

Über die Interaktion aktivierter G- Proteine mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Dissertation zur Erlangung der
naturwissenschaftlichen Doktorwürde der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt
von
Leif Gerrit Hommers
aus
La Jolla

Würzburg 2011

Eingereicht am 05. April 2011

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. Moritz Bünemann

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1. Einführung	1
1.1. Allgemeine Einleitung	1
1.2. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Liganden	2
1.2.1. Allgemeine Einführung	2
1.2.2. Liganden	4
1.2.3. Strukturelle Aspekte G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	5
1.2.4. Rezeptor Desensibilisierung und Aktivierung von nicht G-Protein-gekoppelten Signalwegen durch GPCRs	8
1.3. G-Proteine	11
1.3.1. Allgemeine Einführung in G-Proteine	11
1.3.2. Strukturelle Aspekte von G-Proteinen	12
1.3.3. G-Protein Zyklus	14
1.3.4. G-Protein Untereinheiten Dissoziation	16
1.3.5. Interaktion zwischen Rezeptoren und G-Proteinen	17
1.3.6. Interaktion von G-Proteinen mit Effektoren	20
1.4. Resonanz Energie Transfer	21
1.4.1. Lumineszenz, Phosphoreszenz, Fluoreszenz	21
1.4.2. Physikalische Grundlagen des Förster Resonanz Energie Transfer	22
1.4.3. Bedeutung des FRET als Methodik in der Biologie	25
1.5. Computergestützte Analysen G-Protein gekoppelter Signalwege	27
1.6. Fragestellung	29
2. Methoden	31
2.1. Verzeichnis verwendeter Medien, Puffer und Chemikalien	31
2.1.1. Medien für Bakterienkultur	31
2.1.2. Medien für eukaryote Zellkultur	31
2.1.3. Puffer für Molekularbiologie	32
2.1.4. Extrazellulär- und Intrazellulärpuffer für FRET- und Patch-Clamp-Experimente	32
2.1.5. Puffer für Proteinbiochemie	33
2.2. Biologisches Material und Zellkultur	34
2.2.1. Eukaryote Zellsysteme	34
2.2.2. Prokaryote Zellsysteme	34
2.2.3. Eukaryote Zellkultur	34
2.2.4. Prokaryote Zellkultur	34
2.2.5. Plasmid-DNA	35
2.3. Molekularbiologische Methoden	36
2.3.1. DNA-Transformation	36
2.3.2. DNA-Präparation	36
2.3.3. DNA-Transfektion	36
2.3.4. Liste der DNA-Transfektionsbedingungen	37
2.3.5. Zellmembranpermeabilisierung	37
2.4. Proteinbiochemische Methoden	38
2.4.1. Isolation von Zellmembranen	38

2.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	38
2.4.3. Radioliganden-Bindung	38
2.4.4. GTP γ ³⁵ S-Bindung	39
2.4.5. SDS-Polyamidacrylelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.4.6. Western-Blot	40
2.4.7. Immundetektion	40
2.5. Elektrophysiologische Methoden	41
2.5.1. Prinzip der Patch-Clamp-Methodik	41
2.5.2. Durchführung	42
2.6. Fluoreszenz Mikroskopische Methoden	43
2.6.1. Prinzip von FRET-Messungen	43
2.6.2. Analyse von FRET-Messungen	44
2.6.3. Quantifizierung des FRET	45
2.6.4. Normalisierung des FRET	45
2.6.4.1. Normalisierung des FRET bei Untersuchung der G-Protein Aktivierung	45
2.6.4.2. Normalisierung des FRET bei Untersuchung der Rezeptor/ G-Protein Interaktion	46
2.7. Simulation chemischer Reaktionskinetiken	46
2.7.1. Grundlagen der Reaktionskinetik	46
2.7.2. Prinzip des Runge-Kutta-Verfahren	47
2.8. Software	48
3. Ergebnisse	49
3.1. Analyse des α_{2A} -AR-Gi/o-Signalwegs anhand eines vereinfachten Modells des G-Protein-Zyklus	49
3.1.1. Bestimmung der Versuchsbedingungen	49
3.1.2. Formulierung des Modells	52
3.1.3. Ausgangsbedingungen und Parameterbestimmung	53
3.2. Validierung der FRET-basierten Detektion der G-Protein Aktivierung und Rezeptor/G-Protein Interaktion in einzelnen permeabilisierten Zellen	59
3.3. Überprüfung der Interaktion von aktivierten Go-Proteinen mit α_{2A} -AR in permeabilisierten Zellen	62
3.4. Verlust von GTP γ S und Deaktivierung GTP γ S-aktivierter Go-Proteinen durch aktivierte α_{2A} -AR in in permeabilisierten Zellen	66
3.5. Reversible Deaktivierung GTP- und GTP γ S-präaktivierter Go-Proteine bei maximaler Aktivierung von α_{2A} -AR	69
3.6. Deaktivierung präaktivierter Go-Proteine und GIRK-Kanäle durch aktivierte α_{2A} -AR in intakten HEK293-Zellen	73
3.7. Erweitertes kinetisches Modell des Go-Protein Zyklus	76
4. Diskussion	83
4.1. Biologischer Bedeutung inhibierender Signalwege im Kontext der Untersuchungen	83

4.2. Interpretation der experimentellen Befunde	84
4.3. Diskussion des biologischen Kontext der Versuchsbedingungen	86
4.4. Diskussion alternativer Erklärungen der experimentellen Befunde	89
4.4.1. Rezeptor-Ebene	89
4.4.2. G-Protein-Ebene	90
4.4.3. GIRK-Kanal Ebene	92
4.5. Diskussion des Computermodells	95
4.5.1. Allgemeine Diskussion des Computermodells	95
4.5.2. Vereinfachungen des Modells	96
4.5.2.1. Ebene des Rezeptors	96
4.5.2.2. Vereinfachungen auf Ebene des G-Proteins	98
4.5.3. Diskussion des erweiterten kinetischen Modells	99
4.6. Ausblick	102
5. Zusammenfassung	104
6. Summary	105
7. Literaturverzeichnis	106
8. Abkürzungsverzeichnis	121
9. Danksagung	123
10. Erklärung	124

1. Einführung

1.1. Allgemeine Einleitung

Unter Signaltransduktion versteht man die biochemischen Prozesse, die in einer Zelle als zelluläre Reaktion auf einem externen Stimulus ablaufen. Physiologisch erlaubt dies der Zelle auf Veränderungen der Umgebung zu reagieren. In multizellulären Lebewesen wird durch die Signaltransduktion die Koordination verschiedener spezialisierter Zellen zu einem Organismus ermöglicht. Signaltransduktion ist daher sowohl für die biologische, als auch medizinische und pharmakologisch/pharmazeutische Forschung von zentraler Bedeutung.

Für einen vollständigen Signaltransduktionsweg (kurz: Signalweg) müssen Zellen Proteine besitzen, die einen Stimulus erkennen können (Rezeptoren) und Proteine, die als Folge des Stimulus in ihrer Funktion moduliert werden (Effektoren). Zwischen Rezeptor und Effektor können eine Vielzahl von weiteren Proteinen, Molekülen oder auch Ionen („second messenger“) an der Signalweiterleitung beteiligt sein oder in den Signalweg modulierend eingreifen. Das Prinzip der zellulären Signaltransduktion basiert gewöhnlich auf einer sequentiellen „Aktivierung“ oder „Deaktivierung“ der Elemente eines Signalwegs. „Aktivierung“ und „Deaktivierung“ sind typischerweise über Konformationen der Proteine des Signalwegs oder den Anstieg bzw. Abfall der Konzentration von second messengern definiert und meinen einen „Funktionszustand“. Der Begriff „Konformation“ wird in vorliegender Arbeit (sofern nicht anders angegeben) im Sinne des „Funktionszustandes“ verwendet und summiert alle chemischen Konformationen eines Proteins die eine gleiche physiologische Funktion ausüben.

Häufig wird - den physiologischen Kontext berücksichtigend - von „Signaltransduktionskaskaden“ gesprochen, was suggeriert, dass die „Signalstärke“ wie bei einer Kaskade aufgrund der sequentiellen Aktivierung der elemente des Signalwegs von Rezeptor zu Effektor zunimmt. Auch wenn dies sehr häufig im Rahmen physiologischer Signalprozesse stimmt, so ist dies nicht

allgemeingültig. Aus physiologischer Betrachtungsweise heraus wird in diesem Kontext von „ruhenden“ und „aktiven“ Zellen gesprochen, wobei „ruhend“ gewöhnlich eine zelluläre Situation beschreibt, in der eine bestimmte zelluläre Funktion nicht ausgeübt wird oder werden kann, also z.B. wenn ein Rezeptor nicht aktiviert ist. Dies bedeutet aber keinesfalls im Umkehrschluss, dass in einer „ruhenden“ Zelle grundsätzlich Signalwege „deaktiviert“ sind.

Bei vielen, verschiedenen physiologischen Prozessen sind G-Protein-gekoppelte Signalwege involviert. Diese Signalwege zeichnen sich dadurch aus, dass die Signalweiterleitung von Rezeptor zu Effektor ein zwischengeschaltetes Protein (G-Protein) benutzt, welches durch den Rezeptor in einen aktiven Funktionszustand versetzt werden kann. Die vorliegende Arbeit untersucht einen spezifischen Aspekt der Interaktion dieser Rezeptoren (G-Protein-gekoppelten Rezeptoren) mit G-Proteinen.

1.2. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Liganden

1.2.1. Allgemeine Einführung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Signalwege sind in verschiedenste physiologische Prozesse involviert. Sie spielen eine wesentliche Rolle in der Wahrnehmung von Licht-, Geruchs- und Geschmacksreizen, sie vermitteln die Wirkung verschiedener Hormone, sind involviert in Prozessen der Entzündungsreaktion, Chemotaxis, sowie der Zelldifferenzierung und des Zellwachstums und sind von zentraler Bedeutung im Nervensystem bei der Signalweiterleitung an Synapsen (Rosenbaum, 2009). Der Vielzahl der Stimuli entsprechend gibt es eine Vielzahl von Rezeptoren (englisch G protein coupled receptors, kurz GPCR), die typischerweise hochspezifisch für einen bestimmten Stimulus sind. Stimuli werden über Bindung von Liganden ausgeübt (siehe 1.2.2.), die typischerweise bewirken, dass ein GPCR in einen aktiven Funktionszustand übergeht und G-Proteine aktivieren kann. Die Signalweiterleitung ist aber nicht nur auf G-Protein-gekoppelte Signalwege

beschränkt (siehe 1.2.4.), weswegen vorgeschlagen wurde den Begriff „G-Protein-gekoppelter Rezeptor“ zu Gunsten des Begriffs „7-Transmembrandomänen Rezeptor“ zu verlassen (Pierce, 2002).

Gegenwärtig unterscheidet man fünf Klassen von GPCRs, deren Proteinstrukturen und Funktionen Gemeinsamkeiten aufweisen (Fredriksson, 2003): (I) Klasse der Rhodopsin-ähnlichen GPCRs, (II) Klasse der Sekretin-GPCRs, (III) Klasse der Glutamat-GPCRs, (IV) Klasse der Adhensions-GPCRs und (V) Klasse der Frizzled-taste2-GPCRs. Strukturell gemeinsam ist allen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, dass sie durch 7 transmembranäre α -Helices, die über drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, in der Zellmembran verankert sind.

Für eine detaillierte Diskussion identifizierter GPCR sei es erlaubt auf die bestehende, umfangreiche Literatur zu verweisen (Wettschureck, 2005). Es soll der in vorliegender Arbeit untersuchte α_{2A} -adrenerge Rezeptor (α_{2A} -AR) in seiner Bedeutung zusammenfassend vorgestellt werden. α_{2A} -adrenerge Rezeptoren werden im cerebralen Cortex, in der Gl. Submandibularis, der Niere, dem Herz, in arteriellen und venösen Gefäßen, sowie an sympathischen Ganglien als präsynaptische Autorezeptoren und postsynaptisch ebenfalls im cerebralen Cortex, im Pankreas der Ratte und auf Thrombozytenmembranen exprimiert (Docherty, 1998; Hein, 1999; Arnsten, 2006). Die Bedeutung liegt entsprechend unter anderem in der lokalen Regulation der Transmitterfreisetzung am Ganglion, aber auch systemisch in der Regulation des Sympathikotonus und damit indirekt des kardiovaskulären Systems, der Insulinfreisetzung, sowie im präfrontalen Cortex in Planungs-, Kontroll-, Aufmerksamkeitsfunktionen und dem Arbeitsgedächtnis (Docherty, 1998, Arnsten, 1985). Pathologisch erscheinen Bedeutungen in der Genese der Hypertension (Gavras, 2001), des Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (Arnsten, 2006), bei antikonvulsiven, sedativen und antinozizeptiven Mechanismen (Jurgens, 2007; Vilardaga, 2008), sowie bei Prozessen des Alterns, im Rahmen derer eine es zu einer Abnahme der Funktion präsynaptischer α_{2A} -ARs kommt (Docherty, 1998), zu bestehen.

1.2.2. Liganden

Vereinfacht betrachtet befindet sich ein GPCR entweder im aktiven oder im inaktiven Funktionszustand, wobei jedem Funktionszustand multiple chemische Konformationen zu Grunde liegen (Kobilka, 2007). Orthosterische und allosterische Liganden modulieren bei Bindung an die extrazelluläre Seite des Rezeptors die Wahrscheinlichkeit, mit der der aktive (oder der inaktive) Funktionszustand stabilisiert wird.

Orthosterische Liganden erhöhen bei Bindung an die extrazelluläre Seite des Rezeptors die Wahrscheinlichkeit, mit der sich der Rezeptor im aktiven Funktionszustand befindet. Sie werden durch ihre Affinität zum GPCR und ihre Effektivität, den aktiven Funktionszustand bei erfolgter Bindung zu stabilisieren, charakterisiert. Physiologische Stimuli werden typischerweise von orthosterischen Liganden vermittelt, sie werden in vier Gruppen eingeteilt (Kenakin, 2002; Kobilka, 2007):

1.) Volle Agonisten: Bei Bindung an einen Rezeptor wird die Wahrscheinlichkeit, dass der Rezeptor im aktiven Funktionszustand ist, maximal erhöht. In diese Gruppe fallen typischerweise physiologische Liganden wie Adrenalin, Dopamin, Serotonin, Parathormon, Sekretin etc..

2.) Partielle Agonisten: Bei Bindung an einen Rezeptor wird die Wahrscheinlichkeit, dass der Rezeptor im aktiven Funktionszustand ist, nur submaximal erhöht.

3.) Antagonisten: Die Bindung an einen Rezeptor beeinflusst nicht die Wahrscheinlichkeit, mit der der Rezeptor den aktiven Funktionszustand einnimmt.

4.) Inverse Agonisten: Die Bindung an einen Rezeptor reduziert die Wahrscheinlichkeit, mit der der Rezeptor den aktiven Funktionszustand einnimmt.

Wenn orthosterische Liganden an konstitutiv nicht aktiven Rezeptoren die Wahrscheinlichkeit des aktiven Funktionszustand erhöhen und an konstitutiv aktiven Rezeptoren die Wahrscheinlichkeit des aktiven Funktionszustandes senken spricht man Protean Agonisten (Kenakin, 2007).

Orthosterische Liganden können auch als partielle Agonisten, Antagonisten oder inverse Agonisten eine physiologische Bedeutung haben, was aber noch nicht abschließend geklärt ist. Ein Beispiel stellt das Retinal da: Es ist am „Lichtrezeptor“ Rhodopsin als inverser Agonist gebunden (11-cis-Retinal) und wird durch Absorption eines Photons in einen vollen Agonisten (11-trans-Retinal) isomerisiert (Okada, 2001). Somit wird physiologisch der hohe Signal-Rauschabstand des Sehsystems gewährleistet, da in Abwesenheit von Licht Rhodopsin in inaktivem Funktionszustand stabilisiert wird.

Allosterische Liganden hingegen modulieren nach Bindung an einen GPCR entweder die Affinität mit der der Rezeptor einen orthosterischen Liganden bindet oder dessen Effektivität; sie haben selber keinen direkten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des aktiven Funktionszustandes (Kenakin, 2009). Physiologische Stimuli werden im allgemeinen nicht über allosterische Liganden vermittelt; sie sind typischerweise pharmakologische Substanzen, wie z.B. Benzodiazepine am GABA_A-Rezeptor (Goodman, 2001).

Über die beschriebenen Liganden hinausgehend sind z.B. für den Calcitonin-Rezeptor (CRLR) zelluläre Transmembranproteine beschrieben worden, die die Liganden- und G-Protein-Spezifität modulieren können (receptor-activity-modifying-proteins, Kurzform RAMP; Christopoulos, 2002). Aufgrund des Umfangs sei für einen weiterführenden Überblick über die Vielzahl der identifizierten physiologischen Liganden auf die Literatur verwiesen (Wettschureck, 2005).

1.2.3. Strukturelle Aspekte G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

GPCR sind Transmembranproteine, wodurch sie physiologisch in einem amphiphilen Lösungsmittel gelöst sind. Daher ist es experimentell schwierig sie zu kristallisieren. Gegenwärtig ist dies für das Rhodopsin, für den adrenergen β_1 -Rezeptor (Warne, 2008; Warne, 2011), den adrenergen β_2 -Rezeptor (Rasmussen, 2007; Rasmussen, 2011), den Dopamin D₃-Rezeptor (Chien, 2010), den Chemokin CXCR4-Rezeptor (Wu, 2010) und den Adenosin A_{2A}-Rezeptor (Jaakola, 2008), sowohl in inaktivem als auch teilweise in aktivem

Funktionszustand gelangen. Zur Kristallisation sind jedoch Eingriffe in die Proteinsequenz bzw. die Verwendung kristallstabilisierender Maßnahmen notwendig gewesen. Nur das Rhodopsin konnte in unmodifizierter Weise kristallisiert werden (Palczewski, 2000); bei β_1 -, β_2 - und A_{2A} -Rezeptor wurde zur erfolgreichen Kristallisation die dritte intrazelluläre Schleife, die eine wichtige Bedeutung für die G-Protein Aktivierung hat, aus der Proteinsequenz der Rezeptoren entfernt und für den CXCR4-, D_3 -, β_2 - und A_{2A} -Rezeptor zur Stabilisierung T4-Lysozym verwendet (Rosenbaum, 2009).

Die Bindung von kleinmolekularen, orthosterischen Liganden findet bei der Klasse der Rhodopsin-ähnlichen GPCR typischerweise an Aminosäureresten der Transmembrandomänen statt, wohingegen bei Bindung anderer Liganden wie Glutamat, Ca^{2+} oder Peptiden Bindungstellen sowohl am N-Terminus als auch an den extrazellulären Schleifen involviert sind (Ji, 1998; Kobilka, 2007).

Für Rhodopsin sind die Konformationsänderungen zwischen inaktivem und aktivem Funktionszustand mit verschiedenen Methoden untersucht worden. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass es im Rahmen der Rezeptor-Aktivierung zu einer Rotation der Transmembrandomänen kommt, was insbesondere eine Veränderung der Struktur an der intrazellulären Seite des Rezeptors verursacht (Sprang, 2011). Für das Rhodopsin System konnten Kristallstrukturen sowohl im aktiven wie auch im inaktiven Funktionszustand erhalten werden. Im inaktiven Funktionszustand bestehen demnach zwischen dem Aminosäuremotiv D(E)RY am intrazellulären Ende der TM3 - welches bei etwa 70% der GPCRs der Klasse 1 konserviert ist - und einem Glutamat der TM6 polare Interaktionen („ionic lock“; Weis, 2008). Im aktiven Funktionszustand wird das „ionic lock“ „geöffnet“, da TM3 und TM6 weiter voneinander entfernt stehen. Dies öffnet - analog einem Schloss - am Opsin (die aktivierte Form des Rhodopsin) eine Bindungsstelle für den C-Terminus von $G\alpha$ (Scheerer, 2008). Für die Kristallisierung aktivierter adrenerger β_2 -Rezeptoren ist es gelungen, eine Stabilisierung des aktiven Funktionszustandes durch Antikörper zu erreichen (Rasmussen, 2011). Im Gegensatz zu Rhodopsin scheint hier die Rezeptoraktivierung durch eine Rotation von TM5 und TM6 vermittelt zu werden, wie in Abbildung 1.2.3.

illustriert. Letzendlich führen diese Rotationen wiederum zur Öffnung einer Bindungsstelle für $G\alpha$. Es sei angemerkt, dass nicht in allen Kristallstudien von GPCR ein „ionic lock“ trotz D(E)RY-Motiv gefunden werden konnte. Aufgrund der Eingriffe in die Aminosäuresequenz bzw. der verwendeten Kristallisationsmethodik kann dieser Befund allerdings ein technisch bedingter Artefakt sein (Rosenbaum, 2009). Wie bereits impliziert, muss ein D(E)RY-Motiv nicht zwangsläufig bestehen, damit ein GPCR G-Proteine aktivieren kann.

Seitansicht

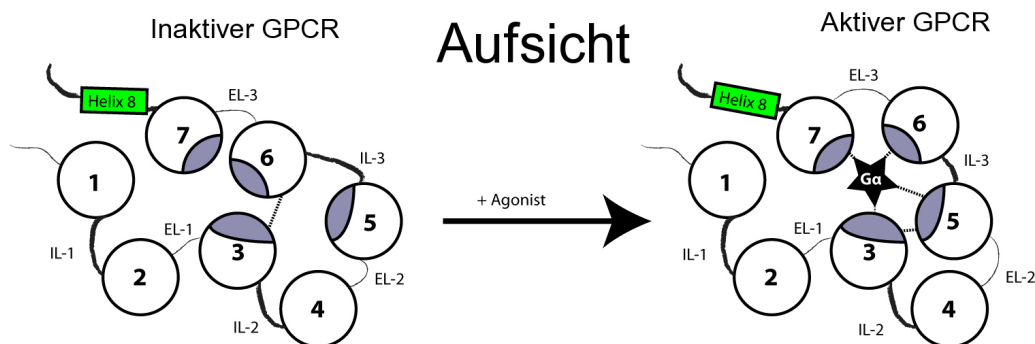
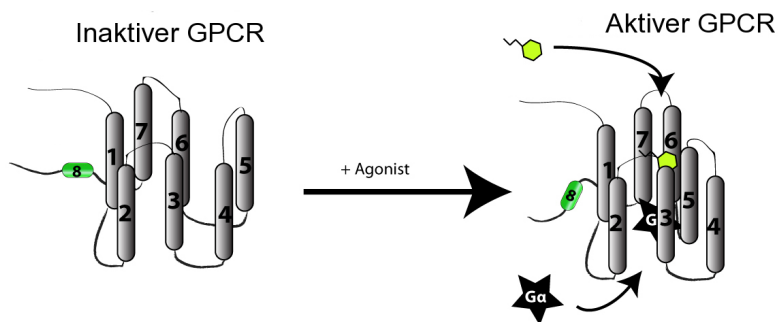


Abbildung 1.2.3: Schematische Illustration des Aktivierungsmechanismus G-Protein gekoppelter Rezeptoren

In der Abbildung ist die Seitansicht oben und die Aufsicht unten, wie ebenfalls in Englisch angegeben. Die Zylinder bzw. Kreise stellen die Transmembrandomänen des GPCR. In Grau sind die Bindungsstellen von $G\alpha$ an den Transmembrandomänen illustriert. Bei Agonistbindung kommt es zu einer Änderung der räumlichen Anordnung der Transmembrandomänen, insbesondere der TM5 und TM6. In der Folge entsteht eine Bindungstasche für $G\alpha$ an TM3, TM5, TM6 und TM7. EL steht für „extracellular loop“; IL steht für „intracellular loop“. Entnommen und verändert unter den Bedingungen der GNU Free Documentation License.

Welche strukturellen Elemente des GPCR von zentraler Bedeutung für die Spezifität der G-Protein-Bindung sind, ist nach dem Stand der Forschung nicht allgemeingültig beantwortbar, da die intrazellulären Abschnitte verschiedener

GPCR, die den gleichen G-Protein Subtyp aktivieren können nur eine geringe Homologie aufweisen (Wess, 1997; Wess, 1998). Darüberhinaus wurde beschrieben, dass bei einigen GPCRs verschiedene Liganden am gleichen Rezeptor mehrere G-Protein Subtypen unterschiedlich effizient aktivieren können (Kenakin, 2003; Perez, 2005), was die Suche nach G-Protein bindungsspezifischen Abschnitten in der Aminosäuresequenz von GPCR erschwert.

Einige Forschungsergebnisse suggerieren, dass Rezeptoren nicht nur in Form monomerer Proteine auftreten, sondern untereinander Dimere bzw. Homo- oder auch Heterooligomere mit anderen GPCRs bilden können (Gather, 1998; Herberth, 1998). Für den GABA_B Rezeptor scheint eine Dimerisierung Voraussetzung für einen Transport vom endoplasmatischen Retikulum zur Zellmembran und für eine physiologische G-Protein Aktivierung zu sein (Galvez, 2001). Welche funktionellen Konsequenzen die quartäre Struktur von GPCRs hat, ist gegenwärtig nicht abschließend geklärt. Es wurde u.a. untersucht, wie sich Oligomere theoretisch verhalten könnten, abhängig davon, welche Affinitäten die beteiligten GPCRs zueinander aufweisen, welche Faktoren (z.B. Liganden, Bindung von G-Proteinen) diese Affinitäten beeinflussen bzw. umgekehrt wie Oligomere wiederum die Affinitäten von Liganden und G-Proteinen zum GPCR verändern (Woolf, 2004). Die Vielzahl der Möglichkeiten erlaubt gegenwärtig keine allgemeingültigen Rückschlüsse.

1.2.4. Rezeptor Desensitisierung und Aktivierung von nicht G-Protein-gekoppelten Signalwegen durch GPCRs

Neben der Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Signalwegen konnten weitere zelluläre Prozesse nach Aktivierung eines GPCRs durch einen Liganden identifiziert werden. Zum einen können diese Prozesse bewirken, dass bei kontinuierlichem Stimulus die Signalweiterleitung über G-Protein gekoppelte Signalwege abgeschwächt wird (Desensitisierung), oder dass nicht G-Protein gekoppelte Signalwege aktiviert werden können (Ferguson, 2001). Das Phänomen der Desensitisierung kann auf verschiedene Art und Weisen

aufgeteilt werden, wobei insbesondere der zeitliche Verlauf, die Spezifität für einen bestimmten Agonist, der Verlust der Rezeptorfunktion und die Reduktion der Rezeptorzahl berücksichtigt werden (Krupnick, 1998).

Für die Agonistspezifität der Desensibilisierung unterscheidet man zwei Möglichkeiten (Premont, 2005): (I) Der aktivierte GPCR und weitere GPCR werden unspezifisch - z.B. als Resultat der Signalweg Aktivierung durch eine PKA- oder PKC-abhängige Phosphorylierung - so modifiziert, dass sie nach Liganden-Bindung „ihren“ Signalweg nicht aktivieren können (heterologe Desensibilisierung). (II) Der aktivierte GPCR wird spezifisch erkannt und so modifiziert, dass er nach Liganden-Bindung nicht „seinen“ Signalweg aktivieren kann (homologe Desensibilisierung).

In der Vermittlung der homologen Desensibilisierung sind GPCR-Rezeptor Kinasen (kurz GRK) und Arrestin-Proteine von zentraler Bedeutung. GRKs können an aktivierten, Agonist-gebundenen GPCR Serin und Threonin Aminosäureresten phosphorylieren. Die Rekrutierung an den GPCR wird für GRK2 und GRK3 durch $G\beta\gamma$ und PIP_2 , im Fall von GRK4, GRK5 und GRK6 nur durch PIP_2 vermittelt (Pitcher, 1998; Bünemann, 1999). Im zweiten Schritt bindet an einen phosphorylierten GPCR ein Arrestin Protein, wodurch (I) sterisch verhindert wird, dass ein aktivierter GPCR G-Proteine binden und aktivieren kann, (II) der Rezeptor durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert werden kann. Darüberhinaus kann der Komplex aus aktiviertem GPCR, GRK und Arrestin G-Protein-unabhängige Signalwege aktivieren, wie z.B. den Signalweg der mitogen-activated-protein-kinase (MAPK) oder dem c-Src-Signalweg. Internalisierte Rezeptoren können degradiert oder an die Zellmembran zurück transportiert werden (Pippig, 1995). Für den Parathormon- und den TSH-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass internalisierte Rezeptoren weiterhin zelluläre Signalweiterleitung ausüben (Calebiro, 2009; Ferrandon, 2009). Die Internalisierung von GPCRs scheint eine wichtige Voraussetzung für die langfristige Verringerung der Anzahl der GPCR an der Zellmembran („receptor downregulation“) zu sein (Pierce, 2002).

Für die Proteine der GRK-Familie sind gegenwärtig 7 Subtypen beschrieben, die anhand von Sequenzhomologien in drei Familien eingeteilt werden:

(I) GRK1/GRK7, die nur im visuellen System vorkommen; (II) GRK2/GRK3, die durch die Pleckstring Homologie Domäne an die Membran nach Interaktion mit $G\beta\gamma$ und PIP_2 rekrutiert werden können; (III) GRK4/GRK5/GRK6, die durch Interaktion mit PIP_2 membrangebunden sind (Reiter, 2006). GRK2, GRK3, GRK5 und GRK6 werden ubiquitär exprimiert werden. Die funktionelle Rolle der verschiedenen GRKs hängt sowohl vom GPCR-Subtyp als auch vom Gewebe ab, weshalb eine Spezifität bzgl. der Interaktion mit verschiedenen GPCRs diskutiert wird (Pierce, 2002). Verschiedene interzelluläre Proteine können die Aktivität von GRKs regulieren, z.B. RKIP, Caveolin oder Calmodulin, bzw. können durch GRKs in ihrer Aktivität moduliert werden, z.B. Akt, PI3K oder Mek (Ribas, 2007).

In der Familie der Arrestin-Proteine sind gegenwärtig 4 Subtypen bekannt, wobei nur Arrestin-2 und Arrestin-3 (auch als β -Arrestin-1 und β -Arrestin-2 bezeichnet) ubiquitär exprimiert werden; Arrestin-1 und Arrestin-4 werden spezifisch im visuellen System exprimiert (Premont, 2007). Liganden scheinen an GPCRs eine unterschiedliche Effektivität für die G-Protein Aktivierung und die β -Arrestin Rekrutierung aufweisen zu können, was ein weiterer Hinweis für distinkte, ligandeninduzierte chemische Konformationen an GPCR ist (Violin, 2007).

Die physiologische Bedeutung der Desensibilisierung liegt nach gegenwärtigem Wissenstand insbesondere bei regulatorischen Prozessen im Rahmen der Embryogenese (Jaber, 1996), der Nozizeption (Bohn, 1999), der Thermoregulation (Gainetdinov, 1999), der Leukozyten Chemotaxis (Fong, 2002) und der „locomotory activity“ (Gainetdinov, 2003). Pathophysiologisch sind gegenwärtig insbesondere eine Bedeutung in kardiovaskulären und neuropsychiatrischen Erkrankungen in Diskussion, wobei die Befunde noch nicht abschließend sind (Gainetdinov, 2004; Premont, 2007). Ligandenspezifische Konformationen und daraus resultierende, unabhängige Aktivierung bzw. Hemmung von G-Protein- und von Arrestin-vermittelten Signalwegen wird gegenwärtig als ein wichtiger Mechanismus der Wirkung von Pharmaka diskutiert, insbesondere von Antagonisten an adrenergen β_1 -

Rezeptoren in der Herzinsuffizienz und von Antagonisten am Dopamin D₂-Rezeptor als Antipsychotika (Marci, 2008; Houslay, 2009).

1.3. G-Proteine

1.3.1. Allgemeine Einführung in G-Proteine

Die Aktivierung des Rezeptors nach Bindung eines Liganden ist der erste Schritt einer Signalkaskade. Im Fall von ligandengesteuerten Ionenkanälen wird hierdurch bereits der Effektor aktiviert, was über eine Änderung des Membranpotentials ein zelluläres Signal erzeugt, wie z.B. bei GABA_A-Rezeptoren. Bei G-Protein gekoppelten Signalwegen erfolgt die Signalweiterleitung von Rezeptor zu Effektor über ein vermittelndes Protein, welches vom inaktiven in den aktiven Funktionszustand überführt werden kann (Switch-Protein). Der Funktionszustand wird über die Bindung von Guanin-Nukleotiden an die G α -Untereinheit bestimmt: im aktiven Funktionszustand ist GTP, im inaktiven Funktionszustand GDP gebunden (Oldham, 2008).

Dies hat mehrere Konsequenzen:

- 1.) Ein Signal kann „verstärkt“ werden, in dem bei Aktivierung einer geringen Fraktion der Rezeptoren bereits eine große Fraktion der G-Proteine aktiviert wird,
- 2.) ein Signal kann durch Aktivierung verschiedener Rezeptoren auf den gleichen zellulären Signalweg konvergieren,
- 3.) ein Signal kann auf mehrere Effektoren wirken.

G-Proteine sind Heterotrimere und bestehen aus drei Untereinheiten - G α , G β und G γ - wobei G β und G γ Untereinheiten unter physiologischen Bedingungen bisher nur als Dimer auftreten (Schmidt, 1992). Für jede der drei Untereinheiten gibt es eine Vielzahl kodierender Gene (16 für G α , 5 für G β und 12 für G γ), was eine Vielzahl an G-Protein Subtypen erlaubt (Downes, 1999), wobei für G $\beta\gamma$ -Dimere nicht alle theoretisch denkbaren Kombinationen von G β und G γ Subtypen physiologisch gefunden werden können (Clapham, 1997). Gleiche

Kombinationen von $G\beta\gamma$ können mit verschiedenen $G\alpha$ Subtypen ein Heterotrimer bilden (Graf, 1991). Für $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ -Dimer sind zahlreiche, verschiedene Effektoren beschrieben worden (Pierce, 2002).

Der Subtyp der $G\alpha$ -Untereinheit vermittelt insbesondere die physiologische Funktion des G-Proteins. Gemäß dieser zentralen Rolle werden G-Proteine anhand der $G\alpha$ Untereinheit in vier Gruppen eingeteilt: G_s , $G_{i/o}$, G_q , $G_{12/13}$ (Simon, 1991; Gilman, 1987). Die $G\alpha$ -Untereinheit bestimmt sowohl welche Rezeptoren das G-Protein aktivieren können, mit welchen Effektoren sowohl $G\alpha$ als auch $G\beta\gamma$ des aktivierten Trimers interagieren können und aufgrund der GTPase Funktion, wie lange das G-Protein in aktivem Funktionszustand vorliegt. Dies bedeutet nicht, dass der jeweilige $G\beta$ und $G\gamma$ Subtyp irrelevant ist: Die Kombination des jeweiligen Subtyps moduliert die Effizienz der rezeptorvermittelten Aktivierung des G-Proteins, wodurch eine Spezifität für verschiedene Rezeptoren erreicht werden kann (McIntire, 2009)

Aufgrund der zahlreichen Befunde kann im Rahmen der Einleitung nicht eine detaillierte Diskussion der verschiedenen G-Protein Subtypen und ihrer Effektoren erfolgen, es sei erlaubt hierzu auf Übersichtsarbeiten der Literatur zu verweisen (Wettschureck, 2004). In vorliegender Arbeit wurde $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ untersucht. $G\alpha_o$ wird vornehmlich in neuronalen und neuroendokrinen Geweben, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ werden ubiquitär exprimiert. Als Effektoren sind insbesondere eine Aktivierung von GIRK-Kanälen und eine Hemmung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen beschrieben (Wettschureck, 2005).

1.3.2. Strukturelle Aspekte von G-Proteinen

Posttranslational werden $G\alpha$ -Proteine - bis auf $G\alpha_t$ (das Transducin der Rhodopsin-Signalkaskade) - am N-Terminus palmitoyliert; $G\alpha_i$ wird zusätzlich myristoyliert, wodurch bis auf $G\alpha_t$ alle $G\alpha$ Untereinheiten membrangebundene Proteine sind (Smotrys, 2004). $G\gamma$ Untereinheiten werden posttranslational isoprenyliert, wodurch $G\beta\gamma$ - ebenso wie $G\alpha$ - ein membrangebundenes Protein wird, und was für die Interaktion mit einigen Effektoren (z.B. PLC) notwendig erscheint (Clapham, 1997).

Die $G\alpha$ -Untereinheit ist aus zwei Domänen aufgebaut: die helikale und die GTPase-Domäne. Die GTPase-Domäne ist unter den verschiedenen $G\alpha$ -Protein Subtypen stark konserviert und besitzt drei flexible Schleifen (Switch I, II und III genannt). Die Nukleotidbindetasche wird von diesen genannten Strukturen begrenzt (Johnston, 2007); Bindung von GTP erzeugt eine Konformationsänderung, insbesondere von Switch I, II und III (Lambright, 1994; Wall, 1998).

Die Interaktion von $G\beta\gamma$ mit $G\alpha$ wird nach gegenwärtigem Kenntnisstand von $G\alpha$ sowohl von der Switch-Region als auch vom N-Terminus mit der β -Propeller Struktur von $G\beta$ vermittelt. $G\gamma$ scheint nicht an dieser Interaktion beteiligt zu sein (Wall, 1995).

