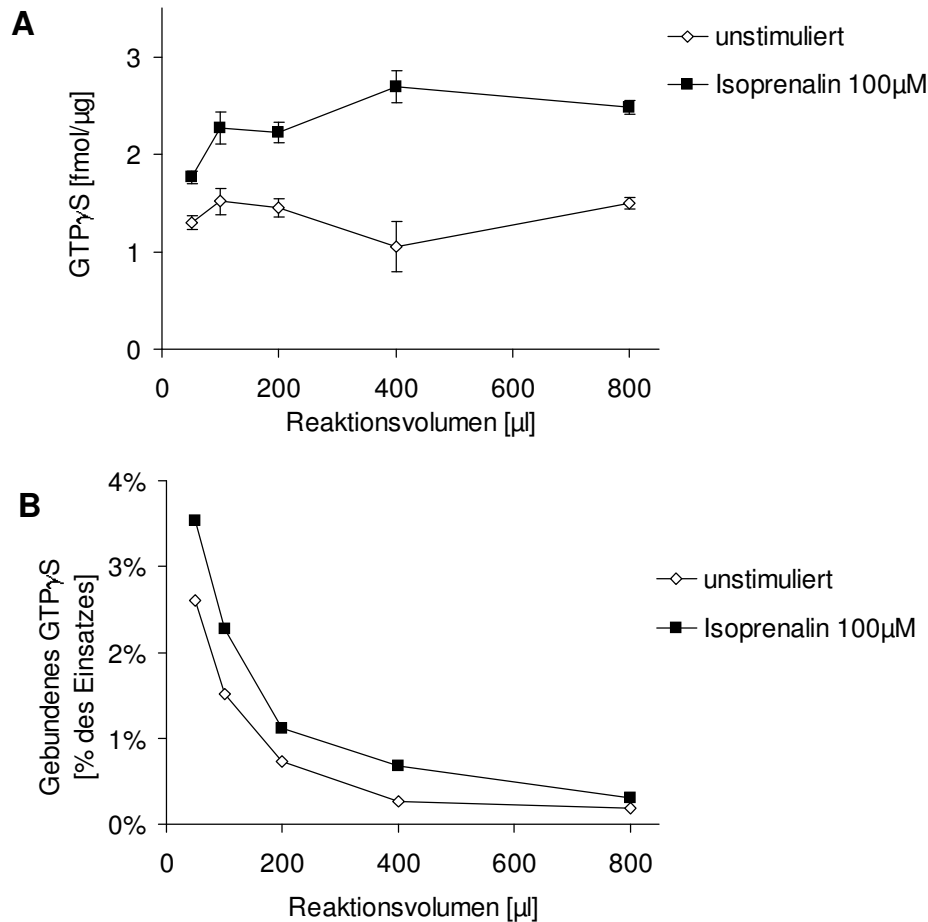


Abbildung 25: [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Abhängigkeit vom Reaktionsvolumen. Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren, die den β_2 -adrenergen Rezeptor, $G\alpha_s$ -S4, $G\beta_2$ und $G\gamma_2$ exprimieren, infiziert. Von den präparierten Plasmamembranen wurde je 1 μg zur [^{35}S]GTP γ S-Bindung eingesetzt. Die Bindung wurde in unterschiedlichen Finalvolumina für 5 min durchgeführt. **A:** Protein-gebundenes [^{35}S]GTP γ S als molare Stoffmenge pro Plasmamembranmasse entsprechend der Proteinbestimmung nach Bradford. Die Daten zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung zwischen Doppelbestimmungen. **B:** Gebundenes [^{35}S]GTP γ S als Anteil des eingesetzten Substrats.

Bei geringen Ansatzvolumina wurden bis zu 3,5 % des zu Verfügung stehenden [^{35}S]GTP γ S gebunden (Abbildung 25B). Als Grenze, unter welcher eine Substratdepletion vernachlässigbar ist, wurden 2 % angesehen. Diese Grenze wurde bei Ansatzvolumina $\geq 200 \mu\text{l}$ eingehalten. Die folgenden Experimente wurden in Reaktionsvolumina von $200 \mu\text{l}$ durchgeführt.

Ein weiteres Kriterium für die Aussagefähigkeit von Bindungskinetiken ist die Stabilität der Proteine in Plasmamembranen während des Experiments unter den optimierten Messbedingungen. Dazu wurde eine Präparation mit β_2 -adrenergem Rezeptor und G_s ohne $GTP\gamma S$ für variable Zeit unter den Bedingungen der Bindungsexperimente (30 °C; pH 8,0; exakte Experimentbedingungen vgl. Abschnitt 3.2.4.4) inkubiert. Anschließend wurde mit der Zugabe von [^{35}S]GTP γS die Bindung gestartet und für eine in allen Proben identische Zeit die verbliebene Bindungsfähigkeit bestimmt (Abbildung 26).

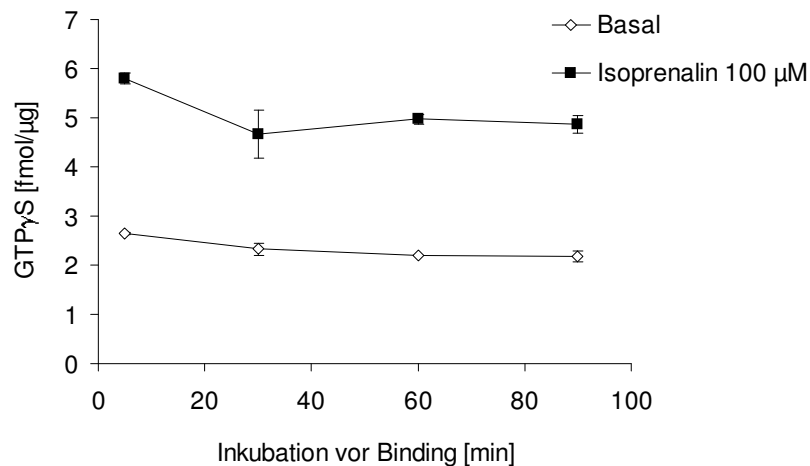


Abbildung 26: Die Stabilität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und $G\alpha_s$ in Plasmamembranen unter den Bedingungen der Bindungsexperimente. Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren, die den β_2 -adrenergen Rezeptor, $G\alpha_s$ -S4, $G\beta_2$ und $G\gamma_2$ exprimieren, infiziert. Von den präparierten Plasmamembranen wurden 1 μg je Messpunkt eingesetzt. Die Proben wurden für variable Zeiten unter den Bindungsbedingungen (Membran in 100 μl Puffer, 30 °C) inkubiert und dann mit 100 μl GTP γS -Mix (vgl. Abschnitt 3.2.4.4) versetzt. Die Inkubation wurde für weitere 5 min fortgesetzt, anschließend wurde Protein-gebundenes von freiem [^{35}S]GTP γS durch Absaugen durch Nitrozellulosefilter getrennt. Die Daten zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung eines repräsentativen von zwei Experimenten mit Doppelbestimmungen.

Die gemessene [^{35}S]GTP γS -Bindung nahm im Zeitraum von 90 Minuten bei den unstimulierten bzw. stimulierten Proben um 17,7 % bzw. 16,1 % ab. Der Rezeptor-abhängige Anteil verringerte sich im selben Zeitraum um 14,8 %. Die Rezeptoren und G-Proteine wurden als hinreichend stabil unter den Inkubationsbedingungen betrachtet. Der Zeitraum war für die durchgeführten Experimente zur Erreichung eines Gleichgewichts der Bindung ausreichend.

4.2.2 Kinetiken der Rezeptor-abhängigen Bindung von [^{35}S]GTP γS an $G\alpha_s$

Nachdem die Inkubationsbedingungen optimiert wurden, konnten Bindungskinetiken aufgezeichnet werden. Es wurden Plasmamembranen, die nur einen Rezeptor und eine Spleißvariante enthielten, untersucht.

Die Aktivierung eines G-Proteins durch einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor lässt sich auf molekularer Ebene in mehrere Schritte aufgliedern: Mit der Bindung eines Agonisten ändert sich die Konformation des Rezeptors. Der so aktivierte Rezeptor interagiert mit dem G-Protein-Heterotrimer, wodurch der Nukleotid-Austausch in Gang gesetzt wird. Um die Bindung des [^{35}S]GTP γ S unabhängig von den Schritten zu messen, die im Rezeptormolekül ablaufen, wurden Liganden vor der Zugabe des Guaninnukleotids zu den Plasmamembranen gegeben. In Abbildung 27 ist die an einer Plasmamembranpräparation aufgenommene Kinetik der [^{35}S]GTP γ S-Bindung dargestellt. Vor der Präparation der Plasmamembranen wurden in den Sf9-Zellen der Histamin-H₂-Rezeptor und G α _s-L2 exprimiert. Der Rezeptor-abhängige Anteil erreichte innerhalb von 30 Minuten die Sättigung (Abbildung 27B).

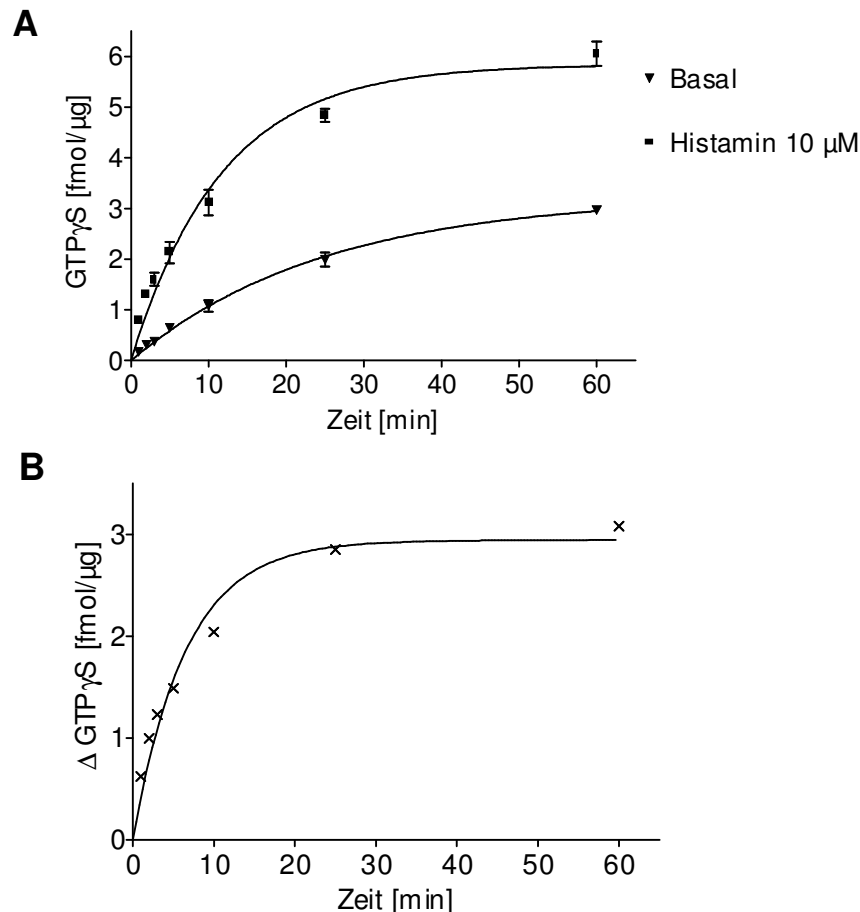


Abbildung 27: Stimulation der [^{35}S]GTP γ S-Bindung an G α _s-L2 durch den Histamin-H₂-Rezeptor. Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren, die den Histamin-H₂-Rezeptor, G α _s-L2, G β ₂ und G γ ₂ exprimieren, infiziert. Von den präparierten Plasmamembranen wurden je 1 μg in 200 μl Volumen mit 1 nM [^{35}S]GTP γ S inkubiert. Gezeigt ist eines von drei Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis. **A:** Zeitverlauf der proteingebundenen [^{35}S]GTP γ S-Menge mit und ohne Stimulation durch 10 μM Histamin. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung eines repräsentativen von vier Experimenten in Doppelbestimmungen. **B:** Die Differenz zwischen Bindung mit und ohne Stimulation beschreibt den Rezeptor-abhängigen Anteil.