Die Interaktion von G-Proteinen mit GPCRs betrifft insbesondere Aminosäurereste des C-Terminus (vor allem die $\alpha 3$ - $\beta 5$ und $\alpha 4$ - $\beta 6$ Schleife) und N-Terminus von $G\alpha$, sowie des C-Terminus von $G\beta$ und des C-Terminus von $G\gamma$ (Oldham, 2008). Diese Bindungsstellen sind räumlich über einen Bereich verteilt, der größer ist, als es anhand der Kristallstruktur von GPCRs für die intrazelluläre Seite eines GPCR zu erwarten wäre. Dies wird entweder als Hinweis für eine Interaktion von G-Proteinen mit GPCR-Oligomeren (Milligan, 2004) oder als Hinweis für eine sequentielle Interaktion der G-Protein Untereinheiten mit einem GPCR interpretiert (Herrmann, 2004).

Die G-Protein/Effektor Interaktion scheint sowohl für $G\alpha$, wie auch für $G\beta\gamma$ maßgeblich von Strukturen vermittelt zu werden, die auch die Interaktion zwischen $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ vermitteln. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand betrifft dies an $G\alpha$ die Switch-Region (Lambert, 2008), an $G\beta$ Bereiche, die mit der Switch-Region von $G\alpha$ (Ford, 1998) und mit dem N-Terminus von $G\alpha$ interagieren (Lodowski, 2003). Diese Befunde lassen daher eine Dissoziation von $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ -Dimer vor einer Effektor Interaktion notwendig erscheinen.

Zusammengefasst sind verschiedene räumliche Strukturen des G-Proteins in die Rezeptor/G-Protein und G-Protein/Effektor Interaktion involviert. Konsequenterweise konnte experimentell gezeigt werden, dass modifiziertes $G\alpha_q$, in dessen C-Terminus Aminosäuren von $G\alpha_q$ nach $G\alpha_i$ ausgetauscht

wurden, nach Aktivierung Gi-gekoppelter Rezeptoren Gq-gekoppelte Effektoren aktivieren (Conklin, 1993).

1.3.3. G-Protein Zyklus

Physiologisch wird die Aktivierung von G-Proteinen in den meisten Fällen von aktivierten GPCRs vermittelt. G-Protein aktivierende Proteine, die den Austausch von GDP zu GTP katalysieren, werden im Allgemeinen als GEF (guanine nucleotide exchange factor) bezeichnet (Sato, 2006). Unabhängig von GPCRs können z.B. AGS-Proteine (activators of G-Protein signaling) GEF-Funktion ausüben. Alternativ können Proteine auch den Nukleotid Austausch behindern, wie z.B. Phosducin (Cismowski, 1999; Bauer, 1998).

Bilden inaktives, GDP-gebundenes G-Protein und aktiver GPCR einen Komplex, so wird die Bindungsaffinität der $G\alpha$ Untereinheit für GDP verringert (Brandt, 1986). Dadurch kann GDP aus der Bindung zum G-Protein diffundieren. Das nukleotidfreie G-Protein bildet mit dem aktiven GPCR einen Komplex der die GPCR/Agonist Interaktion stabilisiert und somit die Affinität des Rezeptors für den Agonist erhöht („ternary complex“; DeLean, 1980). Die Affinität für GDP und GTP zu $G\alpha_t$ in GPCR-gebundener Konformation wurden als gleich geschätzt (Heck, 2001). Da intrazellulär GTP in höherer Konzentration als GDP vorliegt, kann GTP mit höherer Wahrscheinlichkeit als GDP an eine nukleotidfreie $G\alpha$ -Untereinheit binden. Bei Bindung von GTP wird die Konformation des G-Proteins so verändert, dass sich die Affinität des G-Proteins zum GPCR reduziert (Gilman, 1987). In der Folge zerfällt der Komplex aus Rezeptor und G-Protein. Liegt das G-Protein nicht im Komplex mit dem Rezeptor vor, ist GTP - aber auch GDP - mit hoher Affinität an der $G\alpha$ -Untereinheit gebunden (Gilman, 1987; Ferguson, 1986).

Der aktive Funktionszustand des G-Proteins wird durch die Hydrolyse von GTP in GDP durch die GTPase Domäne der $G\alpha$ -Untereinheit beendet. Die Rate der GTPase wird maßgeblich durch Proteine der RGS-Familie bestimmt (Hollinger, 2002). Diese binden an Bereiche der Switch-Region (Tesmer, 1997) und

stabilisieren katalysatorisch einen intermediären Zustand der GTP-Hydrolyse energetisch (Ross, 2000).

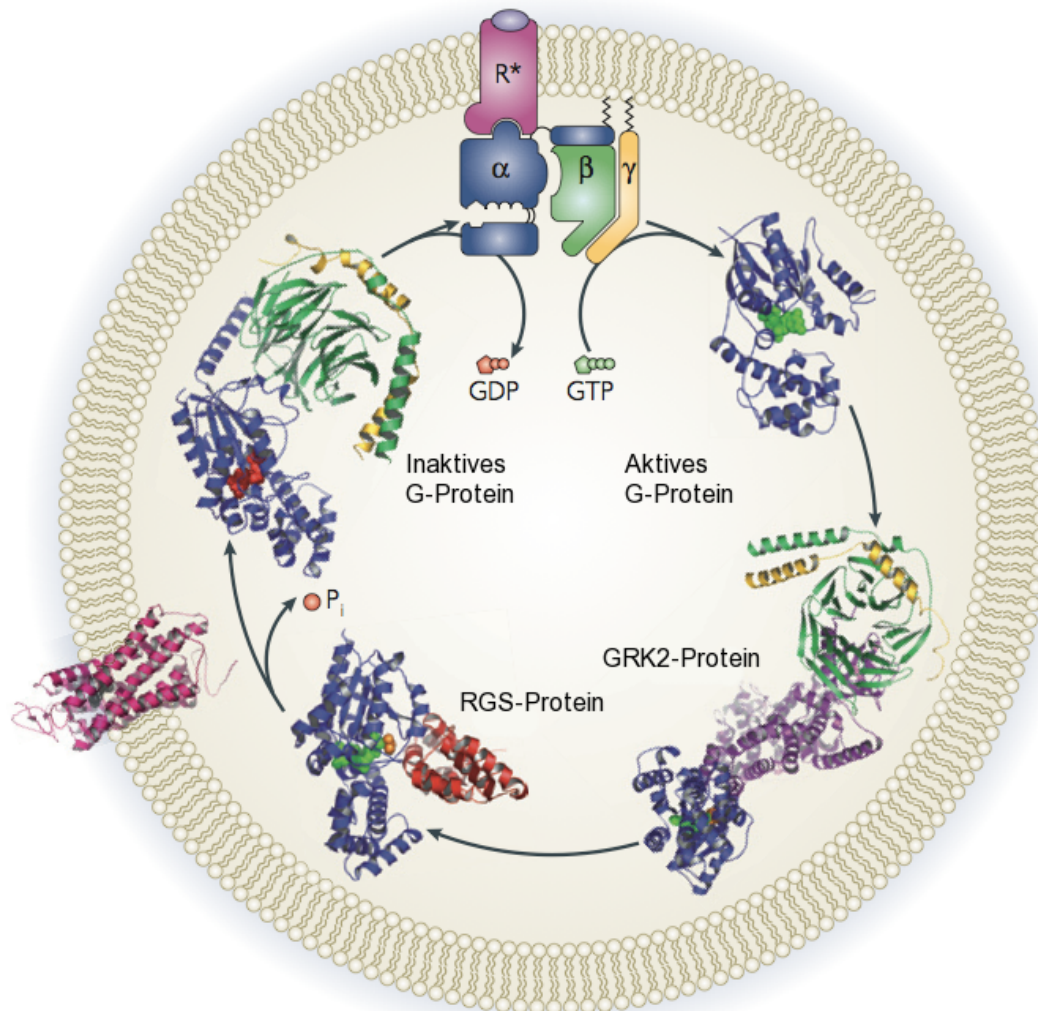


Abbildung 1.3.3: Illustration des G-Protein Zyklus

G_α ist in Blau, G_β in Grün und G_γ in Gelb als Schema und in der Kristallstruktur für G_{α_t} , G_{β_1} und G_{γ_1} dargestellt. Als GPCR ist Rhodopsin in Lila als Kristallstruktur und Schema dargestellt, R^* bezeichnet den aktiven Rezeptor. Als Effektor-Protein ist GRK2 im Komplex mit $G_{\alpha_q}\beta_1\gamma_2$, RGS9 als Kristallstruktur in Rot dargestellt. Modifiziert nach Oldham, 2008.

Für die Aktivierung von G-Protein gekoppelten einwärtsgerichteten Kalium-Kanälen (GIRK-Kanälen) ist ein paradoxes Phänomen unter heterologer Koexpression von RGS-Proteinen beschrieben: Bei Koexpression von RGS1, RGS3, RGS4 und RGS8, aber nicht für RGS2 weist die GIRK-Kanal Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik nach GPCR-Aktivierung eine deutliche

Beschleunigung auf und ähnelt daher dem zeitlichen Verlauf in physiologischen Geweben (Doupnik, 1997; Saitoh, 1997).

1.3.4. G-Protein Untereinheiten Dissoziation

Die ersten Hinweise auf eine Dissoziation von G-Protein Untereinheiten stammen von biochemischen Untersuchungen zur Bindung von GTP γ S an aufgereinigte G-Protein Untereinheiten. Hierbei wurde eine negative Kooperativität in der Bindung an G α zwischen GTP γ S und G $\beta\gamma$ gefunden. Mg²⁺-Ionen stabilisieren die Bindung von GTP γ S an G α ; in Gegenwart supraphysiologischer Mg²⁺ Konzentrationen (größer 1 mM) dissoziieren G α und G $\beta\gamma$ in Gegenwart von GTP γ S unabhängig vom Subtyp (Gilman, 1987).

Physiologisch sind zahlreiche verschiedene Effektoren für G α und G $\beta\gamma$ -Dimere beschrieben worden, was eine G-Protein Untereinheiten Dissoziation vor einer Effektor Interaktion plausibel erscheinen lassen würde. Die Befunde von Kristallisationsstudien ergaben, dass sich die Bindestellen, die in der Untereinheiten- und in der Effektorprotein Interaktion involviert sind weitgehend überlappen, mit Ausnahme der G α - α N Helix, die nur an der Untereinheiten Interaktion beteiligt ist (Lambert, 2008). Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, dass G α mit Effektoren in heterotrimerer G-Protein Konformation interagieren kann, G $\beta\gamma$ /Effektor Interaktionen aber erst nach Dissoziation der Untereinheiten stattfindet. Analog können Fusionsproteine aus G α und G β in *Saccharomyces cerevisiae* eine physiologische Signalweiterleitung wie G $\beta\gamma$ ausüben (Klein, 2000). Untersuchung von G α_q -Mutationen, die die Interaktion von G α_q mit G $\beta\gamma$ unterbinden, legen nahe, dass die Effektor Interaktion mit PLC β 1 in heterotrimerer Konformation des G-Proteins erfolgt (Evanko, 2005). Weitere Untersuchungen wurden mittels Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) basierter Methoden durchgeführt. Eine Dissoziation des G-Protein Trimers sollte zu einer Abnahme des FRET zwischen Fluoreszenz markierten G α -Untereinheiten und G $\beta\gamma$ -Dimeren führen. In *Dictyostelium discoideum* (Janetopoulos, 2001) wurde so eine Abnahme ebenso wie für G α_o (Bünemann,

2003) in HEK293-Zellen gefunden; allerdings wurde für $G\alpha_i$ und $G\alpha_z$ in HEK293-Zellen eine Zunahme des FRET gefunden (Frank, 2005). Mittels FRAP-basierter Methodik (Fluoreszenz Recovery After Photobleaching) wurde für $G\alpha_o$ und $G\alpha_{i3}$ nach Aktivierung eine Dissoziation gefunden, während $G\alpha_s$ als vorwiegend aktiviertes Heterotrimer identifiziert wurde (Digby, 2006).

Somit erscheint es gegenwärtig nicht möglich die Frage bzgl. einer G-Protein Untereinheiten Dissoziation nach rezeptorvermittelter Aktivierung verallgemeinernd beantworten zu können. Übereinstimmend mit den erwähnten Befunden für FRET und FRAP Experimente wäre die Vorstellung, das aktivierte G-Proteine überwiegend in heterotrimerer Konformation vorliegen, bis es zur Effektor Interaktion kommt. Sowohl aktive, als auch inaktive G-Proteine könnten in einem Gleichgewicht zwischen Trimer und dissoziierten Untereinheiten vorliegen, wobei die Lage des Gleichgewichts in beiden Fällen vom G-Protein Subtyp abhängen kann und durch Effektor oder Rezeptorinteraktion moduliert wird.

1.3.5. Interaktion zwischen Rezeptoren und G-Proteinen

Wie bereits erwähnt bilden Agonist-gebundene, aktivierte GPCR und nukleotidfreie G-Proteine einen Komplex, in dem der GPCR eine hohe Affinität für den Liganden aufweist (De Lean, 1980). Weitere Untersuchungen ergaben, dass auch im Komplex aus $G\beta\gamma$ und ligandengebundenem GPCR der GPCR eine hohe Affinität für den Liganden aufweist (Onaran, 1993; Wu, 1998). Aktuelle strukturbiochemische Untersuchungen weisen darauf hin, dass in diesem Komplex der Agonist analog zu Opsin am Verlassen der Bindungsstelle gehindert wird (Rasmussen, 2011). Aus dem Komplex heraus wird die G-Protein Aktivierung durch Bindung von GTP katalysiert.

Die strukturellen Mechanismen der Aktivierung von G-Proteinen durch aktivierte GPCRs sind gegenwärtig nicht abschließend geklärt. Es gibt zwei konkurrierende Modelle, wie der Rezeptor die Konformation des $GDP-G\alpha\beta\gamma$ Trimers beeinflussen könnte, um den Nukleotidaustausch zu vermitteln. Beide Modelle sind mit experimentellen Daten bisher nur unzureichend überprüft, um

eine der beiden Hypothesen zu bevorzugen. Das erste Modell geht von einer rezeptorinduzierten Hebel-Wirkung von $G\beta\gamma$ entweder auf die helikale oder auf die GTPase-Domäne von $G\alpha$ aus, das zweite Modell baut auf einer rezeptorinduzierten Rotation von $G\beta\gamma$ auf (Oldham, 2008). Beide Mechanismen modifizieren die räumlichen Strukturen an der Nukleotid Bindestelle und erlauben eine Diffusion von GDP aus der Bindung. Auch wenn nach gegenwärtigem Kenntnisstand die meisten GPCRs eine G-Protein Klasse bevorzugt aktivieren, so ist diese Interaktion per se nicht nur auf eine Klasse von G-Proteinen eingeschränkt. So wurde u.a. für den adrenergen β_2 -Rezeptor im humanen Herz beschrieben, dass sowohl G_s - als auch G_i -Proteine aktiviert werden können (Xiao, 2001; Kilts, 2000). Physiologisch erlaubt dies eine Auslösung ganz verschiedenartiger zellulärer Prozesse: so könnten im Fall des adrenergen β_2 -Rezeptors eine Kompartimentalisierung des G_s -Signals erreicht werden und zeitgleich antiapoptotische und antihypertrophe Effekte vermittelt werden.

Kontrovers wird die physiologische Interpretation des hochaffinen Funktionszustandes des Rezeptors diskutiert (Roberts, 2004): Soll die Selektivität für einen Liganden erhöht werden oder soll der Nukleotidaustausch effizienter gestaltet werden (und nicht durch eine Ligandeabdiffusion vorzeitig unterbrochen werden)? Aus dieser Frage leitet sich ab, ob inaktive G-Proteine als Komplex mit nicht ligandengebundenen, inaktiven GPCR vorliegen können (Präkoppelung). Dies ist gegenwärtig nicht eindeutig beantwortet die Daten sind bereits für einen untersuchten GPCR (z.B. den α_{2A} -AR), abhängig von der Methodik, widersprüchlich, was sich meist aus der Problematik der experimentellen Kontrollbedingungen für eine spezifische Interaktion ergibt (Hein, 2009). Aus physiologischer Sicht erscheint eine Präkoppelung günstig, da sich so eine Lokalisierung des G-Protein Signals vom GPCR ausgehend einfach etablieren würde. Problematisch wird die Erklärung einer Signalverstärkung zwischen Rezeptor und G-Protein, wenn eine Präkoppelung vorliegt: in diesem Fall müssen nach Aktivierung der prägekoppelten G-Proteine frei diffundierende G-Proteine aktiviert werden während die zuvor aktivierten G-Proteine noch aktiv sind, was im Gegenzug die gewonnene

Signallokalisierung aufhebt. Als Affinität inaktiver GPCR für inaktive G-Proteine wurde für den delta-Opioid Rezeptor und $G\alpha_i$ mittels Plasmon-Resonanz ein K_d von 20 nM bestimmt (Alves, 2003). Experimentelle Untersuchungen mittels FRET am α_{2A} -AR können sowohl eine Präkoppelung (Gales, 2006) als auch keine Präkoppelung finden (Hein, 2005). Untersuchungen mittels FRAP am gleichen Rezeptor System legen nahe, dass eine Fraktion der inaktiven G-Proteine mit inaktiven Rezeptoren transient interagiert (Qin, 2008), was aus chemischer Sicht plausibel wäre, berücksichtigt man die Bindeenergien bei denen sich Proteininteraktionen und Proteinkonformationsänderungen abspielen. Untersuchungen für weitere Rezeptor/G-Protein Kombinationen konnten eine Interaktion zwischen inaktivem Rezeptor und inaktivem G-Protein finden: Mittels Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET) für adrenerge β_2 -Rezeptoren und Gs (Gales 2005), Vasopressin V2-Rezeptoren und Gs, SNSR₄-Rezeptoren und sowohl Gi als auch Gq, TA_{2A}-Rezeptoren und Gs, Gi, Gq sowie G13 (Gales, 2005), CGRP-Rezeptoren und Gi (Gales, 2006) sowie Bradykinin B2-Rezeptoren und Gq (Philip, 2007) bzw. mittels FRET zwischen Dopamin D₂-, muscarinergen M₄- und Adenosin A₁-Rezeptoren und Go sowie Prostacyclin IP-Rezeptoren und Gs (Nobles, 2005). Unabhängig hiervon konnte für verschiedene Rezeptorsystemen (u.a. μ -Opioid Rezeptor, Histamin H₂- Cannbinoid CB₁-Rezeptor) gezeigt werden, dass inaktive G-Proteine an GPCR, die Antagonisten oder inverse Agonisten gebundenen haben, sequestriert werden können (Kenakin, 2004).

Untersuchungen am Phototransduktionssystem legen nahe, dass eine Fraktion von $G\alpha_t$ mit Rhodopsin (dem inaktiven „Lichtrezeptor“, der allerdings einen inversen Agonisten gebunde hat) vorgekoppelt ist, was unter reaktionkinetischen Gesichtspunkten plausibel erscheint (Liebman, 1984). Die Affinitäten für Rhodopsin und $G\alpha_t$ wurden auf einen K_d von 64 nM, für Metarhodopsin III auf einen K_d von 1 nM geschätzt (Alves, 2005).

$G\alpha_{i/o}$ kann durch das Toxin von Bordetella Pertussis, $G\alpha_s$ durch das Toxin von *Vibrio Cholerae* ADP-ribosyliert werden, wodurch im Falle von $G\alpha_{i/o}$ die Rezeptor G-Protein Interaktion behindert wird und das G-Protein inaktiviert wird

bzw. im Falle von $G\alpha_s$ die GTPase-Funktion unterbunden wird und das G-Protein irreversibel aktiviert wird (Gilman, 1987).

1.3.6. Interaktion von G-Proteinen mit Effektoren

Die Untersuchung zur G-Protein/Effektor Interaktion sind gegenwärtig nicht mit einem eindeutigen Ergebnis abgeschlossen. Vom physiologischen Gesichtspunkt aus betrachtet wäre eine stabile Effektor/G-Protein Interaktion vor der G-Protein Aktivierung für eine Lokalisation des Rezeptorsignals zum Effektor hilfreich. Eine Studie zur Interaktion mit GIRK-Kanälen aus Kir3.1 Monomeren und der Adenylatcyclase mittels BRET kamen zu dem Ergebnis, dass heterotrimere G-Proteine und Effektoren unabhängig von der Aktivierung des G-Proteins einen stabilen Komplex bilden (Rebois, 2006). Alternative Untersuchungen an GIRK-Kanälen mittels FRET und Totaler Internaler Reflexions Fluoreszenzmikroskopie (TIRF) ergaben den gleichen Rückschluss (Riven, 2006). Zu beiden Studien sei angemerkt, dass diese in heterologen Expressionssystemen durchgeführt wurden. In Neuronen konnte eine Aktivierung von GIRK-Kanälen durch immobilisierte μ -opioid Rezeptoren mit der gleichen Kinetik wie ohne Immobilisierung gezeigt werden, was bedeutet, dass die Diffusion von GPCRs in der Aktivierungskinetik nicht der zeitlich limitierende Faktor ist (Lober, 2006). Indirekt konnte gezeigt werden, dass aufgrund der verwendeten Methode unter diesen Bedingungen, genauso wie unter heterologen Bedingungen, GIRK Kanäle immobilisiert sind, was gegen stabile Effektor/G-Protein Komplexe spricht.

Neben einer stabilen Interaktion von G-Proteinen und Effektoren könnte sich eine räumliche Lokalisierung des G-Protein Signals auch über „Signalkomplexe“ ergeben, in denen die Proteine der Signalkaskade miteinander verbunden sind. Bekannt ist, dass scaffold-Proteine wie z.B. das A-kinase anchoring protein 250 (AKAP-250), welches neben adrenergen β_2 -Rezeptoren und β -Arrestin zahlreiche weitere Proteine der Signalkaskade, z.B. Proteinkinasen (wie PKA, PKC, GRK2, src) oder Proteinphosphatasen (wie

PP2A) binden kann, wodurch sich eine räumliche Lokalisation des Signals ergibt (Malbon, 2005).

1.4. Resonanz Energie Transfer

1.4.1. Lumineszenz, Phosphoreszenz, Fluoreszenz

Unter Lumineszenz versteht man eine strahlende Desaktivierung (Abgabe überschüssiger Energie) von Materie in Form von sichtbarem Licht, die durch den Übergang von Elektronen aus einem angeregten Energieniveau in den Grundzustand entsteht. Wurden das Elektronensystem durch Photonen angeregt, spricht man von Photolumineszenz; trat die Anregung im Rahmen einer chemischen Reaktion auf, so spricht man von Chemolumineszenz. Chemolumineszenz in biologischen Organismen wird als Biolumineszenz bezeichnet.

Anhand des zeitlichen Verlaufs der Lichtemission nach Beendigung der Photonenbestrahlung wird die Photolumineszenz in die bis zu Stunden nach Beendigung der Bestrahlung andauernde Phosphoreszenz und die nur wenige Nanosekunden anhaltende Fluoreszenz unterteilt. Diesen beiden Phänomenen liegen verschiedene quantenmechanische Ursachen zu Grunde, deren Prinzipien im Rahmen der Arbeit mit einem sehr vereinfachten Modell erklärt werden. Fluoreszenz entsteht durch Übergänge zwischen Elektronenzuständen gleichen Spins. Diese Übergänge gehorchen der Auswahlregel und können mit hoher Wahrscheinlichkeit, d.h. sehr schnell ablaufen. Bei Phosphoreszenz kommt es hingegen nicht nur zur Anregung, sondern auch zu einer Spinänderung des Elektrons (Interkombination genannt), wodurch es bis zu einer weiteren Interkombination im angeregten Zustand „gefangen“ ist. Eine Interkombination ist ein statistisch seltener Prozess, woraus sich erklärt, dass Phosphoreszenz über sehr lange Zeiträume abläuft und Licht schwacher Intensität erzeugt.

Der Begriff Phosphoreszenz rührt fälschlicherweise von dem Leuchten des Elementes Phosphor her, welcher nicht durch Photonenanregung sondern durch Reaktion mit dem Luftsauerstoff bedingt ist (was eine Chemolumineszenz ist). Der Begriff Fluoreszenz leitet sich von dem fluoreszierenden Mineral Fluorit (Flussspat, CaF_2) ab.

Die Energieniveaus in einem Molekül werden von der räumlichen Anordnung der Atomkerne zueinander beeinflusst. Da ein Molekül nicht eine starre, sondern eine „schwingende“ Anordnung von Atomen darstellt, gibt es mehrere, eng benachbarte Energieniveaus, die mit unterschiedlich hoher Wahrscheinlichkeit eingenommen werden können. Ein angeregtes Elektron kann in ein niedrigeres angeregtes Energieniveau fallen, indem es einen Teil seiner Energie abgibt (Schwingungsrelaxation). Zusammengenommen ergibt sich, dass die Anregung eines Elektrons nicht nur mit Photonen einer bestimmten Wellenlänge sondern mit Photonen aus einem Spektrum verschiedener Wellenlängen möglich ist, wobei bestimmte Wellenlängen aufgrund der erwähnten statistischen Prozesse mit höherer Wahrscheinlichkeit eine Anregung verursachen können. Umgekehrt ergibt sich hieraus, unter Berücksichtigung des Energieerhaltes, dass die emittierten Photonen eine längere Wellenlänge haben als die Anregungsphotonen (auch Stokes-Shift genannt), und dass das Spektrum der emittierten Photonen ebenfalls eine Wahrscheinlichkeitsverteilung für verschiedene Wellenlängen zeigt, die analog der Anregung für das jeweilige Molekül charakteristisch ist. Unter Quanteneffizienz (auch Quantenausbeute genannt) versteht man das Verhältnis zwischen emittierten und absorbierten Photonen.

1.4.2. Physikalische Grundlagen des Förster Resonanz Energie Transfer

Die Vorstellung des Förster Resonanz Energie Transfer erfolgt analog nach Lakowicz (Lakowicz, 2004). Unter Förster Resonanz Energie Transfer (Kurzform FRET) versteht man das Phänomen, dass Energie eines angeregten Elektronensystems eines Fluorophors (Donor) auf ein benachbartes Molekül (Akzeptor) abgegeben wird, ohne dass dazu ein Photon vom Donor emittiert

wird. Es handelt sich hierbei um eine Dipol-Dipol Wechselwirkung zwischen den beiden Elektronensystemen. Die Ratenkonstante des FRET kann in Abhängigkeit der Distanz zwischen Donor- und Akzeptorelektronensystem wie folgt berechnet werden:

$$k_T(r) = \frac{\kappa^2 Q_D}{\tau_D r^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda} \quad (1.1.) \text{ Ratengleichung des FRET}$$

$k_T(r)$	Transferrate des FRET in Abhängigkeit der Distanz zwischen Donor und Akzeptor
κ	Orientierungsfaktor zwischen Donor- und Akzeptor-Dipol
Q_D	Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
τ_D	Lebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
r	Distanz zwischen Donor und Akzeptor
N	Avogadrokonstante
n	Refraktiver Index des Mediums
$F_D(\lambda)$	Donoremissionsintensität als Funktion der Wellenlänge
$\varepsilon_A(\lambda)$	Akzeptorresorption als Funktion der Wellenlänge
λ	Wellenlänge

Die relative Überlappung zwischen Donor-Emissionsspektrum und Akzeptor-Resorptionsspektrum, normalisiert auf das gesamte Donor-Emissionsspektrum, wird auch als spektraler Überlappungskoeffizient J zusammengefasst. Überlappen sich diese Spektren nicht, wird $J=0$ und ein Resonanz Energie Transfer ist nicht mehr möglich.

$$J = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda} \quad (1.2.) \text{ Definition des Überlappungskoeffizient } J$$

Der Orientierungsfaktor berechnet sich zu:

$$\kappa = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D \cos\theta_A) \quad (1.3.) \text{ Definition des Orientierungsfaktor } \kappa$$

θ_T	Winkel zwischen Vektor des Donor- und des Akzeptor-Dipols
θ_D	Winkel zwischen Donor-Dipol-Vektor und des Vektors der Summe aus Donor-Dipol-Vektor und Akzeptor-Dipol-Vektor
θ_A	Winkel zwischen Akzeptor-Dipol-Vektor und des Vektors der Summe aus Donor-Dipol-Vektor und Akzeptor-Dipol-Vektor

Der Vereinfachung wegen wird der Förster-Radius R_0 eingeführt, was der Donor-Akzeptor-Distanz r entspricht, bei der die Transferrate des FRET der Lebenszeit des Donors entspricht. Der Förster-Radius ist keine Konstante sondern hängt demnach vom Donor-Akzeptor Paar ab:

$$R_0^6 = \kappa^2 Q_D \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) J(\lambda) \quad (1.4.) \text{ Definition des Förster-Radius } R_0$$

R_0 Förster-Radius; Distanz zwischen Donor und Akzeptor, bei der $k_T(r) = \tau_D$ gilt

Die Ratengleichung des FRET lässt sich daher Vereinfacht schreiben:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (1.5.) \text{ Vereinfachte Ratengleichung des FRET}$$

Aus Gleichung 1.5. ist ersichtlich, dass die Distanz zwischen Donor und Akzeptor einen maßgeblichen Einfluss auf den Resonanz Energie Transfer ausübt. Daher eignen sich Resonanz Energie Transfer Experimente aus biologischer Sicht insbesondere für Fragestellungen, bei denen Proteinassoziationen oder Konformationsänderungen untersucht werden sollen. Die Effizienz des Resonanz Energie Transfers ist definiert als der relative Anteil der Energie der Donoremission, die vom Akzeptor aufgenommen wird.

$$E = \frac{k_T}{k_T + \frac{1}{\tau_D}} \quad (1.6.) \text{ FRET-Effizienz als Funktion von } k_T$$

E FRET-Effizienz

Einsetzen von Gleichung 1.5. erlaubt die Schreibweise der Effizienz des Resonanz Energie Transfers als Funktion der Donor-Akzeptor-Distanz und des Förster-Radius. Hieraus ist ableitbar, dass bei einer Donor-Akzeptor-Distanz, die dem Förster-Radius entspricht die FRET-Effizienz 0,5 beträgt:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (1.6.) \text{ FRET-Effizienz als Funktion von } r$$

Die Effizienz des Resonanz Energie Transfers lässt sich über das Verhältnis der Emissionsintensität des Donors in Abwesenheit und in Anwesenheit des Akzeptors bestimmen:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (1.7.) \text{ FRET-Effizienz}$$

F_{DA} Intensität der Donor-Emission in Anwesenheit des Akzeptors
 F_D Intensität der Donor-Emission in Abwesenheit des Akzeptors

Die Emissionsintensität des Donors ist direkt proportional zur Lebenszeit des Donors. Daher lässt sich die Effizienz des Resonanz Energie Transfers auch über die Lebenszeit des Donors in Abwesenheit und in Anwesenheit des Akzeptors bestimmen:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (1.8.) \text{ Alt. Darstellung der FRET-Effizienz}$$

τ_{DA} Lebenszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
 τ_D Lebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

1.4.3. Bedeutung des FRET als Methodik in der Biologie

Ein methodisch wichtiges Problem von Experimentalwissenschaften ist es, untersuchte Prozesse detektierbar und quantifizierbar zu machen. Die Entwicklung des Mikroskops (und später des Elektronenmikroskops), sowie diese Methoden der Biochemie und der Elektrophysiologie waren daher für die Biologie methodische Meilensteine. Somit hat sich die Zellbiologie von einer rein deskriptiven morphologischen Beschreibung hin zu einer funktionellen Analyse einzelner Moleküle als Folge einer gezielten Veränderung der Versuchsbedingungen gewandelt. Insbesondere die *in vivo* Analyse profitiert von der Anwendung fluoreszenzbasierter Methoden und umfasst Fragestellungen verschiedener Bereiche, die sich mit der Lokalisation von

Proteinen oder Molekülen, der Expression von Proteinen, Aspekten des DNA-Stoffwechsels, dem Membranpotential, der Konzentration von Molekülen oder Ionen im Zytosol und mit der Assoziation bzw. Konformationsänderungen von Proteinen beschäftigen (Tsien, 1989). Fluoreszenz in Proteinen basiert typischerweise auf der Fluoreszenz aromatischer Aminosäuren: Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin (Lakowicz, 2004). Es lassen sich zwei Arten von Fluorophoren unterscheiden: (I) intrinsische Fluorophore, die auf fluoreszierenden Eigenschaften von physiologisch vorkommenden Proteinen oder Molekülen basieren, wie z.B. von $G\alpha$ (Gilman, 1987); (II) extrinsische Fluorophore, die artifiziell in ein biologisches System (der Fragestellung gemäß) eingefügt werden müssen, wobei eine Vielzahl an Fluorophoren beschrieben sind, die von kleinen organischen Molekülen bis hin zu genetisch kodierten Proteinen reicht.

Für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse sind gentechnisch erzeugte Mutanten des „green fluorescent protein“ (GFP) von *Aequorea victoria* (Shimomura, 1962). GFP zeichnet sich durch die Eigenschaft aus, dass sich in seinem Inneren bei physiologischer Proteinfaltung spontan ein Fluoreszenztrum aus der Tripeptidsequenz Serin-Tyrosin-Glycin bildet. Durch gentechnische Mutation der Aminosäuresequenz lassen sich Mutanten des GFP erzeugen, die verschiedene Emissions- und Exzitationsspektren über das Spektrums des sichtbaren Lichts hinausgehend aufweisen (Shaner, 2005), so z.B. das Cyan Fluoreszierende Protein (CFP) und das Gelb Fluoreszierende Protein (YFP), ein typisches Paar für FRET-Donor (CFP) und FRET-Akzeptor (YFP), da sie eine ausreichende Überlappung von Donor-Emissions und Akzeptor-Exzitations Spektrum aufweisen und mit denen die ersten Bestimmungen zur G-Protein Aktivierung in lebenden Zellen durchgeführt wurden (Janetopoulos, 2001). GFP-Mutanten und GFP-ähnliche Proteine anderer Organismen (z.B. von Anthozoa Korallen) bilden physiologisch zumeist Oligomere (typischerweise Tetramere), weswegen für eine sinnvolle molekularbiologische Applikation diese Eigenschaft per Mutation so reduziert werden muss, dass diese Proteine nur noch eine sehr geringe Affinität zueinander aufweisen (Verkusha, 2004).

Als Besonderheit sind Mutanten von GFP-ähnlichen Proteinen erzeugt worden, die durch Photonenbestrahlung in ihren Absorptions- und Exzitationseigenschaften verändert werden können, in dem z.B. mittels UV-Absorption die Struktur der Wasserstoffbrückenbindungen im Fluoreszenzzentrum in eine zuvor energetisch ungünstigere Konformation gebracht wird; man spricht von photoaktivierbaren, fluoreszierenden Proteinen (Lukyanov, 2005). Ebenso ist es möglich, dass zwei GFP-Mutanten, die alleine jeweils eine unvollständige Aminosäurekette besitzen, aber zusammen eine vollständige Aminosäurekette, bei Koexpression eine funktionelle GFP-Variante ergeben („fluorescence complementation“). Dies ist insbesondere für die Markierung von Proteinen, die physiologisch als Dimer auftreten wie z.B. G $\beta\gamma$ von Interesse (Hynes, 2004)

Somit können Fusionsproteine aus GFP oder deren Mutanten und einem zu markierenden Protein mittels etablierter molekularbiologischer Methoden erstellt werden, in dem man beide cDNA-Teilstücke über eine cDNA Sequenz für einen Aminosäurelinker miteinander fusioniert.

1.5. Computergestützte Analysen G-Protein gekoppelter Signalwege

Computergestützte Analysen und Modellierungen von Prozessen in zellulären Signalwegen G-Protein gekoppelter Rezeptoren umfassen von Mechanismen der Konformationsänderung des Rezeptors nach Ligandenbindung bis zum differenzierten Zusammenspiel verschiedener Moleküle alle Teilgebiete. Insbesondere die Wirkung verschiedener Liganden als Agonist, Antagonist oder inverser Agonist im Zusammenspiel mit der Rezeptor/G-Protein Interaktion hat besondere Bedeutung für die pharmazeutische Forschung weshalb ein Schwerpunkt von theoretischen Überlegungen, um die Effektivität von high-throughput-Assays im großtechnischen Ligandenscreening zu erhöhen und die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Resultate zu reduzieren. Theoretische Überlegungen zur Rezeptor/G-Protein Interaktion sind daher zumeist unter dem Gesichtspunkt als Folge der Liganden/Rezeptor Interaktion betrachtet worden.

Hierbei wurden Konsequenzen auf die G-Protein Aktivierung und Rezeptordesensibilisierung in Abhängigkeit der Parameter der Ligand/Rezeptor Interaktion (Bindungswahrscheinlichkeit, mittlere Bindungsdauer, Diffusion des Liganden, Rezeptors und G-Proteins) analysiert. Diese Analysen wurden zum Teil als Gleichgewichtsreaktionen mittels Differentialgleichungssystemen als auch als Monte Carlo Simulationen für eine definierte Zahl an Molekülen durchgeführt (Shea, 1997).

Der G-Protein Zyklus in *Saccharomyces Cerevisiae* wurde von Yi und Mitarbeitern 2003 mittels FRET untersucht. Die Kinetik und die Konzentrationswirkungskurve der G-Protein Aktivierung wurden in dieser Arbeit mit einer einfachen Simulation mit vier Differentialgleichungen zur Rezeptor-Aktivierung, Rezeptor/G-Protein Interaktion und G-Protein Zyklus genähert. Zusätzlich wurde die Abhängigkeit der GTPase Rate von Sst2p analysiert (Yi, 2003).

Bornheimer und Mitarbeiter haben 2004 eine detaillierte Analyse des Gq-Signalwegs unter Berücksichtigung lokaler Konzentrationen von aktivierten Rezeptoren, G-Proteinen, GTPase modelierenden Proteinen und GTP/GDP durchgeführt. Hierbei wurden in Abhängigkeit der Parameter verschiedene „Phänotypen“ des Signalwegs entstehen, wodurch z.B. paradoxe Befunde zur RGS-abhängigen Beschleunigung der GIRK-Kanal Aktivierung erklärt werden können. In diesem Model wurde die Interaktion aktivierter G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren um den Faktor 10^8 vernachlässigt (Bornheimer, 2004).

Eine weitere Analyse von Kinzer-Ursem und Mitarbeitern hat 2007 auf Basis des cubic Ternary Complex Models (cTCM) eine Analyse der G-Protein Aktivierung als Funktion der Parameter des cTCM durchgeführt und hierbei Voraussetzungen für das Phänomen des Protean Agonismus identifiziert. In diesem Model ist eine Interaktion aktivierter G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren nicht vorgesehen (Kinzer-Ursem, 2007).

Falkenburger und Mitarbeiter (Falkenburger, 2010) führten eine Analyse des muscarinergen M_1 -Rezeptor/Gq-Signalwegs auf Basis von FRET basierten Ergebnissen zur Rezeptoraktivierung, Rezeptor/G-Protein Interaktion, G-Protein Aktivierung und elektrophysiologischen Messungen zur PIP_2 -Konzentration

über die Aktivierung von KCNQ2/3 Kanälen. In diesem Modell wird - analog dieser Arbeit - nicht zwischen aktiven und inaktivierten agonistgebundenen Rezeptoren unterschieden, da die verwendete FRET Methodik dies nicht erlaubt. Es konnte eine quantitative Beschreibung der Messdaten erreicht werden, wenn die Interaktion aktivierter G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren vernachlässigt ist. Das Verhältnis zwischen G-Protein und Rezeptor beträgt unter Überexpressionsbedingungen 1:1 und unter physiologischen Simulationsbedingungen 40:1, wie zuvor geschätzt (Luetje, 1987; Neubig, 1994; Alt, 2001).

1.6. Fragestellung

Vorversuche von Bünemann und Mitarbeitern haben die Rezeptoraktivierung, Rezeptor/G-Protein Interaktion, G-Protein Aktivierung und GIRK-Kanal Aktivierung des α_{2A} -AR-Gi/o Signalwegs in HEK293-Zellen mittels Patch-Clamp- und FRET-Experimenten unter reaktionskinetischen Aspekten untersucht. Hierbei wurden mehrere, im Folgenden dargelegte Befunde erhoben. Ziel der Arbeit sollte es sein, die G-Protein Aktivierung anhand dieser Daten theoretisch zu untersuchen. Die Fragestellung der Arbeit gliederte sich demnach in drei Teile:

- (I) Es sollte anhand der erhobenen Befunde ein einfaches kinetisches Reaktionsmodell des α_{2A} -AR-Gi/o Signalwegs etabliert werden
- (II) Anhand des Modells sollten verschiedene Interpretationsmöglichkeiten der erhobenen Befunde theoretisch untersucht werden.
- (III) Vorhersagen des Modells für (II) sollte experimentell überprüft werden.

Folgende Befunde waren in den genannten Untersuchungen erhoben worden:

- (I) im Rahmen der zeitlichen Auflösung (10ms) wurden α_{2A} -AR nach Bindung von Noradrenalin aktiviert (Villardaga, 2003),
- (II) die Kinetik und die Konzentrationswirkungskurve der Noradrenalin induzierten Interaktion aktivierter α_{2A} -AR mit Gi-Proteinen lässt sich

nicht von der Rezeptoraktivierung unterscheiden und zeigt einen Gleichgewichtszustand (Hein, 2005),

- (III) es konnte keine Interaktion von inaktiven α_{2A} -AR und inaktiven Gi-Proteinen gefunden werden (Hein, 2005),
- (IV) Gi-Proteine (und möglicherweise auch Go-Proteine) liegen bei Aktivierung auch als nicht-dissoziiertes Heterotrimer vor (Bünemann, 2003; Frank, 2005),
- (V) der EC_{50} der Konzentrationswirkungskurven für die Aktivierung von Gi-Proteinen und GIRK-Kanälen in Zelllinien, die α_{2A} -AR stabil exprimierten, war nicht signifikant voneinander verschieden, wobei die Fraktion aktivierter Gi/o-Proteine und aktivierter GIRK-Kanäle abhängig von der Rezeptorexpression bereits maximal wurde, wenn durch Noradrenalin weniger als 1% der α_{2A} -Rezeptoren aktiviert werden können („spare-receptor“-Phänomen) (Bünemann, 2003; Bünemann, 2001).
- (VI) Während der Versuche zur Aktivierung von Gi/o-Proteinen GIRK-Kanälen wurde bei maximaler Rezeptoraktivierung vereinzelt ein paradoxer Rückgang des Messsignals beobachtet.

2. Methoden

2.1. Verzeichnis verwendeter Medien, Puffer und Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben stammten alle verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), oder AppliChem (Darmstadt, Deutschland). Die Reinheit betrug mindestens p.A..

2.1.1. Medien für Bakterienkultur

- LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl in Wasser, pH 7,2
- LB-Agar: LB-Medium mit zusätzlich 10 g/l Agar
- Ampicillinhaltiges LB-Medium/LB-Agar: LB-Medium/LB-Agar mit zusätzlich 100 mg/l Ampicillin
- Tetracyclinhaltiges LB-Medium/LB-Agar: LB-Medium/LB-Agar mit zusätzlich 40 mg/l Tetracyclin

2.1.2. Medien für eukaryote Zellkultur

- Modifiziertes DMEM für HEK293-Zellen: Dulbecco's modified Eagle-Medium mit 4,5 g/l Glucose (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) zusätzlich mit 10% (V/V) fetalem Kälberserum, 100 mg/l Streptomycin, 100000 U/l Penicillin und 2 mmol/l Glutamin versetzt
- Modifiziertes DMEM mit G418 für stabile HEK293-Zellen: wie modifiziertes DMEM mit zusätzlich 400 mg/l G418 versetzt
- Modifiziertes DMEM zum Gefrieren von HEK293-Zellen: 50% (V/V) modifiziertes DMEM, 40% (V/V) fetales Kälberserum, 10% (V/V) Dimethylsulfoxid

2.1.3. Puffer für Molekularbiologie

- TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCl, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
- Agarosegel: 1x TAE-Puffer mit 1% (M/V) Agarose und 0,0001% Ethidium-bromid versetzt
- DNA-Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese: 10 mM EDTA, 3% (V/V) Glycerol, 0,005% (M/V) Bromphenolblau, 0,005% (M/V) Xylencyanol
- KCM-Puffer: 30 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂, 100 mM KCl
- TSB Puffer: 10% (M/V) PEG 3000, 5% (V/V) DMSO, 20 mM MgCl₂ in LB-Medium
- Puffer P1: 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0
- Puffer P2: 200 mM NaOH, 1% SDS (M/V)
- Puffer P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5

2.1.4. Extrazellulär- und Intrazellulärpuffer für FRET- und Patch-Clamp-Experimente

- Extrazellulärpuffer: 120 mM NaCl, 20 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,3, Osmolarität 330 mosmol/l; pH-Wert Abgleich mit 1 M NaOH Lösung; Osmolarität Abgleich mit 1 M NaCl Lösung
- Ba²⁺-haltige Extrazellulärpuffer: Extrazellulärpuffer mit 1 mM BaCl₂ versetzt
- NA-haltiger Extrazellulärpuffer: Extrazellulärpuffer mit NA in der Konzentration wie im Experiment angegeben versetzt
- Intrazellulärpuffer für Patch-Clamp-Pipetten: 100 mM Kalium-Aspartat, 40 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM Natrium-ATP, 0,03 mM Natrium-GTP, pH 7,3, Osmolarität 330 mosmol/l; pH-Wert Abgleich mit 1 M KOH Lösung; Osmolarität Abgleich mit 1 M KCl Lösung
- Nukleotidfreier Intrazellulärpuffer für FRET-Experimente: 100 mM Kalium-Aspartat, 40 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂,

pH 7,3, Osmolarität 330 mosmol/l; pH-Wert Abgleich mit 1 M KOH Lösung; Osmolarität Abgleich mit 1 M KCl Lösung

- Nukleotid- und NA-haltiger Intrazellulärpuffer: Nukleotidfreier Intrazellulärpuffer mit GDP, GTP oder GTP γ S bzw. NA in der Konzentration wie im Experiment angegeben versetzt
- Permeabilisierungspuffer: Nukleotidfreier Intrazellulärpuffer mit 0,005% (M/V) Spaonin versetzt

2.1.5. Puffer für Proteinbiochemie

- PBS-Puffer: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,4
- PBS-T: PBS-Puffer, versetzt mit 0,1% (V/V) Tween 20
- 5/2-Puffer: 5mM Tris-HCl, 2mM EDTA, pH 7,4
- Proteinpuffer: 32 mM Hepes, 80 mM NaCl, 4 mM EGTA, 4 mM EDTA, pH 7,6
- Gly-Gly-Puffer: 25mM Gly-Gly, pH7,5
- GTP γ ³⁵S-Bindungspuffer 1: 20mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,4
- SDS-Laufpuffer: 24,8 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,2
- SDS-Laemmli-Puffer: 1% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) DTT, 8% (w/v) Glycerol, 0,001% Bromphenolblau
- SDS-Sammelgel (4%), pro Gel: 250 μ l 0,5 M Tris-HCl, 20 μ l 10% (w/v) SDS, 125 μ l Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8% [w/v]), 1,25 ml ddH₂O, 2 μ l Tetramethylethyldiamin, 10 μ l Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (10%), pH 6,8
- SDS-Trenngel (10%), pro Gel: 2,0 ml 1,5 M Tris-HCl, 80 μ l 10% (w/v) SDS, 2,7 ml Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8% [w/v]), 3,3 ml ddH₂O, 4 μ l Tetramethylethyldiamin, 400 μ l Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (10%), pH 8,8

- Blockpuffer: 5% (w/v) Milchpulver, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7,4

2.2. Biologisches Material und Zellkultur

2.2.1. Eukaryote Zellsysteme

- HEK293: humane embryonale Nierenzellen (Shein, 1962)
- HEK293- α_{2A} -AR: HEK293-Zellen, die stabil humanen α_{2A} -adrenergen Rezeptor exprimieren (Expression von Klon I 19,9 pmol/mg; Expression von Klon II 2,2 pmol/mg)

2.2.2. Prokaryote Zellsysteme

- *E.coli* DH5 α (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

2.2.3. Eukaryote Zellkultur

- HEK293-Zellen wurden in mod. DMEM Medium bei 37° Celsius unter 10% CO₂ kultiviert. Zur Weiterzucht wurden die Zellen bei Konfluenz nach Ablösen mittels 0,5 ml Trypsin-EDTA (0,5 g/l) und Resuspension in

2.2.4. Prokaryote Zellkultur

- *E.coli* DH5 α wurden entweder auf LB-Agarplatten oder in LB-Medium mit dem durch das transformierte Plasmid vermittelten Resistenz entsprechenden Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37°C im Brutschrank oder im Schüttelautomaten kultiviert. Zentrifugation

2.2.5. Plasmid-DNA

- GIRK1/4: Maus GIRK-1-Untereinheit und Maus GIRK-4-untereinheit in IRES-Vektor (Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland) von Dr. L.Y. Jan (Bünemann , 2001)
- $G\beta_1$: menschliches $G\beta_1$ in pCMV5-Vektor (Dr. D. Russell, University of Texas South Western Medical Center, Dallas, USA) von Dr. H.A. Bourne (Bünemann , 2001)
- $G\gamma_2$: menschliches $G\gamma_2$ in pcDNA1-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) von Dr. H.A. Bourne (Bünemann , 2001)
- CFP- $G\gamma_2$: N-terminal mit CFP markiertes bovines $G\gamma_2$ in pCI Vektor (Promega, Madison, USA) von Dr. S. Ikeda (Ruiz-Velasco , 2001)
- $G\alpha_o$: Ratten- $G\alpha_o$ im pcDNA3-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) von M. Frank (Frank , 2005)
- $G\alpha_o$ -91-YFP: Ratten- $G\alpha_o$, in dessen Aminosäuresequenz zwischen Position 91 und 92 enhanced-YFP F46L (Nagai, 2002) fusioniert wurde und das durch die Mutation C352I PTX-resistent ist, im pcDNA3-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) von M. Frank (Frank, 2005)
- α_{2A} -YFP: Maus α_{2A} -adrenerger-Rezeptor, C-Terminal mit enhanced-YFP F46L (Nagai, 2002) fusioniert, im pcDNA3-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) von Dr. P. Hein (Hein, 2005)
- α_{2A} -cam: Maus α_{2A} -adrenerger-Rezeptor im pcDNA3 Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), mit enhanced-YFP F46L (Nagai, 2002) zwischen Position 250 und 371 in der Aminosäuresequenz und C-terminal mit CFP an Position 461 fusioniert von Dr. J.P. Vilardaga (Vilardaga, 2003)
- mGFP: GFP in pCMV6-Vektor (amsbio, Abdingdon, Großbritannien)

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. DNA-Transformation

DH5 α *E. coli* Bakterien wurden mit 0,1 μ g der zu präparierenden DNA gemischt und für 10 min auf Eis, danach für 40 s bei 42° C und 120 s auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit zusätzlich 900 μ l LB-Medium versetzt und für 1h bei 37° C inkubiert. Entweder wurden 50 μ l des Ansatzes auf selektionsantibiotikahaltige Agarplatten oder 10% (V/V) des Ansatzes auf LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum überimpft.

2.3.2. DNA-Präparation

Endotoxinfreie DNA für die heterologe Expression wurde nach dem Protokoll des Endotoxinfree Maxi Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) gewonnen und aufgereinigt. Dieses Kit lysiert Bakterien im alkalischen Milieu und reinigt die DNA chromatographisch über Anionenaustausch auf.

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm Lichtwellenlänge bestimmt. Es gilt, dass einer optischen Dichte von 1,0 bei 260 nm Lichtwellenlänge 50 ng/ μ l DNA entspricht. Die Reinheit der DNA wurde über das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm zur optischen Dichte bei 280 nm bestimmt. Ein Verhältnis größer als 1,8 wurde als ausreichend angesehen.

2.3.3. DNA-Transfektion

Endotoxinfreie DNA wurde mit dem Effectene Transfection Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) in HEK293-Zellen dem Protokoll des Herstellers entsprechend transfiziert. Sowohl die verwendete DNA als auch die verwendete Menge sind unter 2.3.4. angegeben. Für jeden Versuch wurde die optimale Menge an Effectene-Reagenz bzgl. Transfektionseffizienz und Zellsterben individuell bestimmt. Transfizierte Zellen wurden max. 18h vor den

Experimenten auf 2cm-Deckgläschen im Verhältnis 1:20 bis 1:50 passagiert, um für die Experimente einzelne Zellen vorliegen zu haben. Die Experimente wurden 40-48 h nach der Transfektion durchgeführt.

2.3.4. Liste der DNA-Transfektionsbedingungen

- Bestimmung der Go-Protein Aktivierung mittels FRET in HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimieren: $G\alpha_o$ -91-YFP 1,8 μ g, $G\beta_1$ 0,5 μ g, CFP- $G\gamma_2$ 0,25 μ g
- Bestimmung der Go-Protein/ α_{2A} -AR Interaktion mittels FRET: α_{2A} -AR-YFP 0,5 μ g, $G\alpha_o$ 1,8 μ g, $G\beta_1$ 0,5 μ g, CFP- $G\gamma_2$ 0,25 μ g
- Bestimmung des GIRK-Kanal Stroms mittels Patch-Clamp in HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimieren: $G\alpha_o$ 1,8 μ g, GIRK1/4 0,5 μ g, mGFP 0,1 μ g

2.3.5. Zellmembranpermeabilisierung

HEK293-Zellen wurden 18-24 h zuvor auf Deckgläschen passagiert. Die Permeabilisierung der Zellmembran wurde durch Inkubation für 1 Minute mit 500 μ l Permeabilisierungspuffer (0,005% (M/V) Saponin in nukleotidfreiem intrazellulären Puffer) durchgeführt. Die erfolgreiche Permeabilisierung unter diesen Bedingung war zuvor mittels Markierung permeabilisierter Zellen durch Methylen-Blau untersucht worden. Nach Abnahme des Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen dreimalig mit 1000 μ l nukleotidfreiem intrazellulären Puffer gespült.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Isolation von Zellmembranen

Zellmembranen wurden aus konfluent gewachsenen, transfizierten HEK293-Zellen gewonnen, die zur Lagerung bei -20°C mit PBS gewaschen worden waren. Zur Präparation wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 5 ml eiskaltem 5/2 Puffer (20 cm Zellkulturschale) gelöst und anschließend mit einem Dispergierer aufgebrochen (Ultra-Turrax T25, Jahnke & Kunkel, Staufen). Zur Trennung von Zellmembran von Zellkerne und intakten Zellen wurde das Homogenat für 10 min bei 1200 g zentrifugiert (Avanti J25 Zentrifuge, Beckman Coulter, Krefeld). Die Membranfraktion wurde aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation für 40 min bei 100.000 g gewonnen (Optima LE 70 Ultrazentrifuge, Beckman Coulter, Krefeld). Das Pellet wurde in 5/2-Puffer mit einem Glashomogenisator resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach der Bradford-Methode mit dem Protein-Assay-Kit Bio-Rad photometrisch bestimmt (Bradford, 1976). Diese Methode beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximum bei Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue G-250 an Proteine von 465 nm nach 595 nm. Die Proteinkonzentration der Probelösung wird anhand einer Referenzgeraden für die Absorption bestimmt, die aus Messung einer standardisierten Albuminlösung resultiert.

2.4.3. Radioliganden-Bindung

Die Bindung von [^3H]RX821002 an HEK293-Zellmembranen mit $\alpha_{2\text{A}}$ -AR wurde als totale Bindung und als unspezifische Bindung in Gegenwart des Antagonisten Altipamezol bestimmt. Für die totale Bindung wurden 100 μl

Proteinpuffer und 50 μ l Membranpräparation in Proteinpuffer mit 50 μ l 2 mM [3 H]RX821002 in Proteinpuffer inkubiert. Für die unspezifische Bindung wurden 50 μ l Proteinpuffer und 50 μ l Membranpräparation in Proteinpuffer mit 50 μ l 2 mM [3 H]RX821002 in Proteinpuffer und 50 μ l 4 μ M Altipamezol inkubiert. Zusätzlich wurde die unspezifische Bindung an den GFB-Filter mittels Inkubation mit einem Ansatz aus 150 μ l Proteinpuffer und 50 μ l 2 mM [3 H]RX821002 in Proteinpuffer bestimmt. Die [3 H]RX821002-Bindung wurde nach Filtration der Membranen über GFB-Filter und waschen mit Gly-Gly-Puffer bestimmt, indem die Filter mit 4 ml Lumasafe Plus (Perkin Elmer, Wiesbaden) resuspendiert worden und die Radioaktivität über 5 Minuten mittels eines Beckman LS-1801 Counter (Beckman Coulter, Krefeld) für jede Probe dreifach bestimmt wurde. Die spezifische Bindung an den α_{2A} -AR ergibt sich als Differenz von unspezifischer Bindung, Filter-Bindung und totaler Bindung.

2.4.4. GTP γ ³⁵S-Bindung

Die GTP γ ³⁵S-Bindung an G α wurde analog zu Sternweis durchgeführt (Sternweis, 1981). 10 μ g Zellmembranen von HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimierten (Klon I) wurden mit 3×10^5 cpm GTP γ ³⁵S im GTP γ S-Bindungspuffer bei Raumtemperatur in einem Gesamtvolumen von 4 ml inkubiert. Der verwendete GTP γ S-Bindungspuffer enthielt (im Gegensatz zu Sternweis und Mitarbeitern) 1 mM Mg²⁺, um unter möglichst physiologischen Mg²⁺ Konzentrationen zu arbeiten. Die GTP γ ³⁵S-Bindung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Filtration von 2x200 μ l Reaktionsansatz auf G/F Filtern nach viermaligen Waschen mit 5 ml GTP γ S-Bindungspuffer bestimmt, indem die Filter in 8 ml Lumasafe Plus (Perkin Elmer, Wiesbaden) resuspendiert worden und die Radioaktivität über 5 Minuten mittels eines Beckman LS-1801 Counter (Beckman Coulter, Krefeld) für jede Probe dreifach bestimmt wurde.

2.4.5. SDS-Polyamidacrylgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Gelelektrophorese mit Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) wurde nach

Laemmli (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Elektrophoresesystem Protean 4 Mini der Firma Bio-Rad (Gelmaße 10x8 cm) durchgeführt. Zu analysierende Proteinproben wurden mit SDS-Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und nach Gelauftrag (SDS-Sammelgel und SDS-Trenngel) in vertikaler Laufkammer (SDS-Laufpuffer als Kathoden- und Anodenpuffer) mit konstanter Spannung (200 V) aufgetrennt.

2.4.6. Western-Blot

Mittels SDS-Gel aufgetrennte Proteine wurden durch elektrischen Strom auf PVDF-Membranen transferiert. Dazu wurde ein Sandwich bestehend aus drei Lagen Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel), SDS-Gel, in 100% Methanol äquilibrierte PVDF-Membran und drei Lagen Filterpapier aufgebaut. Der Transfer der Proteine wurde in einer Transferkammer der Firma Bio-Rad bei konstanter Stromstärke von 350 mA durchgeführt. Die Transferzeit betrug 70 min.

2.4.7. Immundetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen die PVDF-Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in Blockpuffer geschwenkt. Danach wurde der Primärantikörper in der geeigneten Verdünnung (1:500-1:5.000) in Blockpuffer zugegeben und bei 4°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für jeweils 10-15 min wurde der in Blockpuffer verdünnte Sekundärantikörper (1:10.000) zugegeben und wiederum eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen für jeweils 10-15 min in PBS-T entfernt. Als Primärantikörper wurden polyklonale $G\alpha_o/G\alpha_{i3}$ -Antikörper und YFP-Antikörper (Merck, Darmstadt) verwendet, die mittels Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper (Dianova, Hamburg) detektiert wurden. ECL Plus Western Blot Detection Agent (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde nach den

Anleitungen des Herstellers verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mittels eines LAS-1000 Systems (Fujifilm Europe, Düsseldorf).

Die Daten zur Immundetektion mittels Western-Blot wurden in einer Kooperation mit Dr. Dr. Christoph Klenk durchgeführt.

2.5. Elektrophysiologische Methoden

2.5.1. Prinzip der Patch-Clamp-Methodik

Ziel der Patch-Clamp-Methodik ist es, Ionenströme durch eine Zellmembran über einen geschlossenen Stromkreis zwischen Intrazellulärraum und Extrazellulärraum zu messen. Eine Elektrode liegt im Extrazellulärraum (Badelektrode). Eine zweite Elektrode liegt in einer dünn ausgezogenen Glaspipette, die mit einer Ionenlösung gefüllt ist, die dem Intrazellulärraum nachempfunden ist. Diese Glaspipette wird auf die Zellmembran gebracht. Durch Unterdruck wird die Zellmembran an die Pipettenspitze „angesaugt“ bis ein Widerstand von mehreren G Ω (Giga-Seal genannt) zwischen Badelektrode und Elektrode in der Glaspipette besteht. Liegt die Pipette im Giga-Seal auf der Zellmembran an, kann durch einen weiteren Unterdruckimpuls die Zellmembran unter der Pipette geöffnet werden. Dadurch ist die Pipette mit dem Intrazellulärraum verbunden. Der Widerstand des nun bestehenden Stromkreises wird (bei intaktem Giga-Seal) durch die Offenwahrscheinlichkeit der Ionenkanäle der Zellmembran unter der untersuchten Versuchsbedingung bestimmt. Jede Änderung dieses Widerstands in Abhängigkeit von definierbaren Faktoren kann als Änderung des Stroms bei einem vorgegebenen Membranpotential gemessen werden. Diese Konfiguration der Patch-Clamp-Methodik wird Whole-Cell-Konfiguration genannt. Der Messverstärker des Patch-Clamp-Setups zeichnet sich durch eine elektrische Schaltung aus, die es ermöglicht eine konstante Spannung an der Zellmembran zu erhalten und den fließenden Strom mit hoher zeitlicher Auflösung verzögerungsfrei zu messen, weshalb man auch von Voltage-Clamp spricht (Neher, 1978).

2.5.2. Durchführung

GIRK-Kanal Ströme wurden in der Voltage-Clamp-Whole-Cell-Konfiguration ermittelt. Der Gesamtionenstrom kann so in Abhängigkeit vom Membranpotential gemessen werden (Hamill, 1981). In der extrazellulären (auch Badlösung genannten) Ionenlösung, die in ihrer Zusammensetzung dem physiologischen Extrazellulärraum nachempfunden ist, wurde die Kaliumkonzentration auf 20 mM erhöht, wodurch sich das Kalium-Gleichgewichtspotential bei -50 mV einstellt. Daher wurde der GIRK-Kanal Strom bei -90 mV Membranpotential in Einwärtsrichtung gemessen.

Die gemessenen Zellen, die auf polylysinbeschichteten 24 mm Deckgläschen kultiviert und in Attofluor-Messkammern (Invitrogen, Karlsruhe) montiert worden waren, wurden mit verschiedenen Pufferlösungen mittels einer Druckluft- und Ventilgesteuerten Superfusionsanlage (AKA-VM8, ALA Scientific, USA) umspült. Der GIRK-Kanal Strom und Ströme anderer einwärtsgerichteter Kalium-Kanäle lassen sich durch Kanal-Block mit Ba^{2+} identifizieren. In den vorliegenden Untersuchungen wurde nur im heterologen Expressionssystem gearbeitet: GIRK-Kanäle waren die einzig exprimierten Kalium-Kanäle, daher wurde der GIRK-Kanal Strom als Differenz des Membranstroms ohne und in Gegenwart von 1 mM Ba^{2+} bestimmt.

Patch-Clamp Pipetten wurden aus Borosilikat Glas-Kapillaren mit einem Pipetten-Automaten (Sutter Instrument Comp., Novato, USA; Modell p97) so hergestellt, dass ihr DC-Widerstand zwischen 3-6M Ω lag. Der Strom wurde mit einem EPC-10-Patch-Clamp-Verstärker von HEKA Instruments (New York, USA) mit dem Programm Pulse 10.0 (ebenfalls von HEKA) unter Verwendung eines analogen 3 kHz-Bessel-Filters aufgezeichnet (Bünemann, 1998).

2.6. Fluoreszenz Mikroskopische Methoden

2.6.1. Prinzip von Messungen des FRET

Messungen des FRET wurden an einem Zeiss Axiovert200 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) mit einem dem Plan-Neofluar Objektiv (Carl Zeiss, Jena) in 100-facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl durchgeführt. Die Exzitation erfolgte monochromatisch mit einem Polychrom IV (Till Photonics, Gräfeling) als Lichtquelle, wobei sich Exzitations Wellenlänge und Belichtungsdauer computergestützt einstellen lassen.

In den durchgeführten Experimenten wurde die Photonenemission einer ganzen Zelle bestimmt. Das emittierte Spektrum wurde dabei über einen Spiegel, der nur Licht mit Wellenlängen unterhalb von 505 nm reflektiert (dichroic long pass filter (DCLP) in zwei Kanäle getrennt (CFP-Kanal für Wellenlängen <505 nm; YFP-Kanal für Wellenlängen >505 nm). Durch einen nachgeschalteten weiteren Filter wurden im CFP-Kanal nur Photonen der Wellenlänge 460-500 nm und im YFP Kanal der Wellenlänge 520-550 nm detektiert. Die Emissionsintensität wurde in jedem Kanal mittels einer LCL-902 Kamera (Watec Incorporated, Middletown, USA) unter Ausnutzung des photoelektrischen Effekts mit einem Analog-Digital Konverter (Digidata 1322A, Xon Instruments) digitalisiert und mit dem Programm Pulse 10.0 (HEKA Instruments, New York, USA) aufgezeichnet. Die gemessene Zellen wurden auf Poly-D-Lysin beschichteten 24mm Deckgläschen kultiviert und in Attofluor-Messkammern (Invitrogen, Karlsruhe) montiert. Die verschiedenen Pufferlösungen wurden mittels einer Druckluft- und Ventilgesteuerten Superfusionsanlage (AKA-VM8, ALA Scientific, Framingdale, USA) umspült. Die Messungen in 3.2. bis 3.5. erfolgten mit einer Rate von 1 Hz gemessen, bei einer Belichtungsdauer von 50 ms, in 3.6. wurde mit einer Rate von 10 Hz bei einer Belichtungsdauer von 50 ms.

2.6.2. Analyse von FRET-Messungen

Wie in Abbildung 2.6.2. illustriert überlappen sich CFP-Emissions- und YFP-Emissionsspektrum.

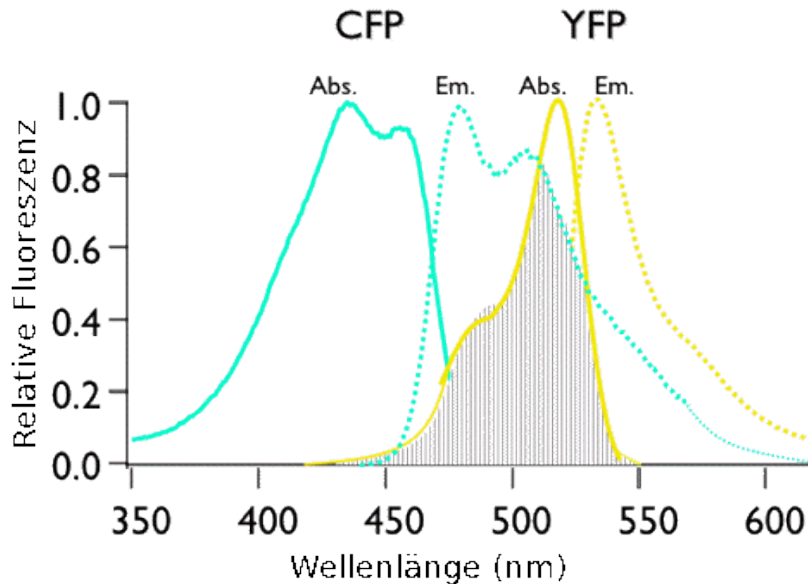


Abbildung 2.6.2: Absorptions- und Emissionsspektrum von CFP und YFP
(Modifiziert nach Visser & Rolinski, Universität Wageningen und Strathclyde)

Daher wird die CFP-Emission nicht nur im CFP- sondern auch im YFP-Kanal detektiert. Um dies zu korrigieren wurde in Vorversuchen das Verhältnis der gemessenen Intensitäten der CFP-Emission im YFP- und CFP Kanal bestimmt, im folgenden als Korrekturfaktor bezeichnet:

$$C_{\text{Korrektur}} = \frac{I(\text{CFP})_{\text{YFP-Kanal}}}{I(\text{CFP})_{\text{CFP-Kanal}}} \quad (2.1.) \text{ Definition des Korrekturfaktors}$$

$C_{\text{Korrektur}}$	Korrekturfaktor
$I(\text{CFP})_{\text{YFP-Kanal}}$	Intensität der CFP-Emission im YFP-Kanal
$I(\text{CFP})_{\text{CFP-Kanal}}$	Intensität der CFP-Emission im CFP-Kanal

Für die Bestimmung der reinen Akzeptoremission (YFP-Emission) wurde daher die gemessene Emissionsintensität des YFP-Kanals nach folgender Berechnung korrigiert:

$$I(YFP) = I_{YFP-Kanal} - C_{Korrektur} \times I_{CFP-Kanal} \quad (2.2.) \quad \text{Korrektur der YFP-Kanal-Emission}$$

$I(YFP)$ Intensität der Akzeptoremission
 $I_{YFP-Kanal}$ Intensität des YFP-Kanals
 $C_{Korrektur}$ Korrekturfaktor
 $I_{CFP-Kanal}$ Intensität des CFP-Kanals

2.6.3. Quantifizierung des FRET

In den durchgeführten Untersuchungen wurde der FRET als Ratio zwischen den Emissionsintensitäten des Donors (CFP) und des Akzeptor (YFP) quantifiziert, was es erlaubt, Änderungen des FRET mit hoher zeitlicher Auflösung zu detektieren. Der Begriff „ratiometrisches FRET“ steht für „FRET, ratiometrisch als Quotient zwischen Intensität des YFP-Kanals und Intensität des CFP-Kanals bestimmt“.

2.6.4. Normalisierung des FRET

2.6.4.1. Normalisierung des FRET bei Untersuchung der G-Protein Aktivierung

Das Gleichgewicht des FRET zwischen YFP-markierten G_{α_o} und CFP-markierten G_{γ_2} bei Umspülung permeabilisierter, α_{2A} -AR-exprimierender HEK293-Zellen (Klon I) mit nukleotidfreier, 100 μ M NA-haltiger Intrazellulärlösung wurde als minimale G-Protein Aktivierung definiert. Unter diesen Bedingungen sind G-Protein maximal möglich im nukleotidfreien Zustand am α_{2A} -AR gebunden (De Lean, 1982) und daher maximal inaktiviert. Analog wurde das Gleichgewicht des FRET bei Umspülung dieser Zellen mit GTP γ S- oder GTP-haltiger Intrazellulärlösung, die zusätzlich 0,1 μ M NA enthält, als maximale G-Protein Aktivierung definiert.

2.6.4.2. Normalisierung des FRET bei Untersuchung der Rezeptor/G-Protein Interaktion

Das Gleichgewicht des FRET zwischen YFP-markierten α_{2A} -AR und CFP-markierten $G_{\gamma 2}$ bei Umspülung permeabilisierter HEK293-Zellen mit nukleotidfreier, 100 μ M NA-haltiger Intrazellulärlösung wurde als maximale Rezeptor/G-Protein Interaktion definiert. Unter diesen Bedingungen sind G-Proteine maximal möglich im nukleotidfreien Zustand am α_{2A} -AR gebunden (De Lean, 1982). Analog wurde das Gleichgewicht des FRET bei Umspülung dieser Zellen mit nukleotidhaltiger und NA-freier Intrazellulärlösung, als minimale Rezeptor/G-Protein Interaktion definiert. Nach dem Modell des collision-coupling (Levitzki, 1981) ist in diesem Fall keine Rezeptor/G-Protein Interaktion zu erwarten, wie auch experimentell für die verwendeten Versuchsbedingungen bestätigt werden konnte (Hein, 2005).

2.7. Simulation chemischer Reaktionskinetiken

2.7.1. Grundlagen der Reaktionskinetik

Die Simulation der Kinetik chemischer Reaktionen beruht auf den Gesetzen der Reaktionskinetik. Die Reaktionen von Signalkaskaden können sich als ein Netzwerk bimolekularer Gleichgewichtsreaktionen darstellen. Jede Reaktion folgt dem Zeitgesetz für chemische Reaktionen zweiter Ordnung. Eine Ausnahme bildet die Rezeptor-Liganden-Bindung, da aufgrund der experimentellen Bedingungen die Konzentration des Liganden konstant gehalten wird, weswegen die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der Konzentration des Rezeptors abhängt, und die Reaktion dann dem Zeitgesetz für Reaktionen pseudo-erster Ordnung entspricht.