Um Bindungskinetiken verschiedener Bedingungen (Spleißvarianten, Rezeptoren, Mehrfachbestimmungen) miteinander vergleichen zu können, wurden sie als einphasige Assoziation beschrieben (Gleichung 4). Die beobachtete (scheinbare) Bindungskonstante k_{app} repräsentiert neben der eigentlichen Nukleotid-Bindung weitere Schritte wie die GDP-Dissoziation und die thermische Inaktivierung der α -Untereinheit.

$$Y = Y_{max} \cdot (1 - e^{-k_{app} \cdot t})$$

Y	gebundenes [35 S]GTP γ S [fmol/ μ g]
Y_{max}	Asymptote der Bindung im Gleichgewicht [fmol/ μ g]
k_{app}	scheinbare Bindungskonstante [min^{-1}]
t	Zeit [min]

Gleichung 4: Die Zeitverläufe der [35 S]GTP γ S-Bindung wurden als Assoziation erster Ordnung beschrieben.

Für das Beispielerperiment aus Abbildung 27 ergab sich die scheinbare Bindungskonstante $k_{app}=0,153 \text{ min}^{-1}$. In weiteren Experimenten mit Plasmamembranen, in denen $G\alpha_s$ -L2 jeweils zusammen mit einem anderen Rezeptor exprimiert wurde, wurden ebenfalls Bindungskonstanten bestimmt. Diese sind in Tabelle 7 gezeigt.

stimulierter Rezeptor	k_{app} [min^{-1}]
β_2 -adrenerger Rezeptor	$0,180 \pm 0,026$
Histamin- H_2 -Rezeptor	$0,195 \pm 0,059$
Glucagon-Rezeptor	$0,115 \pm 0,069$
Secretin-Rezeptor	$0,318 \pm 0,110$

Tabelle 7: Bindungskonstanten für die Rezeptor-abhängige [35 S]GTP γ S-Bindung an $G\alpha_s$ -L2. Die Daten wurden in Experimenten entsprechend der Beschreibung zu Abbildung 27 erhoben. Die gezeigten Daten sind Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei (Secretin-R.) bzw. drei (andere R.) Bestimmungen.

Da aus den bereits bekannten Befunden eher geringe Unterschiede zwischen der Aktivierung der Spleißvarianten erwartet wurden (1.2.2.6.3), erschien die Variabilität der Bindungskonstanten zwischen den Experimenten zu groß.

Um die Experimente unabhängiger von chargenspezifischen Unterschieden zwischen Plasmamembranen zu machen, wurden mehrere Rezeptoren mit je einer Spleißvariante in derselben Sf9-Zelle kombiniert. Während es in Zellen von Körpergeweben nicht ungewöhnlich ist, dass mehrere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren von einer Zelle exprimiert werden, waren für eine Expression mehrerer Rezeptoren in Sf9-Zellen Koinfektionen mit Baculoviren nötig. Um alle Sf9-Zellen mit allen eingesetzten Viren zu infizieren, wurde jeder einzelne Virus im Überschuss (*multiplicity of infection*, MOI) gegenüber den Sf9-Zellen eingesetzt. Die Summe der MOI überschritt für keinen Infektionsansatz 14. Sf9-Zellen exprimieren auch bei hohen MOI zuverlässig das Transgen [Kuhn 1999]. Die

Expression des transferierten Gens stand in jedem verwendeten Baculovirus unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors (vgl. Abschnitt 3.2.2.1.2).

Zuerst wurde untersucht, ob die Menge der eingesetzten Rezeptor-exprimierenden Viren Einfluss auf die Expression des G-Proteins, gemessen als [³⁵S]GTPγS-Bindungsstellen, hatte. Das Experiment wurde beispielhaft mit dem β₂-adrenergen Rezeptor durchgeführt. Sf9-Zellen wurden infiziert mit Viren, die den Rezeptor und Gα_s exprimierten. Der Überschuss der Rezeptor-exprimierenden Viren gegenüber der Anzahl der Zellen wurde variiert, die Gesamtzahl der Viren pro Zelle durch Ergänzen mit einem β-Galaktosidase-exprimierenden Virus konstant gehalten (Abbildung 28).

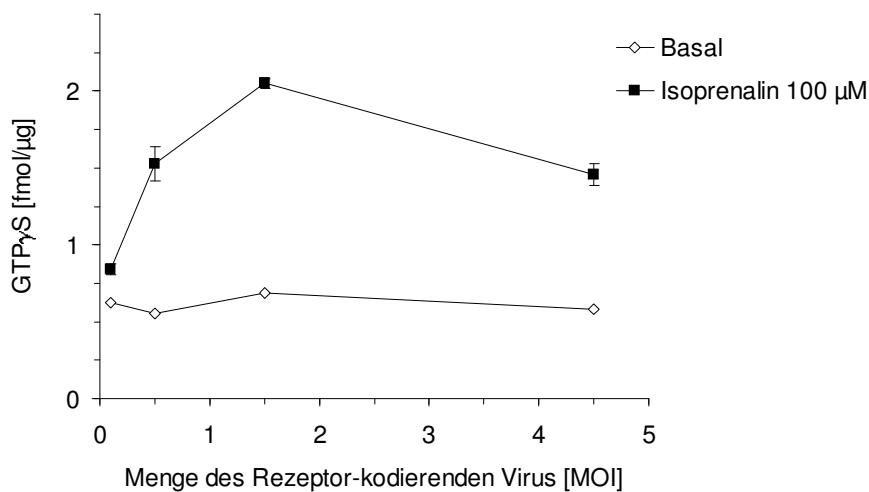


Abbildung 28: Variation der [³⁵S]GTPγS-Bindung in Abhängigkeit von der Menge an Rezeptor-kodierendem Virus. Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren, die Gα_s-S4, Gβ₂ und Gγ₂ exprimieren, mit den in Abschnitt 3.2.2.1.5 angegebenen MOI sowie einer variablen Menge des Virus für den β₂-adrenergen Rezeptor infiziert. Die Virusmenge aller Ansätze wurde durch Ergänzung mit einem β-Galaktosidase-exprimierenden Baculovirus konstant auf 12,5 gehalten. Nach Präparation von Plasmamembranen wurde die [³⁵S]GTPγS-Bindung mit jeweils 1 μg Plasmamembran in 200 μl in Anwesenheit von 1 nM [³⁵S]GTPγS für 5 Minuten durchgeführt. Die Daten zeigen Mittelwert ± Standardabweichung zwischen Doppelbestimmungen eines repräsentativen von zwei Experimenten.

Das Maximum der Rezeptor-vermittelten Bindung wurde für den β₂-adrenergen Rezeptor bei einer statistischen Anzahl von 1,5 Viren pro Zelle erreicht. Es wurden für die folgenden Experimente bis zu einer MOI von 4,5 Rezeptor-kodierende Viren bei der Infektion von Sf9-Zellen kombiniert. Die Summe der MOI für alle während einer Infektion eingesetzten Viren betrug 12,5.

Für die Aufnahme von [³⁵S]GTPγS-Bindungskinetiken an Spleißvarianten wurden mehrere Rezeptoren koinfiziert. Die gemessenen Bindungskonstanten sind in Abbildung 29 dargestellt.

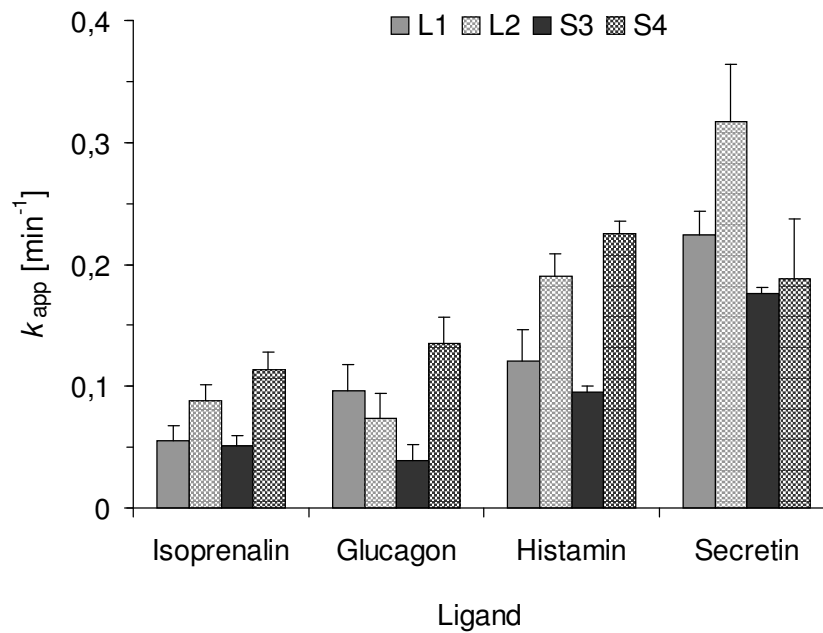


Abbildung 29: Bindungskonstanten der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung für die vier $\text{G}\alpha_s$ -Spleißvarianten und verschiedene Rezeptoren. Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren koinfiziert, die mehrere Rezeptoren und je eine Spleißvariante exprimierten. Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren infiziert, die eine $\text{G}\alpha_s$ -Spleißvariante, $\text{G}\beta_2$ und $\text{G}\gamma_2$ sowie vier Rezeptoren exprimierten (Abschnitt 3.2.2.1.5). Nach Expression und Präparation von Plasmamembranen wurde die $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung mit jeweils $1\ \mu\text{g}$ Plasmamembran in $200\ \mu\text{l}$ in Anwesenheit von $1\ \text{nM}$ $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ durchgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei (Secretin) bzw. drei (andere R.) unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmungen. Konzentrationen der Liganden: Isoprenalin: $100\ \mu\text{M}$; Glucagon: $500\ \text{nM}$; Histamin $10\ \mu\text{M}$; Secretin: $500\ \text{nM}$.

Die höheren Mittelwerte der Bindungskonstanten der Serin-haltigen Spleißvarianten (L2, S4) legten eine schnellere Aktivierung im Vergleich zu Serin-freien $\text{G}\alpha_s$ nahe; die gemessenen Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Damit kann in diesem System von einer vergleichbar wirksamen Interaktion der Spleißvarianten mit den Rezeptoren ausgegangen werden. Es bestanden deutlichere Unterschiede zwischen den Rezeptoren. Die Aktivierung aller Spleißvarianten durch den Secretin-Rezeptor verlief schneller als durch den β_2 -adrenergen und den Glucagon-Rezeptor.

4.3 Signalübertragung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zur Adenylylcyclase in überexprimierenden Systemen

Die $G\alpha_s$ -Spleißvarianten zeigten in Plasmamembranen von Sf9-Zellen vergleichbare Geschwindigkeiten des Guaninnukleotid-Austauschs. Die Konzentration von exprimiertem $G\alpha_s$ konnte bei der viralen Infektion kaum reguliert werden, da bereits ein einzelnes Infektionsereignis pro Zelle zur Transformation führt. Bei transienter Transfektion von Plasmiden konnte dagegen durch die Anzahl von Plasmidmolekülen pro Zelle die Expression in Grenzen beeinflusst werden. Damit konnte die $G\alpha_s$ -Konzentration als unabhängiger Parameter variiert und die Adenylylcyclase-Aktivität als davon abhängige Größe gemessen werden. Zudem kann an diesem System die Frage beantwortet werden, ob geringe, bisher nicht messbare Unterschiede über die gesamte Signaltransduktionskaskade vom GPCR bis zur Adenylylcyclase verstärkt würden.

Zur Beschreibung des Einflusses der Spleißvarianten von $G\alpha_s$ auf die Signaltransduktion war die Aufnahme von Konzentrations-Wirkungs-Kurven vorgesehen. Eine Voraussetzung dafür war, die Konzentration des $G\alpha_s$ -Proteins in der Plasmamembran exakt festzustellen. Im Abschnitt 4.3.1 wird die Etablierung der dazu nötigen Methoden beschrieben.

Die zweite Voraussetzung war die Wahl eines geeigneten Meßsystems für die Aktivierung der Adenylylcyclase. Dazu wurden zwei Methoden adaptiert. Aufbauend auf diesen Grundlagen konnte die Aktivierung der Adenylylcyclase durch die $G\alpha_s$ -Spleißvarianten in einem Modellsystem verglichen werden.