Aus den Differentialgleichungen für jede Einzelreaktion lässt sich ein Gleichungssystem gewöhnlicher Differentialgleichungen erstellen, das dann z.B. die Kinetik des Effektors einer Signalkaskade vollständig beschreiben

kann. Die Kinetik von bimolekularen Reaktionen zweiter Ordnung, bei denen Komplexe aus zwei Reaktionspartnern entstehen, lässt gemäß folgender Formel in allgemeiner Form berechnen:

$$\frac{d(c_A)}{d(t)} = -k_1 c_A(t) c_B(t) + k_{-1} c_{AB}(t)$$

(2.3.) Zeitgesetz zweiter Ordnung

$$c_{AB}(t) = c_A(t_0) - c_A(t)$$

$$c_B(t) = c_B(t_0) - n \times c_A(t)$$

c_A, c_B, c_{AB} Konzentration der Produkte A und B und des Edukts AB
 n Stöchiometrisches Verhältnis der Reaktion zwischen B und A

2.7.2. Prinzip des Runge-Kutta-Verfahren

Gleichungssysteme gewöhnlicher Differentialgleichungen lassen sich mathematisch nur in Ausnahmefällen explizit lösen, sind aber ein häufiges Problem in mathematischen Modellen aus vielfältigen wissenschaftlichen Bereichen von der Astronomie bis zur Volkswirtschaftslehre. Es wurden daher verschiedene Verfahren zur numerischen Näherung entwickelt. Eines dieser Verfahren, das aufgrund seines geringen relativen Fehlers häufig eingesetzt wird, ist das Runge-Kutta-Verfahren, weshalb es hier stellvertretend vorgestellt werden soll. Das Runge-Kutta Verfahren ist ein sogenanntes Einschrittverfahren zur Lösung von Anfangswertproblemen gewöhnlicher Differentialgleichungen. Bei diesen Problemem ist y_0 bei bekanntem x_0 gegeben, wie es z.B. der Konzentration eines Reaktionspartners zu Beginn einer chemischen Reaktion (Zeitpunkt t_0) entspricht. Das Verfahren basiert auf der Taylor-Entwicklung von Funktionen. Diese stellt eine stetig differenzierbare Funktion als eine Summe ihrer Ableitungen dar.

$$p_n(x) := \sum_{k=0}^n \frac{f^{(k)}(x_0)}{k!} (x - x_0)^k \quad (2.4.) \text{ Definition der Taylor Entwicklung}$$

Im Folgenden wird das vierstufige Runge-Kutta Verfahren vorgestellt. Gegeben sei eine Differentialgleichung mit bekanntem y_0 an der Stelle x_0 (Ausgangswert):

$$\frac{d(y)}{d(x)} = f(x,y) \text{ mit } y(x_0) = y_0$$

Berechnet wird inkrementell für jeden Schritt n an der entsprechenden Stelle x_n , (x_n von x_0 ausgehend in n Schritten bei gegebener Schrittweite h) y_n .

$$x_n = x_0 + n \times h$$

Zur Berechnung des zugehörigen y_n werden vier Hilfwerte k_1 bis k_4 bestimmt:

$$k_1 = h \times f(x_n, y_n)$$

$$k_2 = h \times f\left(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{k_1}{2}\right)$$

$$k_3 = h \times f\left(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{k_2}{2}\right)$$

$$k_4 = h \times f(x_n + h, y_n + k_3)$$

y_n wird dann aus dem y_{n-1} des vorherigen Schrittes (im ersten Schritt dann der Ausgangswert y_0) und dem gewichteten Mittel von k_1 bis k_4 berechnet:

$$y_n = y_{n-1} + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4)$$

Die Berechnung wird für y_{n+1} an der Stelle x_{n+1} nach dem gleichen Vorgehen bis zum Erreichen der gesuchten Stelle x wiederholt.

2.8. Software

Die Daten von Patch-Clamp- oder FRET-Experimenten wurden mittels ClampFit 10.0 von HEKA Instruments aufgezeichnet und ausgewertet. Die Datenanalyse und statistische Auswertung wurde mit Student's t-Test in Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, USA) vorgenommen.

Die Lösung gewöhnlicher Differentialgleichungssysteme für kinetische Simulationen wurden mittels MatLab R2006b (Mathworks, Ismaning) und der Eingabeoberfläche Simbiology 1.0 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse des α_{2A} -AR-Gi/o-Signalwegs anhand eines vereinfachten Modells des G-Protein-Zyklus

3.1.1. Bestimmung der Versuchsbedingungen

Ziel der Arbeit war es, eine vereinfachte Modellierung des G-Protein Zyklus zu etablieren anhand derer zuvor gewonnene experimentelle Befunde theoretisch untersucht werden sollten. Für eine plausible Modellierung ist es notwendig, die Zahl freier Parameter in der Modellierung gering zu halten, weshalb das Verhältnis der $G\alpha_o$ - und der α_{2A} -AR Expression unter den verwendeten Versuchsbedingungen bestimmt wurde.

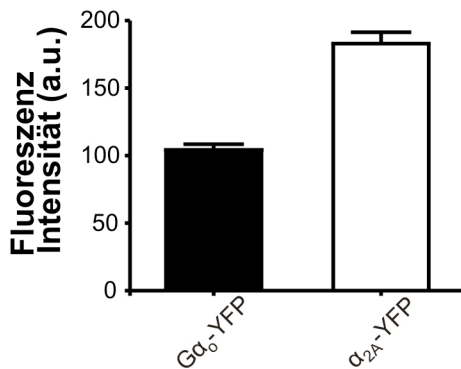
Im ersten Schritt wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt, der 1 pmol/mg YFP entspricht. Hierzu wurde in α_{2A} -YFP transfizierten HEK293-Zellen die mittlere, konfokale Membranfluoreszenz einer transfizierten Zelle, die Transfektionseffizienz und die Membranexpression von α_{2A} -YFP mittels Radioliganden-Bindung bestimmt. Die mittlere Membranfluoreszenz einer transfizierten Zelle betrug $182,9 \pm 8,5$ A.U. ($n=62$), Transfektionseffizienz betrug 49,1 % und die durchschnittliche α_{2A} -AR-YFP Expression 5,1 pmol/mg. Hieraus folgt, dass in einer transfizierten Zelle die mittlere α_{2A} -AR-YFP Expression 10,4 pmol/mg beträgt. Somit entspricht 1 pmol/mg YFP 17,59 A.U. Fluoreszenz Intensität. Anhand der mittleren Fluoreszenz Intensität einer $G\alpha_o$ -91-YFP transfizierten Zelle ergibt sich, dass $G\alpha_o$ -91-YFP in einer kotransfizierten Zelle eine mittlere Expression von 5,9 pmol/mg aufweist.

$G\alpha_o$ wird in HEK293-Zellen physiologisch endogen exprimiert. Das Verhältnis von endogenem $G\alpha_o$ zu kotransfiziertem $G\alpha_o$ -91-YFP wurde über eine Immunodetektion mittels Western-blot bestimmt. Es wurde die $G\alpha_o$ Expression in nicht kotransfizierten HEK293-Zellen und sowohl die $G\alpha_o$ - als auch die $G\alpha_o$ -91-YFP Expression bei jeweiliger kotransfektion in HEK293-Zellen bestimmt. Das Verhältnis der Intensität der Banden von kotransfiziertem $G\alpha_o$ -WT zu

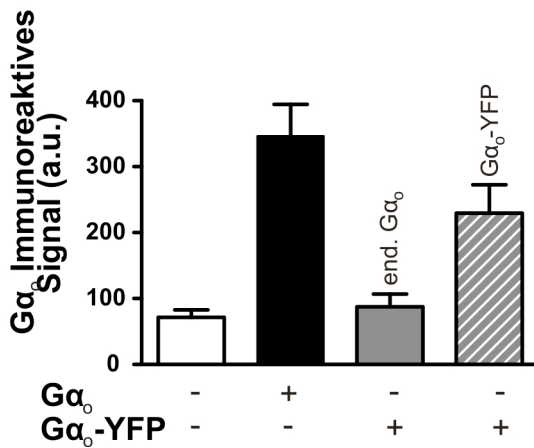
endogenem $G\alpha_o$ beträgt 3,84; von kotransfiziertem $G\alpha_o$ -91-YFP zu endogenem $G\alpha_o$ 2,63. Da diese Bestimmung nicht hinsichtlich der erfolgreichen Kotransfektion selektiert waren, müssen diese Verhältnisse um die mittlere Transfektionseffizienz von 56,3 % bei einer $G\alpha_o$ -91-YFP Kotransfektion korrigiert werden. Somit wäre zu erwarten, dass in einer transfizierten Zelle das mittlere Verhältnis von kotransfiziertem $G\alpha_o$ -91-YFP zu endogenem $G\alpha_o$ 4,67 beträgt; das Verhältnis von kotransfiziertem $G\alpha_o$ -WT zu endogenem $G\alpha_o$ beträgt dann unter der Annahme der gleichen Transfektionseffizienz 6,82.

Unter Bedingungen zur Bestimmung der G-Protein Aktivierung werden insgesamt 7,2 pmol/mg $G\alpha_o$ - und $G\alpha_o$ -91-YFP-Protein in einer transfizierten Zelle exprimiert. Unter Bedingungen zur Bestimmung der Rezeptor/G-Protein Interaktion wäre zu erwarten, dass nach $G\alpha_o$ -Kotransfektion 6,8 pmol/mg $G\alpha_o$ -Protein exprimiert werden. Unter den Bedingungen zur Bestimmung der G-Protein Aktivierung (α_{2A} -AR Expression von 19,9 pmol/mg) entspricht dies einem mittleren Verhältnis von Rezeptoren zu G-Proteinen von 2,76 zu 1 in einer untersuchten Zelle.

A



B



C

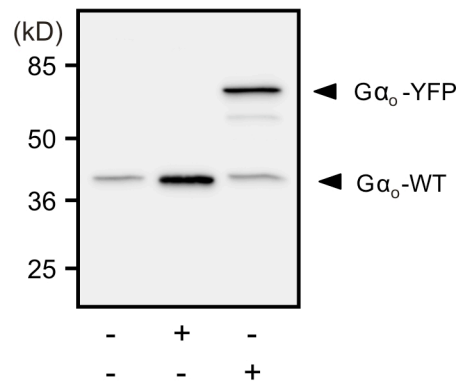


Abbildung 3.1.1: Expressionsverhältnis zwischen Gα₀ und α_{2A}-AR unter den verwendeten Versuchsbedingungen

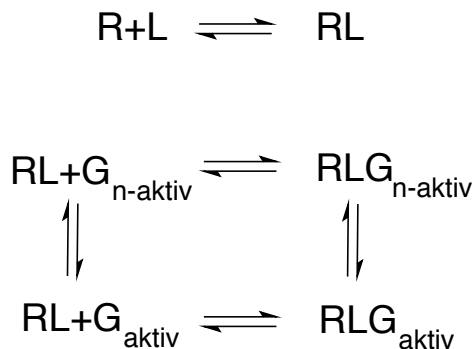
(A) HEK293-Zellen, die α_{2A}-AR mit 19,9 pmol/mg stabil exprimierten wurden mit Gα₀-91-YFP, Gβ₁ and Gγ₂ bzw. HEK293-Zellen wurden mit α_{2A}-AR-YFP, Gα₀-WT, Gβ₁ and Gγ₂ wie in Material und Methoden beschrieben transfiziert. Die mittlere Fluoreszenz Intensität von definierten Membranabschnitten wurde mittels konfokaler Mikroskopie für beide Transfektionsbedingungen bestimmt (Gα₀-91-YFP: 104,2 ± 4,2 A.U.; α_{2A}-AR-YFP: 182,9 ± 8,5 A.U., n=62). (B, C) Bestimmung des Verhältnisses zwischen endogener Gα₀ Expression und Gα₀-WT bzw. Gα₀-91-YFP Expression nach Kotransfektion unter den gleichen Bedingungen wie zuvor. Gleiche Proteinmengen aus Zellmembranpräparationen transfizierter Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Gα₀ mittels Western-blot bestimmt. Die Stärke des immunoreaktiven Signals wurde quantifiziert (n=4 jeweils). (C) Repräsentatives Beispiel eines Western-blot für Gα₀-WT bzw. Gα₀-91-YFP Expression in HEK293-Zellen.

3.1.2. Formulierung des Modells

Ziel der qualitativen Modellierung des G-Protein Zyklus war es, ein einfachst mögliches Modell zu bestimmen, dass die gemessenen Daten beschreibt. Dazu wurden folgende Vereinfachungen durchgeführt:

- (I) Für das Rhodopsin-System wurde die Zeitdauer nach einem Lichtblitz bis zur Stabilisierung von Metarhodopsin II als weniger als eine Millisekunde dauernd (Cone, 1967) bestimmt. Für die Zeitauflösung des Modells wurde daher vereinfachend angenommen, dass die Bindung von Noradrenalin (NA) an den α_{2A} -AR diesen instantan aktiviert.
- (II) Im Modell wird nur zwischen dem aktiven und inaktiven Funktionszustand des G-Proteins unterschieden. Dies erfolgt in Analogie zu den Messungen der G-Protein Aktivierung mittels FRET zwischen Gi/o-Protein Untereinheiten und mittels GIRK-Kanal Strömen. Aktivierte G-Protein sind im Modell nicht zugleich am Rezeptor gebunden.
- (III) Die Inaktivierung des G-Proteins wird als konstant modelliert.
- (IV) Die modellierten Reaktionen werden unter Bedingungen freier Diffusion aller Reaktionspartner in einem dreidimensionalen Raum simuliert.
- (V) Es wird angenommen, dass die Aktivierung von G-Protein Effektoren durch die Anzahl der G-Proteine limitiert ist, wodurch beide im Modell als äquivalent modelliert werden.

In dem vereinfachten Modell wird der α_{2A} -AR-Gi/o-Signalweg von fünf Reaktionsgleichungen beschreiben:



R	Nicht-aktiverter α_{2A} -AR
L	Ligand Noradrenalin
LR	komplex aus Ligand und Rezeptor: aktiverter Rezeptor
LRG _{n-aktiv}	Komplex aus aktiviertem Rezeptor und nicht-aktiviertem G-Protein
LRG _{Aktiv}	Komplex aus aktiviertem Rezeptor und aktiviertem G-Protein
G _{n-aktiv}	Nicht-aktiviertes G-Protein
G _{Aktiv}	Aktiviertes G-Protein

Der zeitliche Verlauf der Konzentration von Reaktionspartnern einer chemischen Reaktion lässt sich bei bekannten Ratenkonstanten und bekannter Ausgangskonzentration gemäß den Gesetzen der chemischen Reaktionskinetik beschreiben. Die zeitabhängige Konzentration der einzelnen Reaktionspartner stellen zeitabhängige Variablen dar, die Ratenkonstanten sind zeitunabhängige, konstante Parameter des Modells. Über ein Gleichungssystem gewöhnlicher Differentialgleichungen lassen sich die Konzentrationen zeitabhängig berechnen:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[R](t)}{dt} &= -k_{on}[R][L](t) + k_{off}[RL](t) \\
 \frac{d[RLG_{n\text{-aktiv}}](t)}{dt} &= -k_{AssoRLG_{n\text{-aktiv}}}[RL](t)[G_{n\text{-aktiv}}](t) + k_{DissoRLG_{n\text{-aktiv}}}[RLG_{n\text{-aktiv}}](t) \\
 \frac{d[RLG_{n\text{-aktiv}}](t)}{dt} &= -k_{RLG_{n\text{-aktiv}}RLG_{\text{aktiv}}}[RLG_{n\text{-aktiv}}](t) + k_{RLG_{\text{aktiv}}RLG_{n\text{-aktiv}}}[RLG_{\text{aktiv}}](t) \\
 \frac{d[RLG_{\text{aktiv}}](t)}{dt} &= -k_{DissoRLG_{\text{aktiv}}}[RLG_{\text{aktiv}}](t) + k_{AssoRLG_{\text{aktiv}}}[RL](t)[G_{\text{aktiv}}](t) \\
 \frac{d[G_{\text{aktiv}}](t)}{dt} &= -k_{G_{\text{aktiv}}G_{n\text{-aktiv}}}[G_{\text{aktiv}}](t) + k_{G_{n\text{-aktiv}}G_{\text{aktiv}}}[G_{n\text{-aktiv}}](t)
 \end{aligned}$$

Aufgrund der Stöchiometrie gilt zu jedem Zeitpunkt:

$$[R](t=0) = [R](t) + [RL](t) + [RLG_{aktiv}](t) + [RLG_{n-aktiv}](t)$$

$$[G_{n-aktiv}](t=0) = [G_{aktiv}](t) + [G_{n-aktiv}](t) + [RLG_{aktiv}](t) + [RLG_{n-aktiv}](t)$$

Lineare, gewöhnliche Differentialgleichungssysteme können nicht explizit gelöst werden, allerdings für beliebig kleine Zeitschritte Δt numerisch genähert werden, wie in 2.7.2. erläutert. Ziel des Modells war es, die Resultate von Bünemann und Hein (Bünemann, 2003; Hein, 2005) unter den dortigen Versuchsbedingungen zu simulieren.

3.1.3. Ausgangsbedingungen und Parameterbestimmung

Unter Ausgangsbedingung versteht man den Wert der zeitabhängigen Variablen des Modells zum Zeitpunkt $t=0$. Tabelle 3.1.1. gibt eine Übersicht über die Reaktionspartner und die Ausgangsbedingungen des Modells.

Reaktionspartner	Akronym	Ausgangswert
α_{2A} -AR	R	0.03 bis 3 M
Ligand (NA)	L	1 nM bis 1 mM
Heterotrimeres G-Protein, inaktiv	$G_{n-aktiv}$	1 M
Heterotrimeres G-Protein, aktiv	G_{aktiv}	0 M

Tabelle 3.1.1. Reaktionspartner des vereinfachten Modell

Die Reaktionspartner können unter Bedingungen freier Diffusion miteinander interagieren und Komplexe bilden, z.B. $R+L \rightleftharpoons RL$. Inaktive und aktive, heterotrimere G-Proteine können ineinander umgewandelt werden. „*Fraktion aktiver G-Proteine*“ bezeichnet $G_{aktiv} / (G_{n-aktiv} + G_{aktiv} + RLG_{n-aktiv} + RLG_{aktiv})$; „*Fraktion Rezeptor/ G-Protein Interaktion*“ bezeichnet $(RLG_{n-aktiv} + RLG_{aktiv}) / (G_{n-aktiv} + G_{aktiv} + RLG_{n-aktiv} + RLG_{aktiv})$.

Als Ausgangsbedingung für das Modell wurde festgelegt, dass Rezeptoren und G-Proteine im inaktiven Funktionszustand vorliegen. Da das Modell unter Bedingungen freier Diffusion in einem Volumen berechnet wird, wurde die G-Protein Konzentration und die Rezeptor Konzentration in der Zellmembran einer transfizierten Zelle auf eine Volumenkonzentration normalisiert. Für Rhodopsin ist eine Membrandichte von 25000 Molekülen pro μm^2 beschrieben (Heck, 2001). Eindimensional entspricht dies etwa 158 Molekülen pro μm , dreidimensional 3952847 Molekülen in einem Volumen von $1 \mu m^3$, was zu einer Konzentration von etwa 6 M äquivalent wäre. Analog dieser geschätzten

Größenordnung wurde für die Überexpressionsbedingungen im verwendeten HEK293-Zellsystem die Rezeptor Konzentration relativ zur G-Protein Konzentration gewählt, welche auf $G_{n-aktiv} = 1 \text{ M}$ festgelegt wurde. Die Reaktionsraten des Modells sind daher nicht auf die physiologische Situation unangepasst übertragbar.

Das Verhältnis zwischen G-Protein und Rezeptorexpression wurde mittels Fluoreszenzmessungen und proteinbiochemischer Methoden wie in 3.1.1. erläutert geschätzt. Die α_{2A} -Rezeptorexpression betrug 2 pmol/mg bei der Bestimmung der G-Protein Aktivierung, die mittels des Modells simuliert werden soll (Bünemann, 2003). Unter Berücksichtigung der Befunde von 3.1.1. entspricht das Verhältnis Rezeptor:G-Protein unter diesen Bedingungen 1:3, weshalb die Konzentration des Rezeptors auf 0.3 M festgelegt wurde ($R=0.3 \text{ M}$). Die Konzentration von NA wurde den Versuchsbedingungen mittels einer Superfusionsvorrichtung entsprechend als zeitlich konstant definiert, wobei die Kinetik der Umspülung nicht berücksichtigt wurde.

Für die Bindung von NA an α_{2A} -AR ergibt sich unter diesen Annahmen eine Reaktionsbedingung pseudoerster Ordnung, da die Konzentration von NA konstant gehalten wird. Der K_d für NA am α_{2A} -AR wurde auf 5.0 μM bestimmt (Bünemann, 2001). k_{off} und k_{on} wurden so gewählt, dass die kinetischen Daten zur α_{2A} -AR Aktivierung den Befunden am α_{2A} -YFP/CFP- bzw. α_{2A} -FIAsH/CFP-Sensor unter Berücksichtigung des jeweiligen K_d des Rezeptor-Sensors entspricht (Hoffmann, 2005). Somit gilt:

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

K_d Gleichgewichtskonstante

k_{off} Reaktionsrate des Zerfalls des Komplex aus Liganden und Rezeptor

k_{on} Reaktionsrate der Bildung des Komplex aus Liganden und Rezeptor

Die Reaktionskonstanten, die die G-Protein Aktivierung und die Rezeptor/G-Protein Interaktion beschreiben ($k_{AssoRLGn-aktiv}$, $k_{DissoRLGn-aktiv}$, $k_{AssoRLGaktiv}$, $k_{DissoRLGaktiv}$, $k_{RLGn-aktivRLGaktiv}$, $k_{RLGaktivRLGn-aktiv}$), wurden so angepasst, dass sowohl die Befunde zur Rezeptor/G-Protein Interaktion (Hein, 2005) als auch zur G-Protein Aktivierung für α_{2A} -AR und Gi-Proteinen (Bünemann, 2003) beschrieben werden.

Im ersten Schritt wurden die Reaktionskonstanten, welche die Rezeptor/G-Protein Interaktion beschreiben ($k_{\text{AssoRLGn-aktiv}}$, $k_{\text{DissoRLGn-aktiv}}$, $k_{\text{AssoRLGaktiv}}$, $k_{\text{DissoRLGaktiv}}$) an Messungen der Konzentrations-Wirkungskurve und der Kinetik der Interaktion von α_{2A} -AR mit Gi-Proteinen angepasst (Hein, 2005). Sowohl Konzentrations-Wirkungskurve als auch Kinetik zeigten in diesen Messungen keinen signifikanten Unterschied zur Aktivierung von α_{2A} -AR. Dieser Befund ergibt für das Modell zwei Interpretationsansätze:

- (I) Es werden im Gleichgewicht so viele G-Protein aktiviert, wie auch inaktiviert werden. Somit muss zwischen G-Protein-Inaktivierung und G-Protein-Aktivierung ein Gleichgewicht bestehen.
- (II) Es gibt im Gleichgewicht eine konstante Interaktion von aktivierten G-Proteinen mit aktivierten Rezeptoren.

Interpretation (I) erscheint eher unwahrscheinlich, wenn man berücksichtigt, dass Gi/o-Proteine maximal aktiviert werden können, wenn nur ein Bruchteil der α_{2A} -AR durch NA aktiviert wurde (Bünemann, 2003). Um dies zu erreichen, müssen im Gleichgewichtszustand alle Prozesse, die zur G-Protein Aktivierung führen, schneller sein als die Prozesse der G-Protein Inaktivierung, was unter Berücksichtigung der langsamen GTPase-Rate (Gilman, 1987) und beobachteten langsamen G-Protein Inaktivierung Lösung (I) als unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Reaktion	Ratenkonstante	Wert
Rezeptor-Ligand	k_{on} k_{off}	$10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $0,5 \text{ s}^{-1}$
Inaktives G-Protein/ aktiver Rezeptor	$k_{\text{AssoRLGn-aktiv}}$ $k_{\text{DissoRLGn-akti}}$	$240 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 10 s^{-1}
Aktives G-Proteins/ aktiver Rezeptor	$k_{\text{AssoRLGaktiv}}$ $k_{\text{DissoRLGaktiv}}$	$240 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 480 s^{-1}
G-Protein-Aktivierung	$k_{\text{RLGn-aktivRLGaktiv}}$ $k_{\text{RLGaktivRLGn-aktiv}}$	$10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $0,2 \text{ s}^{-1}$
G-Protein-Inaktivierung	$k_{\text{GaktivGn-aktiv}}$	$0,2 \text{ s}^{-1}$

Tabelle 3.1.2: Reaktionskonstanten des vereinfachten Modell

Die Aktivierung des G-Proteins durch den Rezeptor nach Rezeptor/G-Protein Interaktion wurde nicht als zeitbestimmender Reaktionsschritt simuliert; das G-Protein wird stets mit der gleichen Rate deaktiviert ($k_{RLGaktivRLGn-aktiv} = k_{GaktivGn-aktiv}$). Eine G-Protein Aktivierung unabhängig vom Rezeptor wurde nicht berücksichtigt. Tabelle 3.1.3. zeigt die verwendeten Parameter des Modells.

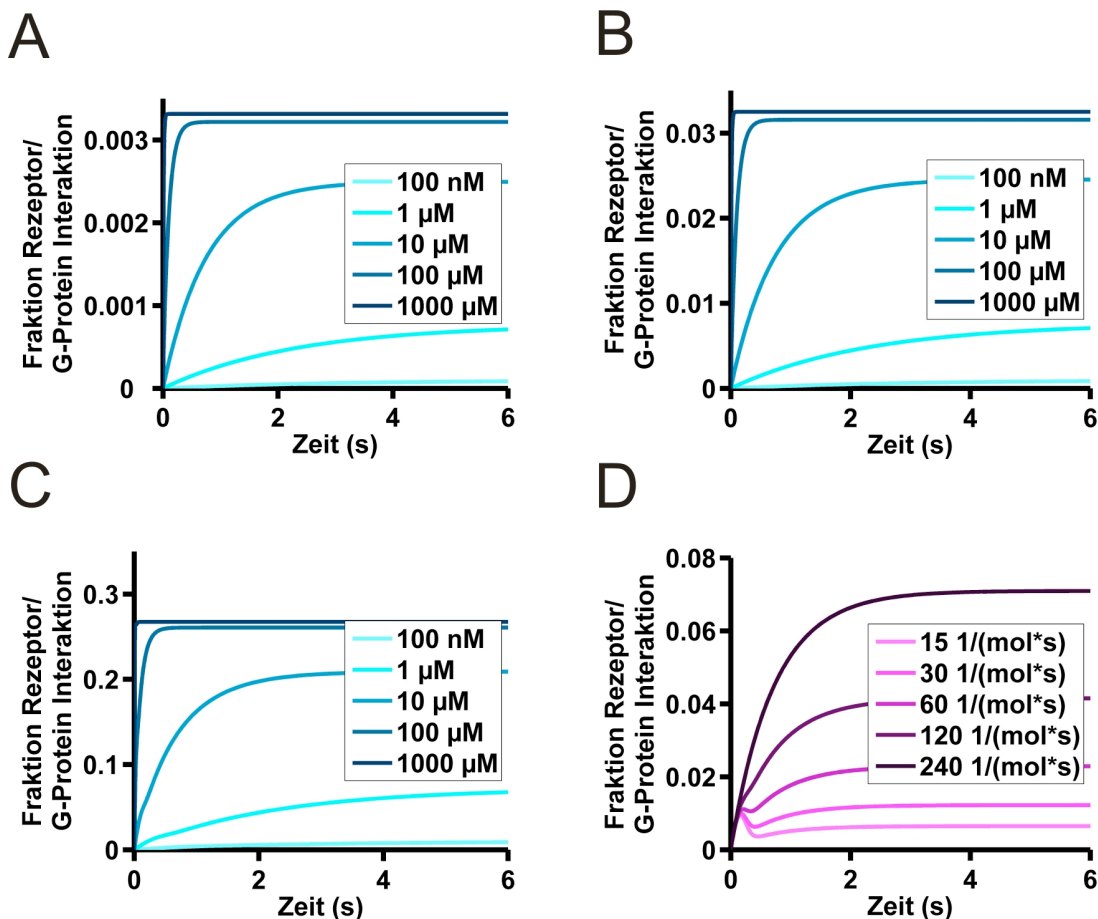


Abbildung 3.1.3.1: Receptor/G-Protein Interaktion in Abhängigkeit von R und $k_{AsoRLGaktiv}$
 (A, B, C) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fraktion der G-Proteine, die mit dem Rezeptor nach Rezeptoraktivierung interagiert für (A) $R=0,01$ M (B), $R=0,1$ M und (C) $R=1$ M. (D) Die Abhängigkeit der Kinetik ist für die angegebenen Werte der Reaktionskonstante $k_{AsoRLGaktiv}$ bei $L=10$ µM, $R=0,01$ M illustriert.

Bedeutend ist dass $k_{AsoRLGaktiv} \geq k_{AsoRLGn-aktiv}$ sein muss, um einen Verlauf der Rezeptor/G-Protein Interaktion zu simulieren, wie er den kinetischen Befunden entspricht (Hein, 2005). Alternativ entsteht ein transientes Maximum, da sich die Menge an inaktiven G-Proteinen, die mit dem aktivierten Rezeptor interagieren könnten, mit Fortlauf der Reaktion verringert (siehe Abbildung 3.1.3.1). Aus der Konkurrenz von inaktiven und aktiven G-Proteinen um den aktiven Rezeptor

resultiert ein zeitlicher Verlauf der Rezeptor/G-Protein Interaktion, der der Rezeptor-Aktivierung folgt.

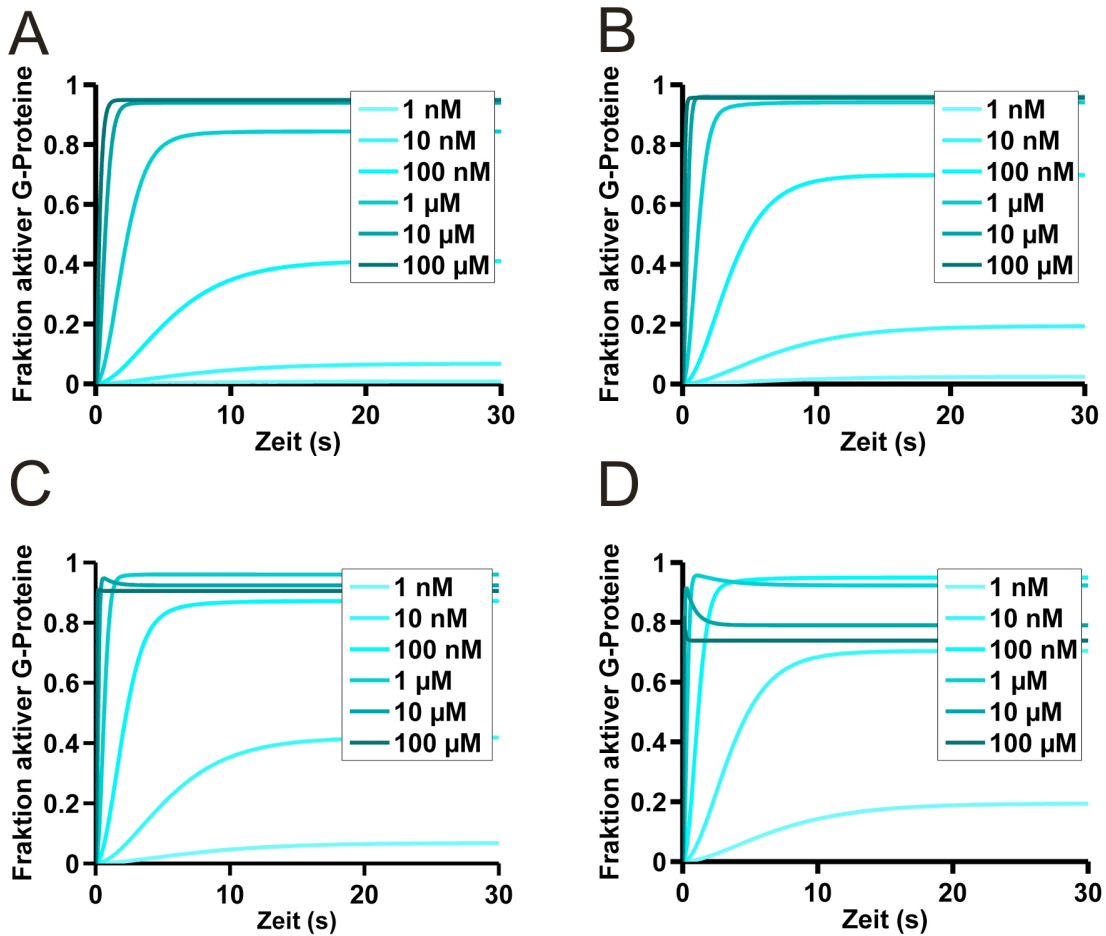


Abbildung 3.1.3.2: G-Protein in Abhängigkeit von R

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fraktion aktiver G-Proteine für (A) $R=0,03$ M, (B) $R=0,01$ M, (C) $R=0,3$ M und (D) $R=1$ M.

Für die Plausibilität des Modells ist neben der Simulation der Kinetik der Rezeptor/G-Protein Interaktion die Simulation des „sparereceptor“-Phänomens von wesentlicher Bedeutung. Bei einem hohen Rezeptor/G-Protein Verhältnis kann es bei sättigender Rezeptor-Aktivierung zu einer paradoxen Deaktivierung von G-Proteinen kommen. Diese ist Folge der Interaktion bzw. Sequestration von aktivierten G-Proteinen an aktivierten Rezeptoren (Abbildung 3.1.3.2).

Der zeitliche Verlauf der G-Protein Deaktivierung und die off-Rate der Rezeptor/G-Protein Interaktion entsprechen den veröffentlichten Befunden (Abbildung 3.1.3.3).

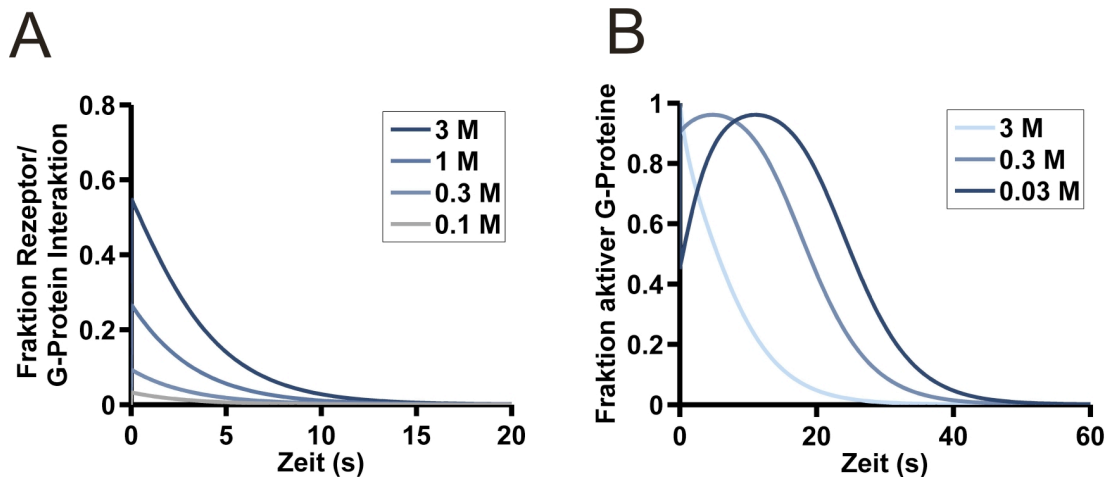


Abbildung 3.1.3.3: Rezeptor/G-Protein off-Rate und G-Protein Deaktivierung

Dargestellt ist in (A) der zeitliche Verlauf der Fraktion G-Proteine, die mit dem Rezeptor interagiert und in (B) der zeitliche Verlauf der Fraktion aktiver G-Proteine bei Abwesenheit von Agonist und der angegebenen initialen Konzentration aktiver Rezeptoren RL für maximal aktivierte G-Proteine $G_{\text{aktiv}}=1$ M.

3.2. Validierung der FRET-basierten Detektion der G-Protein Aktivierung und Rezeptor/G-Protein Interaktion in einzelnen permeabilisierten Zellen

Für die Überprüfung der Simulationsergebnisse des Modells ist es nötig, den Funktionszustand der G-Proteine experimentell festzulegen. Der Funktionszustand wird durch die Bindung von Guanin-Nukleotiden an $G\alpha$ festgelegt. Durch reversible Manipulation der intrazellulären Guanin-Nukleotid Konzentration wäre es möglich, G-Proteine gemäß des verwendeten Nukleotids (GDP oder GTP) in einem Funktionszustand festzuhalten.

Für die Detektion der Rezeptor/G-Protein Interaktion und der G-Protein Aktivierung waren FRET-basierte Methoden für Messungen an einzelnen HEK293-Zellen etabliert worden (Bünemann, 2003; Hein, 2005). Diese Methodik sollte dahingehend erweitert werden, dass sie bei festgelegter intrazellulärer Guanin-Nukleotid-Konzentration durch Permeabilisierung der Zellmembran mittels Saponin und Superfusion der permeabilisierten Zelle mit definierten Guanin-Nukleotid-Konzentrationen durchgeführt werden kann.

Anhand der Literatur war bekannt, dass 0,1 μM NA eine kaum detektierbare α_{2A} -AR/Gi/o-Protein Interaktion induziert, hingegen 100 μM NA eine deutliche Zunahme der α_{2A} -AR/Gi/o-Protein Interaktion bewirken (Hein, 2005).

Der erste Versuch sollte überprüfen, ob es in permeabilisierten Zellen möglich ist, in der Gegenwart von 10 μM GTP eine entsprechende NA-induzierte Interaktion von Go-Proteinen mit α_{2A} -AR zu detektieren. HEK293-Zellen wurden wie in 2.3.4. beschrieben transfiziert und anschließend wie in 2.3.5. beschrieben mit Saponin permeabilisiert.

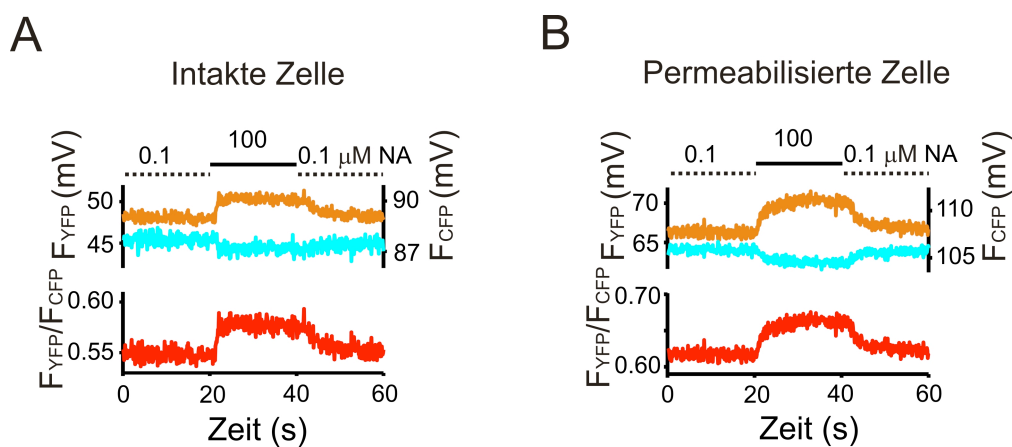


Abbildung 3.2.1: Messung der Rezeptor/G-Protein Interaktion in permeabilisierten Zellen mittels FRET

HEK293-Zellen wurden mit YFP-markiertem α_{2A} -AR, $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ transfiziert. Einzelne transfizierte Zellen wurden mit GTP und NA in angegebener Konzentration umspült. Der obere Teil der Abbildung zeigt die von der Photodiode gemessene CFP- und YFP-Intensität als elektrische Spannung an der Photodiode, der untere Teil der Abbildung den FRET zwischen YFP-markiertem α_{2A} -AR und CFP-markiertem $G\gamma_2$, ratiometrisch quantifiziert als Verhältnis aus YFP- zu CFP-Intensität (siehe 2.6.3.). (A) zeigt eine repräsentative Messung einer nicht-permeabilisierten Zelle, (B) zeigt eine repräsentative Messung einer Zelle, die zuvor durch Inkubation mit 0,005% Saponin für 1 Minute permeabilisiert worden war.

Abbildung 3.2.1 zeigt eine repräsentative Messung für eine intakte und eine permeabilisierte Zelle. Transfizierte HEK293-Zellen wurden kontinuierlich mit 10 μM GTP umspült, NA wurde wie angegeben reversibel von 0,1 μM auf 100 μM erhöht. Als Ergebnis zeigt sich für beide Versuchsbedingungen eine NA-induzierte Zunahme des FRET zwischen YFP-markierten α_{2A} -AR und CFP-markierten $G\gamma_2$, was einer vermehrten Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein entspricht (Hein, 2005). Die relative Zunahme des ratiometrischen

FRET ist proportional der Protein-Protein Interaktion und war unter beiden Bedingungen vergleichbar.

Der zweite Versuch sollte überprüfen, ob in permeabilisierten HEK293-Zellen eine Aktivierung und Deaktivierung von G-Proteinen gefunden werden kann wenn GDP gegen GTP ausgetauscht wird, die eine dem physiologischen System ähnliche Kinetik zeigt. HEK293-Zellen wurden wie in 2.3.4. beschrieben transfiziert und wie in 2.3.5. beschrieben permeabilisiert. Abbildung 3.2.2 zeigt eine repräsentative Messung. Wurden einzelne Zellen mit 10 μM GTP statt 10 μM GDP umspült, so zeigte sich in der Gegenwart von 0,1 μM NA eine Abnahme des FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$, was vereinbar mit einer Aktivierung von Go-Proteinen und Effektoren mit physiologischer Kinetik ist (Bünemann, 2003). Wurde die Umspülung anstatt mit 10 μM GTP wieder mit 10 μM GDP durchgeführt, kam es zu einer Zunahme des FRET, was vereinbar mit einer Deaktivierung von Go-Proteinen und Effektoren mit physiologischer Kinetik ist (Bünemann, 2003).

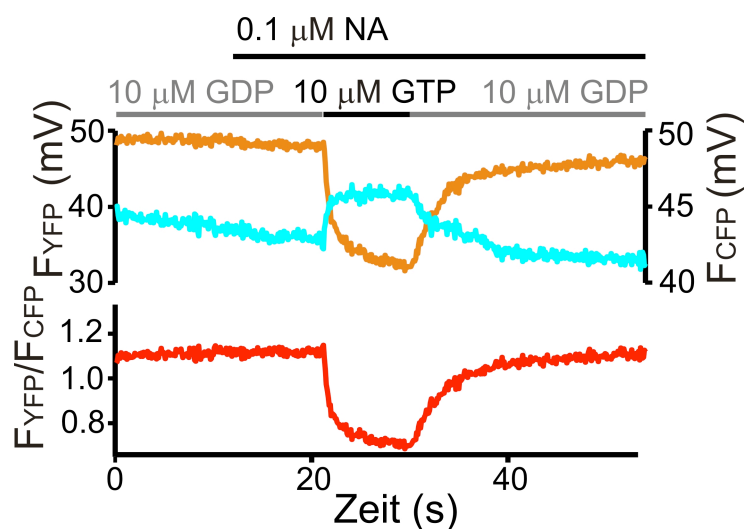


Abbildung 3.2.2: Messung der Go-Protein Aktivierung in permeabilisierten Zellen mittels FRET

HEK293-Zellen wurden mit α_{2A} -AR, YFP-markiertem $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ transfiziert und durch Inkubation mit 0,005% Saponin für 1 Minute permeabilisiert. Einzelne transfizierte und permeabilisierte Zellen wurden mit GDP, GTP und NA in angegebener Konzentration umspült. Der obere Teil der Abbildung zeigt die von der Photodiode gemessene CFP- und YFP-Intensität als elektrische Spannung an der Photodiode, der untere Teil der Abbildung den FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$, ratiometrisch quantifiziert als Verhältnis aus YFP- zu CFP-Intensität (siehe 2.6.3.).

Zusammenfassend legen beide Ergebnisse den Schluss nahe, dass sich in permeabilisierten HEK293-Zellen sowohl α_{2A} -AR/Go-Protein Interaktionen als auch Go-Protein Aktivierung mittels FRET detektieren lassen und dass ein Austausch intrazellulärer Guanin-Nukleotide durch Umspülung permeabilisierter Zellen mit verschiedenen Guanin-Nukleotiden möglich ist. Darüberhinaus sind die Ergebnisse zur α_{2A} -AR/Go-Protein Interaktion ein erster Hinweis, dass GTP-aktivierte Go-Proteine mit aktivierten α_{2A} -AR interagieren könnten.

3.3. Überprüfung der Interaktion von aktivierten Go-Proteinen mit α_{2A} -AR in permeabilisierten Zellen

Die Simulation des Modells sagen eine Interaktion von aktivierten Gi/o-Proteinen mit aktivierten α_{2A} -AR voraus. Der Funktionszustand eines G-Proteins wird durch die Bindung von Guanin-Nukleotiden an die $G\alpha$ -Untereinheit bestimmt. Der aktive Funktionszustand durch Bindung von GTP wird durch die intrinsische GTPase Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit (die GTP zu GDP hydrolysiert) beendet. Somit lässt sich anhand des Ergebnisses von 3.2. nicht unterscheiden, ob GTP-gebundenen Go-Proteine mit α_{2A} -AR interagieren, oder ob das GTP zuvor in GDP hydrolysiert worden ist.

Um diese Frage und damit die Vorhersage des Modells zu untersuchen ist es notwendig, diese „Abschaltung“ des G-Proteins durch die GTPase zu umgehen, in dem als „aktivierendes“ Nukleotid nicht GTP, sondern das nicht-hydrolysierbare Analogon $GTP\gamma S$ verwendet wurde.

HEK293-Zellen wurden wie in 2.3.4. beschrieben transfiziert und wie in 2.3.5. beschrieben permeabilisiert. Abbildung 3.3.1 zeigt eine repräsentative Messung. Transfizierte HEK293-Zellen wurden analog zu 3.2. kontinuierlich mit 1 μM $GTP\gamma S$ umspült, NA wurde wie angegeben reversibel von 0,1 μM auf 100 μM erhöht. Als Ergebnis zeigt sich eine NA-induzierte Zunahme des FRET zwischen YFP-markierten α_{2A} -AR und CFP-markierten $G\gamma_2$, was einer vermehrten Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein entspricht (Hein,

2005). Die mittlere Zunahme des ratiometrischen FRET war unter dieser Bedingung nicht signifikant von intakten Zellen verschieden.

Dieses Ergebnis war ein weiterer Hinweis, dass aktivierte Go-Proteine mit aktivierten α_{2A} -AR interagieren können.

Als nächstes sollte die Abhängigkeit der Interaktion von GTP γ S-aktivierten Go-Proteinen mit aktivierten α_{2A} -AR von der GTP γ S Konzentration untersucht werden. Für GDP ist bekannt, dass die Affinität der G α -Untereinheit für GDP sinkt, sobald G α mit einem aktiven Rezeptor interagiert. Das gleiche Prinzip könnte auch für die Interaktion von GTP- oder GTP γ S-gebundenen Go-Proteinen mit aktivierten α_{2A} -AR gelten. Im Falle einer Rezeptor/G-Protein Interaktion eines GDP-gebundenen G-Proteins kann GDP die Bindung zu G α verlassen. Der Komplex aus Rezeptor und nukleotidfreiem G-Protein ist hochaffin und daher sehr stabil (De Lean, 1980).

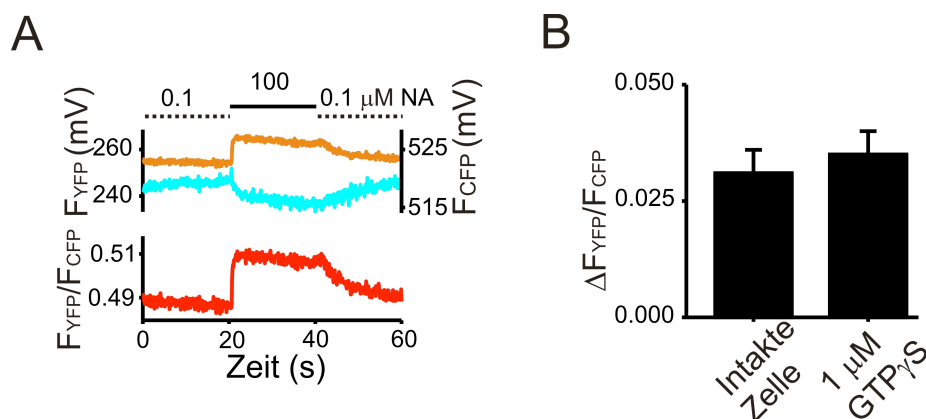


Abbildung 3.3.1: Messung der Rezeptor/G-Protein Interaktion in permeabilisierten Zellen mittels FRET

HEK293-Zellen wurden mit YFP-markiertem α_{2A} -AR, G α_o , G β_1 und CFP-markiertem G γ_2 transfiziert und durch Inkubation mit 0,005% Saponin für 1 Minute permeabilisiert. Einzelne transfizierte Zellen wurden mit GTP γ S und NA in angegebener Konzentration umspült. (A) zeigt eine repräsentative Messung. Der obere Teil der Abbildung zeigt die von der Photodiode gemessene CFP- und YFP-Intensität als elektrische Spannung an der Photodiode, der untere Teil der Abbildung den FRET zwischen YFP-markiertem α_{2A} -AR und CFP-markiertem G γ_2 , ratiometrisch quantifiziert als Verhältnis aus YFP- zu CFP-Intensität (siehe 2.6.3.). (B) zeigt die mittlere Zunahme des ratiometrischen FRET unter 100 μ M NA für intakte Zellen und permeabilisierte Zellen in Gegenwart von 1 μ M GTP γ S (intakt: n=6; GTP γ S: n=9).

Daraus folgt, dass Interaktionen nukleotid-gebundener G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren eher transient und Interaktionen nukleotidfreier G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren eher stabil sein sollten.

Somit wäre als Hypothese zu erwarten, dass die (mittels FRET detektierbaren) agonistinduzierten Rezeptor/G-Protein Interaktionen bei Umspülung transfizierter, permabilisierter Zellen mit abnehmenden Konzentrationen von Guanin-Nukleotiden größer werden und in der Abwesenheit von Guanin-Nukleotiden maximal sind. Umgekehrt müssten agonistinduzierte Rezeptor/G-Protein Interaktionen bei zunehmender Konzentration von Guanin-Nukleotiden und abnehmender Konzentration von Agonist minimal werden.

In folgendem Versuch sollte diese Hypothese überprüft werden. HEK293-Zellen wurden wie in 2.3.4. beschrieben transfiziert und wie in 2.3.5. beschrieben permeabilisiert. Zuerst wurden die Zellen mit 100 μM NA umspült. Hierbei wurde eine Zunahme des FRET zwischen YFP-markierten α_{2A} -AR und CFP-markierten $G_{\gamma 2}$ detektiert, was einer Zunahme der Interaktionen zwischen Rezeptor und G-Protein entspricht (Hein, 2005). Dieser FRET-Anstieg zeigte nach 5 Minuten ein Gleichgewichtszustand, der als Maximum der Rezeptor/G-Protein Interaktion definiert wurde. Danach wurden die Zellen für 120 Sekunden mit 100 μM NA und der angegebenen Konzentration eines Guanin-Nukleotids umspült. Unabhängig vom Guanin-Nukleotid zeigte sich eine Abnahme des FRET zwischen YFP-markierten α_{2A} -AR und CFP-markierten $G_{\gamma 2}$ auf ein niedrigeres Gleichgewicht detektiert. Anschließend wurden Zellen für 120 Sekunden nur mit der angegebenen Konzentration eines Guanin-Nukleotids ohne NA umspült. Hierbei wurde unter allen Versuchsbedingungen eine weitere Abnahme des FRET zwischen YFP-markierten α_{2A} -AR und CFP-markierten $G_{\gamma 2}$ auf ein noch niedrigeres Gleichgewicht detektiert, was als Minimum der Interaktionen zwischen Rezeptor und G-Proteinen definiert wurde. Als Kontrolle wurden die Zellen abschließend für weitere 120 Sekunden mit 100 μM NA und der angegebenen Konzentration eines Guanin-Nukleotids umspült. Hierbei wurde wieder ein Anstieg des FRET zwischen YFP-markierten α_{2A} -AR und CFP-markierten $G_{\gamma 2}$ auf ein vergleichbares Gleichgewicht wie zuvor detektiert, was also der NA-induzierten Zunahme der Interaktionen zwischen Rezeptoren und G-Proteinen entspricht.

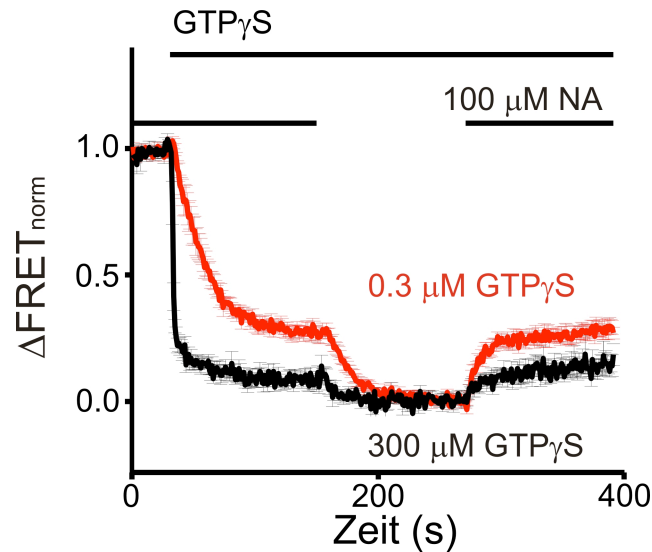


Abbildung 3.3.2: Gemittelte Messung der Rezeptor/G-Protein Interaktion in permeabilisierten Zellen mittels FRET

HEK293-Zellen wurden mit YFP-markiertem α_{2A} -AR, $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ transfiziert und durch Inkubation mit 0,005% Saponin für 1 Minute permeabilisiert. Einzelne transfizierte und permeabilisierte Zellen wurden mit $GTP\gamma S$ und NA in angegebener Konzentration umspült. Die Abbildung illustriert den mittleren FRET zwischen YFP-markiertem α_{2A} -AR und CFP-markiertem $G\gamma_2$ (ratiometrisch quantifiziert wie in 2.6.2. beschrieben und normalisiert auf die maximale und minimale Rezeptor/G-Protein Interaktion, wie in 2.6.4. definiert) bei Umspülung einzelner transfizierter Zellen mit $GTP\gamma S$ und NA wie angegeben (0,3 μM $GTP\gamma S$: n=11, rot; 300 μM $GTP\gamma S$: n=7, schwarz).

Wie in Abbildung 3.3.2 und 3.3.3 illustriert wurde die Hypothese von den Versuchsergebnissen bestätigt. In der Abwesenheit von Nukleotid erschien die NA-induzierte Rezeptor/G-Protein Interaktion maximal. In Gegenwart einer niedrigen Nukleotid-Konzentration war die NA-induzierte Rezeptor/G-Protein Interaktion (normalisiert auf die maximale Rezeptor/G-Protein Interaktion und minimale Rezeptor/G-Protein Interaktion wie in 2.6.4. definiert) signifikant größer als in Gegenwart einer hohen Nukleotid-Konzentration.

Als Kontrolle wurde überprüft, ob die nukleotidinduzierte Abnahme der Rezeptor/G-Protein Interaktion unter allen getesteten Nukleotid-Bedingungen gleich ist. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die verschiedenen Bedingungen.

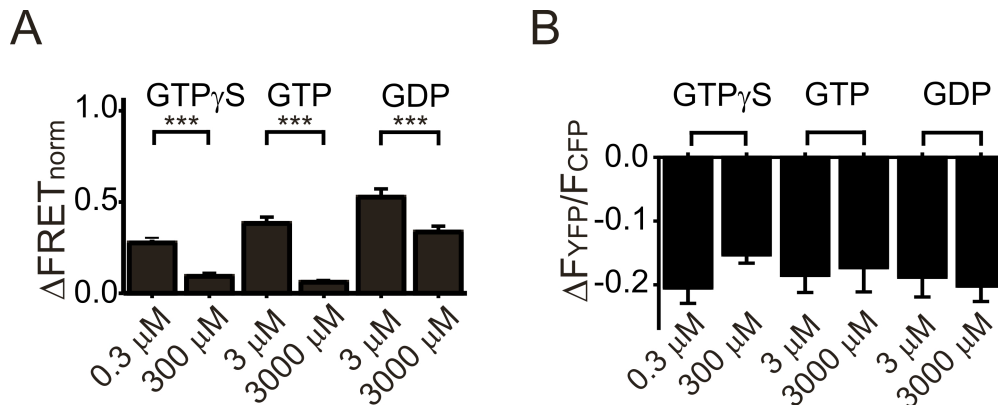


Abbildung 3.3.3: Agonistinduzierte Zunahme und nukleotidinduzierte Abnahme der Rezeptor/G-Protein Interaktion in permeabilisierten Zellen

HEK293-Zellen wurden mit YFP-markiertem α_{2A} -AR, $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ transfiziert und durch Inkubation mit 0,005% Saponin für 1 Minute permeabilisiert. Einzelne transfizierte und permeabilisierte Zellen wurden mit Guanin-Nukleotid und NA in angegebener Konzentration umspült. (A) illustrierte die mittlere NA-induzierte Zunahme des FRET zwischen YFP-markiertem α_{2A} -AR und CFP-markiertem $G\gamma_2$, (ratiometrisch quantifiziert wie in 2.6.3. beschrieben und normalisiert auf die maximale und minimale Rezeptor/G-Protein Interaktion, wie in 2.6.4. definiert) für die verschiedenen untersuchten Nukleotid-Bedingungen (n=8 bis n=12, *** bedeutet $p < 0,001$). (B) illustriert die mittlere nukleotidinduzierte Abnahme des ratiometrischen FRET (siehe 2.6.3.) von maximaler Rezeptor/G-Protein Interaktion ausgehend für die verschiedenen untersuchten Nukleotid-Bedingungen (n=8 bis n=12, kein signifikanter Unterschied).

Zusammenfassend bestätigen die Versuchsergebnisse die Voraussage des Modells, dass aktivierte G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren interagieren können. Ferner bestätigen sie die Hypothese, dass Interaktionen aktivierter G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren eher transient sind, weshalb für hohe Nukleotid Konzentrationen eine geringe agonistinduzierte Rezeptor/G-Protein Interaktion gefunden wurde.

3.4. Verlust von GTP γ S und Deaktivierung GTP γ S-aktivierter Go-Proteinen durch aktivierte α_{2A} -AR in permeabilisierten Zellen

In 3.2. und 3.3. wurden experimentelle Hinweise für die Hypothese gefunden, dass aktivierte G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren interagieren können und dass während der Interaktion ein Verlust des Nukleotides mit folgender Sequestration des G-Proteins im nukleotidfreien Zustand am aktivierten Rezeptor möglich ist.

Diese Hypothese könnte zwei weitere Befunde erhärten: (I) radioaktiv markiertes $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ kann gegen nicht markiertes $\text{GTP}\gamma\text{S}$ durch Aktivierung des $\alpha_{2\text{A}}\text{-AR}$ ausgetauscht werden; (II) $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -präaktivierte Go-Proteine werden in permeabilisierten Zellen bei Wegnahme des $\text{GTP}\gamma\text{S}$ in Abhängigkeit von der Aktivierung des $\alpha_{2\text{A}}\text{-AR}$ inaktiviert.

Im ersten Versuch sollte überprüft werden, ob radioaktiv markiertes $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ gegen nicht markiertes $\text{GTP}\gamma\text{S}$ durch Aktivierung des $\alpha_{2\text{A}}\text{-AR}$ ausgetauscht werden kann. Hierzu wurden Zellmembranen von HEK293-Zellen, die $\alpha_{2\text{A}}\text{-AR}$ -Rezeptoren stabil exprimierten (Klon I), für 10 Minuten mit 3×10^5 cpm $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ und $0,1 \mu\text{M}$ NA inkubiert, wie in 2.4.3. beschrieben. Nach 10 Minuten hatte $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ an Gi/o-Proteine sättigend gebunden. Der Reaktionsansatz wurde dann auf zwei Bedingungen aufgeteilt. Die erste Bedingung wurde mit 1 mM des $\alpha_{2\text{A}}\text{-AR}$ Antagonisten Rauwolscin und mit $100 \mu\text{M}$ $\text{GTP}\gamma\text{S}$ inkubiert. Erwartet wurde, dass es aufgrund der weitgehenden Inaktivierung der $\alpha_{2\text{A}}\text{-AR}$ durch den Antagonisten Rauwolscin trotz des Überschusses an $\text{GTP}\gamma\text{S}$ nicht zu einem bedeutenden Rückgang der $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ -Bindung kommt. Die zweite Bedingung wurde mit $100 \mu\text{M}$ NA und $100 \mu\text{M}$ $\text{GTP}\gamma\text{S}$ inkubiert. Erwartet wurde, dass es aufgrund der maximalen Aktivierung des $\alpha_{2\text{A}}\text{-AR}$ zu einem deutlichen Rückgang der $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ -Bindung kommt.

Wie in Abbildung 3.4.1 illustriert wurden die Erwartungen bestätigt. Die erste Bedingung zeigte nach 15 Minuten Inkubation eine signifikant geringere Abnahme der $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ -Bindung als die zweite Bedingung ($16,9\% \pm 1,6\%$ vs. $94,4\% \pm 0,7\%$, $n=3$).

Im zweiten Versuch sollte überprüft werden, ob $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -präaktivierte Go-Proteine in permeabilisierten Zellen bei Wegnahme des $\text{GTP}\gamma\text{S}$ in Abhängigkeit von der Aktivierung des $\alpha_{2\text{A}}\text{-AR}$ inaktiviert werden können. HEK293-Zellen, die $\alpha_{2\text{A}}\text{-AR}$ stabil exprimierten, wurden wie in 2.3.4. beschrieben transfiziert und wie in 2.3.5. beschrieben permeabilisiert.

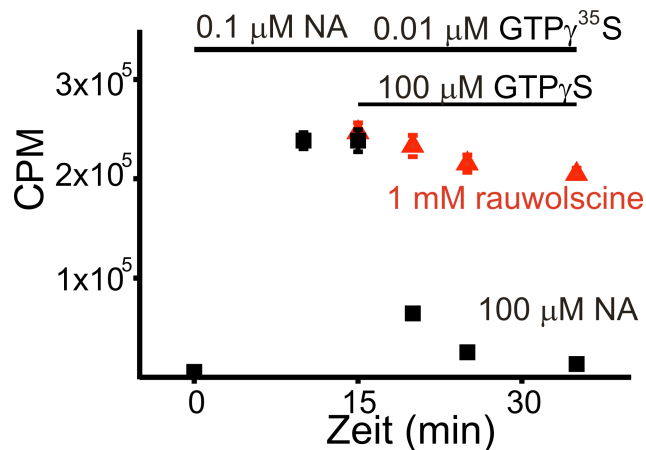


Abbildung 3.4.1: Messung der GTP γ ³⁵S-Bindung in HEK293-Zellmembranen

Zellmembranen von HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimierten (Klon I) wurden für 10 Minuten mit 3×10^5 cpm GTP γ ³⁵S und $0,1 \mu\text{M}$ NA inkubiert, wodurch GTP γ ³⁵S an Gi/o-Proteine sättigend gebunden hatte (wie in 2.4.3. angegeben). Danach wurde die erste Bedingung mit 1 mM des α_{2A} -AR Antagonisten Rauwolscin und mit $100 \mu\text{M}$ GTP γ S inkubiert wie angegeben. Die zweite Bedingung wurde mit $100 \mu\text{M}$ NA und $100 \mu\text{M}$ GTP γ S inkubiert. Dargestellt sind die mittleren cpm (counts per minute) des verwendeten Beckman LS-1801 Counters, wie sie in einer $200 \mu\text{l}$ Probe des Reaktionsansatzes zum jeweilig angegebenen Zeitpunkt bestimmt worden waren ($n=3$ für jede Bedingung).

Einzelne transfizierte Zellen wurden mit $0,1 \mu\text{M}$ NA und $1 \mu\text{M}$ GTP γ S umspült. Dabei wurde eine Abnahme des FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markierten $G\gamma_2$ bis zu einem konstanten Minimum beobachtet, was vereinbar mit einer maximalen Aktivierung von Go-Proteinen ist (Frank, 2005) und als solche definiert wurde. Im folgenden wurde die Umspülung mit NA beendet, was zu keiner Veränderung des FRET führte. Nach 30 Sekunden wurden die Zellen mit NA ohne GTP γ S für weitere 5 Minuten umspült. Zur Normalisierung der Änderung des FRET wurde abschließend neben der maximalen auch die minimale Go-Protein Aktivierung bestimmt. Als minimale G-Protein Aktivierung wurde das Gleichgewicht des FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ nach 5 Minuten Umspülung von transfizierten Zellen mit $100 \mu\text{M}$ NA definiert.

Erwartet wurde, dass es nach maximaler Go-Protein Aktivierung bei Umspülung der Zellen mit $0,1 \mu\text{M}$ NA ohne die Gegenwart von GTP γ S zu einem langsameren Anstieg des FRET kommt, was eine als bei weiterer Umspülung der Zellen mit $100 \mu\text{M}$ NA ohne die Gegenwart von GTP γ S.

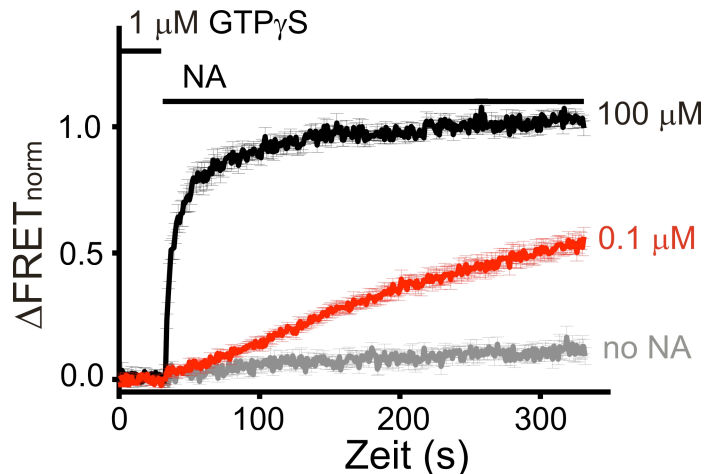


Abbildung 3.4.2: Gemittelte Messung der G-Protein Aktivierung in permeabilisierten Zellen mittels FRET

HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimierten (Klon I), wurden mit YFP-markiertem $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ transfiziert und durch Inkubation mit 0,005% Saponin für 1 Minute permeabilisiert. Die Abbildung illustriert den mittleren relativen FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ (ratiometrisch quantifiziert wie in 2.6.3. beschrieben und normalisiert auf die maximale und minimale Go-Protein Aktivierung, wie in 2.6.4. definiert), bei Umspülung einzelner transfizierter Zellen mit $GTP\gamma S$ und NA in angegebener Konzentration (n=7).

Wie Abbildung 3.4.2 zeigt wurde die Hypothesen bestätigt. Wurden transfizierte Zellen nur mit intrazellulärem Puffer umspült, kam es so einer Zunahme des FRET von weniger als 10% über 5 Minuten. Wurden die Zellen mit 0,1 μM NA umspült kam es zu einer Zunahme des normierten FRET von etwa 50% nach 5 Minuten, was einer Deaktivierung von etwa 50% der Go-Proteine entspricht. Bei Umspülung mit 100 μM NA kam es nach 5 Minuten zu einer maximalen Deaktivierung der Go-Proteine.

3.5. Reversible Deaktivierung GTP- und $GTP\gamma S$ -präaktivierter Go-Proteine bei maximaler Aktivierung von α_{2A} -AR

Im Kontext zu den Ergebnissen der Rezeptor/G-Protein Interaktion (siehe 3.3.) wäre denkbar, dass bei einer niedrigen Konzentration von GTP oder $GTP\gamma S$ Go-Proteine während maximaler Rezeptoraktivierung durch 100 μM NA nur submaximal aktiviert werden, weil eine Fraktion der Go-Proteine im inaktiven, nukleotidfreien Funktionszustand am Rezeptor sequestriert wird. Für

verschiedene Konzentrationen von NA sollte sich für das Ausmaß dieser Deaktivierung in einer einzelnen Zelle eine Konzentrationsabhängigkeit zeigen, die der Bindung von NA am α_{2A} -AR entspricht. In Gegenwart einer hohen Nukleotid Konzentration sollten Go-Proteine hingegen auch bei maximaler Rezeptoraktivierung maximal aktiviert werden können.

HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimierten, wurden wie in 2.3.4. beschrieben transfiziert und wie in 2.3.5. beschrieben permeabilisiert. In weiteren Vorversuchen (nicht gezeigt) war bestätigt worden, dass in Gegenwart von 1 μ M GTP γ S in der verwendeten HEK293-Zelllinie, die α_{2A} -AR stabil exprimiert, bereits die Stimulation des α_{2A} -AR mit 0,1 μ M NA ausreicht um eine vollständige Aktivierung der zellulären Go-Proteine zu erreichen. Aufgrund des K_d von 5 μ M von NA an den α_{2A} -AR wurde erwartet, dass in permeabilisierten Zellen in Gegenwart von 0,1 μ M NA weniger als 5% der Rezeptoren aktiviert sind.

Wie in Abbildung 3.5.1 anhand einer repräsentativen Messung illustriert, kann die Hypothese in Gegenwart von einer niedrigen physiologischen GTP Konzentration von 10 μ M bestätigt werden. Einzelne transfizierte Zellen wurden mit nukleotidfreiem intrazellulären Puffer und 100 μ M NA umspült, bis der FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ maximal wurde, was einer maximalen Deaktivierung von Go-Proteinen entspricht (siehe auch 3.4.2. und 2.6.4.). Anschließend wurde die gleiche Zelle mit 10 μ M GTP und 0,1 μ M NA umspült, bis der FRET minimal wurde, was einer maximalen Go-Protein Aktivierung entspricht (siehe 3.4.2. und 2.6.4.). Nach Erreichen des Gleichgewichts wurde die Umspülung mit NA reversibel auf 100 μ M NA erhöht. Wie erwartet nahm während der Umspülung mit 100 μ M NA der FRET zu, was mit einem Rückgang der Go-Protein Aktivierung vereinbar ist.

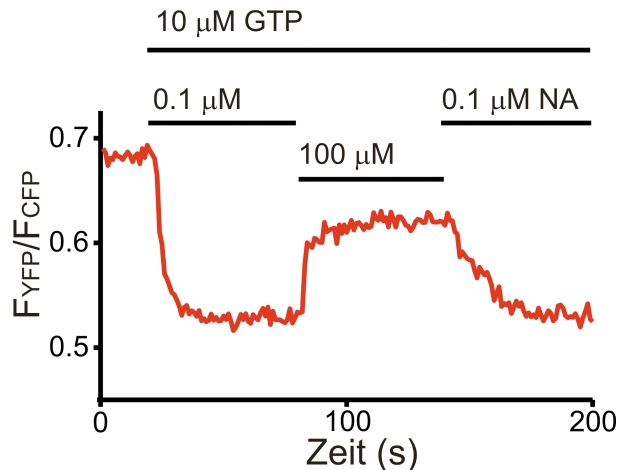


Abbildung 3.5.1: Messung der G-Protein Aktivierung in permeabilisierten Zellen mittels FRET

HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimierten (Klon I), wurden mit YFP-markiertem $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ transfiziert und durch Inkubation mit 0,005% Saponin für 1 Minute permeabilisiert. Dargestellt ist der FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$, ratiometrisch quantifiziert als Verhältnis aus YFP- zu CFP-Intensität (siehe 2.6.3.), bei Umspülung einzelner transfizierter und permeabilisierter Zellen mit GTP und NA in angegebener Konzentration.

Da es denkbar wäre, dass GTP vor oder während Bindung der GTP-beladenen $G\alpha$ -Untereinheit in GDP hydrolysiert wird, wurde der Versuch in Gegenwart von 1 μM und 100 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ wiederholt. Abbildung 3.5.2. illustriert die Ergebnisse.

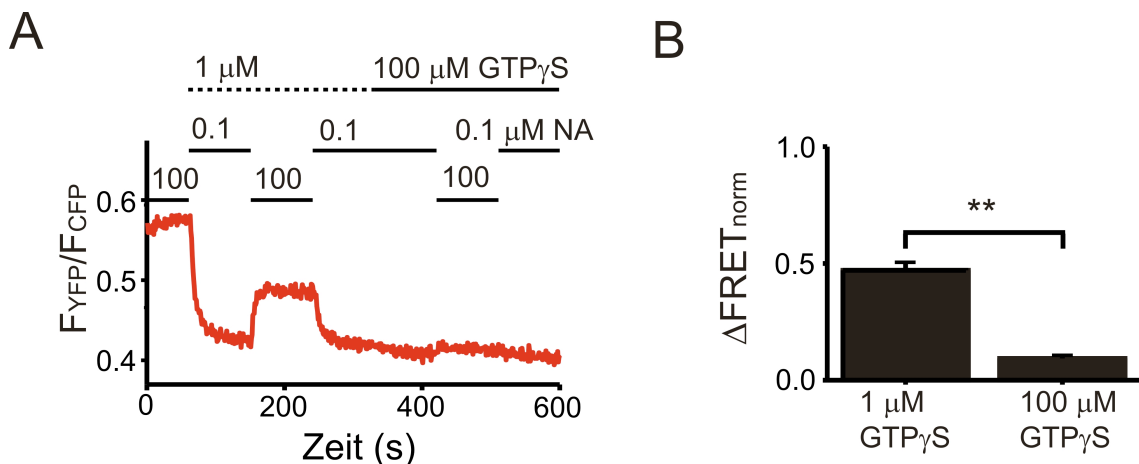


Abbildung 3.5.2: Messung der G-Protein Aktivierung in permeabilisierten Zellen mittels FRET

HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimierten (Klon I), wurden mit YFP-markiertem $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ transfiziert und durch Inkubation mit 0,005% Saponin für 1 Minute permeabilisiert. (A) zeigt eine repräsentative Messung des FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ (ratiometrisch quantifiziert wie in 2.6.3. beschrieben) bei Umspülung einzelner transfizierter und permeabilisierter Zellen mit $\text{GTP}\gamma\text{S}$ und NA in angegebener Konzentration. (B) Die Zunahme des FRET während Stimulation mit 100 μM NA wurde in den einzelnen Messungen auf die jeweilige maximale und minimale $G\alpha$ -Protein Aktivierung normalisiert (wie in 2.6.4. definiert) und gemittelt ($n=8$). ** bedeutet $p<0,01$.