4.3.1 Quantifizierung der $G\alpha_s$ -Konzentration in Plasmamembranen

Die Interaktion von $G\alpha_s$ -Spleißvarianten mit Rezeptoren bzw. mit Adenylylcyclasen kann durch die $G\alpha_s$ -Konzentration beschrieben werden, welche die Adenylylcyclase halbmaximal aktiviert. Zur Messung von $G\alpha_s$ -Konzentrationen wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden entwickelt. So kann die Rekonstitution der $G\alpha_s$ -abhängigen Adenylylcyclase-Aktivierung in $G\alpha_s$ -defizienten S49 cyc⁻-Plasmamembranen genutzt werden [Ross 1977a]. Der Vergleich der gemessenen Adenylylcyclase-Aktivitäten erlaubt relative Aussagen zur $G\alpha_s$ -Konzentration. Eine weitere Methode ist die Cholera-toxin-induzierte ADP-Ribosylierung [Cassel 1977]. Diese Methode wird in der Anwendung auf Zellen oder Plasmamembranen von Faktoren wie der Konzentration von $G\beta\gamma$ -

Untereinheiten und den Peptiden der ADP-Ribosylierungs-Faktor-Familie beeinflusst und führt zu einer systematischen Unterschätzung der $G\alpha_s$ -Konzentrationen in Plasmamembranen [Watkins 1987]. Verlässlichere Quantifizierungen beruhen auf der immunologischen Detektion durch $G\alpha_s$ -spezifische Antikörper, entweder in Form von Immunoblots oder dem *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) [Ransnäs 1988]. Für die Richtigkeit der höheren Konzentrationsbestimmungen im Vergleich zur ADP-Ribosylierung sprechen die hohen für $G\alpha_s$ kodierenden mRNA-Konzentrationen [Brann 1987], ähnliche Erfahrungen mit dem $G\alpha_o$ -Protein [Watkins 1987]. Zur Durchführung von Titrationen musste das angestrebte Meßsystem in der Lage sein, auch Konzentrationen unterhalb derer in nativen Geweben zu messen.

Eine weitere Anforderung ergab sich aus der Struktur von $G\alpha_s$. Da sowohl C- und N-Termini von $G\alpha_s$ an der Funktion beteiligt sind, sollte die Detektion nicht auf Veränderungen der Primärstruktur des Proteins („tag“) beruhen.

4.3.1.1 Quantifizierung von $G\alpha_s$ im *enzyme-linked immunosorbent assay*

In der vorliegenden Arbeit wurde angestrebt, einen beschriebenen kompetitiven ELISA-Ansatz [Ransnäs 1988] mit einem anderen, kommerziell verfügbaren Antikörper ($G\alpha_s$ -spezifischer IgG-Antikörper aus Kaninchen) zu etablieren. Das Epitop, das vom kommerziellen Antikörper erkannt wird, liegt am C-Terminus und ist identisch mit dem Epitop des erstmals durch Spiegels Gruppe beschriebenen $G\alpha_s$ -spezifischen Antikörpers und [Simonds 1989]. Seine Spezifität für $G\alpha_s$ und die fehlende Affinität zu den phylogenetisch verwandten α -Untereinheiten $G\alpha_o$, $G\alpha_i$ und $G\alpha_t$ ist bekannt.

Der ELISA beruht auf der Konkurrenz zwischen der $G\alpha_s$ -haltigen Probe und einem immobilisierten Peptid. Das Peptid ist dasjenige, gegen das der Antikörper generiert wurde. Der am Peptid gebundene Antikörper wird mit einem sekundären, enzymkonjugierten Antikörper inkubiert und anhand der Enzymaktivität quantifiziert (vgl. Abschnitt 3.2.3.5.2). Zuerst wurden der primäre Antikörper und das Peptid zur Beschichtung der Mikrotiterplatte titriert (Abbildung 30). Mit zunehmender Konzentration an Peptid während der Beschichtung konnte mehr Antikörper an den Träger gebunden werden; ab zirka $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Peptid war die Bindungsfähigkeit gesättigt. Für die folgenden Experimente wurde eine Peptidkonzentration am oberen Ende des dynamischen Bereichs gewählt ($0,08 \mu\text{g}/\text{ml}$); der primärer Antikörper wurde 1:1500 verdünnt.

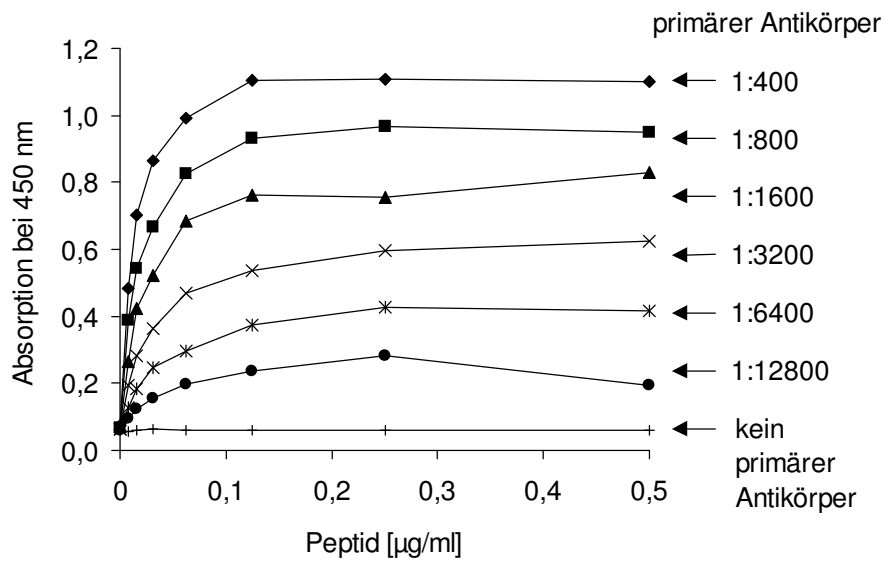


Abbildung 30: Beschichtung von ELISA-Platten mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen und Bindungsfähigkeit für den primären Antikörper. Die Durchführung des ELISA erfolgte wie in Abschnitt 3.2.3.5.2 beschrieben. Allerdings wurden das Peptid und der $G\alpha_s$ -spezifische Antikörper in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Es wurde keine $G\alpha_s$ -haltige Probe zugesetzt. Der sekundäre Antikörper wurde 1:4000 verdünnt. Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten.

Im nächsten Schritt wurde die Konzentration des sekundären Antikörpers titriert (Abbildung 31).

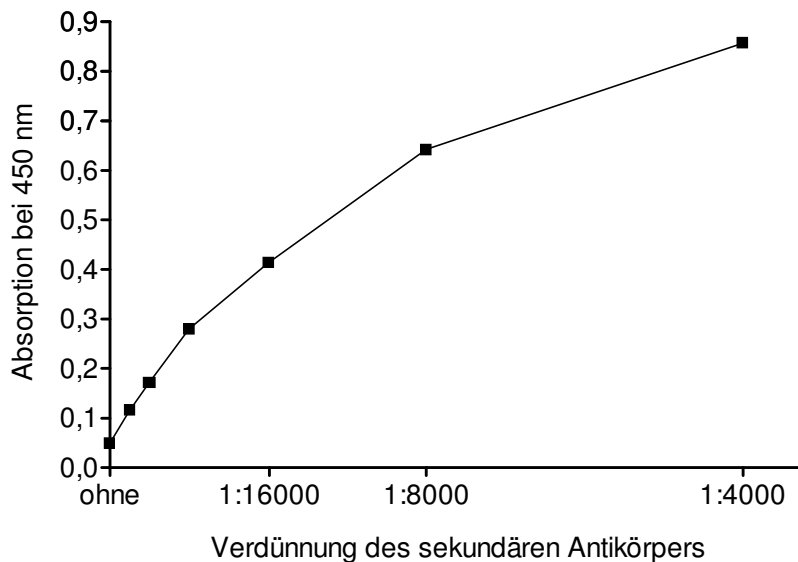


Abbildung 31: Bindungsfähigkeit für sekundären Antikörper. Mikrotiterplatten wurden, wie in Abschnitt 3.2.3.5.2 beschrieben, mit Peptid beschichtet. Die Inkubation mit primärem Antikörper (1:1500) erfolgte ohne Zusatz von G-Protein, der sekundäre Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen appliziert.

Bei der Titration des sekundären Antikörpers wurde keine Sättigung des Messsignals erreicht, was darauf hinweist, dass noch nicht alle Bindungsstellen für den sekundären Antikörper besetzt waren. Da die Menge des gebundenen Antikörpers bzw. der damit

gebundenen Enzymaktivität ausreichend war (Erreichen der OD_{450} von 0,7-0,9 in Kontrollproben innerhalb von 15-20 min), wurde für die folgenden Experimente eine Verdünnung von 1:4000 gewählt. Damit war der Arbeitsbereich der Antikörper bestimmt und der ELISA zur Bestimmung von Analyten bereit. Eine Konkurrenz von gereinigtem $G\alpha_s$ mit dem Peptid ist in Abbildung 32 dargestellt.

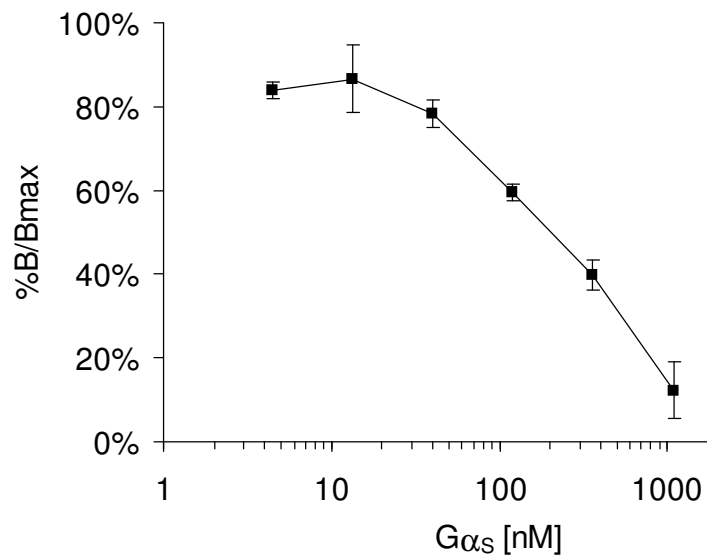


Abbildung 32: Konkurrenz zwischen Peptid und gereinigtem $G\alpha_s$. Gereinigtes $G\alpha_s$ wurde in PBS mit 1 % (w/v) Natriumcholat vermischt 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Die erhaltene Lösung wurde für 15 min bei $15\,000 \times g$, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:5 mit einer 1:1200 Verdünnung des primären Antikörpers in PBS mit 0,05 % Tween-20 verdünnt. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Ansätze in eine beschichtete Mikrotiterplatte überführt und für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte für 30 min sekundärem Antikörper inkubiert und die gebundene Meerrettichperoxidase quantifiziert (vgl. Abschnitt 3.2.3.5.2). %B/Bmax: Verhältnis der Absorption einer Probe in Vergleich zur $G\alpha_s$ -freien Kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten mit Doppelwerten.

Die halbmaximale Konkurrenz wurde bei einer Konzentration von ≈ 200 nM in der Mikrotiterplatte erreicht, die Nachweisgrenze lag um 50 nM. Diese Konzentration konnte mit den erwarteten $G\alpha_s$ -Konzentrationen in den Plasmamembranen nicht erreicht werden. Bei Ansatzgrößen von 100 μ l in der ELISA-Kammer und erwarteten $G\alpha_s$ -Konzentrationen von 1 ng/ μ g hätten 200 μ g Plasmamembran eingesetzt werden müssen. Eine quantitative Extraktion und Aufkonzentrierung schien in Anbetracht der großen Probenzahlen zu aufwändig. In der getesteten Form war die Empfindlichkeit des ELISA mit dem zur Verfügung stehenden Antikörper demnach nicht hoch genug für den vorgesehenen Einsatz.