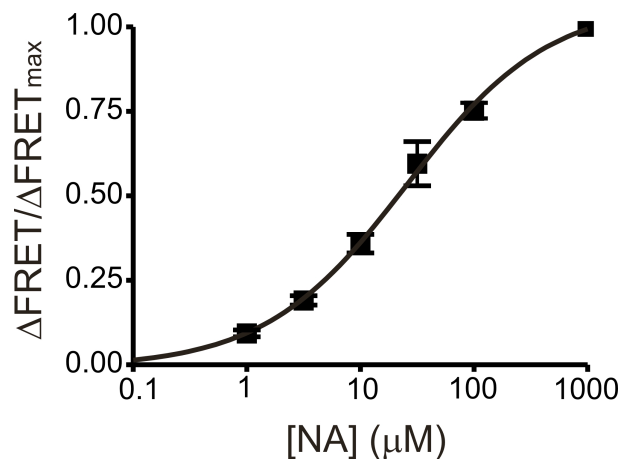


Abbildung 3.5.3: Konzentrations-Wirkungskurve der NA-induzierten Go-Protein Deaktivierung in permeabilisierten Zellen in Gegenwart von 1 µM GTPγS

HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimierten (Klon I), wurden mit YFP-markiertem $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ transfiziert und durch Inkubation mit 0,005% Saponin für 1 Minute permeabilisiert. Die Zunahme des FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ (ratiometrisch quantifiziert wie in 2.6.3. beschrieben) während Umspülung mit 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM und 100 µM von 0,1 µM NA ausgehend wurde auf die Zunahme während Umspülung mit 1000 µM NA normalisiert ($4,6 \pm 0,06$, $n=8$)

Wie erwartet nahm während Umspülung mit 100 µM NA der FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ zu, was mit einem Rückgang der Go-Protein Aktivierung vereinbar ist; in Gegenwart von 100 µM GTPγS zeigte sich bei 100 µM NA wie erwartet ein signifikant geringerer Anstieg des normalisierten FRET ($9,3\% \pm 3,7\%$ vs. $47,1\% \pm 9,7\%$, $n=8$, normalisiert auf minimale und maximale G-Protein Aktivierung).

Das relative Ausmaß des Anstiegs des FRET während Umspülung der Zelle mit zunehmender Konzentration von NA, normalisiert auf den Anstieg während Umspülung mit 1000 µM NA sollte der Hypothese nach der Aktivierung des α_{2A} -Rezeptors entsprechen. Erwartet wurde, dass der EC_{50} dieser Konzentrations-Wirkungskurve in Näherung zum K_d der NA-Bindung an den α_{2A} -AR liegt. Wie in Abbildung 3.5.3 illustriert konnte diese Erwartung nicht bestätigt werden. Der pEC_{50} betrug $4,6 \pm 0,06$ ($n=8$), was um eine Größenordnung niedriger ist als der beschriebene pK_d von NA (Bünemann, 2001). Eine ähnliche Verschiebung des pEC_{50} bei permeabilisierten Zellen im Vergleich zu intakten Zellen wurde für die Aktivierung des FRET-basierten α_{2A} -AR Sensors α_{2A} -cam gefunden (permeabilisierte Zellen: $3,8 \pm 0,05$, $n=5$; intakte Zellen: $5,4 \pm 0,02$, $n=6$).

3.6. Deaktivierung präaktivierter Go-Proteine und GIRK-Kanäle durch aktivierte α_{2A} -AR in intakten HEK293-Zellen

Die Ergebnisse von 3.5. legen die Vermutung nahe, dass nicht nur in permeabilisierten, sondern auch in intakten Zellen eine Deaktivierung von Go-Proteinen bei maximaler Rezeptoraktivierung beobachtet werden kann. Eine Deaktivierung von Go-Proteinen sollte sich in Form einer Abschwächung der Aktivität von Go-Protein Effektoren (wie zum Beispiel dem GIRK-Kanal) während maximaler Rezeptorstimulation wiederfinden (Hypothese I). Das Ausmaß dieser Deaktivierung bzw. Abschwächung sollte in guter Näherung zur Aktivierung des α_{2A} -AR liegen (Hypothese II), wie in 3.5. erläutert.

HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimierten, wurden zur Bestimmung der G-Protein Aktivierung und zur Messung von GIRK-Kanal Strömen wie in 2.3.4. beschrieben transfiziert.

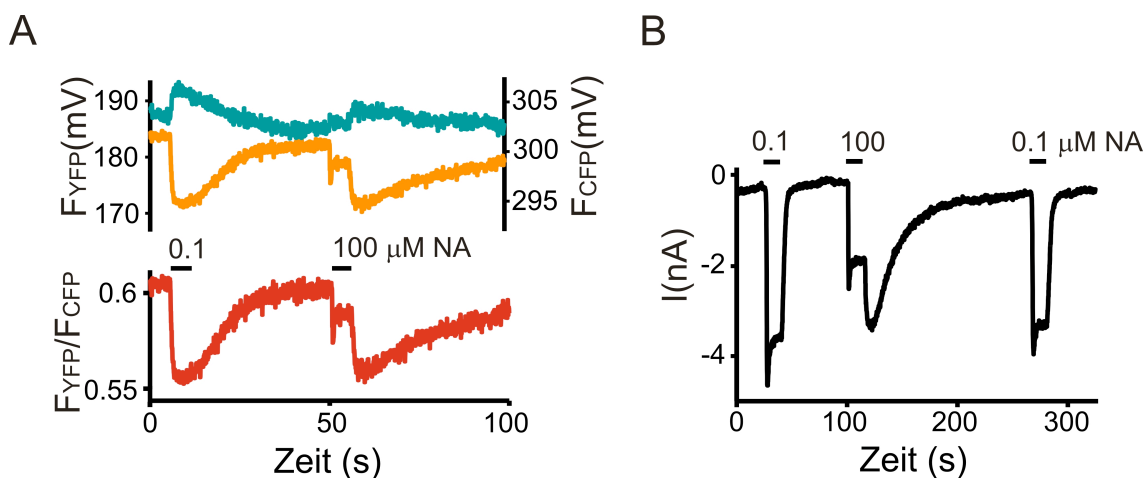


Abbildung 3.6.1: Messung der Go-Protein Aktivierung und des GIRK-Kanal Stroms in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimierten (Klon I), wurden in (A) mit YFP-markiertem $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ und in (B) mit $G\alpha_o$, GIRK1/4 und mGFP transfiziert. (A) illustriert eine repräsentative Messung des FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ (ratiometrisch quantifiziert wie in 2.6.3. beschrieben) während Umspülung mit NA wie angegeben. (B) illustriert eine repräsentative Messung von GIRK-Kanal Strömen während Umspülung mit NA wie angegeben.

Wie in Abbildung 3.6.1 anhand einer repräsentativen Messung sowohl für FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ als auch für GIRK-Kanal Ströme illustriert konnte die erste Hypothese bestätigt werden. Bei

Umspülung einzelner transfizierter Zellen mit 0,1 μM NA zeigte sich ein maximaler Rückgang des FRET, was mit einer maximalen Go-Protein Aktivierung vereinbar ist. Während Umspülung mit 100 μM NA zeigte sich eine Zunahme des FRET, was vereinbar mit einer submaximalen Aktivierung der Go-Proteine ist. Bei Auswaschen von 100 μM NA zeigte sich dann wiederum ein maximaler Rückgang des FRET, vereinbar mit maximaler Aktivierung der Go-Proteine. Qualitativ konnte die gleiche Beobachtung bei der Messung von GIRK-Kanal Strömen gemacht werden: Bei Umspülung mit 0,1 μM NA waren diese Ströme maximal, während der Umspülung mit 100 μM NA waren sie submaximal und während des Auswaschens erreichten sie für kurze Zeit wieder die maximale Amplitude.

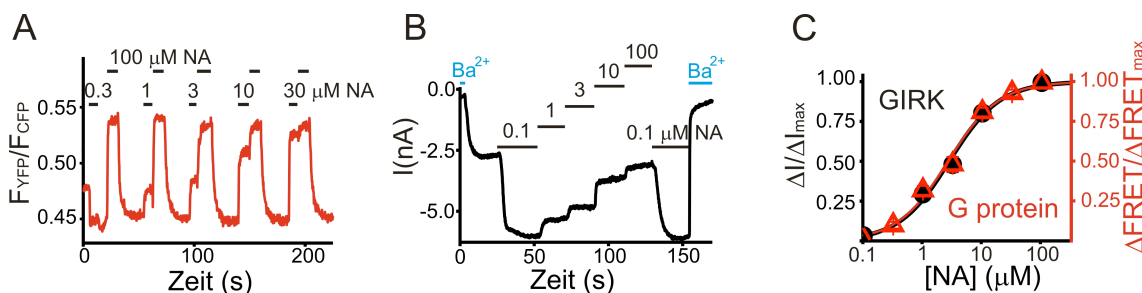


Abbildung 3.6.2: Konzentrations-Wirkungskurve der NA-induzierten Go-Protein Deaktivierung und GIRK-Kanal Strom Abschwächung

HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimierten (Klon I), wurden in (A) mit YFP-markiertem $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ und in (B) mit $G\alpha_o$, GIRK1/4 und mGFP transfiziert. (A) illustriert eine repräsentative Messung des FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ (ratiometrisch quantifiziert wie in 2.6.3. beschrieben) während Umspülung mit NA wie angegeben. (B) illustriert eine repräsentative Messung von GIRK-Kanal Strömen während Umspülung mit NA und Ba^{2+} (zur spezifischen Blockade der GIRK-Kanäle) wie angegeben. (C) zeigt die resultierenden Konzentrations-Wirkungskurven, wenn die Zunahme des FRET bzw. Rückgang der GIRK-Kanal Ströme für ansteigende NA-Konzentrationen auf die Zunahme des FRET bzw. Rückgang der GIRK-Kanal Ströme während Umspülung mit 100 μM NA normalisiert wurde (FRET (rot): $pEC_{50}=5,6 \pm 0,04$, $n=8$; GIRK-Kanal Ströme (schwarz): $pEC_{50}=5,5 \pm 0,04$, $n=7$).

Wie in Abbildung 3.6.2 illustriert bestätigen die Versuchsergebnisse die zweite Hypothese. Wurde die Zunahme des FRET bei ansteigenden Konzentrationen von NA auf die Zunahme des FRET während Superfusion mit 100 μM NA normalisiert, bzw. wurde der Rückgang der GIRK-Kanal Ströme bei ansteigenden Konzentrationen von NA auf den Rückgang während Superfusion mit 100 μM NA normalisiert so zeigte sich eine annähernd identische

Konzentrations-Wirkungskurve (Zunahme des FRET: $pEC_{50}=5,6 \pm 0,04$ ($n=8$)
 GIRK-Kanal Ströme: $pEC_{50}=5,5 \pm 0,04$).

Abbildung 3.6.3 illustriert, dass der zeitliche Verlauf der Deaktivierung und Reaktivierung von Go-Proteinen und GIRK-Kanälen während Umspülung mit und Auswaschen von 100 μM NA identisch zu sein scheint.

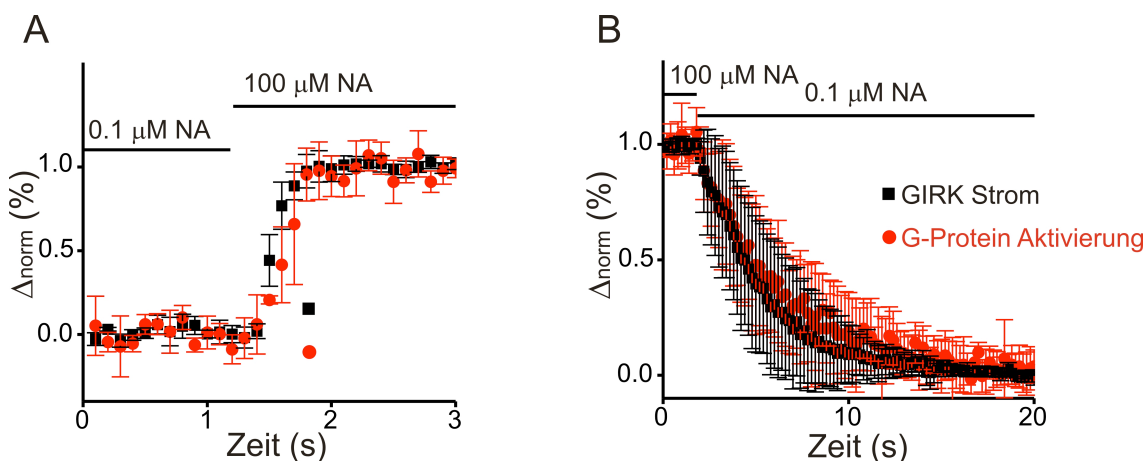


Abbildung 3.6.3: Zeitlicher Verlauf der Deaktivierung und Reaktivierung von Go-Proteinen und GIRK-Kanal Strömen in HEK293-Zellen während

HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR stabil exprimierten, wurden in (A) mit YFP-markiertem $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ und in (B) mit $G\alpha_o$, GIRK1/4 und mGFP transfiziert. (A) illustriert den mittleren zeitlichen Verlauf der Deaktivierung von Go-Proteinen und GIRK-Kanälen beim Umschalten der Umspülung von 0,1 μM NA auf 100 μM NA. Die Deaktivierung von Go-Proteinen wurde anhand des FRET zwischen YFP-markiertem $G\alpha_o$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ bestimmt und auf den mittleren FRET im Gleichgewicht während Umspülung mit 0,1 μM und mit 100 μM NA normalisiert und anschließend gemittelt ($n=8$). GIRK-Kanal Ströme wurden analog auf den mittleren Strom im Gleichgewicht während Umspülung mit 0,1 μM und mit 100 μM NA normalisiert und anschließend gemittelt ($n=5$). (B) illustriert den mittleren zeitlichen Verlauf der Go-Protein und GIRK-Kanal Reaktivierung bei Auswaschen von 100 μM NA (gleiche Bedingungen wie zuvor).

Das Modell sagt voraus, dass eine Deaktivierung von Go-Proteinen bei maximaler Rezeptoraktivierung eine hohe Rezeptorexpression benötigt. Um diese Vorhersage zu überprüfen sollte untersucht werden, wie stark die mittlere Deaktivierung von Go-Proteinen bei Umspülung mit 100 μM NA sowohl in der verwendeten HEK293-Zelllinie, die α_{2A} -AR mit 19,9 pmol/mg exprimiert, als auch in einer zweiten HEK293-Zelllinie, die den α_{2A} -AR mit 2,2 pmol/mg exprimiert, ist. Zur Quantifizierung wurde der mittlere Anstieg des ratiometrischen FRET bei reversibler Umspülung einzelner transfizierter Zellen mit 100 μM NA ausgehend von 0,1 μM NA gewählt. Es zeigte sich hierbei ein signifikant größer Anstieg des FRET in der hoch exprimierenden Zelllinie (vgl.

Abbildung 3.6.4). Dies bedeutet, dass das Ausmaß der G-Protein Deaktivierung signifikant größer ist.

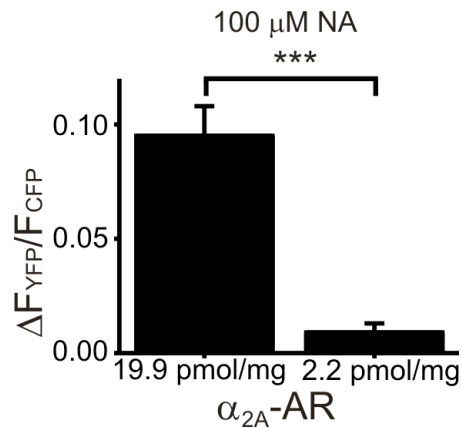


Abbildung 3.6.4: Ausmaß der NA-induzierten Go-Protein Deaktivierung für zwei α_{2A} -AR exprimierende Zelllinien

HEK293-Zellen, die α_{2A} -AR entweder mit 19,9 pmol/mg oder 2,2 pmol/mg stabil exprimierten, wurden mit YFP-markiertem $G\alpha_o$, $G\beta_1$ und CFP-markiertem $G\gamma_2$ transfiziert. Quantifiziert wurde der mittlere Anstieg des ratiometrischen FRET bei reversibler Umspülung einzelner transfizierter Zellen mit 100 μM NA ausgehend von 0,1 μM NA (19,9 pmol/mg α_{2A} -AR: 0,095 ± 0,013, n=14; 2,2 pmol/mg α_{2A} -AR: 0,009 ± 0,004, n=14; *** bedeutet p<0,001).

3.7. Erweitertes kinetisches Modell des G-Protein Zyklus

Um die Ergebnisse theoretisch zu untersuchen, wurde ein erweitertes kinetisches Modell des G-Protein Zyklus etabliert, mit dem die experimentellen Befunde der Arbeit überprüft werden sollten. Das verwendete Modell baut auf dem vereinfachten Modell der Signalkaskade (vgl. 3.1.2. und 3.1.3.) auf und integriert als zusätzlichen Reaktionen die rezeptorvermittelten Reaktionen des Nukleotidaustausch am G-Protein. Tabelle 3.7.1 und 3.7.2 zeigen die Reaktionen, Parameter und Ausgangsbedingungen des Modells. Wie im vereinfachten Modell können nur aktivierte (NA-gebundene) α_{2A} -AR Go-Proteine aktivieren. Go-Proteine werden, da keine physiologischen Abschätzungen der Reaktionsraten der G-Protein Dissoziation vorliegen, als aktives (GTP-gebundenes) oder inaktives (GDP-gebundenes) Heterotrimer betrachtet, nur während der Interaktion des G-Proteins mit aktivierten Rezeptoren kann das G-Protein nukleotidfrei auftreten.

Reaktionspartner	Akronym	Ausgangswert
α_{2A} -AR	R	0.03 bis 3 M
Ligand (NA)	L	1 nM bis 1 mM
Heterotrimeres Go-Protein	G	0 M
inaktives Go-Protein im Komplex	G:GDP	1 M
GTP	GTP	300 nM bis 3 mM
GDP	GDP	100 nM

Tabelle 3.7.1 Reaktionspartner des erweiterten Modell

Die Reaktionspartner können unter Bedingungen freier Diffusion miteinander interagieren und Komplexe bilden, z.B. Rezeptor-Ligand $R+L \leftrightarrow R:L$, inaktives G-Protein $G:GDP$, aktives G-Protein $G:GTP$, aktivierter Rezeptor und inaktives G-Protein $R:L+G:GDP \leftrightarrow R:L:G:GDP$. „Fraktion aktiver G-Proteine“ bezeichnet $G:GTP / (G + G:GDP + G:GTP + R:L:G + R:L:G:GDP + R:L:G:GTP)$; „Fraktion Rezeptor/ G-Protein Interaktion“ bezeichnet $(R:L:G + R:L:G:GDP + R:L:G:GTP) / (G + G:GDP + G:GTP + R:L:G + R:L:G:GDP + R:L:G:GTP)$.

Das Modell simuliert den hochaffinen Zustand des Rezeptors vereinfacht, indem die NA-Bindung an den GPCR nur in Abwesenheit von G-Proteinen möglich ist. Die Aktivierung von GIRK-Kanälen wird als direkt proportional zur Aktivierung von G-Proteinen modelliert.

Reaktion	Ratenkonstante	Wert
Interaktion Rezeptor-Ligand	k_{on}	$10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	k_{off}	$0,5 \text{ s}^{-1}$
Interaktion GDP-G-Protein/ aktiver Rezeptor	$k_{AssoRLGgdp}$	$800 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$k_{DissoRLGgdp}$	20000 s^{-1}
Interaktion GTP-G-Protein/ aktiver Rezeptor	$k_{AssoRLGgtp}$	$320 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$k_{DissoRLGgtp}$	10000 s^{-1}
GDP/ G-Protein-Bindung	$k_{RLGxRLGgdp}$	$3 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$k_{RLGgdpRLGx}$	10^3 s^{-1}
GTP/ G-Protein-Bindung	$k_{RLGxRLGgtp}$	$3 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$k_{RLGgtpRLGx}$	10^3 s^{-1}
G-Protein Inaktivierung	$k_{GgtpGgdp}$	0,03

Tabelle 3.7.2 Parametersatz des erweiterten Modell

Folgende Reaktionen und zugehörige Ratenkonstanten sind definiert: Interaktion Rezeptor-Ligand: $R+L \leftrightarrow R:L$; Interaktion GDP-G-Protein/aktiver Rezeptor: $G:GDP+R:L \leftrightarrow R:L:G:GDP$; Interaktion GTP-G-Protein/aktiver Rezeptor $G:GTP+R:L \leftrightarrow R:L:G:GTP$; GDP/G-Protein-Bindung: $R:L:G+GDP \leftrightarrow R:L:G:GDP$; GTP/G-Protein-Bindung: $R:L:G+GTP \leftrightarrow R:L:G:GTP$; G-Protein Inaktivierung $G:GTP \rightarrow G:GDP$.

Das Modell berücksichtigt nicht, dass unter permeabilisierten Bedingungen die Aktivierung von α_{2A} -AR durch NA um etwa eine Größenordnung niedriger ist, da sich aus den Messbedingungen nicht bestimmen lässt, welchen Anteil hieran die on- und die off-Rate der NA-Bindung haben. Zur Abschätzung wurde daher die Konzentration von NA zur Simulation der Versuchsergebnisse nach Zellmembranpermeabilisierung eine Größenordnung niedriger gewählt (vgl. 3.5.). Die Ausgangsbedingungen wurden analog dem vereinfachten Modell gewählt: G-Proteine liegen inaktiv im GDP-gebundenen Zustand und Rezeptoren inaktiv ohne gebundenen Agonisten vor.

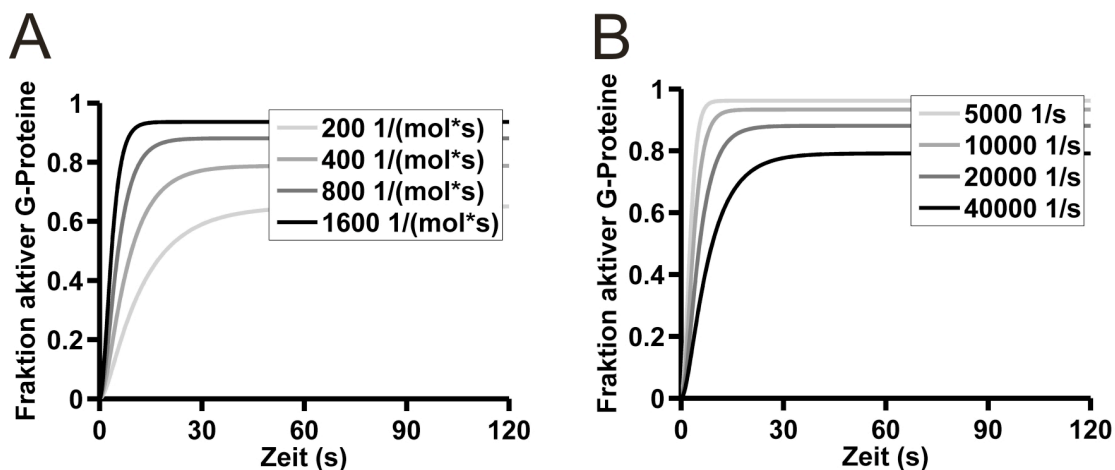


Abbildung 3.7.1: Parameter Anpassung zur G-Protein Aktivierung

(A, B) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fraktion aktiver G-Proteine bei $R=0,3$ M und $G:GDP=1$ M in Gegenwart von 100 nM NA, 100 μM GTP und 100 nM GDP in Abhängigkeit der angegebenen Werte der Reaktionskonstante für (A) $k_{\text{AssoRLGgdp}}$ und (B) $k_{\text{DissoRLGgdp}}$.

Für die Reaktionsparameter der GTP- und GDP-Bindung an G_i/o stehen, sowie für die Bindung nukleotidgebundener G-Proteine an α_{2A} -AR stehen keine kinetischen Daten unter physiologischen Bedingungen zur Verfügung. Am Rhodopsin-System wurden Abschätzungen der Interaktion GDP-gebundener G_i -Proteine mit lichtaktiviertem Rhodopsin sowie der GTP-Bindung an den Komplex aus G_t und aktiviertem Rhodopsin unter physiologischen Bedingungen durchgeführt (Heck, 2001).

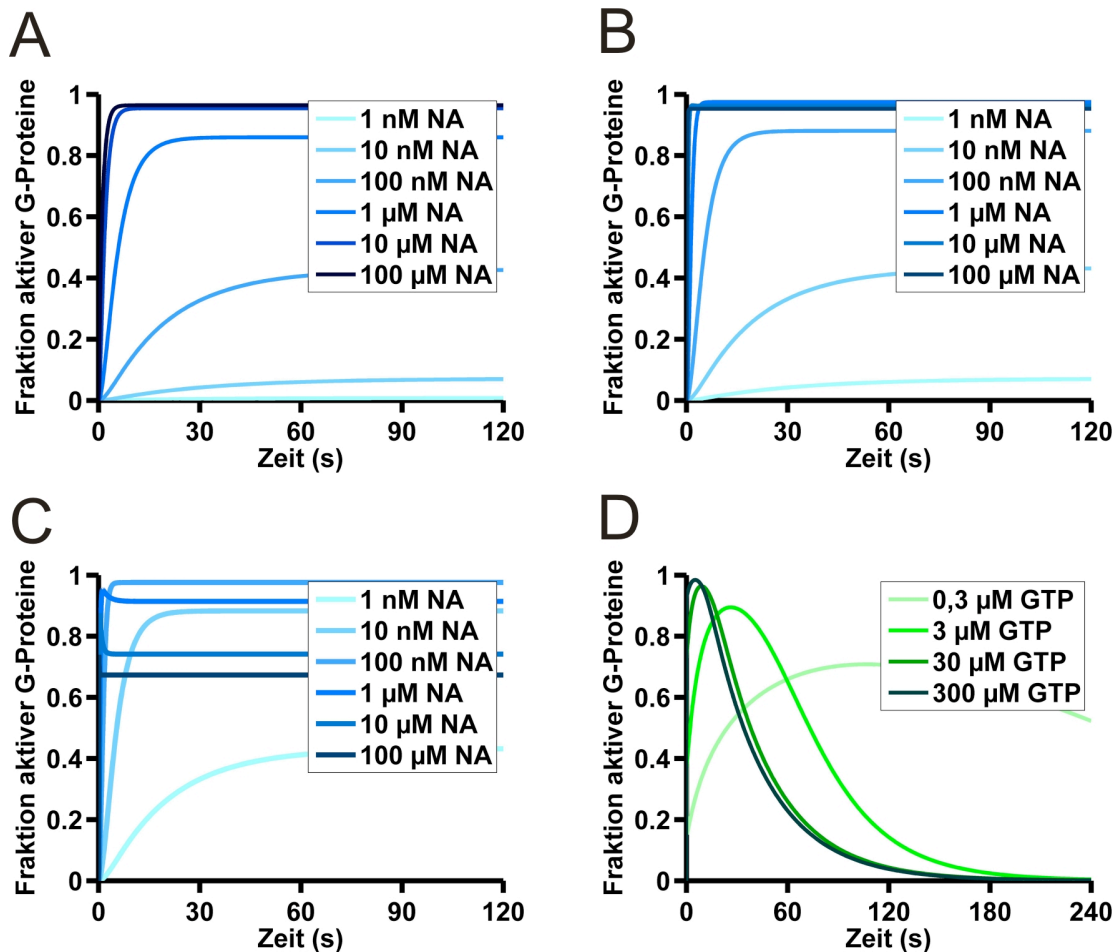


Abbildung 3.7.2: G-Protein Aktivierung und G-Protein Deaktivierung

(A, B, C) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fraktion aktiver G-Proteine bei $G:GDP=1\text{ M}$ in Gegenwart von $100\text{ }\mu\text{M}$ GTP und 100 nM GDP für (A) $R=0,03\text{ M}$, (B) $R=0,3\text{ M}$ und (C) $R=3\text{ M}$ in Abhängigkeit der angegebenen Konzentration für NA von 1 nM bis $100\text{ }\mu\text{M}$. (D) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der G-Protein Deaktivierung nach maximaler G-Protein Aktivierung $G:GTP=1\text{ M}$ in Abhängigkeit der angegebenen Konzentration für GTP von $0,3\text{ }\mu\text{M}$ bis $3000\text{ }\mu\text{M}$.

Diese Parameter, sowie die Parameter zur Bindung von NA an α_{2A} -AR und die GTPase-Rate des vereinfachten Modells, wurden im erweiterten Modell übernommen. Die Parameter der Assoziation und Dissoziation GDP-gebundener G-Proteine von aktivierten α_{2A} -AR wurden so angepasst, dass die Daten zur Gi-Aktivierung (Bünemann, 2003) plausibel simuliert werden können (vgl. Abbildung 3.7.1 und 3.7.2). Das Gleichgewicht der Interaktion inaktiver G-Proteine mit aktiven Rezeptoren liegt auf Seiten der Dissoziation, wie die Befunde in 3.3. (Abbildung 3.3.3) nahelegen. Unter einer mittleren physiologischen GTP-Konzentration von $100\text{ }\mu\text{M}$ GTP nimmt bis zu einem Verhältnis von 1:3 Rezeptoren zu G-Proteinen das Ausmaß des

„sparereceptor“- Phänomens parallel zur Menge aktivierter Rezeptoren zu, über diese Verhältnis hinaus zeigt sich eine paradoxe Deaktivierung aktivierter G-Proteine bei maximaler Rezeptoraktivierung.

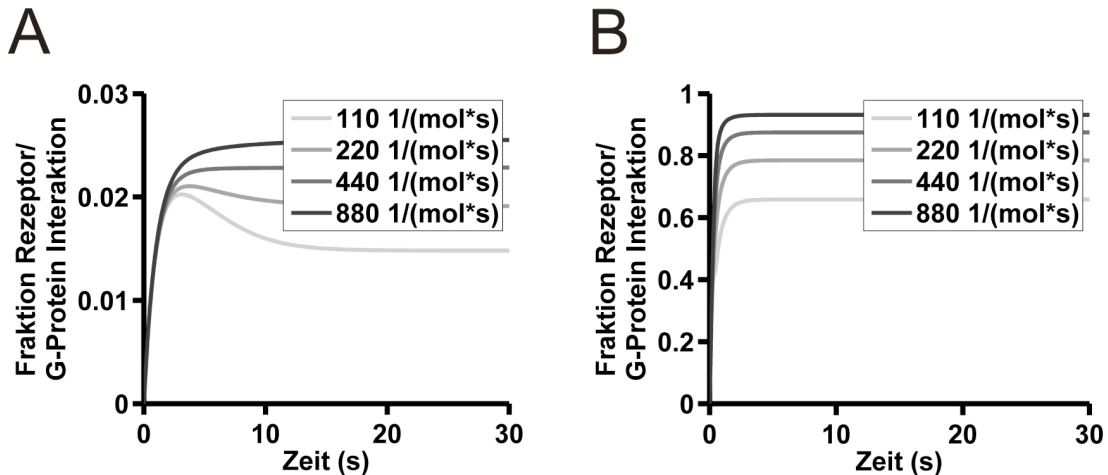


Abbildung 3.7.3: Parameter Anpassung zur Rezeptor/G-Protein Interaktion

Dargestellt sind die Simulationsergebnisse des zeitlichen Verlaufs der Fraktion G-Proteine, die mit aktivierten Rezeptoren interagiert, (A) bei $R=0,03$ M bzw. (B) bei $R=3$ M für $100 \mu\text{M}$ NA und 1 M G:GDP in Gegenwart von $3 \mu\text{M}$ GTP und 100 nM GDP für $k_{\text{AssoRLGgtp}}$ wie angegeben.

Die Parameter zur Interaktion aktivierter G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren wurden zum einen an die Daten zur α_{2A} -AR/Gi Interaktion (Hein, 2005) und zum anderen an die Daten vorliegender Arbeit angepasst. Dabei wurde die Anpassung ausgehend von gleichen Reaktionsparametern für die Interaktion GTP- bzw. GDP-gebundener G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren (vgl. Abbildung 3.7.3) gestartet. Es zeigt sich bei niedriger Assoziationsrate für aktivierte Rezeptoren und GTP-gebundene G-Proteine ein transientes Maximum der Receptor/G-Protein Interaktion, was analog zu den Untersuchungen des vereinfachten Modells ist. Für die verwendeten Parameter des Nukleotidaustauschs tritt dieses transiente Maximum insbesondere bei niedrigem Rezeptor:G-Protein Verhältnis hervor.

Über zwei Größenordnungen ist das Gleichgewicht der agonistinduzierten Receptor/G-Protein Interaktion für die verwendeten Parameter von der Rezeptorkonzentration weitgehend unbeeinflusst (vgl. Abbildung 3.7.4). Je geringer die Konzentration an Nukleotid ist, desto stabiler wird die agonistinduzierte Receptor/G-Protein Interaktion.

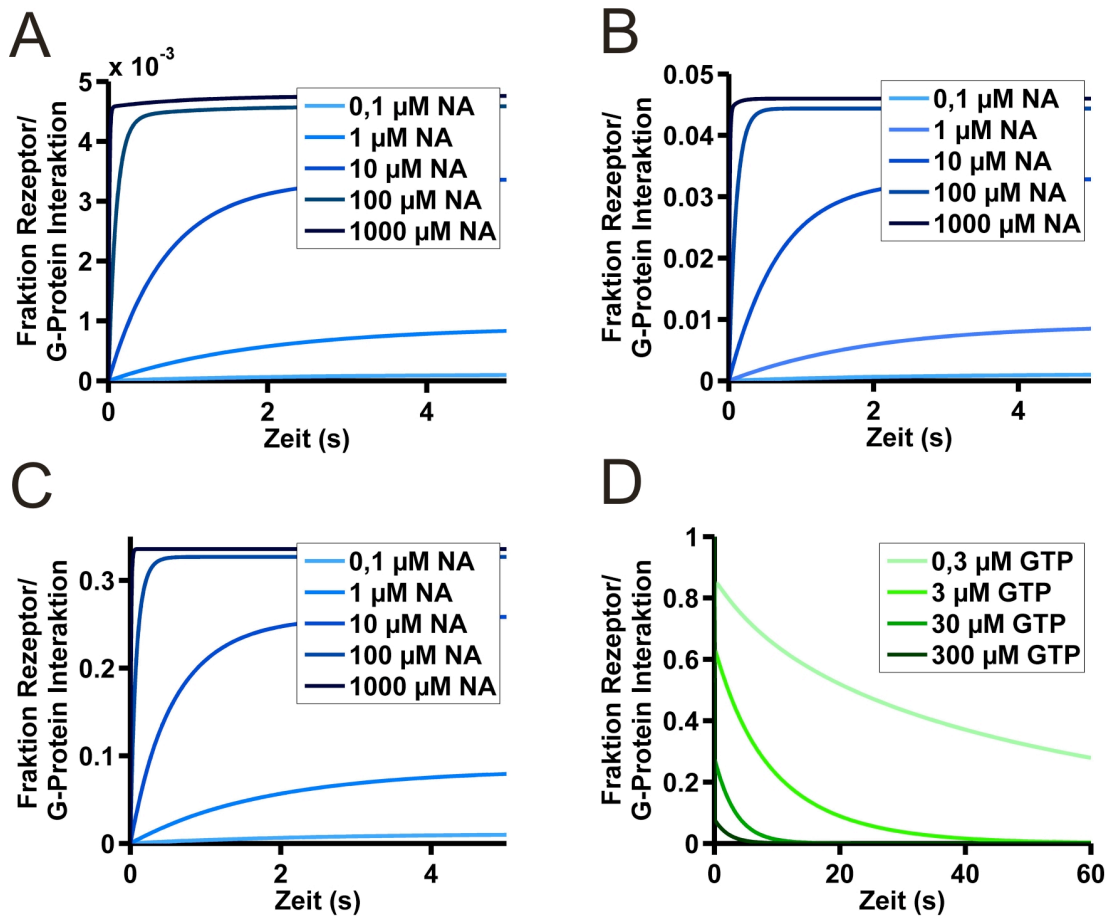


Abbildung 3.7.4: Rezeptor/G-Protein Interaktion

(A, B, C) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fraktion der G-Proteine, die mit dem Rezeptor nach Rezeptoraktivierung interagiert bei $G:\text{GDP}=1\text{ M}$ in Gegenwart von $100\ \mu\text{M}$ GTP und $100\ \text{nM}$ GDP für (A) $R=0,03\text{ M}$, (B) $R=0,3\text{ M}$ und (C) $R=3\text{ M}$ in Abhängigkeit der angegebenen Konzentration für NA von $1\ \text{nM}$ bis $100\ \mu\text{M}$. (D) Dargestellt ist der off-Rate der Rezeptor/G-Protein Interaktion nach maximaler G-Protein Aktivierung $R:L:G:\text{GTP}=1\text{ M}$ und maximaler Rezeptoraktivierung $R:L=1\text{ M}$ in Abhängigkeit der angegebenen GTP Konzentration.