4.3.1.2 Quantifizierung von $G\alpha_s$ auf Nitrozellulosemembranen

Als alternative Quantifizierungsmethode wurde der Nachweis von $G\alpha_s$ nach Transfer auf Nitrozellulosemembranen adaptiert. Der prinzipielle Vorteil dieser Detektionsmethode gegenüber einem ELISA ist die vorherige Auftrennung der Probe durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dadurch werden die Proteine der Probe nach Molekülgröße getrennt, was das Signal-Rausch-Verhältnis der Detektion positiv beeinflusst. Zur spezifischen Erkennung kommen in beiden Verfahren ein $G\alpha_s$ -spezifischer Antikörper und ein Enzym-konjugierter sekundärer Antikörper zum Einsatz. Die Enzym-Aktivität des sekundären Antikörpers erlaubt eine hohe Verstärkung des Signals. Durch neue Entwicklungen von Chemilumineszenz-Substraten zur Detektion von Meerrettichperoxidase bleibt gleichzeitig das Hintergrundsignal niedrig [Mattson 1996].

Gereinigtes $G\alpha_s$ -Protein wurde nach Gelelektrophorese und Transfer auf Nitrozellulosemembranen zuerst mit Kaninchen-Anti- $G\alpha_s$ -Antikörper und anschließend mit einem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert. Die mit diesem sekundären Antikörper konjugierte Meerrettichperoxidase katalysiert bei der nachfolgenden Detektion die Umsetzung eines Substrats unter Photonenfreisetzung (Abbildung 33A).

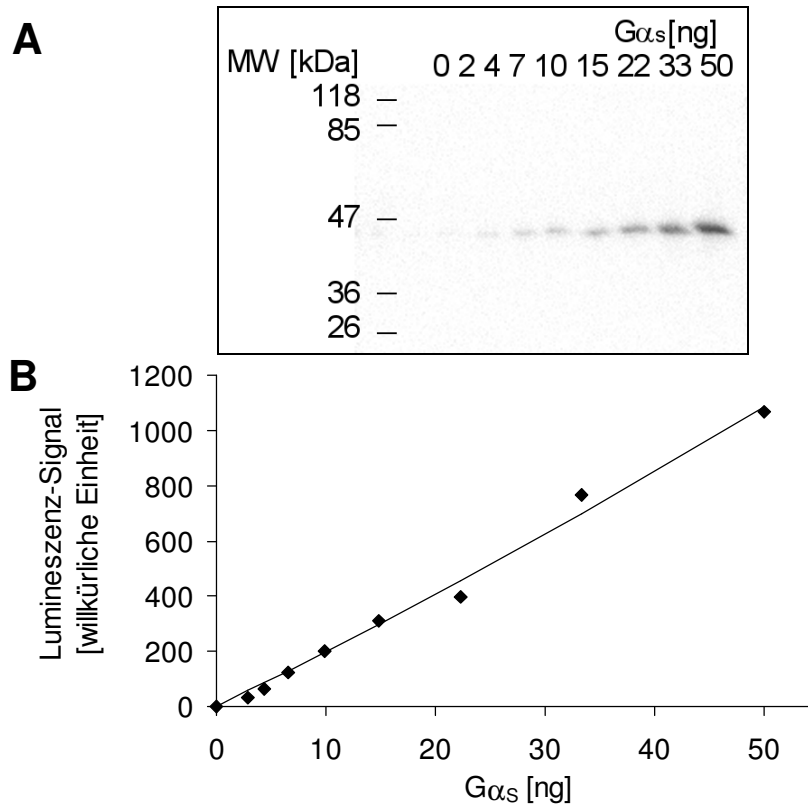


Abbildung 33: Detektion von $G\alpha_s$ im Immunoblot. Definierte Mengen von gereinigtem $G\alpha_s$ -Protein (vgl. Abschnitt 3.2.3.5.3) wurden in einem 11 % Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem $G\alpha_{s/olf}$ -spezifischen Antikörper detektiert. Die gebundenen konjugierten Antikörper wurden durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. **A:** Fotografie der Chemilumineszenz-Detektion, MW: Molekulargewichts-Standard; **B:** Darstellung des Zusammenhangs zwischen $G\alpha_s$ -Menge und Chemilumineszenz-Signal

Mit linearer Regression wurde der Zusammenhang zwischen dem Lumineszenzsignal und der bekannten $G\alpha_s$ -Mengen dargestellt (Abbildung 33B). Anhand der so erhaltenen Kalibriergeraden konnten im Folgenden die $G\alpha_s$ -Konzentrationen unbekannter Plasmamembranproben ermittelt werden. Die Nachweisgrenze, definiert als die Menge an $G\alpha_s$, die das dreifache Signal im Vergleich zum Hintergrund erreicht, lag in den Experimenten bei ca. 4 ng $G\alpha_s$. Somit war der Immunoblot die Methode der Wahl zur Quantifizierung von $G\alpha_s$ in Plasmamembranen.

4.3.2 Rezeptor-stimulierte Adenylylcyclase-Aktivität in Plasmamembranen

Die Adenylylcyclase ist ein zentrales Element der Signalweiterleitung von $G\alpha_s$ -koppelnden Rezeptoren hin zu intrazellulären Effektoren, um physiologische Prozesse wie Proliferation, Glykogenstoffwechsel und Zelladhäsion zu steuern. Zur Bestimmung der Adenylylcyclase-Aktivierung wurden vielfältige Methoden entwickelt, welche die Entstehung des Reaktionsproduktes zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP) messen. Die am

häufigsten genutzten Methoden sind die Quantifizierung des Umsatzes von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ an Plasmamembranen [Salomon 1974] und der Umsatz von $[\text{}^3\text{H}]\text{ATP}$ in intakten Zellen, welches nach Wachstum in Gegenwart von $[\text{}^3\text{H}]\text{Adenin}$ synthetisiert wird [Enjalbert 1983]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Messung der Adenylylcyclase-Aktivität an isolierten Plasmamembranen gewählt, da im Gegensatz zu Ganzzell-basierten Methoden auch Membran-impermeable Aktivatoren wie das komplexe Ion AlF_4^- zur Aktivierung der G-Proteine genutzt werden können.

Um die spezifische Aktivität des Enzyms Adenylylcyclase in Plasmamembranen bestimmen zu können, müssen Zellen aufgeschlossen und die Plasmamembranen von anderen Zellbestandteilen isoliert werden. Gleichzeitig dürfen die Signaltransduktionskomponenten physikalisch-chemisch nicht geschädigt werden. Die höchste Selektivität in der Anreicherung von Plasmamembranen oder –bestandteilen liefern Prozeduren, bei denen durch einen schonenden Aufschluss Zellkerne und granuläre Zellbestandteile intakt bleiben und aufgrund ihrer höheren Sedimentationsgeschwindigkeit von Plasmamembranen abgetrennt werden. Ein Beispiel dafür ist der Aufschluss durch Stickstoff-Dekompression [Hunter 1961]. Bei dieser Methode wird die Zellsuspension in einer speziellen Kammer unter den Überdruck von Stickstoff versetzt, der sich physikalisch in der Flüssigkeit löst. Bei der Entnahme aus der Kammer werden die Zellen durch das Ausgasen des Stickstoffs und durch die Passage durch ein Ventil definierter Weite geschert. Die Zellkerne bleiben weitgehend intakt. Diese Eigenschaft macht die Stickstoff-Dekompression sehr wertvoll, da aus Zellkernen austretende genomische DNA die Viskosität von Membranpräparationen stark erhöht und bei der weiteren Verarbeitung störend wirkt. Membranpräparationen können zusätzlich über Dichtegradienten fraktioniert werden [Svoboda 1992]. Mehrstufige Prozeduren sind jedoch zur Anfertigung vieler Präparationen, wie sie zur Aufnahme von Titrationskurven mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen von exprimiertem $\text{G}\alpha_s$ benötigt werden, zu aufwendig.

Es wurden zwei Prozeduren, die es ermöglichen, größere Probenzahlen zu bearbeiten, mit dem Aufschluss durch Stickstoff-Dekompression verglichen. Beim Ultraschall-Aufschluss werden die resuspendierten Zellen durch Eintauchen einer Ultraschall-gepulsten Spitze Scherbelastungen ausgesetzt, beim Einfrieren-Auftauen-Aufschluss werden Scherkräfte durch mehrfachen Wechsel des Aggregatzustandes des Wassers erzeugt.

Die Tests wurden an Zellen der Maus-Lymphom-Zelllinie S49 (Wildtyp) durchgeführt, die neben $G\alpha_s$ und einer Forskolin-stimulierbaren Adenylylcyclase-Aktivität auch β_2 -adrenerge Rezeptoren exprimiert. Als Maß für die Qualität der Membranpräparation diente die Adenylylcyclase-Aktivität nach Stimulation des β_2 -adrenergen Rezeptors (Abbildung 34). Beide Prozeduren lieferten Plasmamembranen, die etwas geringere spezifische Adenylylcyclase-Aktivitäten aufwiesen als durch Stickstoff-Dekompression aufgeschlossene. Ursache dafür dürfte sein, dass bei der Stickstoff-Dekompression Zellkerne sedimentiert und abgetrennt wurden und sich der relative Anteil der Plasmamembran an der Präparation erhöht.

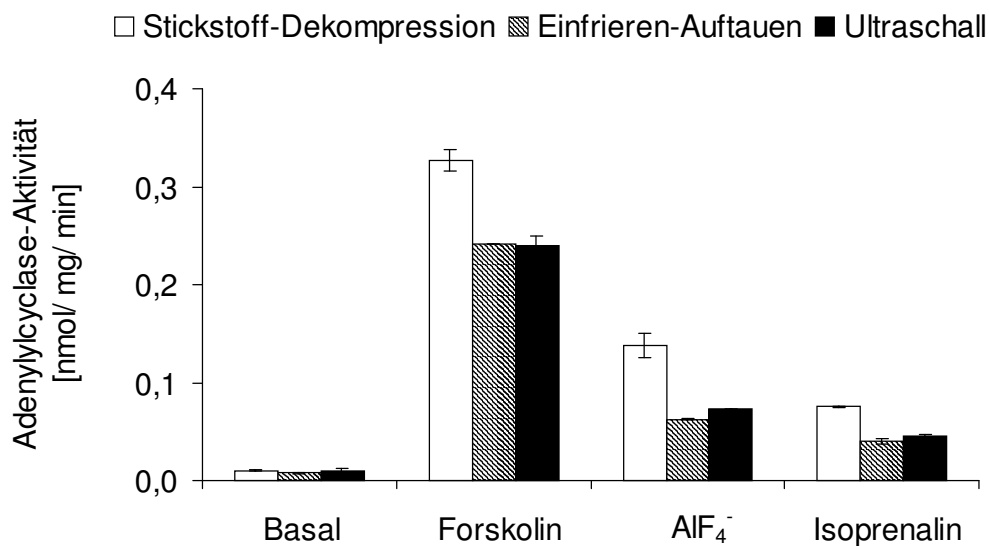


Abbildung 34: Vergleich von Prozeduren zur Plasmamembranpräparation. Plasmamembranen von S49-Lymphom-Zellen wurden nach verschiedenen Prozeduren präpariert. Die Aufschlüsse wurden wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben durchgeführt, beim Ultraschallaufschluss wurden 6 Pulse auf Stufe 5 appliziert. Anschließend wurde die Adenylylcyclase-Aktivität nach der Membranmethode ohne und mit Stimulationen (10 μ M Isoprenalin, 30 μ M AIF_4^- , 10 μ M Forskolin) bestimmt. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung aus einem repräsentativen von zwei Experimenten in Doppelwerten.

Der Einfrieren-Auftauen- und der Ultraschall-Aufschluss lieferten in der Adenylylcyclase-Aktivität vergleichbare Plasmamembranen. Die mit der ersten Prozedur präparierten Membranen waren jedoch deutlich viskos, was mit der Freisetzung von genomischer DNA zu begründen ist. Beim Ultraschall-Aufschluss wurde dieses Phänomen nur bei Anwendung von weniger als drei Pulsen (siehe unten) beobachtet. Daraus kann abgeleitet werden, dass beim Ultraschall-Aufschluss genomische DNA weitgehend geschert wurde. Für die folgenden Experimente wurde der Ultraschall-Aufschluss gewählt.

Beim Ultraschall-Aufschluss gab es mehrere Parameter, welche die Vollständigkeit des Aufschlusses aber auch die mögliche Denaturierung der in der Plasmamembran enthaltenen Proteine beeinflussten. Das waren die Energiemenge, die über die Ultraschallspitze in die Probe geleitet wird und das Volumen, in dem der Aufschluss durchgeführt wurde. Mit zunehmenden Volumen führt eine konstante Energiemenge zu geringerer Scherung der Zellen. Das Volumen wurde auf 200 μl festgesetzt, der minimalen Menge, welche die verwendete Ultraschallspitze vollständig umgab. Die Energiemenge konnte beim verwendeten Gerät in Leistungsstufen gewählt werden (vgl. Abschnitt 3.1.6). Sie wurde auf eine möglichst geringe Beeinträchtigung der Signaltransduktion, gemessen als Rezeptor-stimulierbare Adenylylcyclase-Aktivität, optimiert. Mit zunehmender Energie des Ultraschallstabes sanken sowohl die basale als auch die Rezeptor-stimulierbare Adenylylcyclase-Aktivität (Abbildung 35A). Die Einstellung „Stufe 3“ wurde gewählt, da sie die geringe Beeinträchtigung der Signaltransduktion bei weitgehender Scherung der genomischen DNA erlaubte.

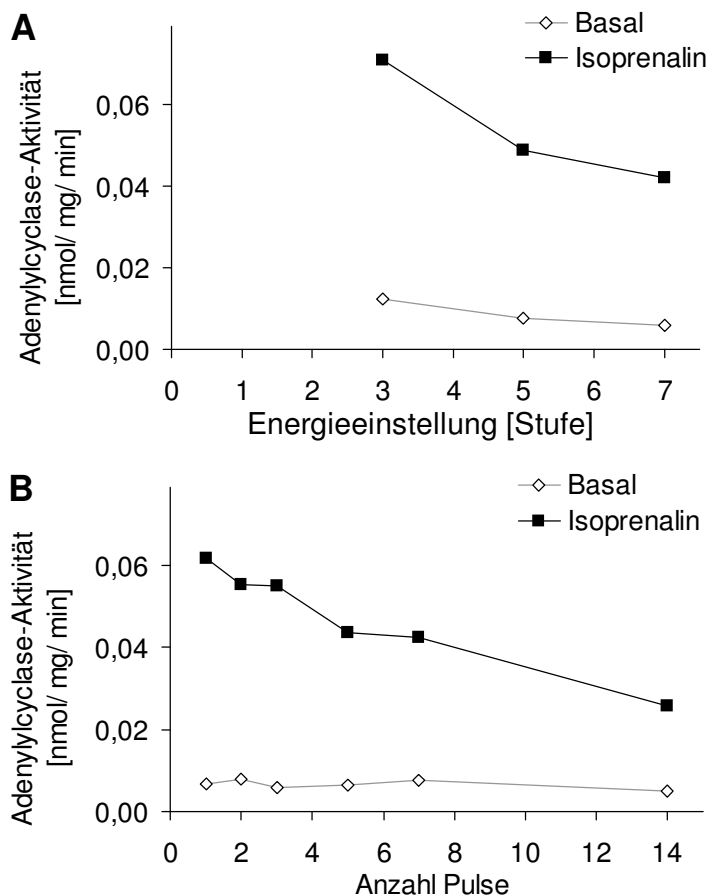


Abbildung 35: Veränderung der Adenylylcyclase-Aktivität in Plasmamembranen in Abhängigkeit von der zum Aufschluss zugeführten Energie. S49-Lymphom-Zellen wurden durch Ultraschall unter verschiedenen Geräteeinstellungen für Energie und Anzahl der Pulse aufgeschlossen. Nach der Präparation der Plasmamembranen wurde die Adenylylcyclase-Aktivität nach der Membranmethode ohne und mit Stimulation durch Isoprenalin bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte eines repräsentativen von zwei Experimenten in Doppelwerten. Die mittlere Standardabweichung lag unter 3 %. **A:** Jeweils drei Pulse wurden bei verschiedener Energie durchgeführt. **B:** Bei Energieeinstellung Stufe 3 wurde eine variable Anzahl von Pulsen appliziert.

Im Folgenden wurde die Anzahl der Pulse bei Energieeinstellung Stufe 3 variiert (Abbildung 35B). Während die basale Adenylylcyclase-Aktivität nicht messbar beeinflusst wurde, ließ die Rezeptor-stimulierbare Adenylylcyclase-Aktivität bei zunehmenden Pulsen kontinuierlich nach. Für folgende Experimente wurde der Ultraschall-Aufschluss mit die Energieeinstellung Stufe 3 und mit drei Pulsen durchgeführt.

4.3.3 $G\alpha_s$ -abhängige Signaltransduktion in Maus-Fibroblasten

Nachdem mit der Quantifizierung von $G\alpha_s$ in Plasmamembranen (vgl. Abschnitt 4.3.1) und der Messung der Adenylylcyclase-Aktivität (vgl. 4.3.2) die Grundlagen gelegt worden sind, wird im folgenden Abschnitt die Aufnahme von Konzentrations-Wirkungs-Kurven nach Expression von $G\alpha_s$ in $G\alpha_s$ -defizienten Säugerzellen beschrieben.

4.3.3.1 Rekonstitution der Signaltransduktion in $G\alpha_s$ -defizienten Zellen

Für die Untersuchung von rekonstituierten Proteinen in einer Membranumgebung war ein Null-Hintergrund wünschenswert. Neben Insektenzellen, die kein funktionell $G\alpha_s$ -analoges Protein besitzen (vgl. Abschnitt 4.1), wurde dafür verbreitet die Maus-Lymphom-Linie S49 cyc⁻ verwendet [Bourne 1975]. Da sie schlecht transfizierbar ist, erwies sie sich für Experimente mit vielen transienten Expressionen als ungeeignet.

Im Jahre 2002 wurde im Labor von Jüppner eine weitere $G\alpha_s$ -defiziente Zelllinie etabliert [Bastepe 2002]. Dafür wurde bei der Maus das Gen *Gnas*, ein Ortholog des humanen *GNAS*, durch gezielte Insertion einer Expressionskassette in Exon 2 unterbrochen [Yu 1998]. Für Mausembryonen ist der homozygote Verlust von $G\alpha_s$ letal. Daher wurden vor dem Absterben des Embryos Zellen entnommen und immortalisiert. Eine der so erzeugten Fibroblasten-Zelllinien, bezeichnet als 2B2, wurde für die folgenden Arbeiten eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Zelllinie stabil mit einem Plasmid, das den Glucagon- und β_2 -adrenergen Rezeptor kodiert, transfiziert (3.2.2.2.1).

Am Beispiel der Spleißvariante L2 wurde die Überexpression von $G\alpha_s$ untersucht. Bei der Transfektion von $G\alpha_s$ -L2-kodierendem Plasmid in 2B2-Zellen wurde ein linearer Zusammenhang zwischen Plasmidmenge und dem in der Membran nachweisbaren $G\alpha_s$ gefunden (Abbildung 36A). Die Funktion des exprimierten Proteins in der Rezeptor-vermittelten Stimulation der Adenylylcyclase wurde im Ganzzellassay (vgl. Abschnitt 3.2.4.2) gezeigt (Abbildung 36B). Die Stimulation des β_2 -adrenergen Rezeptors führte zur Zunahme des cAMP-Gehalts in Abhängigkeit von der exprimierten $G\alpha_s$ -Menge. Ab einem

Gehalt von > 2 ng $G\alpha_s$ pro μg Membran nahm die Rezeptor-abhängige Stimulierbarkeit der Adenylylcyclase nicht weiter zu.

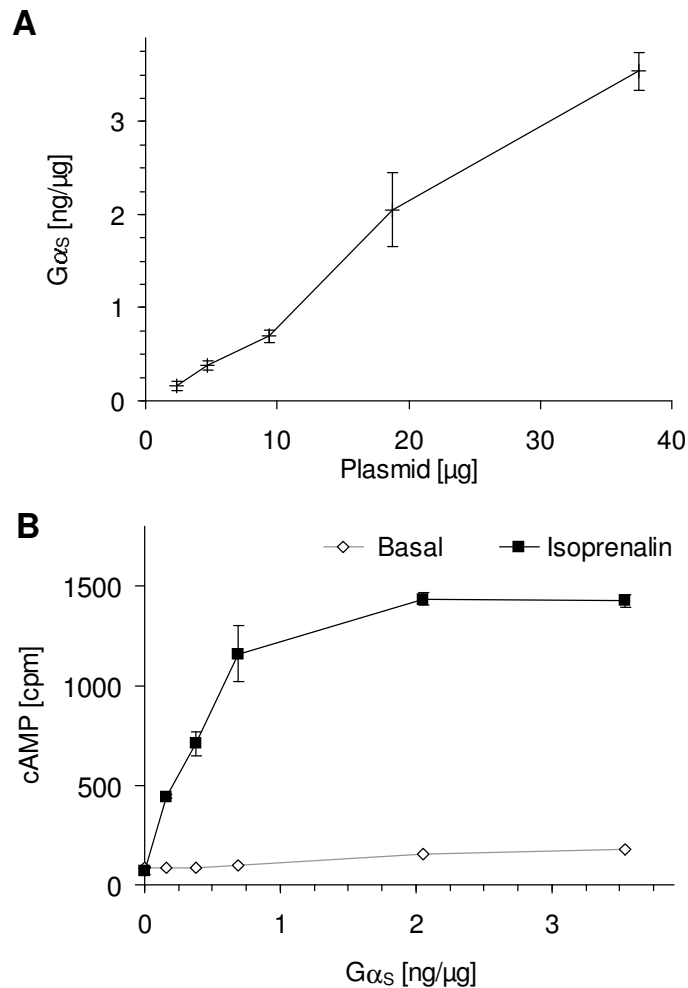


Abbildung 36: Überexpression von $G\alpha_s$ -L2 in 2B2-Zellen und Analyse auf Protein- und Funktions-ebene. Jeweils $1,5 \cdot 10^6$ 2B2-Zellen wurden durch Elektroporation mit $G\alpha_s$ -L2 (2,3-37,5 μg $G\alpha_s$ -kodierendes Plasmid ergänzt durch Leerplasmid zur Gesamtmasse von 37,5 μg in jeder Probe) transfiziert. Unmittelbar nach der Transfektion wurde jeder Ansatz in zwei Teile zur späteren Quantifizierung und funktionellen Bestimmung aufgeteilt. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten mit Doppelwerten. **A:** 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Proben geerntet, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und Plasmamembranen präpariert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und detektiert. **B:** Die Adenylylcyclase-Aktivität wurde ohne oder mit Stimulation durch 10 μM Isoprenalin nach der Ganzzellmethode (Akkumulationsdauer 5 min) bestimmt.

Lichtmikroskopisch blieb die Morphologie der Zellen von der Transfektion unbeeinflusst. Die Transfektionseffizienz lag unabhängig von der Menge des $G\alpha_s$ -kodierenden Plasmids im obigen Experiment bei ca. 80 % und schwankte zwischen verschiedenen Experimenten zwischen 60-80 %.

Die Transfektion zunehmender DNA-Mengen führt zu einer Verlangsamung der Proliferation der transfizierten Zellen. Die molekulare Ursache dafür könnte die Konkurrenz

zwischen Bindungsmotiven auf den transfizierten Plasmiden und zelleigenen Promotoren sein. Um diesen Effekt zu umgehen, wurden alle Proben einer Konzentrations-Wirkungs-Reihe mit Leerplasmid auf die gleiche DNA-Menge im Transfektionsansatz aufgefüllt. Mit dieser Maßnahme war die Wachstumsgeschwindigkeit, gemessen als Plasmamembran-Masse, nur in geringem Maße abhängig von der transfizierten Menge an $G\alpha_s$ -kodierendem Plasmid (Abbildung 37). Die exprimierte $G\alpha_s$ -Konzentration stand in linearer Abhängigkeit zur Menge des $G\alpha_s$ -kodierenden Plasmids (nicht gezeigt). Das Nachlassen der Proliferation bei $G\alpha_s$ -kodierenden Plasmidmengen über 35 μg pro Ansatz dürfte auf die Belastung der Zellen durch die Translation zurückzuführen sein.