Das Modell simuliert qualitativ die Befunde zur G-Protein Aktivierung (Bünemann, 2003) und Rezeptor/G-Protein Interaktion (Hein, 2005). Die Simulation der Rezeptor/G-Protein Interaktion in Gegenwart von GTP und GDP überschätzen im Vergleich zu den experimentellen Befunden das Ausmaß dieser Interaktion (vgl. Abbildung 3.3.3 und 3.7.5). Die Kinetik des $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Auswaschens wird schneller simuliert, als in vorliegender Arbeit experimentell bestimmt (vgl. Abbildung 3.4.2 und 3.7.5). Die Möglichkeiten für diese Diskrepanz werden in 4.5.3. diskutiert.

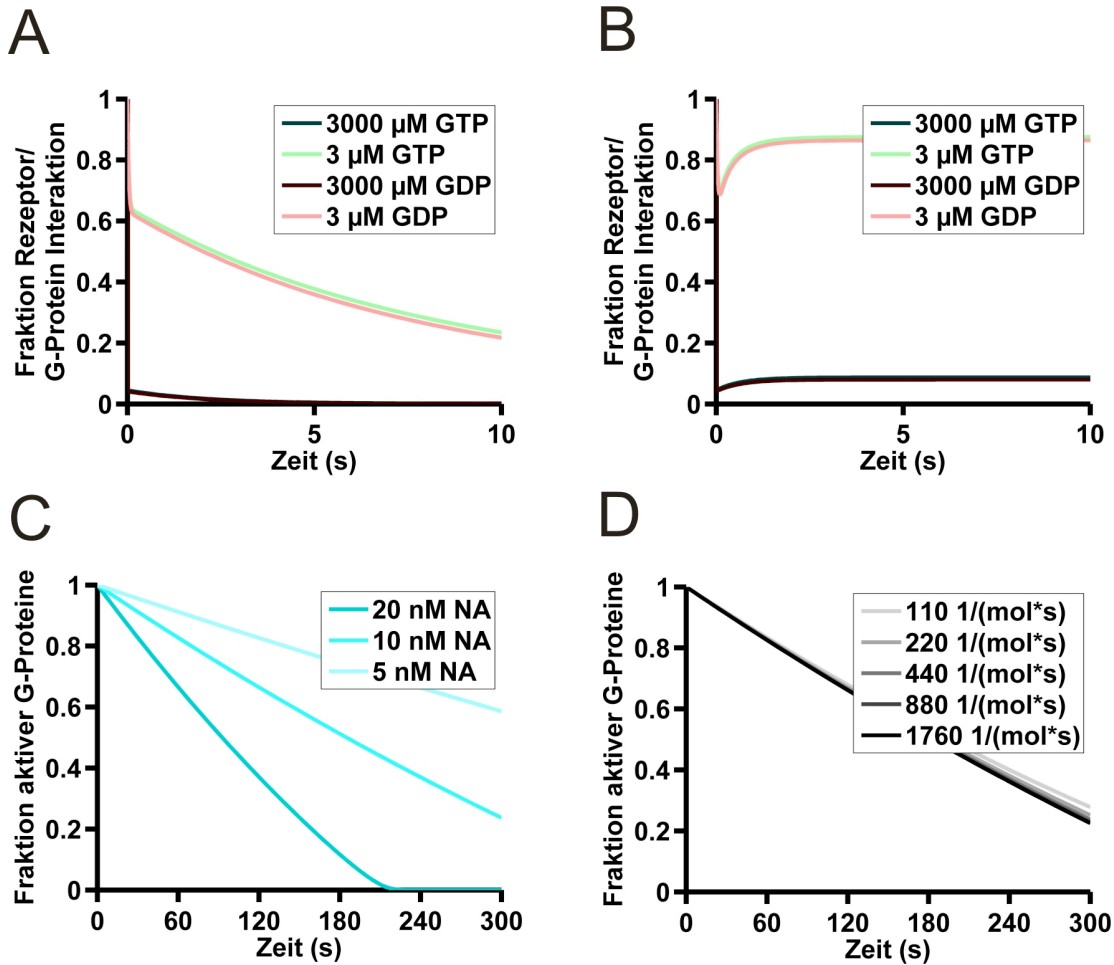


Abbildung 3.7.5: Exemplarische Simulation von Befunden vorliegender Arbeit

(A, B) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fraktion der G-Proteine, die mit dem Rezeptor nach Rezeptoraktivierung interagiert ausgehend von R:L:G=1 M in Gegenwart von (A) 10 nM NA und (B) 10 μM NA für die angegebene Nukleotid Konzentration. (B,C) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fraktion aktiver G-Proteine nach vollständiger, irreversibler Aktivierung (G:GTP=1 M bei $k_{\text{GgtpGgdp}}=0$) in Abhängigkeit (C) der angegebenen Konzentration für NA und (D) für 10 nM NA in Abhängigkeit der angegebenen Werte der Reaktionskonstante $k_{\text{Ass0RLGgtp}}$.

4. Diskussion

4.1. Biologischer Bedeutung inhibierender Signalwege im Kontext der Untersuchungen

Signalübertragung ist von zentraler Bedeutung, um in multizellulären Organismen die verschiedenen spezialisierten Zellen zu einem Organismus zu koordinieren. Ein extrazelluläres Signal soll eine intrazelluläre Reaktion auslösen. Ausgangspunkt für die Reaktion sind extrazelluläre Rezeptoren, unter denen die Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren die häufigste in höheren Organismen ist. Diese Signalkaskade zeichnet sich dadurch aus, dass es möglich ist, dass bei Aktivierung eines Bruchteils der Rezeptoren nachgeschaltete Elemente der Kaskade bereits maximal aktiviert sein können („spare-receptor“-Phänomen).

Verschiedene Befunde legen nahe, dass diese Signalverstärkung bereits im ersten Schritt der Signalkaskade vollzogen werden kann, in dem mehrerer G-Proteine durch einen Rezeptor aktiviert werden. Die Aktivierung des G-Proteins verläuft in diesem Modell durch aktivierte G-Protein gekoppelte Rezeptoren kataklytisch, d.h. G-Proteine und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (unabhängig von ihrer Aktivierung) können in der Zellmembran frei diffundieren (Lefkowitz, 1981; Levitzki, 1988). Faktoren, die das Ausmaß der Signalverstärkung bestimmen sind auf der Ebene der Rezeptor/G-Protein Interaktion die Geschwindigkeit der G-Protein Aktivierung und das Verhältnis zwischen G-Proteinen zu G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die Geschwindigkeit der G-Protein Aktivierung hängt - abhängig vom Subtyp des Rezeptors und des G-Proteins - von den Reaktionsraten zwischen inaktiven bzw. aktivierten G-Proteinen und aktivierten Rezeptoren, von der Bindungsaffinität des Rezeptor-gebundenen G-Proteins zu GDP und GTP, sowie von der interzellulären Konzentration von GDP und GTP („ternary-complex“-Modell; De Lean, 1982).

Viele Befunde weisen darauf hin, dass das Modell der katalytischen Kollisions-Kopplung die α_{2A} -AR-Gi/o-Signalkaskade zutreffend beschreibt (Hein, 2009),

auch wenn experimentelle Befunde andere Modelle ebenfalls erlauben (Neubig, 1994; Chidiac, 1998), weswegen diese als Paradigma in vorliegender Arbeit verwendet und untersucht wurde.

Theoretisch erlaubt das Modell der katalytischen Kollisions-Kopplung auch, dass die Prozesse der Aktivierung „rückwärts“ ablaufen: Aktivierte, heterotrimere G-Proteine (GTP-gebunden) könnten mit aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagieren und dabei das gebundene GTP verlieren. Sie könnten, ohne ein Nukleotid gebunden zu haben, am aktivierten Rezeptor sequestriert werden. Bei hohem Verhältnis aktivierter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zu G-Proteinen wäre daher nicht nur eine besonders starke Signalverstärkung bei geringer Rezeptoraktivierung, sondern eine paradoxe Deaktivierung von G-Proteinen (und ihren Effektoren) bei maximaler Rezeptoraktivierung denkbar: Nach einem „schwachen“ Stimulus, der aufgrund der Signalverstärkung die Gesamtmenge aller G-Proteine, aber nur eine Bruchteil aller Rezeptoren aktiviert hat, könnte ein zweiter, „starker“ Stimulus, der die Mehrzahl der Rezeptoren aktiviert, für die Zeitdauer der Rezeptoraktivierung die vormals aktivierten G-Proteine deaktivieren.

Dieser Prozess würde eine Erklärung für paradoxe, „glockenförmige“ Konzentrationswirkungskurven geben, in denen die Wirkung bei hoher Konzentration abnimmt. Neben unspezifischen Effekten oder einer Aktivierung von inhibierenden Signalwegen, deren Rezeptor eine niedrigere Affinität für den untersuchten Liganden hat, kann auch der eigentlich zu untersuchende Signalweg den Effektor direkt inhibieren.

4.2. Interpretation der experimentellen Befunde

Die vorliegende Arbeit konnte für die α_{2A} -AR-Go-Signalkaskade als Paradigma zeigen, dass es zu einer paradoxen Deaktivierung von Go-Proteinen und dem Go-Protein-Effektor GIRK-Kanal kommen kann, wenn mehr α_{2A} -AR stimuliert werden, als für eine maximale Aktivierung von Go-Proteinen notwendig sind. Die Arbeit konnte zeigen, dass das Ausmaß der Deaktivierung sowohl von der

relativen Stöchiometrie zwischen Go-Proteinen und α_{2A} -AR als auch von der Konzentration an Guanosin Nukleotiden abhängt und als Nebenbefund, dass die Interaktion zwischen Go-Proteinen und α_{2A} -AR minimal ist in der Gegenwart hoher Nukleotidkonzentrationen und Abwesenheit von NA und hingegen maximal in Abwesenheit von Nukleotid und Anwesenheit von NA ist. Mechanistisch kommt daher eine wesentliche Interaktion zwischen Go-Proteinen und α_{2A} -AR nur bei Rezeptoraktivierung vor und die Deaktivierung ist Folge des Verlustes des Nukleotids von GTP-gebundenen Go-Proteinen und einer Sequestration des Go-Proteins in nukleotidfreiem Zustand am α_{2A} -AR. Abbildung 4.2 fasst die Interpretation zusammen.

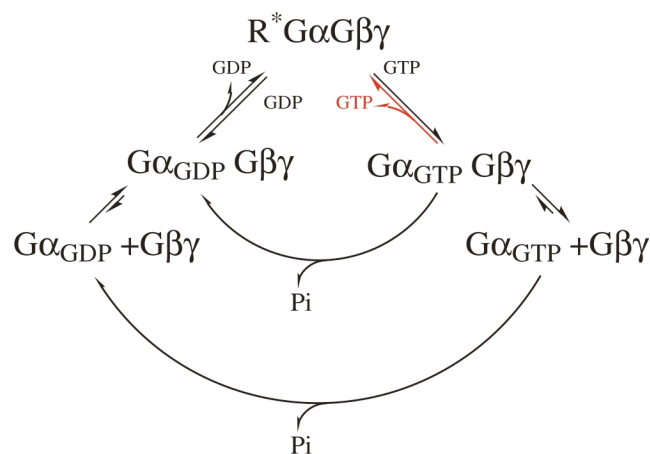


Abbildung 4.2: Schematisches Modell der experimentellen Befunde.

Sowohl die Untereinheitendissoziation von G-Proteinen als auch die Interaktion von G-Proteinen mit Rezeptoren stehen untereinander im Gleichgewicht. In Rot ist der untersuchte Reaktionsschritt illustriert. Wenn aktivierte α_{2A} -AR mit GDP-, aber auch mit GTP-gebundenen, heterotrimeren Go-Proteinen interagieren kann es zum Nukleotidverlust kommen und der Komplex aus Rezeptor, Ligand und nukleotidfreiem G-Protein wird stabilisiert. Somit ist eine paradoxe Deaktivierung aktivierter G-Proteine und aktivierter G-Protein Effektoren möglich.

Die Versuche bestätigen, dass eine Interaktion aktivierter G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren existiert, die nach den Theorien der G-Protein Aktivierung zu fordern wäre, bisher aber nur anhand einer Carbachol-vermittelten Verdrängung von $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ durch Guaninnukleotiden in kardialen Membranen vermutet werden konnte (Hilf, 1992). Diese Reaktion erklärt Befunde der Literatur, die nach den gegenwärtigen Modellen paradox gewesen wären (Bösche, 2003; Leaney, 2004). Indirekt geben die Befunde somit einen weiteren Hinweis, dass aktivierte Go-Proteine in einem Gleichgewicht zwischen

dissoziierter (dimerer) und nicht-dissoziierter (heterotrimerer) Konformation vorliegen. Die Interaktion zwischen Go-Proteinen und α_{2A} -AR wurde mittels FRET zwischen CFP-G γ und α_{2A} -YFP-AR untersucht (was bedeutet, dass verwendeten Fluorophore näher als 10 nm kommen), konnte aber durch die Guanosin-Nukleotidkonzentration, die an G α binden, moduliert werden. Dies ist in Einklang mit dem Modell, dass eine stabile Interaktion von G-Proteinen mit aktivierten GPCR, die zu einem Nukleotidaustausch führen kann, eine Interaktion aller drei Untereinheiten des G-Proteins mit dem Rezeptor (Oldham, 2008) bedarf, auch wenn diese sequentiell ablaufen können (Hermann, 2004). Untersuchungen der Rezeptor/G-Protein Interaktion für weitere G-Protein Subtypen, z.B. für Gs (Hein, 2006) zeigen vom Verlauf der Kinetik analoge Befunde zur Kinetik der α_{2A} -AR-Gi/o-Signalkaskade. Die Befunde der vorliegenden Arbeit können daher als Hinweis interpretiert werden, dass auch in weiteren Signalkaskaden die wesentliche Fraktion der Rezeptor/G-Protein Interaktion nach Aktivierung der Signalkaskade aus der Interaktion der aktivierten G-Proteine mit dem zugehörigen aktivierten Rezeptor resultiert. Ob eine Sequestrierung aktivierter Go-Proteine nach Aktivierung durch einen zusätzlichen Go-gekoppelten Rezeptor möglich ist wurde im Rahmen der Arbeit nicht abschließend untersucht. Die Untersuchungsergebnisse würden dies aber erwarten lassen, was ein weiterer Hinweis für eine freie Diffusion aktivierter G-Proteine in der Zellmembran wäre.

4.3. Diskussion des biologischen Kontext der Versuchsbedingungen

Die Arbeit untersucht einen Effekt, der mittels theoretischer Untersuchungen vorhergesagt wurde. Die Bedingungen, unter denen der Effekt in heterologen Zellsystemen auftritt, konnten durch die Bestimmung der Stöchiometrie zwischen Rezeptoren und G-Proteinen, sowie die Abhängigkeit des Effektes von der GTP Konzentration bestimmt werden. Für die physiologische Relevanz der Befunde dieser Arbeit ist es daher von besonderer Bedeutung, ob diese Bedingungen in physiologischen Zellsystemen vorkommen können.

Die Befunde der Arbeit wurden für ein mittleres stöchiometrisches Verhältnis zwischen Go-Proteinen und α_{2A} -AR von 1:3 erhoben. Eine wesentliche Deaktivierung von Go-Proteinen und GIRK-Kanälen (als Go-Protein Effektoren) wurde für GTP Konzentrationen kleiner als 100 μ M beobachtet. Somit wären Gewebe, die eine hohe Expression von GPCR zeigen interessante Kandidaten. Insbesondere die Stäbchenzelle der Retina weisen eine außergewöhnlich hohe Expression von Rezeptoren auf, um die hohe Sensitivität des Sehsystems zu gewährleisten: etwa 20% der Membranoberfläche der Stäbchenzellen werden von Rhodopsinmolekülen eingenommen, was etwa 25000 Rhodopsinmolekülen pro μm^2 Zellmembranoberfläche entspricht (Liebman, 1987).

Die Konzentration Gi/o-aktivierender GPCR ist in nativen Geweben aufgrund der zur Verfügung stehenden Methoden gegenwärtig nur für Gewebelysate bestimmt worden. Mittels Radioliganden Bindungs-Assays konnte in Lysaten des Cortex eine mittlere Konzentration von α_2 -AR (Subtyp unspezifisch) in der Größenordnung von 0,3 pmol/mg für *M. musculus* (MacKinnon, 1989) und humane Gewebeproben (Bylund, 1985) bestimmt werden. Eine Konzentration von α_2 -AR an Prä- oder auch Postsynapsen in der Größenordnung von 10 pmol/mg erscheint daher durchaus möglich. Für $G\alpha_o$ wurde in Lysaten des Cortex von Ratten allerdings eine Konzentration in der Größenordnung von 100 pmol/mg mit überwiegender Lokalisation im neuronalen Gewebe gefunden (Asano, 1988).

Neben neuronalen Geweben werden Gi/o-gekoppelte Rezeptoren kardiovaskulär im Herz exprimiert. Hierbei sind insbesondere die Anteile von Bedeutung, die vom Sympathikus und vom Parasympathikus innerviert werden. Bezüglich der Expression spielen α_2 -AR aber eher eine untergeordnete Rolle gegenüber Adenosin A_1 - und muscarinergen M_2 -Rezeptoren. Für Adenosin A_1 -Rezeptoren wurde im adulten Atrium von Ratten eine mittlere Expression in der Größenordnung von 1 fmol/mg (Rivkees, 1995) bis zu 10 fmol/mg (Froldi, 1990) beschrieben. Die Expression von muscarinergen Rezeptoren im Sinusknoten von Hasen liegt in der Größenordnung von über 1 pmol/mg (Kurogouchi, 2002), wobei anzumerken ist, dass diese Untersuchungen nicht spezifisch für den M_2 -Rezeptor durchgeführt wurden, jedoch M_2 -Rezeptoren die wesentliche Fraktion

muscarinergere Rezeptoren im Herz ausmachen (Jeck, 1988). Die gesamtatriale Expression von muscarinergere Rezeptoren liegt in dieser Untersuchung in der gleichen Größenordnung wie die Expression von M_2 -Rezeptoren im humanen Atrium (Motomura, 1990), was eine ähnliche Expression im humanen Sinusknoten wahrscheinlich erscheinen lässt.

Für die physiologische Bedeutung der Befunde ist neben der Rezeptorexpression das Verhältnis zwischen exprimierten Rezeptoren und G-Proteinen von entscheidender Bedeutung. Im Falle der Retina wurde hierzu ein Verhältnis in der Größenordnung von 1:10 für Rhodopsin zu Transducin geschätzt, was weit unter dem Verhältnis der heterologen Versuchsbedingungen der Arbeit ist (Stryer, 1986). Ferner liegt die GTP Konzentration in Höhe von 1 mM (Hárosi, 1975; Biernbaum, 1979), was über der geschätzten K_d von GTP an Transducin ist (Heck, 2001). Im Kontext der experimentell beobachteten Dissoziation nahezu der gesamten aktivierten Transducin-Fraktion (Rosenzweig, 2007) erscheint daher eine Interaktion aktivierten Transducins mit aktiviertem Rhodopsin analog dem untersuchten Mechanismus der Arbeit unwahrscheinlich zu sein.

$G\alpha_o$ konnte in atrialen Gewebelysaten verschiedener Spezies in einer Größenordnung unter 3 pmol/mg gefunden werden, in Ventrikeln noch niedriger (Asano, 1995). Es ist zu berücksichtigen, dass $G\alpha_o$ bevorzugt in den neuronalen Gewebeanteilen vorliegt, weshalb die Expression im stark innervierten Atrium höher als im Ventrikel ist (Asano, 1988).

Die GTP Konzentration wurde in atrialen Myozyten in der Größenordnung von 30 μ M (Breitwieser, 1988) bis zu 300 μ M bestimmt (Traut, 1994), für neuronale Gewebe bis zu 600 μ M (Traut, 1994). Untersuchungen an atrialen Myozyten legen nahe, dass der Neurotransmitter Acetylcholin im synaptischen Spalt eine Konzentration größer 10 μ M und damit größer des K_i an M_2 -Rezeptoren erreichen könnte (Campbell, 1989), was in Analogie zu den Versuchsbedingungen vorliegender Arbeit ist.

Zusammenfassend lässt sich weder bestätigen noch widerlegen, dass im physiologischen Kontext Bedingungen auftreten, die das Auftreten des untersuchten Effekts erlauben. Es erscheint wahrscheinlich, dass Bedingungen

im pathophysiologischen Kontext, in deren Folge ein Energiemangel ein Absinken der GTP Konzentration bedingt (z.B. bei Ischämie) den Effekt der paradoxen Deaktivierung begünstigen. Erst die detaillierte Aufklärung lokalisierter Rezeptorkonzentrationen wird erlauben, die physiologische Relevanz des Effektes abschließend zu beurteilen.

4.4. Diskussion alternativer Erklärungen der experimentellen Befunde

4.4.1. Rezeptor-Ebene

Um die Sensibilität eines Signalwegs auf die vorherrschende Signalstärke abzustimmen gibt es eine Vielzahl von Mechanismen. Hierbei muss man zeitlich kurzfristige (d.h. während der Rezeptoraktivierung einsetzende) Prozesse von langfristigen unterscheiden, die auch nach der Rezeptoraktivierung modulierend wirken können. Diese Prozesse können auf allen Ebenen der Signaltransduktionskaskade (von Rezeptor über G-Protein bis zum Effektor) ansetzen, was eine umfassende Diskussion umfangreich werden lässt.

Langfristig orientierten Regulationsprozessen ist typischerweise gemeinsam, dass sie auf den verschiedenen Ebenen des Signaltransduktionswegs die Anzahl der aktivierbaren Proteine verringern, entweder durch biochemische Prozesse (z.B. Phosphorylierung der Proteine oder Komplexbildung) oder durch Regulation der Genexpression. Prozesse, die die Genexpression betreffen, scheiden aufgrund der zeitlichen Größenordnung der Reaktionskinetik im Sekundenbereich für eine Erklärung der Versuchsbefunde generell aus.

Prozesse, welche die Funktion von Proteinen, z.B. mittels Phosphorylierung, regulieren, könnten als Erklärung für den Befund der Effektordeaktivierung in Betracht kommen. Zu beachten ist allerdings, dass der zeitliche Verlauf der GIRK-Kanal und Gi/o-Protein Deaktivierung von der Gegenwart von NA abhängt, weshalb dieser - in guter Näherung - der Rezeptor/Liganden Interaktion und daher der Rezeptoraktivierung und Rezeptorinaktivierung folgt.

Insbesondere spricht der Befund, dass die Effektordeaktivierung parallel zum Auswaschen von NA reversibel beendet wird gegen längerfristig regulierende Prozesse als primäre Ursache des Befundes. Somit sind in der Diskussion alternativer Erklärungen für den Kontext der Arbeit kurzfristige Regulationsprozesse von Bedeutung.

Auf Ebene des Rezeptors ist eine Reversibilität mit einer ausreichend schnellen Kinetik für rezeptorregulierende Prozesse (wie z.B. Rezeptordeaktivierung durch Phosphorylierung mittels GRKs und subsequeute Arrestin-Bindung) nahezu undenkbar, da die Kinetik der GRK/GPCR- und Arrestin/GPCR-Interaktion bereits eine wesentlich langsamere Reaktionskinetik ausweisen, als es der Kinetik des untersuchten Befundes entspricht (Krasel, 2004). Weitere, der Arrestin-Bindung und Rezeptorphosphorylierung folgende Prozesse, scheiden aufgrund der zeitlichen Größenordnung der Reaktionskinetik für eine Erklärung der Versuchsbefunde daher aus.

4.4.2. G-Protein-Ebene

Regulierende Prozesse auf Ebene des G-Proteins könnten auf verschiedenen Wegen wirken. Um den Befund der Effektordeaktivierung auf Ebene des G-Proteins zu vermitteln, müssen G-Proteine deaktiviert werden. Intrinsisch werden G-Proteine durch die GTPase inaktiviert. Könnte eine beschleunigte GTPase-Rate den beobachteten Befund vermitteln? Hierzu wäre zu fordern, dass die GTPase-Rate durch Rezeptoraktivierung beschleunigt wird, was z.B. durch eine sättigende Bindung von RGS-Proteinen oder eine GPCR-intrinsische GTPase denkbar wäre. Die experimentellen Befunde der Arbeit zeigen, dass eine NA-induzierte Interaktion zwischen G α -Proteine und α_{2A} -AR - abhängig von der Konzentration - in Gegenwart von nicht hydrolysiertem, irreversibel aktivierendem GTP γ S, aber auch von GTP oder GDP auftritt. Im Fall von GTP γ S erscheint eine Interaktion in GTP γ S-gebundener Konformation mit GPCR die plausibelste Erklärung: Eine Spaltung von GTP γ S in GDP ist biochemisch nicht beschrieben, denkbar wäre alternativ ein Verlust von GTP γ S aus der Bindung an G α , was aber anhand proteinbiochemischer

Untersuchungen aufgrund der physiologischen Mg^{2+} Konzentration unwahrscheinlich ist, weil Mg^{2+} die $GTP\gamma S$ -Bindung in dieser Konzentration bereits deutlich stabilisiert und ein $GTP\gamma S$ -Verlust eine langsame Reaktion ist (Gilman, 1987). Ferner ist die beobachtete Beschleunigung der G-Protein Deaktivierung durch NA Superfusion mit einem Verlust von $GTP\gamma S$ vor Bindung von $G\alpha_o$ an den α_{2A} -AR nicht vereinbar. Dies wäre nur dann denkbar, wenn NA unabhängig vom α_{2A} -AR direkt auf $G\alpha_o$ wirken könnte, wofür es keinen Hinweis gibt. Allerdings könnten weitere Faktoren die Rezeptor/G-Protein Interaktion begünstigen. Denkbar wäre, dass $G\alpha_o$ -GTP vor einer möglichen Bindung an den α_{2A} -AR in $G\alpha_o$ -GDP gespalten wird, z.B. durch eine lokale Beschleunigung der GTPase am Rezeptor durch RGS-Proteine oder andere GAPs, die mit GPCR einen Komplex bilden. Da gegenwärtig keine Möglichkeit bekannt ist, die GTPase direkt zu inhibieren, können die Untersuchungen eine solche Möglichkeit nicht ausschließen, lassen sie aber im Kontext der Befunde zur Interaktion in Gegenwart von $GTP\gamma S$ als eher unwahrscheinlichen Prozess der paradoxen G-Protein Deaktivierung erscheinen. Es würde sich die Frage stellen, wie eine lokale Beschleunigung der GTPase durch aktivierte α_{2A} -AR, die die G-Protein Aktivierung bei geringer Konzentration aktivierter Rezeptoren nicht behindert, mechanistisch vermittelt werden könnte. Hierzu müsste das Erklärungsmodell um mehrere unbekannte Faktoren erweitert werden, was diese Erklärungsmöglichkeit unwahrscheinlich erscheinen lässt. Eine Möglichkeit könnte sich z.B. über α_{2A} -AR Oligomere an Scaffold-Proteinen bei hoher Rezeptorexpression ergeben: In einem Oligomer könnten alle Rezeptoren aktiviert werden, wodurch sich in der Folge instabile Komplexe mit RGS-Proteinen ergeben, aber aufgrund sterischer Gründe nur ein G-Protein aktiviert werden könnte. Weder ist eine ausreichend hohe Beschleunigung der GTPase durch RGS-Proteine (oder sogar α_{2A} -AR), noch eine Interaktion von RGS-Proteinen mit α_{2A} -AR bekannt, was diese Spekulationen unterstützen könnte. Alternativ wäre denkbar, dass $G\beta\gamma$ nach NA Superfusion an α_{2A} -AR sequestriert wird, da in den Untersuchungen FRET zwischen CFP- $G\gamma$ und α_{2A} -YFP-AR zunimmt. Somit könnten weniger GIRK-Kanäle durch $G\beta\gamma$ aktiviert werden. Gegen diese Erklärung spricht, dass das Ausmaß der Interaktion von der

verwendeten Nukleotidkonzentration abhängt: Nukleotide binden an die $G\alpha$ -Untereinheit, weshalb die hypothetische Bindung von $G\beta\gamma$ durch einen Faktor moduliert wird, der an $G\alpha$ bindet. Somit ist es wahrscheinlich, dass eine Interaktion des aktivierten G-Proteins mit aktivierten Rezeptoren in heterotrimerer Konformation abläuft.

4.4.3. GIRK-Kanal Ebene

Auf Ebene des GIRK-Kanals könnten verschiedene transiente Mechanismen einen Rückgang des GIRK-Kanal Stroms bei starker Rezeptoraktivierung bewirken:

- (I) Aktivierung eines oder mehrerer Signalwege, die den GIRK-Kanal inaktivieren,
- (II) Desensibilisierung des GIRK-Kanals während starker Agonistgabe,
- (III) Zusammenbruch des K^+ -Gradienten während der GIRK-Kanal Aktivierung,
- (IV) transienter Block des Kanals durch NA.

Für die Regulation der GIRK-Kanal Aktivität ist eine Inaktivierung des GIRK-Kanals bei Aktivierung von Gq-Signalwegen über PKC-vermittelte GIRK-Kanal Phosphorylierung und PLC vermittelten PIP_2 -Abbau beschrieben (Mao, 2004). Die rasche Kinetik der GIRK-Kanal Deaktivierung (innerhalb weniger Sekunden) lässt einen Phosphorylierungsprozess recht unwahrscheinlich erscheinen, da für solche Prozesse wesentlich langsamere Kinetiken beschrieben worden sind (Krasel, 2004). Dies lässt auch eine GIRK-Kanal Deaktivierung durch Protein Phosphatase 2A, die die $G\beta\gamma$ -abhängige GIRK-Kanal Aktivierung durch GIRK-Kanal Dephosphorylierung inhibiert, als Erklärungsmöglichkeit unwahrscheinlich erscheinen (Medina, 2000).

Ein Abbau von PIP_2 kann durch eine Koaktivierung von Gq-Proteinen vermittelt werden. Insbesondere wäre eine Koaktivierung von α_1 -AR oder eine Transaktivierung von Gq-Proteinen entweder durch α_{2A} -AR oder durch andere adrenerge Rezeptoren denkbar. Eher unwahrscheinlich erscheint eine NA-vermittelte Gq-Aktivierung durch nicht-adrenerge Rezeptoren, weswegen diese Möglichkeit nicht diskutiert wird. Eine Koaktivierung von α_1 -AR könnte den beobachteten pEC_{50} der GIRK-Kanal Stromdeaktivierung erklären. Allerdings

zeigt sich der Befund der paradoxen G-Protein Deaktivierung nur bei hoher Expression von α_{2A} -AR, was gegen eine Koaktivierung von α_1 -AR spricht.

Eine Transaktivierung von Gq-Signalwegen durch α_{2A} -AR könnte prinzipiell die paradoxe GIRK-Kanal Deaktivierung erklären, allerdings erscheint die Beobachtung, dass aktivierte G-Proteine mit dem gleichen EC50 deaktiviert werden können wie der GIRK-Kanal eher dafür zu sprechen, dass die paradoxe GIRK-Kanal Deaktivierung nicht ein Resultat entgegengesetzter Signalwege auf Ebene des GIRK-Kanals ist, sondern aus einer Deaktivierung der G-Proteine selber folgt. Dies wird unterstützt durch den Befund, dass das Ausmaß der paradoxen G-Protein Deaktivierung zur Höhe der α_{2A} -AR Expression im erwarteten Ausmaß korrelierte. Eine Deaktivierung von Gi/o-Proteinen durch Aktivierung von Gs- oder Gq-Signalwegen bzw. Gs- oder Gq-aktivierenden Rezeptoren ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand nicht beschrieben worden, was diese Erklärungen als unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Eine Deaktivierung des GIRK-Kanals als Resultat eines Kanalblocks durch NA scheint ein ebenso unwahrscheinlicher Erklärungsversuch zu sein. Ein Block des GIRK-Kanals von extrazellulärer Seite ist für positiv-geladene Ionen und Moleküle - von divalenten Ionen, z.B. Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Ba^{2+} (Kanjhan, 2005) bis hin zu positiv-geladenen Proteinen, wie z.B. das Bienengift Tertiapin (Jin, 1998) - beschrieben worden. NA hingegen weist keine positive Ladung des Moleküls auf, was gegen eine GIRK-Kanal blockierende Bindung am GIRK-Kanal Selektivitätsfilter spricht. Es wäre darüber hinaus sehr unwahrscheinlich, selbst wenn eine blockierende Bindung stattfindet, dass diese eine Affinität aufweist, die in der Größenordnung der K_d für die NA-Bindung an den α_{2A} -AR liegt.

Ein Rückgang des GIRK-Kanal Stroms könnte auch aus einem lokalen Zusammenbruch des transmembranen K^+ -Gradienten als Resultat der maximalen Aktivierung des GIRK-Kanals resultieren. Diese Erklärung wurde für verschiedene experimentelle Befunde bemüht (Bender, 2004). Ein Zusammenbruch des K^+ -Gradienten kann erfolgen, wenn die aktiven Transportmechanismen der Zellmembran den K^+ -Ausstrom bei Aktivierung des GIRK-Kanals nicht mehr kompensieren können. Bei Deaktivierung des GIRK-

Kanals wäre demnach eine lineare Zunahme des K^+ -Gradienten zu erwarten, da die aktiven Transportmechanismen mit maximaler Rate arbeiten. Somit sollte der Kalium-Strom linear zunehmen, was aber nicht beobachtet wird. Daher erscheint diese Erklärungsmöglichkeit der paradoxen Deaktivierung eher unwahrscheinlich.

Könnte eine transiente Desensibilisierung von GIRK-Kanälen die Befunde erklären? Nach Aktivierung des GIRK-Kanals kommt es zu einem kontinuierlichen Rückgang des GIRK-Kanal Stroms im Sekunden- bis Minutenbereich; aktuelle Untersuchungen konnten eine Sequestrierung von $G\beta\gamma$ durch GRK2 als wesentliche Komponente des zugrunde liegenden Mechanismus identifizieren (Raveh, 2010). Der zeitliche Verlauf der Desensibilisierung entspricht aber nicht dem raschen kinetischen Verlauf der paradoxen Deaktivierung. Darüberhinaus kommt es im Rahmen der Desensibilisierung nicht zu einer rapiden Reaktivierung des GIRK-Kanals bei Auswaschen von NA. Ferner spricht gegen diese Erklärungsmöglichkeit, dass sowohl auf Ebene des G-Proteins als auch auf Ebene des GIRK-Kanals der untersuchte Effekt in gleichem Ausmaß über eine Messdauer von bis zu 20 Minuten gefunden wurde.

Ebenfalls wäre denkbar, dass eine paradoxe Deaktivierung des GIRK-Kanals über eine Deregulation der Interaktion von RGS-Proteinen mit GIRK-Kanälen vermittelt wird. Die Koexpression von verschiedenen RGS-Subtypen erzeugt eine Beschleunigung der agonistabhängigen GIRK-Kanal Aktivierung und Deaktivierung (Doupnik, 1997; Saitoh, 1997), was mechanistisch z.B. mit einer Beschleunigung des Nukleotidaustauschs und der GTPase vereinbar wäre. Im Extremfall wäre es somit denkbar, dass eine übermäßige Beschleunigung der GTPase Rate bei starker agonistabhängiger Aktivierung der Signalkaskade auftritt. Dies sollte dann in eine Inaktivierung des GIRK-Kanals münden. Aus mehreren Gründen erscheint diese Erklärung unwahrscheinlich. Zum einen sind in vorliegender Arbeit RGS-Proteine nicht überexprimiert worden und es erscheint unwahrscheinlich, dass eine Zelllinie, die den α_{2A} -AR stabil exprimiert, kompensatorisch RGS-Proteine vermehrt exprimiert, um die basale Aktivität der Go-Signalkaskade gering zu halten. Weder sind mechanistische

Voraussetzungen für eine rezeptorvermittelte RGS-Rekrutierung beschrieben, noch, warum RGS-Proteine parallel zur Ligand/Rezeptor Interaktion vermehrt auf G-Proteine wirken sollten, auch wenn hierfür theoretische Überlegungen existieren (Turcotte, 2008). Ferner ist die Deaktivierungskinetik sowohl aktivierter G-Proteine als auch aktivierter GIRK-Ströme langsam, was bei einer vermehrten RGS-Funktion nicht zu erwarten wäre.

4.5. Diskussion des Computermodells

4.5.1. Allgemeine Diskussion des Computermodells

Das verwendete Modell stellt eine Vereinfachung des G-Protein Zyklus dar. Mit Hilfe von diesem sollte untersucht werden, ob es Hinweise gibt, dass aktivierte G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren interagieren. In den durchgeführten Simulationen ergab sich, dass der Gleichgewichtszustand der NA-induzierten Interaktion von α_{2A} -AR mit Gi-Proteinen (Hein, 2005) ein entscheidender Befund ist: Nur wenn eine Reaktion aktivierter G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren erlaubt ist, kann im Modell dieser Befund widerspruchsfrei integriert werden. Konsequenterweise bedeutet diese Reaktion, dass bei hoher Konzentration aktivierter Rezeptoren eine bedeutende Fraktion aktivierter G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren interagiert, und somit nicht für die Effektoraktivierung zur Verfügung steht.