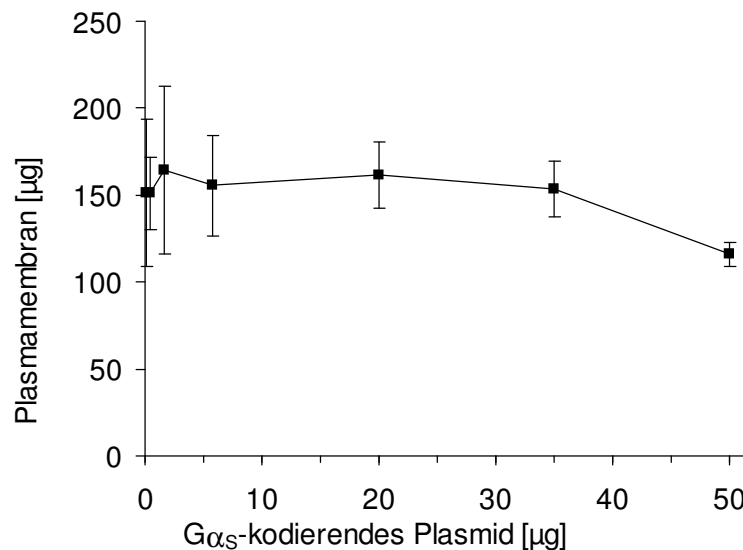


Abbildung 37: Zellwachstum bei Überexpression von $G\alpha_s$. Jeweils $1,5 \cdot 10^6$ 2B2-Zellen wurden durch Elektroporation mit $G\alpha_s$ -kodierendem Plasmid transfiziert, die Gesamtmenge an Plasmid wurde jeweils durch Leerplasmid zu 50 μg ergänzt. Nach Aussaat und Inkubation für 48 Stunden wurden Plasmamembranen der Zellen präpariert. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von vier Transfektionen mit $G\alpha_s$ -L1/-L2/-S3/-S4-kodierenden Plasmiden.

Um neben der Rezeptor-abhängigen Aktivierung der Adenylylcyclase auch Interaktion $G\alpha_s$ - Adenylylcyclase getrennt betrachten zu können, wurde die direkte Stimulation durch das komplexierte Aluminiumion AlF_4^- gewählt (vgl. Abschnitt 1.2.2.3). Die Aktivierung durch AlF_4^- unterscheidet sich von schwer hydrolysierbaren Nukleotidanaloga wie $\text{GTP}\gamma\text{S}$ darin, dass zur Bindung von AlF_4^- durch $G\alpha_s$ -GDP kein Nukleotid-Austausch notwendig ist.

Die Messung der Rezeptor-stimulierten Adenylylcyclase-Aktivität war vergleichbar mit den Befunden in der Ganzzellmethode (Abbildung 36B): Durch Stimulation des β_2 -adrenergen

Rezeptor erhöhte sich die Adenylylcyclase-Aktivität maximal um 3,5fach gegenüber nicht stimulierten Proben, im Ganzzellansatz lag dieses Verhältnis bei 8fach. Die Konzentration von $G\alpha_s$ in der Membran, bei der eine halbmaximale Rezeptor-vermittelte Aktivierung erreicht wurde, betrug bei der Membranmethode 1,70 ng/ μ g, im Ganzzellansatz 0,41 ng/ μ g. Die Aktivierung durch AlF_4^- erreichte eine etwa 3,5fach höhere Adenylylcyclase-Aktivität als Isoprenalin. Das kann zum einen dadurch bedingt sein, dass AlF_4^- das G-Protein für die Dauer der Messung aktivierte, während in Anwesenheit von GTP bei der Rezeptor-abhängigen Stimulation ein Wechsel zwischen aktivem und inaktivem Zustand stattfand. Zum anderen ist nicht sicher, ob eine Aktivierung aller vorhandenen Rezeptormoleküle zur Aktivierung des gesamten $G\alpha_s$ -Vorrats führte.

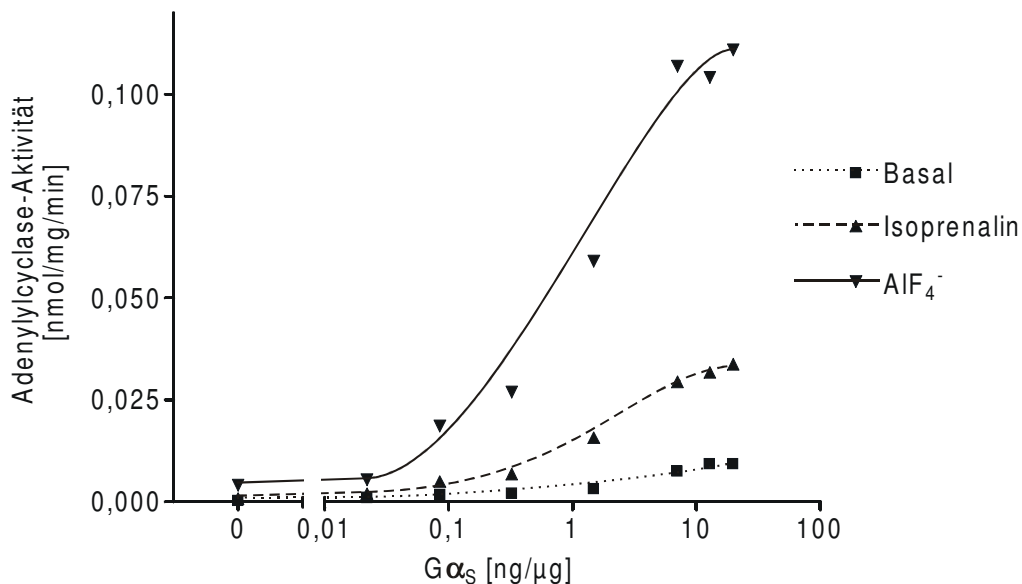


Abbildung 38: Überexpression von $G\alpha_s$ -L2 wurde in 2B2-Zellen und Messung der Adenylylcyclase-Aktivität nach der Membranmethode. Jeweils $1,5 \cdot 10^6$ 2B2-Zellen wurden durch Elektroporation mit verschiedenen Mengen $G\alpha_s$ -L2-Plasmid transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und Plasmamembranen präpariert. Daran wurden die Konzentration von $G\alpha_s$ sowie die basale, durch 10 μ M Isoprenalin bzw. 30 μ M AlF_4^- stimulierte Adenylylcyclase-Aktivität bestimmt. Gezeigt sind Daten eines repräsentativen von drei Experimenten, die in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Die mittlere Standardabweichung lag unter 3 %.

Durch die Expression von $G\alpha_s$ in $G\alpha_s$ -defizienten Zellen wurde die GPCR-vermittelte Stimulierbarkeit der Adenylylcyclase wiederhergestellt. Am Beispiel einer Spleißvariante wurde gezeigt, dass die Transfektion variabler Plasmidmengen eine Steuerung der $G\alpha_s$ -Konzentration in den Plasmamembranen erlaubte. Die gezeigten Daten legen nahe, dass die

beobachtete Sättigung der Adenylylcyclase-Aktivität auf einer hohen Konzentration von $G\alpha_s$ an der Membran beruht.

4.3.3.2 Kinetik der transienten Expression von $G\alpha_s$

$G\alpha_s$ konnte in 2B2-Zellen in ausreichend hohen Konzentrationen exprimiert werden, um die Adenylylcyclase zu sättigen. Es stellte sich die Frage, ob die Expression von $G\alpha_s$ ein Gleichgewicht erreicht hatte. Diese Experimente wurden 48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt (Abbildung 38). Zu diesem Zeitpunkt hatte nach der Transfektion etwa eine Verdopplung der Zellzahl stattgefunden. Die verbleibende Plasmidmenge pro Zelle halbierte sich dadurch, zusätzlich zum (nicht quantifizierten) Abbau durch Desoxyribonukleasen.

Um die Expression von $G\alpha_s$ im Zeitverlauf zu verfolgen, wurden 2B2-Zellen mit $G\alpha_s$ -kodierenden Plasmiden transfiziert und vor der Präparation von Plasmamembranen 2 bis 4 Tage wachsen gelassen. Die Konzentration von $G\alpha_s$ in den Plasmamembranen und die Stimulierbarkeit der Adenylylcyclase wurden anschließend bestimmt (Abbildung 39).

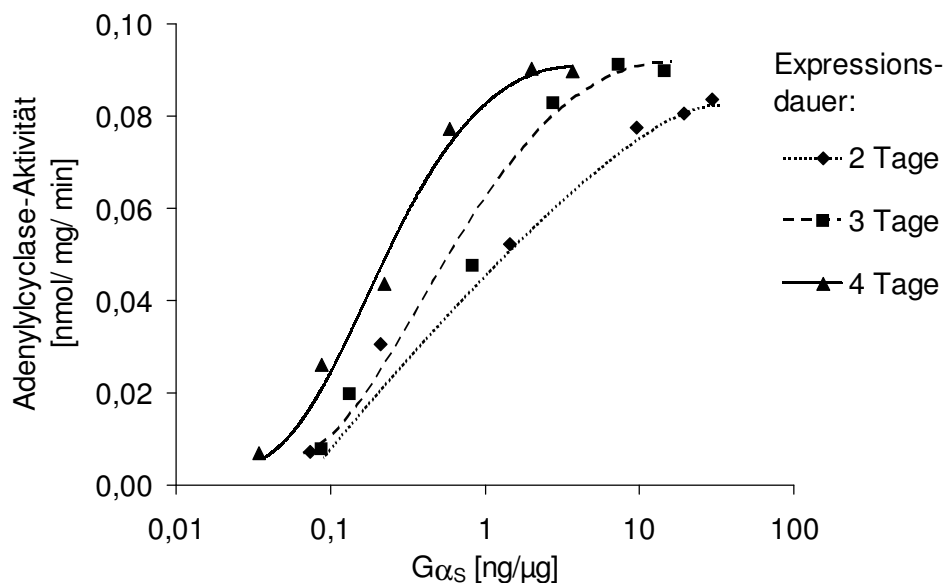


Abbildung 39: Veränderung der $G\alpha_s$ -stimulierbaren Adenylylcyclase-Aktivität in Abhängigkeit von der Expressionsdauer von $G\alpha_s$. Jeweils $1,5 \cdot 10^6$ 2B2-Zellen wurden durch Elektroporation mit verschiedenen Mengen $G\alpha_s$ -L2-Plasmid transfiziert (0,2-50 μg $G\alpha_s$ -kodierendes Plasmid), anschließend wurde jede Probe auf 3 Kulturgefäße aufgeteilt. 48, 73 und 98 Stunden nach der Transfektion wurde jeweils eines der Kulturgefäße jeder Plasmidmenge abgelöst, sedimentiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Nach Ernte aller Proben wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen, Plasmamembranen präpariert und die Konzentration von $G\alpha_s$ sowie die Adenylylcyclase-Aktivität in Anwesenheit von 30 μM AlF_4^- bestimmt. Das dargestellte Diagramm zeigt repräsentative Daten aus einem von zwei Experimenten in Doppelbestimmungen. Die mittlere Standardabweichung lag unter 3 %.

Die maximal erreichte Adenylylcyclase-Aktivität durch AlF_4^- -aktiviertes $\text{G}\alpha_s$ war unabhängig von der Expressionsdauer nahezu konstant. Jedoch sanken die gemessenen $\text{G}\alpha_s$ -Konzentrationen in den Plasmamembranen, das heißt die Potenz zur Stimulation der Adenylylcyclase durch $\text{G}\alpha_s$ erhöhte sich mit der Expressionsdauer. Für die folgenden Experimente wurde die Expressionsdauer von 4 Tagen gewählt.

4.3.3.3 Einfluss der inhibitorischen G-Proteine auf die Adenylylcyclase-Aktivierung in Maus-Fibroblasten

Die Aktivierbarkeit der α -Untereinheit durch AlF_4^- ist ein gemeinsames Merkmal aller Unterfamilien heterotrimer G-Proteine [Sprang 1997]. Damit aktiviert AlF_4^- neben dem überexprimierten $\text{G}\alpha_s$ auch endogene Proteine der Unterfamilie G_i . In Maus-Fibroblasten sind insbesondere die Varianten $\text{G}\alpha_{i1/2/3}$, $\text{G}\alpha_o$ und $\text{G}\alpha_z$ zu erwarten, die im Folgenden als $\text{G}\alpha_i$ zusammenfassend bezeichnet werden sollen (vgl. Abschnitt 1.2). Im Unterschied zu $\text{G}\alpha_s$, das alle Adenylylcyclase-Isoformen stimuliert, vermindern $\text{G}\alpha_i$ nur bei einigen Adenylylcyclase-Isoformen die Aktivität. Das betrifft insbesondere die Isoformen I, V, VI und VIII [Taussig 1995]. Das Ausmaß, um das eine $\text{G}\alpha_s$ -vermittelte Stimulation durch $\text{G}\alpha_i$ inhibiert wird, variiert zwischen den Isoformen und korreliert nicht mit anderen Interaktionen wie der Calcium-Calmodulin- oder Forskolin-vermittelten Stimulation [Krupinski 1998].

Die Inhibition der Adenylylcyclase-Aktivität ist aufgrund einer niedrigen basalen Umsatzrate praktisch nur an vorstimulierten Adenylylcyclasen messbar. Um zu bestimmen, welchen Einfluss die gleichzeitige Aktivierung der endogenen $\text{G}\alpha_i$ zusammen mit überexprimierten $\text{G}\alpha_s$ durch AlF_4^- hatte, wurden 2B2-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das eine daueraktive Mutante des $\text{G}\alpha_s$ ($\text{G}\alpha_s\text{-Q227L}$) kodiert (Abbildung 40). Bei dieser Mutante ist durch Austausch einer Glutamin-Aminosäure am katalytischen Zentrum die intrinsische GTPase-Aktivität praktisch aufgehoben [Masters 1989]. Das Molekül bleibt nach einmaliger Aktivierung (bereits in der Zelle) aktiv.

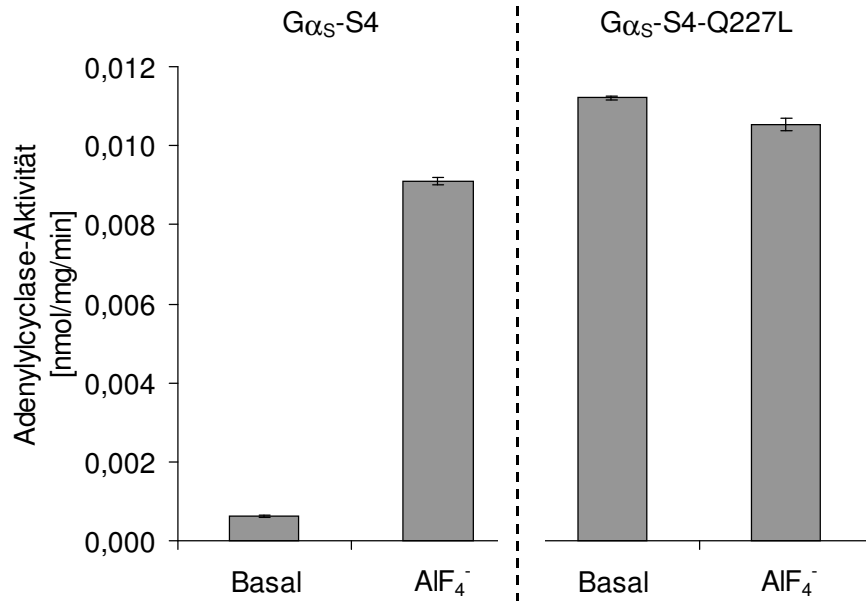


Abbildung 40: Anteil des inhibitorischen G-Proteins G_i an der Signaltransduktion. Jeweils $1,5 \cdot 10^6$ 2B2-Zellen wurden mit Plasmiden für Gα_s-S4 bzw. die Gα_s-S4-Q227L-Mutante transfiziert (13 μg Gα_s-kodierendes Plasmid). Nach wurden 96 Stunden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen, Plasmamembranen präpariert und daran die Konzentration von Gα_s sowie die Adenylylase-Aktivität mit bzw. ohne Aktivierung durch 30 μM AIF₄⁻ bestimmt. Die Konzentrationen von Gα_s-S4 bzw. Gα_s-S4-Q227L in den Plasmamembranen betragen $(3,65 \pm 0,03)$ bzw. $(3,22 \pm 1,08)$ ng/μg. Die Daten zeigen Mittelwert ± Standardabweichung eines repräsentativen von zwei Experimenten in Doppelwerten.

Die Adenylylase-Aktivität konnte in Plasmamembranen, welche die Wildtyp-Spleißvariante enthielten, durch AIF₄⁻ um den Faktor 15 stimuliert werden. In Plasmamembranen mit der daueraktiven Mutante lag die unstimulierte Aktivität bereits auf dem Niveau der stimulierten Wildtyp-Variante. Bei Zugabe von AIF₄⁻ ging diese Aktivität um ca. 6 % zurück. Dieses Ergebnis lässt zwei Interpretationen zu. Entweder exprimierten 2B2-Zellen nur eine im Vergleich zum überexprimierten Gα_s geringe Menge Gα_i, oder der Anteil der Gα_i-sensitiven Adenylylase an der gesamten Aktivität war entsprechend gering. Als Konsequenz für die Untersuchungen zur Gα_s-stimulierten Adenylylase-Aktivität kann die gleichzeitige Aktivierung von Gα_i durch AIF₄⁻ vernachlässigt werden.

4.3.3.4 Interaktion Gα_s-Adenylylase

Die Bestimmung der Adenylylase-Aktivität an isolierten Plasmamembranen erlaubt die Stimulation einzelner Ebenen der Signaltransduktionskaskade GPCR- G-Protein - Adenylylase. Damit kann der Beitrag der Moleküle getrennt erfasst und zwischen den Gα_s-Spleißvarianten verglichen werden.

Um die Qualität der Interaktion zwischen $G\alpha_s$ und der Adenylylcyclase zu betrachten, wurden Adenylylcyclase-Aktivitäten in Abhängigkeit von variablen $G\alpha_s$ -Konzentrationen bestimmt. Um die $G\alpha_s$ -Menge in den Plasmamembranen zu variieren, wurden 2B2-Zellen mit variablen Plasmidmengen je einer Spleißvariante transfiziert. Die Messung der Adenylylcyclase-Aktivitäten erfolgte in Gegenwart von AlF_4^- (Abbildung 41). Eine Sättigung der Adenylylcyclase-Aktivität durch $G\alpha_s$ wurde in diesem Experiment für die Spleißvarianten L2 und S4 erreicht. Im Fall von L1 und S3 lag die höchste rekonstituierte Konzentration nicht in der Sättigung. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt. Dabei wurde jeweils für ein bis zwei Spleißvarianten keine Sättigung erreicht. Der nachlassende Anstieg der Adenylylcyclase-Aktivität bei hohen $G\alpha_s$ -Konzentrationen signalisierte, dass zumindest der Wendepunkt und somit die EC_{50} überschritten wurde. Für die Quantifizierung ergaben sich in diesen Fällen angenäherte Werte. Über die durchgeführten Experimente ergaben sich für alle Spleißvarianten die in Tabelle 8 angegebenen Werte. Zwischen den vier untersuchten Spleißvarianten bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der maximalen Adenylylcyclase-Aktivität und der $G\alpha_s$ -Konzentration halbmaximaler Aktivierung der Adenylylcyclase. Damit konnte die vorgeschaltete Interaktion GPCR - $G\alpha_s$ auf der Ebene der Adenylylcyclase verglichen werden.

Spleißvariante	L1	L2	S3	S4
maximale Adenylylcyclase-Aktivität [nmol/mg/min]	0,085±0,010	0,072±0,009	0,090±0,007	0,082±0,004
EC_{50} [ng/μg]	2,07±0,52	2,14±0,62	1,23±0,08	1,48±0,12

Tabelle 8: Stimulation der Adenylylcyclase-Aktivität in Plasmamembranen von 2B2-Zellen durch Aktivierung von $G\alpha_s$ -Spleißvarianten mit AlF_4^- . Die Zellen wurden analog dem in Abbildung 41 beschriebenen Protokoll mit jeweils einer Spleißvariante transfiziert und daraus Plasmamembranen präpariert. An diesen wurde die AlF_4^- -stimulierte Adenylylcyclase-Aktivität gemessen. Gezeigt sind die Mittelwert ± Standardabweichung von drei Experimenten.

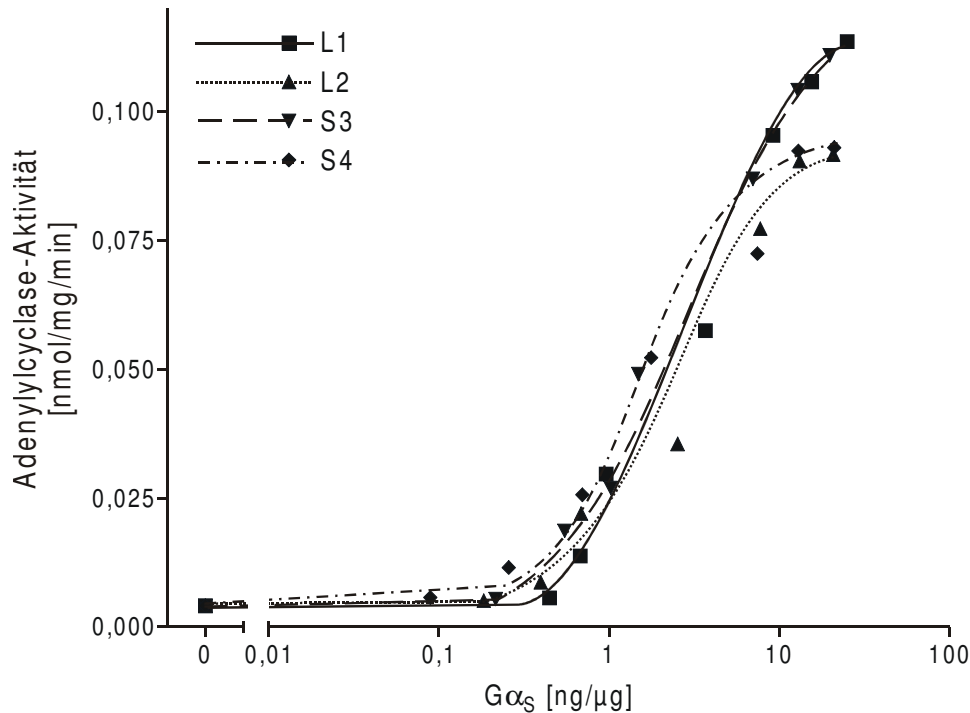


Abbildung 41: Vergleich der Adenylylcyclase-Aktivität bei direkter Aktivierung von $G\alpha_s$ -Spleißvarianten durch AlF_4^- . Jeweils $1,5 \cdot 10^6$ 2B2-Zellen wurden durch Elektroporation mit verschiedenen Mengen eines Plasmids transfiziert, welches eine der Spleißvarianten (L1-S4) kodiert. 96 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen aufgeschossen und Plasmamembranen präpariert. Die Stimulierbarkeit der Adenylylcyclase wurde nach der Membranmethode in Gegenwart von $30 \mu M$ AlF_4^- bestimmt. $G\alpha_s$ -Konzentrationen in Plasmamembranproben wurden immunologisch bestimmt. Gezeigt sind Daten eines repräsentativen von drei Experimenten, die in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Die mittlere Standardabweichung lag unter 3 %.

4.3.3.5 Bedeutung von $G\alpha_s$ bei der Rezeptor-vermittelten Stimulation der Adenylylcyclase

Die Interaktion zwischen Rezeptoren und $G\alpha_s$ -Spleißvarianten wurde in dieser Arbeit bereits am Modellsystem der *Spodoptera-frugiperda*-Plasmamembranen (Sf9) untersucht (vgl. Abschnitt 4.1). Dabei wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede im Verhalten der Spleißvarianten gefunden. Es bestand jedoch das Problem, dass durch die virale Infektion der Insektenzellen eine Variation der $G\alpha_s$ -Expression nur auf sehr hohem Niveau möglich war und mögliche Unterschiede nicht messbar blieben. Dagegen erlaubte die Transfektion mit variablen Plasmidmengen eine weitgehende Steuerung der exprimierten Proteinmenge.

Nachdem im vorigen Abschnitt die Spleißvarianten als vergleichbar in der Qualität der Interaktion mit der Adenylylcyclase charakterisiert wurden, vergleichen die folgenden Experimente die Adenylylcyclase-Aktivität nach Stimulation von GPCR. Dazu wurden

2B2-Zellen mit variablen Mengen der Spleißvarianten-kodierenden Plasmide transfiziert und nach der Expression Plasmamembranen der Zellen isoliert. Anschließend wurden die Adenylylcyclase-Aktivitäten bei Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bestimmt (Abbildung 42). Die Rezeptoren wurden mit sättigenden Konzentrationen der jeweiligen Agonisten stimuliert. Die Eigenschaften der Spleißvarianten, angegeben als maximale Adenylylcyclase-Aktivität und EC_{50} , sind in Tabelle 9 (Seite 106) angegeben. Die vier Spleißvarianten erwiesen sich wiederum als vergleichbar effizient und potent. Bei der Stimulation des Glucagon-Rezeptors in Gegenwart von sättigenden $G\alpha_s$ -Konzentrationen wurde für alle Spleißvarianten eine niedrigere maximale Adenylylcyclase-Aktivität erreicht als beim β_2 -adrenergen Rezeptor.

Neben den stabil ins Zellgenom integrierten cDNA der beiden beschriebenen Rezeptoren wurde die Interaktion mit weiteren Rezeptoren untersucht. Zum einen exprimierten die 2B2-Zellen endogen einen Vasopressin-Rezeptor, dessen Subtyp (AVPR1A, AVPR1B, AVPR2) nicht bekannt ist. Zusätzlich wurden Histamin-, Secretin- und LH-Rezeptoren transient überexprimiert.

Zuvor wurde sichergestellt, dass bei der transienten Expression der Rezeptoren die Rezeptormenge nicht limitierend sein würden. Dazu wurden 2B2-Zellen mit variablen Mengen der GPCR-kodierenden Plasmide und konstanter Menge $G\alpha_s$ -kodierendem Plasmid transfiziert und nach der Expression Plasmamembranen isoliert. Nach der Membranmethode wurden mit sättigenden Agonist-Konzentrationen die GPCR-vermittelten Adenylylcyclase-Aktivitäten bestimmt. Die Aktivitäten wiesen in Abhängigkeit von der transfizierten Menge an GPCR-kodierendem Plasmid Sättigungskurven auf (nicht gezeigt). In den folgenden Experimenten wurden die GPCR-kodierenden Plasmide in den so bestimmten Plasmidmengen transfiziert. Der Gehalt an $G\alpha_s$ in den Plasmamembranen blieb unabhängig von der transfizierten Menge an Rezeptor-kodierendem Plasmid. Die Ergebnisse dieser Rekonstitutionen von Rezeptoren und Spleißvarianten sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Die EC_{50} der Spleißvarianten sind waren schon zuvor untereinander gleich und lagen wie bei der Interaktion zwischen $G\alpha_s$ und Adenylylcyclase um 2 ng/ μ g (Abschnitt 4.3.3.4). Der Vasopressin- und der LH-Rezeptor fielen durch höhere EC_{50} um 3-5 ng/ μ g auf. Diese beiden Rezeptoren vermittelten jedoch auch die mit Abstand niedrigsten maximalen Adenylylcyclase-Aktivitäten, so dass die Unsicherheit der Bestimmung bei beiden als höher angesehen werden muss.

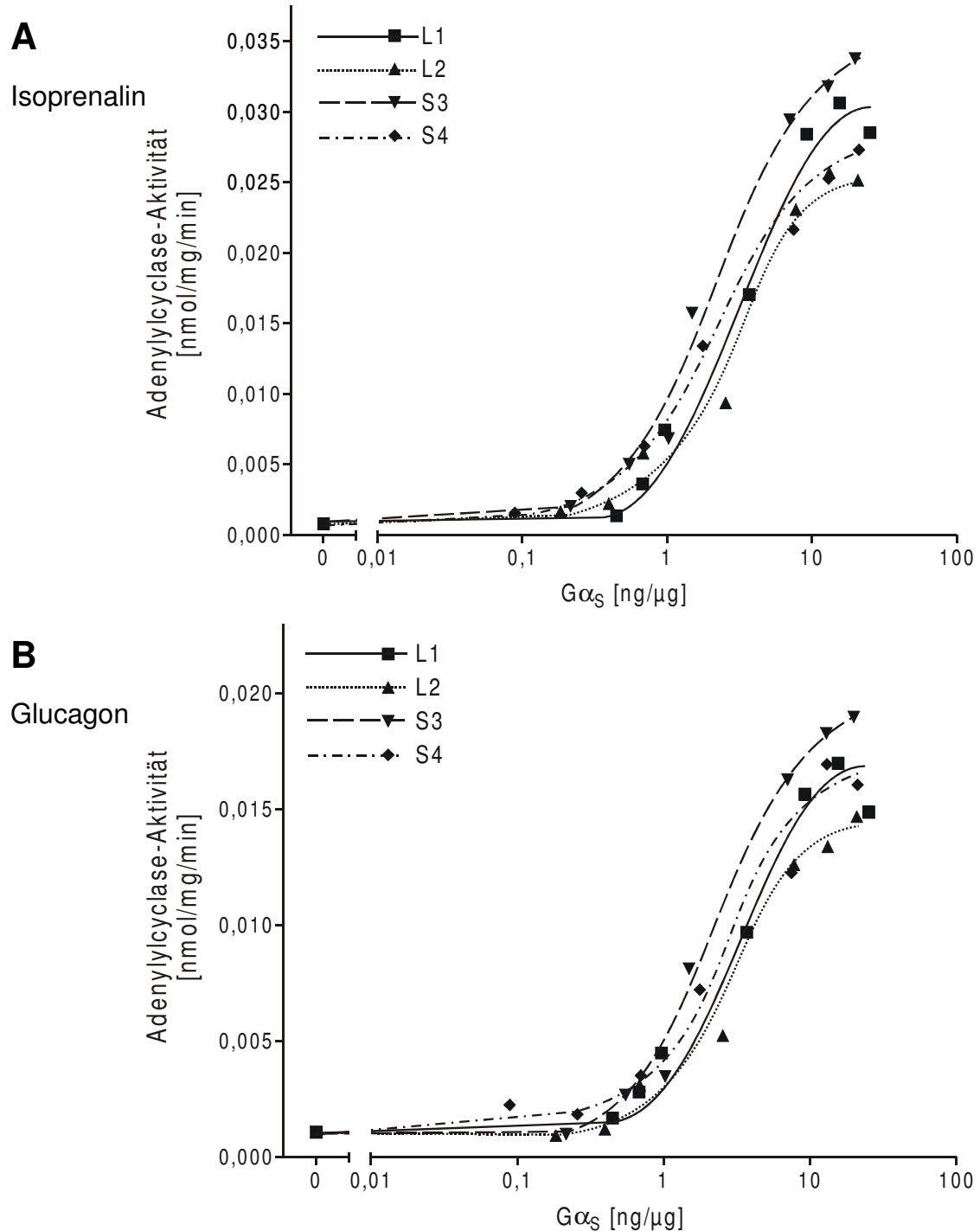


Abbildung 42: Stimulation von GPCR an Plasmamembranen, die transient exprimierte $G\alpha_s$ -Spleißvarianten enthielten. Jeweils $1,5 \cdot 10^6$ 2B2-Zellen mit stabil exprimierten β_2 -adrenergem und Glucagon-Rezeptor wurden durch Elektroporation mit verschiedenen Mengen eines der Spleißvarianten-kodierenden Plasmide (L1-S4) transfiziert. 96 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen aufgeschossen und Plasmamembranen präpariert. $G\alpha_s$ -Konzentrationen in Plasmamembranproben wurden immunologisch bestimmt. Die Adenylyl cyclase-Aktivität wurde nach der Membranmethode durch Stimulation mit **A:** $10 \mu\text{M}$ Isoprenalin bzw. **B:** Glucagon (500 nM) bestimmt. Gezeigt sind jeweils Daten eines repräsentativen von drei Experimenten, die in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Die mittlere Standardabweichung lag unter 3 %.

Spleißvariante	L1	L2	S3	S4
β_2-adrenerger Rezeptor (stabil exprimiert)				
max. AC-Akt. [nmol/mg/min]	0,027±0,004	0,022±0,005	0,029±0,008	0,027±0,001
EC ₅₀ [ng/μg]	2,71±0,88	2,74±1,13	1,59±0,69	1,85±0,35
Glucagon-Rezeptor (stabil exprimiert)				
max. AC-Akt. [nmol/mg/min]	0,016±0,001	0,016±0,001	0,018±0,004	0,017±0,001
EC ₅₀ [ng/μg]	2,51±1,28	2,81±0,34	1,97±0,49	2,44±0,98
Vasopressin-Rezeptor (endogen exprimiert)				
max. AC-Akt. [nmol/mg/min]	0,009±0,002	0,009±0,001	0,013±0,002	0,012±0,001
EC ₅₀ [ng/μg]	4,45±0,42	4,89±0,41	3,06±0,26	5,40±0,95
Histamin-H₂-Rezeptor (transient exprimiert)				
max. AC-Akt. [nmol/mg/min]	0,027±0,004	0,023±0,002	0,032±0,004	0,025±0,002
EC ₅₀ [ng/μg]	2,16±0,62	2,57±0,52	1,26±0,25	1,63±0,85
Secretin-Rezeptor (transient exprimiert)				
max. AC-Akt. [nmol/mg/min]	0,026±0,004	0,024±0,003	0,028±0,003	0,021±0,004
EC ₅₀ [ng/μg]	2,34±0,33	3,12±0,26	1,68±0,19	1,79±0,44
LH-Rezeptor (transient exprimiert)				
max. AC-Akt. [nmol/mg/min]	0,012±0,002	0,007±0,001	0,009±0,002	0,012±0,002
EC ₅₀ [ng/μg]	3,95±0,47	3,17±0,79	1,73±0,80	5,57±0,30

Tabelle 9: Vergleich der $G\alpha_s$ -Spleißvarianten, angegeben als maximale stimulierte Adenylylcyclase-Aktivität (max. AC-Akt.) und Konzentration von $G\alpha_s$ bei halbmaximaler Aktivierung (EC₅₀). Der Vasopressin-Rezeptor wird von 2B2-Zellen endogen exprimiert, β_2 -adrenerger und Glucagon-Rezeptor wurden stabil exprimiert und weitere Rezeptoren wurden jeweils transient überexprimiert. Die Experimente wurden wie in der Legende zur Abbildung 42 beschrieben durchgeführt. Zur Überexpression der transient überexprimierten Rezeptoren wurden jeweils 2,5 μg Plasmid zu allen Transfektionsansätzen zugesetzt. Der LH-Rezeptor wurde durch den Agonisten Humanchoriongonadotropin (hCG) aktiviert, der dem Luteinisierungshormon in seinen Rezeptorbindungseigenschaften sehr ähnlich ist [Ryan 1988]. Gezeigt sind Mittelwert ± Standardabweichung aus zwei (Vasopressin-, Secretin- und LH-R.) bzw. drei (β_2 -adrenerger, Glucagon- und Histamin-H₂-R.) Experimenten.

Die beobachteten Unterschiede in der Potenz der Spleißvarianten zur Aktivierung der Adenylylcyclase lagen unterhalb der Varianzbreite der Experimente. Die vier Spleißvarianten verhielten sich in der Interaktion mit den untersuchten Rezeptoren wie schon in Sf9-Zellen vergleichbar.

Beim Vergleich der maximalen Adenylylcyclase-Aktivierung bei sättigenden Konzentrationen $G\alpha_s$ fielen deutlichere Unterschiede zwischen verschiedenen Rezeptoren auf. So führten Histamin-, Secretin- und β_2 -adrenerge Rezeptoren zur höchsten Aktivierung um 0,025 nmol/mg/min, Vasopressin- und LH-Rezeptoren führten zu den niedrigsten

Aktivierungen um 0,010 nmol/mg/min. Wie bereits in Abschnitt 4.3.3.1 beschrieben, wurde bei direkter Aktivierung der α -Untereinheit durch AlF_4^- eine höhere Adenylylcyclase-Aktivität als nach Rezeptor-Stimulation erreicht (um 0,08 nmol/mg/min, vgl. Tabelle 8). Zusammenfassend verhielten sich die vier $G\alpha_s$ -Spleißvarianten in 2B2-Zellen in der Rezeptor-vermittelten Adenylylcyclase-Aktivierung vergleichbar hinsichtlich der halbmaximal wirksamen Konzentrationen in der Plasmamembran und der erreichten Adenylylcyclase-Aktivität bei einer sättigenden $G\alpha_s$ -Konzentration.