Unter physiologischen Bedingungen treten innerhalb einer Signalkaskade Interaktionen zwischen Reaktionspartnern auf, die in einem Volumen gelöst sind oder sich in einer Membran befinden. Die Interaktion von Rezeptoren mit Liganden, bzw. die Bindung von Nukleotiden an G-Proteine stellt eine solche Interaktion zwischen einem Reaktionspartner in Lösung in einem Volumen und einem Reaktionspartner in einer Membran dar. Für eine qualitative Modellierung, bei der die Reaktionskonstanten des Modells an die vorhandenen Daten angepasst werden, macht es keinen Unterschied, ob die Reaktionspartner in einem dreidimensionalen Volumen oder einer

zweidimensionalen Membran diffundieren; die Reaktionskonstanten sind entsprechend eines konstanten Faktors zu skalieren (Heck, 2001). Zur Vereinfachung wurde das Modell in dieser Analogie gerechnet, als wären die Reaktionspartner in Lösung. Durch dieses Vorgehen werden Probleme der Berechnung von Konzentrationen in infinitesimalen Volumeneinheiten, durch die der Übergang Lösung-Membran simuliert werden kann, umgangen.

Damit das Modell nicht unterdefiniert ist (mehr Freiheitsgrade der Variablen als Messdaten) wurde es nur auf die Reaktionen des G-Protein Zyklus beschränkt, die direkt mittels FRET-basierter Methodiken messbar geworden waren. Das verwendete Modell stellt daher eine starke Vereinfachung des G-Protein Zyklus dar, die mehrere Befunde der Literatur zur G-Protein Signalkaskade explizit nicht berücksichtigt. Unter 3.1.2. sind die verwendeten Vereinfachungen und das iterative Vorgehen zum Angleich der Parameter beschrieben, weswegen diese hier nicht wiederholt aufgezählt werden.

4.5.2. Vereinfachungen des Modells

4.5.2.1. Ebene des Rezeptors

Im Modell wird die Aktivierung von Rezeptoren dahingehend vereinfacht, dass die Agonist-Bindung der Rezeptoraktivierung entspricht. Dies berücksichtigt nicht, dass die Rezeptoraktivierung einem statistischen Prozess gleicht, dem nach erfolgter Bindung eines Agonisten während eines Zeitintervalls die Stabilisierung eines aktiven Konformationszustands des Rezeptors mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit folgt (Kenakin, 2009).

Die gewählte Vereinfachung scheint aus mehreren Gründen zulässig. NA ist ein voller Agonist am α_{2A} -AR, d.h. die Bindung stabilisiert mit hoher Wahrscheinlichkeit den aktiven Funktionszustand des Rezeptors (Kenakin, 1984). Somit erscheint eine Berücksichtigung anderer Funktionszustände des α_{2A} -AR (z.B. nicht-aktiviert und Agonist-gebunden, bzw. aktiviert und nicht-Agonist-gebunden) als Vereinfachung plausibel. Ohnehin hat die Simulation zum Ziel, nur einen Agonist zu berücksichtigen, was bedeutet, dass

unterschiedliche Aktivierungswahrscheinlichkeiten für verschiedene Agonisten vernachlässigt werden können. Die absolute Konzentration aktivierter Rezeptoren ist daher aufgrund der verwendeten Vereinfachungen im Modell um einen konstanten Faktor erhöht - unabhängig von der modellierten Agonistkonzentration. Experimentell konnte in Untersuchungen am Rhodopsin System gezeigt werden, dass die Isomerisierung von cis- nach trans-Retinal innerhalb von 200 fsec stattfindet, weshalb in der Folge inaktives Rhodopsin im Millisekunden-Bereich aktiviert wird (Okada, 2001). Untersuchungen an Klasse I GPCRs (α_{2A} -AR, adrenerger β_1 -Rezeptor, Adenosin A_2 -Rezeptor) konnten im Rahmen der Messgenauigkeit (Auflösung im Millisekunden-Bereich) keinen Unterschied zwischen Kinetik der Rezeptoraktivierung und zur erwarteten Kinetik der Agonistbindung finden (Villardaga, 2003; Hoffmann, 2005; Rochais, 2007). Diese Befunde würden im Einklang mit Modellen zur GPCR-Agonistbindung und GPCR-Aktivierung stehen, nach denen die Agonistbindung in einer GPCR Konformation stattfindet, in der der GPCR bereits vor Agonistenbindung die agonistgebundene Konformation eingenommen hat und nach Bindung diese Konformation aufgrund der Bindung stabilisiert wird (Kobilka, 2007).

Ferner vernachlässigt das Modell jeglichen Einfluss von G-Proteinen auf die Bindung von Liganden an GPCR. Es ist beschrieben worden, dass Rezeptoren, die nukleotidfreie G-Proteine gebunden haben, Liganden mit hoher Affinität binden („ternary-complex“; De Lean, 1980). Hieraus könnte eine Diskrepanz der Modellierungsergebnisse zu Messbefunden resultieren: Im Modell ist die Dissoziationsrate der Rezeptor/G-Protein Interaktion schneller als die experimentellen Befunde. Als Erklärung kommt, neben dem nicht modellierten Einfluss des Auswaschens des Agonisten mittels der Perfusion, die Stabilisierung des hochaffinen Rezeptor-Zustandes - insbesondere bei niedrigen Guanin-Nukleotid-Konzentrationen - in Betracht: Vor Abdiffusion von NA muss Go ein Nukleotid binden und die Rezeptorbindung verlassen.

4.5.2.2. Vereinfachungen auf Ebene des G-Proteins

Die Lösungen des Modells basieren auf der Annahme, dass die Interaktion von G-Proteinen und Rezeptoren nach dem Prinzip der katalytischen Kollisionskopplung abläuft, d.h. G-Proteine und Rezeptoren können in der Zellmembran frei diffundieren und werden durch Katalyse des Austauschs von GDP zu GTP durch aktivierte Rezeptoren aktiviert. Es stellt sich die Frage, ob mit dem Modell plausible Lösungen möglich sind, wenn G-Proteine und Rezeptoren vor Rezeptoraktivierung bereits interagieren, bzw. wenn eine Fraktion der G-Proteine stets mit Rezeptoren interagiert.

Es können mehrere Lösungswege unterschieden und diskutiert werden:

(I) Liegen inaktivierte G-Proteine mit inaktivierten Rezeptoren im Komplex und sollen alle G-Proteine der Zelle aktiviert werden, so müsste zu Beginn der Agonistgabe die Rezeptor/G-Protein Interaktion maximal sein und parallel zur G-Protein Aktivierung abnehmen; nach Rezeptorinaktivierung würde die Rezeptor/G-Protein Interaktion wieder zunehmen. Dieser Fall scheidet aber aus, da die Rezeptor/G-Protein Interaktion bei Agonistgabe zunimmt (Hein, 2005).

(II) Interagieren sowohl inaktivierte G-Proteine mit inaktivierten Rezeptoren als auch aktivierte G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren, hängt der kinetische Verlauf von den kinetischen Parametern und der Menge der Reaktionspartner ab. Um die Befunde zu modellieren sind demnach alle Fälle denkbar, in denen eine Fraktion der G-Proteine mit dem Rezeptor interagiert, die während der Rezeptoraktivierung größer wird. Sofern gefordert wird, dass alle G-Proteine aktiviert werden, ist dies denkbar, wenn nur eine Fraktion der inaktiven G-Proteine mit inaktiven Rezeptoren interagiert und ein Überschuss von G-Proteinen gegenüber Rezeptoren vorliegt, wobei der Überschuss entsprechend der Größe der interagierenden Fraktion zunehmen muss. Ansonsten resultiert der in (I) dargelegte Reaktionsverlauf. Dies impliziert, dass die Interaktion aktivierter G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren größer als die Interaktion inaktivierter G-Proteine mit inaktivierten Rezeptoren sein muss.

Das Modell berücksichtigt nicht, dass aktivierte G-Proteine in dimerer Konformation vorliegen können. Bisher konnte eine Interaktion von G-Proteinen mit Rezeptoren nur in heterotrimerer Konformation gezeigt werden, auch wenn experimentelle Befunde eine Interaktion von $G\beta\gamma$ mit aktivierten Rezeptoren erlauben würden (Herrmann, 2004). Anhand verschiedener Befunde ist es plausibel anzunehmen, dass aktivierte G-Protein im Gleichgewicht zwischen Heterotrimer und Dimer vorliegen. Die Reaktionsraten der G-Protein Dissoziation und Assoziation sind unter physiologischen Bedingungen bisher nicht bestimmt, sondern nur in biochemischen Analysen (Gilman, 1987). Dem Massen-Wirkungs-Gesetz folgend ist das Verhältnis dissoziierter und nicht-dissoziierter aktivierter G-Proteine konstant, sofern keiner der beiden Zustände aus dem Gleichgewicht (z.B. durch Interaktion mit Effektoren) entfernt wird. Das Modell überschätzt daher die Menge aktivierter, heterotrimerer G-Proteine, wobei das Ausmaß unbekannt bleibt.

Im Modell wird weder der Austausch des Guanin-Nukleotid an der $G\alpha$ -Untereinheit noch der Einfluss von RGS-Proteinen auf die Rate der GTP-Hydrolyse berücksichtigt. Die Reaktionskonstanten des Nukleotidaustausch unter physiologischen Bedingungen wurden für das Rhodopsin System als minimale Grenzwerte geschätzt (Heck, 2001); das erweiterte Modell baut hierauf auf (siehe 4.5.3.). Biochemische Untersuchungen an aufgereinigten G-Proteinen sind für die Abschätzung der Bindungskinetik unter physiologischen Bedingungen nur von begrenztem Nutzen, da diese zu meist unter nicht-physiologischen Pufferbedingungen mit einer supraphysiologischen Mg^{2+} -Konzentration von 10 mM durchgeführt wurden, um nach Bindung von Guanin-Nukleotid an $G\alpha$ das zuvor nukleotidfreie, heterotrimere G-Protein zu dissoziieren, damit die Bindung des Nukleotids stabilisiert wird (Gilman, 1987).

4.5.3. Diskussion des erweiterten kinetischen Modells

Das erweiterte kinetische Modell des G-Protein Zyklus baut auf dem vereinfachten Modell auf und berücksichtigt den Nukleotidaustausch am G-Protein. Es kann qualitativ die Befunde zur G-Protein Aktivierung (Bünemann,

2003) und zur Rezeptor/G-Protein Interaktion (Hein, 2005) modellieren. Der EC_{50} der Konzentrationswirkungskurve der GIRK-Kanal Aktivierung ist niedriger, als es anhand des Modells zu erwarten wäre (Bünemann, 2003; Bünemann, 2001). Das Modell berücksichtigt keine Signalverstärkung auf Ebene des GIRK-Kanals, was die Diskrepanz zu den experimentellen Befunden erklären würde. Die Befunde der Arbeit zur Nukleotidabhängigkeit der Rezeptor/G-Protein Interaktion und der paradoxen Deaktivierung aktivierter G-Proteine können qualitativ mit dem Modell simuliert werden. Das Ausmaß Rezeptor/G-Protein Interaktion in Abhängigkeit der Nukleotidkonzentration wird überschätzt. Mehrere Erklärungsmöglichkeiten kommen in Betracht. Wenn man von unbekanntem Einflussgrößen absieht haben die Parameter des erweiterten Modells prinzipiell folgende Unsicherheiten:

- Die Parameter der Nukleotidbindung an G_o wurden in Analogie zu G_t gewählt,
- die Permeabilisierung der Zellmembran mit Saponin kann nicht nur zu einer Veränderung der Reaktionsparameter der agonistabhängigen Rezeptor-Aktivierung führen (wie untersucht wurde), sondern auch die Reaktionsparameter aller membrangebundener Reaktionspartner, wie z.B. die Rezeptor/G-Protein Interaktion verändern (die verlangsamte Kinetik der Reaktionsprozesse nach Zellmembranpermeabilisierung mit Saponin legt diese Vermutung nahe),
- es ist nicht bekannt, ob der FRET für die Interaktion nukleotidfreier bzw. nukleotidgebundener G-Proteine mit aktivierten GPCR gleich ist. Der hochaffine Zustand des Rezeptors und die strukturellen Untersuchungen an GPCRs legen nahe, dass der Komplex aus Ligand, GPCR und G-Protein eine stabile Konformation aufweist, weshalb der Interaktion aktivierter GPCRs mit nukleotidfreien G-Proteinen eine eigene Konformation zugrunde liegen könnte.

Nach Zellmembranpermeabilisierung mit Saponin zeigt die Konzentrationswirkungskurve der α_{2A} -AR-Aktivierung einen verringerten EC_{50} . Im Modell wurde daher eine äquivalente NA-Konzentration geschätzt, was eine weitere Fehlerquelle darstellt.

Im Modell kann die Überschätzung der Rezeptor/G-Protein Interaktion in Gegenwart niedriger Nukleotidkonzentrationen zum einen durch eine Verringerung der äquivalenten NA-Konzentration und durch eine Verringerung der Interaktion aktiver G-Proteine mit aktiven Rezeptoren korrigiert werden. Letzteres steht in Analogie zu einer Behinderung der Interaktion nach Zellmembranpermeabilisierung mit Saponin. Sofern man nur einen Parameter ändert kann dies durch eine Verringerung der Ratenkonstante $k_{\text{AssoRLGgtp}}$ erreicht werden. Ohne weitere Anpassungen im Modell wäre in der Folge ein transientes Maximum in der Rezeptor/G-Protein Interaktion zu beobachten (vgl. Abbildung 3.7.3): Da die Interaktion GTP-gebundener G-Proteine unwahrscheinlicher wird, können nach vollständiger G-Protein Aktivierung - in Analogie zum vereinfachten Modell - nur noch wenige G-Proteine mit aktivierten Rezeptoren interagieren. Dies steht im Widerspruch zu den Befunden in vorliegender Arbeit und in Veröffentlichungen (Hein, 2005). Es sei angemerkt, dass sich ein geringes transientes Maximum der Rezeptor/G-Protein Interaktion möglicherweise aufgrund der technischen Grenzen der Messgenauigkeit nicht bestimmen lässt.

Der Verlauf der Kinetik der rezeptorvermittelten Deaktivierung $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -aktivierter G-Proteine wird mit dem erweiterten Modell zu langsam modelliert. Für eine Erklärung über eine Interaktionsbehinderung durch Zellmembranpermeabilisierung mit Saponin ist zu berücksichtigen, dass im Modell die Kinetik insbesondere von der Konzentration aktivierter Rezeptoren abhängt, nur gering von Parametern, die die Interaktion aktiver G-Proteine mit aktiven Rezeptoren bestimmen. Somit erscheint es plausibel, dass die äquivalente NA-Konzentration zu hoch geschätzt wurde.

Ferner kann das erweiterte Modell nicht die Befunde zur Rezeptor/G-Protein Interaktion in Gegenwart von GDP plausibel modellieren. Es zeigt eine Interaktion wie in Gegenwart von GTP, da GDP- und GTP-Bindungsparameter als gleich gewählt wurden. Somit kann diese Diskrepanz ein Hinweis auf eine verringerte GDP-Affinität von G_o nach Bindung nach α_{2A} -AR sein. Die ausgeprägte Interaktion von G-Proteinen bei hoher GDP-Konzentration erscheint mechanistisch plausibel, zu erwarten wäre aber, dass bei geringer

GDP-Konzentration die Interaktion maximal erscheint. Möglicherweise repräsentiert diese Diskrepanz auch zwei unterschiedliche Konformationen des G-Proteins am Rezeptor - GDP-gebunden und nukleotidfrei - aus denen ein unterschiedlicher FRET resultiert, weshalb trotz maximaler Rezeptor/G-Protein Interaktion der FRET in Gegenwart von Nukleotiden geringer erscheint. Die Überlegungen zum Ternary Complex Modell würde eine solche Vermutung stützen, da nur bei Interaktion von GPCR mit nukleotidfreien G-Proteinen ein hochaffiner Bindungszustand des Rezeptors für Liganden erreicht wird.

4.6. Ausblick

Weiterführende experimentelle Untersuchungen könnten mit mehreren Zielsetzungen die Ergebnisse der Arbeit direkt aufgreifen. Eine wesentliche Fragestellung wäre, ob die Befunde für die Gi/o Signalkaskade spezifisch sind, oder ob sie auch für andere G-Protein Signalkaskaden wie Gs oder Gq gefunden werden können. Untersuchungen könnten z.B. für die Gs-Signalkaskade mit dem adrenergen β_1 -Rezeptor und die Gq-Signalkaskade mit dem purinergeren P_2Y_1 -Rezeptor durchgeführt werden, für die die FRET-basierte Detektion der Rezeptor/G-Protein Interaktion und der G-Protein Aktivierung möglich sind (Hein, 2006; unpublizierte Beobachtungen). Präliminäre Versuche zeigten für die β_2 /Gs-Signalkaskade, dass nach Permeabilisierung der Zellmembran in Gegenwart von 10 μ M GTP die agonistinduzierte Änderung des FRET nur unzureichend den Signal-Rauschabstand übersteigt. Eine mögliche Ursache könnte die hohe konstitutive Aktivität des β_2 -Rezeptors sein, welche zwei Konsequenzen haben kann: (I) Gs-Proteine werden agonistunabhängig vollständig aktiviert und (II) Gs-Proteine können agonistunabhängig mit β_2 -Rezeptoren interagieren. In beiden Fällen würde die agonistinduzierte Änderung des FRET verringert werden und könnte möglicherweise nicht mehr mit den zur Verfügung stehenden Techniken aufgelöst werden. Dies wäre in Analogie zu Befunden zur Rezeptor/G-Protein Interaktion von rekonstituierten β_2 -Rezeptor und $G\alpha_s$ in Lipidvesikeln: In Abwesenheit von Guaninnukleotiden

interagieren Rezeptoren und G-Proteine stabil, die Gabe des Agonisten Isoproterenol begünstigt, die Gabe des inversen Agonisten ICI-118,551 verhindert diese Interaktion (Yao, 2009). Welchen Einfluss die Membranpermeabilisierung durch Saponin (was sich in die Zellmembran einlagert) auf die Funktion von β_2 -Rezeptoren und die Rezeptor/G-Protein Interaktion hat, ist nicht bekannt, eine Veränderung der konstitutiven Aktivität des Rezeptors wäre zu erwarten. Methodisch könnte daher für weiterführende Experimente eine Zellmembranpermeabilisierung mittels α -Hämolyisin von *S. aureus* von Vorteil sein, da hierbei durch Membraninsertion von Transmembranproteinen distinkte Poren in der Membran erzeugt werden. Mit dieser Methodik konnten erfolgreich FRAP-basierte Untersuchungen unter Modulation der intrazellulären Nukleotide durchgeführt werden (Qin, 2008).

Ein weiteres bedeutendes Themengebiet für weiterführende Untersuchungen liegt in einer verfeinerten kinetischen Modellierung des G-Protein Signalwegs unter Berücksichtigung der räumlichen Lokalisation der beteiligten Reaktionspartner. Initial wäre die Membrangebundenheit von Rezeptoren und G-Proteinen im Modell zu berücksichtigen, was erlauben würde, experimentell bestimmte kinetische Parameter des Rhodopsin-Systems auf Plausibilität in anderen G-Protein gekoppelten Signalwegen zu überprüfen. Parallel ermöglicht ein verfeinertes Modell auch Simulationen als Monte-Carlo Experimente. Hierbei wird das Diffusionsverhalten einer definierten Anzahl von Reaktionspartnern simuliert und die chemischen Reaktionen als statistischer Prozess in Folge einer Kollision zweier Reaktionspartner modelliert. Ziel einer verfeinerten Simulation wird es sein, die räumliche Lokalisationen von Rezeptoren, G-Proteinen, Liganden oder Nukleotiden wie z.B. in einer Synapse zu modellieren. Somit könnte untersucht werden unter welchen physiologischen Bedingungen eine lokale Depletion von GTP zu erwarten wäre oder welche Folgen sich aus rezeptorreichen und rezeptorarmen Membranabschnitten ergeben.

5. Zusammenfassung

Aktiviert G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktivieren heterotrimere G-Proteine, in dem sie den Austausch von GDP zu GTP am G-Protein katalysieren. Theoretische Untersuchungen mittels eines vereinfachten kinetischen Modells des Gi/o-Protein Zyklus legen nahe, dass nicht nur GDP-, sondern auch GTP-gebundene Gi/o-Proteine mit aktivierten α_{2A} -adrenergen Rezeptoren (α_{2A} -AR) interagieren können. Demgemäß sollten aktivierte Gi/o-Proteine mit aktivierten α_{2A} -AR vermehrt interagieren, wenn mehr α_{2A} -AR aktiviert werden als für eine maximale G-Protein Aktivierung nötig sind. Dies sollte zu einer paradoxen Deaktivierung von Gi/o-Proteinen und deren Effektorproteinen, z.B. dem G-Protein gekoppelten, einwärtsgerichtenden Kaliumkanal (GIRK-Kanal) führen. Mittels FRET lässt sich in lebenden und in permeabilisierten Zellen unter Kontrolle der intrazellulären Nukleotide die Aktivierung von α_{2A} -AR, die Interaktion von Gi/o-Proteinen mit α_{2A} -AR und die Aktivierung von Gi/o-Proteinen bestimmen. Die Arbeit zeigt auf mehreren Ebenen, dass Go-Proteine mit aktivierten α_{2A} -AR interagieren und im nukleotidfreiem Zustand sequestriert werden können: (I) Go-Proteine, irreversibel durch $GTP\gamma S$ aktiviert werden abhängig von der Rezeptor Aktivierung in Abwesenheit von Nukleotiden deaktiviert, (II) Go-Proteine interagieren in Gegenwart niedriger Nukleotidkonzentrationen in wesentlich größer Fraktion mit aktivierten α_{2A} -AR als in Gegenwart hoher Nukleotidkonzentrationen, (III) Go Proteine können in Gegenwart niedriger GTP und $GTP\gamma S$ -Konzentrationen bei Aktivierung des α_{2A} -AR inaktiviert werden.

Die Arbeit zeigt exemplarisch an der Signalkaskade des α_{2A} -AR und Go, dass der G-Protein Zyklus in lebenden Zellen reversibel ist, woraus eine Deaktivierung aktivierter G-Proteine und aktivierter G-Protein Effektoren resultieren kann. Dies erklärt paradoxe Befunde zur Deaktivierung von GIRK-Kanälen in Myozyten durch A_1 -Rezeptoren.

6. Summary

G protein coupled receptors activate heterotrimeric G proteins by catalyzing the exchange of GDP with GTP at the $G\alpha$ subunit. Kinetic modelling of the Gi/o protein cycle suggests, that both GDP- and GTP-bound Gi/o proteins interact with activated α_{2A} -adrenergic receptors (α_{2A} -AR). Consequently, upon activating more α_{2A} -AR than required for maximal Gi/o protein activation, the interaction of activated Gi/o proteins with activated α_{2A} -AR will become increasingly prominent and ultimately lead to a paradoxical deactivation of Gi/o proteins and their effectors such as G protein coupled inwardly rectifying potassium channels. Using means of FRET allows the detection of the receptor activation, receptor/G protein interaction and G protein activation in single living cells and in single permeabilized cells while controlling the intracellular nucleotide composition. Data suggest, that activated Go proteins may be sequestered at activated α_{2A} -AR in their nucleotide-free state: (I) Go proteins irreversibly activated by $GTP\gamma S$ become inactivated upon receptor stimulation in the absence of nucleotides, (II) Go proteins interact with activated α_{2A} -AR to a large extent in the presence of low concentrations of nucleotide, (III) Go proteins may be inactivated upon activation of α_{2A} -AR in the presence of low concentrations of GTP or $GTP\gamma S$. Taken together, the data demonstrate the reversibility of the G protein cycle in living cells for the paradigm α_{2A} -AR/Go pathway. The data thereby explain the paradoxical inactivation of G protein coupled inwardly rectifying potassium channels in myocytes upon activation of adenosine A_1 receptors.

7. Literaturverzeichnis

- Alt A, McFadyen IJ, Fan CD, Woods JH, Traynor JR (2001) Stimulation of guanosine-5'-o-(3-[³⁵S]thio)triphosphate binding in digitonin-permeabilized C6 rat glioma cells: evidence for an organized association of mu-opioid receptors and G protein. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 116-121
- Alves ID, Salamon Z, Varga E, Yamamura HI, Tollin G, Hruby VJ (2003) Direct observation of G-protein binding to the human μ -opioid receptor using plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 278: 48890-48897
- Alves ID, Salgado GF, Salamon Z, Brown MF, Tollin G, Hruby VJ (2005) Phosphatidylethanolamine enhances rhodopsin photoactivation and transducin binding in a solid supported lipid bilayer as determined using plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *Biophys J* 88: 198-210
- Arnsten AF; Goldman-Rakic PS (1985) Alpha 2-adrenergic mechanisms in prefrontal cortex associated with cognitive decline in aged nonhuman primates. *Science* 230: 1273-1276
- Arnsten A (2006) Stimulants: Therapeutic actions in ADHD. *Neuropsychopharmacol* 31: 2376-2383
- Asano T, Semba R, Kamiya N, Ogasawara N, Kato K (1988) Go, a GTP-binding protein: immunochemical and immunohistochemical localization in the rat. *J Neurochem* 50:1164-1169
- Asano T, Shinohara H, Morishita R, Norota I, Kato K, Endoh M (1995) The G-protein Go in mammalian cardiac muscle: localization and coupling to A1 adenosine receptors. *J Biochem* 117: 183-189
- Bauer PH, Bluml K, Schroder S, Hegler J, Dees C, Lohse MJ (1998) Interactions of phosducin with the subunits of G-proteins. Binding to the alpha as well as the betagamma subunits. *J. Biol. Chem.* 273: 9465-9471A
- Bender K, Wellner-Kienitz MC, Bösche LI, Rinne A, Beckmann C, Pott L (2004) Acute desensitization of GIRK current in rat atrial myocytes is related to K⁺-current flow. *J Physiol* 561: 471-483
- Biernbaum MS, Bownds MD (1979) Influence of light and calcium on guanosine 5'-triphosphate in isolated frog rod outer segments. *J Gen Physiol* 74: 649-669
- Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta* 1031: 163-224
- Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 286: 2495-2498.

- Bornheimer SJ, Maurya MR, Farquhar MG, Subramaniam S (2004) Computational modeling reveals how interplay between components of a GTPase-cycle module regulates signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15899-15904
- Bösche LI, Wellner-Kienitz M-C, Bender K, Pott L (2003) G protein-independent inhibition of GIRK current by adenosine in rat atrial myocytes overexpressing A1 receptors after adenovirus-mediated gene transfer. *J Physiol* 550: 707-717
- Bourne HR (1998) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9: 134-142
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brandt DR, Ross EM (1986) Catecholamine-stimulated GTPase cycle. Multiple sites of regulation by β -adrenergic receptor and Mg^{2+} studied in reconstituted receptor-Gs vesicles. *J Biol Chem* 261: 1656-1662
- Bünemann M, Brandts B, Pott L (1996) Downregulation of muscarinic M2 receptors linked to K⁺ current in cultured guinea-pig atrial myocytes. *J Physiol* 494: 351-362
- Bünemann M, Hosey MM (1998) Regulators of G protein signaling (RGS) proteins constitutively activate G $\beta\gamma$ -gated potassium channels. *J Biol Chem* 273: 31186-31190
- Bünemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG, Hosey MM (1998) Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 61: 169-192
- Bünemann M, Bücheler MM, Philipp M, Lohse MJ, Hein L (2001) Activation and deactivation kinetics of α_{2A} - and α_{2C} -adrenergic receptor-activated G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel currents. *J Biol Chem* 276: 47512-47517
- Bünemann M, Frank M, Lohse MJ (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100: 16077-16082
- Breitwieser GE, Szabo G (1988) Mechanism of muscarinic receptor-induced K⁺ channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J Gen Physiol* 91: 469-493
- Bylund DB (1985) Heterogeneity of alpha-2 adrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 22:835-843

- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preninger A, Mazzone MR, Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine Reviews* 24: 765-781
- Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, Persani L, Lohse MJ (2009) Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* 7:e1000172
- Campbell GD, Edwards FR, Hirst GD, O'Shea JE (1989) Effects of vagal stimulation and applied acetylcholine on pacemaker potentials in the guinea-pig heart. *J Physiol* 415: 57-68
- Chidiac P (1998) Rethinking receptor–G protein–effector interactions. *Biochem Pharmacol* 55: 549-556
- Chien EY, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, Shi L, Newman AH, Javitch JA, Cherezov V, Stevens RC (2010) Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* 330: 1091-1095
- Christopoulos A, Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 54: 323-374
- Clapham DE, Neer EJ (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 167-203
- Conklin BR, Farfel Z, Lustig KD, Julius D, Bourne HR (1993) Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq to that of Gi. *Nature* 363: 274-276
- Cone RA (1967) Early receptor potential: photoreversible charge displacement in rhodopsin. *Science* 155: 1128-1131
- De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255: 7108-7117
- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA, Kofuji P (1997) RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of G $\beta\gamma$ -activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94: 10461-10466
- Docherty JR (1998) Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 361: 1-15
- Evanko DS, Thiyagarajan MM, Takida S, Wedegaertner PB (2005) Loss of association between activated G α_q and G $\beta\gamma$ disrupts receptor-dependent and receptor-independent signaling. *Cell Signal* 17: 1218-1228

Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, Gardella TJ, Vilardaga JP (2009) Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol* 5: 734-42

Ferguson KM, Higashijima T, Smigel MD, Gilman AG (1986) The influence of bound GDP on the kinetics of guanine nucleotide binding to G proteins. *J Biol Chem* 261: 7393-7399

Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24.

Fong AM, Premont RT, Richardson RM, Yu YR, Lefkowitz RJ, Patel DD (2002) Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7478 -7483

Kim YM, Barak LS, Caron MG, Benovic JL (2002) Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem* 277: 16837-16846

Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Wenig G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE (1998) Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science* 280: 1271-1274

Frank M, Thümer L, Lohse M, Bünemann M (2005) G Protein activation without subunit dissociation depends on a G α i-specific region. *J Biol Chem* 280: 24584-24590

Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-1272

Froldi G, Belardinelli L (1990) Species-dependent effects of adenosine on heart rate and atrioventricular nodal conduction. Mechanism and physiological implications. *Circ Res* 67: 960-978

Galés C, Rebois RV, Hogue M et al (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2:177-184

Galés C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H, Bouvier M (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13: 778-786

Gainetdinov RR, Bohn LM, Walker JKL, Laporte SA, Macrae AD, Caron MG, Lefkowitz RJ, Premont RT (1999) Muscarinic supersensitivity and impaired receptor desensitization in G protein-coupled receptor kinase 5-deficient mice. *Neuron* 24: 1029-1036

Gainetdinov RR, Bohn LM, Sotnikova TD, Cyr M, Laakso A, Macrae AD, Torres GE, Kim KM, Lefkowitz RJ, Caron MG, Premont RT (2003) Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. *Neuron* 38: 291-303

Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 27: 107-144

Gavras I, Manolis AJ, Gavras H (2001) The alpha2-adrenergic receptors in hypertension and heart failure: experimental and clinical studies. *J Hypertens* 19: 2115-2124

Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prézeau L, Pin JP (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J* 20: 2152-2159

Gether U, Kobilka B (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273: 17979-17982

Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615-649

Graf R, Mattera R, Codina J, Evans T, Ho YK, Estes MK, Birnbaumer L (1992) Studies on the interaction of alpha subunits of GTP-binding proteins with beta gamma dimers. *Eur J Biochem* 210: 609-619

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100

Hárosi FI (1975) Absorption spectra and linear dichroism of some amphibian photoreceptors. *J Gen Physiol* 66: 357-382

Hein L, Altman JD, Kobilka BK (1999) Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 402: 181-184

Hein P, Frank M, Hoffmann C, Lohse MJ, Bünemann M (2005) Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *EMBO J* 24: 4106-4114

Hein P, Rochais F, Hoffmann C, Dorsch S, Nikolaev VO, Engelhardt S, Berlot CH, Lohse M, Bünemann M (2006) Gs activation is time-limiting in initiating receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* 281: 33345-33351

Hein P, Bünemann M (2009) Coupling mode of receptors and G proteins. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 379: 435-443

- Heck M, Hofmann KP (2001) Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism. *J Biol Chem* 276: 10000-10009
- Hebert TE, Bouvier M (1998) Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem Cell Biol* 76: 1-10
- Herrmann R, Heck M, Henklein P, Henklein P, Kleuss C, Hofmann KP, Ernst OP (2004) Sequence of interactions in receptor-G protein coupling. *J Biol Chem* 279: 24283-24290
- Higashijima T, Ferguson KM, Sternweis PC, Ross EM, Smigel MD, Gilman AG (1987) The effect of activating ligands on the intrinsic fluorescence of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *J Biol Chem* 262: 752-756
- Hilf G, Kupprion C, Wieland T, Jakobs KH (1992) Dissociation of guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate from guanine-nucleotide-binding regulatory proteins in native cardiac membranes. Regulation by nucleotides and muscarinic acetylcholine receptors. *Eur J Biochem* 204: 725-731
- Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. *Sinauer*
- Hollinger S, John R Hepler JR (2002) Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54: 527-559
- Hoffmann C, Gaietta G, Bünemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilardaga JP, Tsien RY, Ellisman MH, Lohse MJ (2005) A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2: 171-176
- Houslay MD (2009) Arrestin times for developing antipsychotics and beta-blockers. *Science Signaling* 2: pe 22
- Hubbell WL, Altenbach C, Hubbell CM, Khorana HG (2003) Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Adv Protein Chem* 63: 243-290
- Hur EM, Kim KT (2002) G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* 14: 397-405
- Hurowitz E, Melnyk J, Chen Y, Kouros-Mehr H, Simon M, Shizuya H (2000) Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein α , β , γ subunit genes. *DNA Res* 7: 111-120
- Hynes TR, Tang L, Mervine SM, Sabo JL, Yost EA, Devreotes PN, Berlot CH (2004). Visualization of G protein $\beta\gamma$ dimers using bimolecular fluorescence

complementation demonstrates roles for both β and γ in subcellular targeting. *J Biol Chem* 279: 30279-30286

Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, Yano R, Sora I, Niki H (2002) Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys? *Neurosci Res* 44: 121-131

Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322: 1211-1217

Jaber M, Koch WJ, Rockman H, Smith B, Bond RA, Sulik KK, Ross J, Lefkowitz RJ, Caron MG, Giros B (1996) Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 12974-12979

Janetopoulos C, Jin T, Devreotes P (2001) Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells. *Science* 291: 2408-2411

Jeck D, Lindmar R, Löffelholz K, Wanke M (1988) Subtypes of muscarinic receptor on cholinergic nerves and atrial cells of chicken and guinea-pig hearts. *Br J Pharmacol* 93: 357-366

Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 273:17299-17302

Jin W, Lu Z (1995) A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry* 37: 13291-13299

Jurgens CW, Hammad HM, Lichter JA, Boese SJ, Nelson BW, Goldenstein BL, Davis KL, Xu K, Hillman KL, Porter JE, Doze VA (2007) Alpha2A adrenergic receptor activation inhibits epileptiform activity in the rat hippocampal CA3 region. *Mol Pharm* 71: 1572-1581

Kanjhan R, Coulson EJ, Adams DJ, Bellingham MC (2005) Tertiapin-Q blocks recombinant and native large conductance K⁺ channels in a use-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 1353-1361

Kinzer-Ursem TL, Linderman JJ (2007) Both ligand- and cell-specific parameters control ligand agonism in a kinetic model of g protein-coupled receptor signaling. *PLoS Comput Biol*: 3, e6

Kenakin TP (1984) The relative contribution of affinity and efficacy to agonist activity: organ selectivity of noradrenaline and oxymetazoline with reference to the classification of drug receptors. *Br J Pharmacol* 81: 131-141

Kenakin T (2002) Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov* 1: 103-110

- Kenakin T (2003). Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* 24: 346-354
- Kenakin T (2004) Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 25: 186-192
- Kenakin T (2007) Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 407-415
- Kenakin T (2007) Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharm acol* 72: 1393-1401
- Kenakin T (2009) '7TM receptor allostery: putting numbers to shapeshifting proteins. *Trends Pharmacol Sci* 2009: 460-469
- Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, Kwatra MM (2000) β 2-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both Gs and Gi. *Circ Res* 87: 705-709
- Klein S, Reuveni H, Levitzki A (2000) Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3219-3223
- Kobilka BK (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 1768: 794-807
- Kobilka BK, Deupi X(2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 397-406
- Kurogouchi F, Nakane T, Furukawa Y, Hirose M, Inada Y, Chiba S (2002) Heterogeneous distribution of beta-adrenoceptors and muscarinic receptors in the sinoatrial node and right atrium of the dog. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 666-672
- Krasel C, Vilardaga JP, Bünemann M, Lohse MJ (2004) Kinetics of G-protein-coupled receptor signalling and desensitization *Biochem Soc Trans* 32: 1029-1031
- Krupnick JG, Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 289-319
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- Lakowicz JR (2004). Principles of Fluoresence Spectroscopy. *Springer, New York*

Lambert N (2008) Dissociation of heterotrimeric G proteins in cells. *Science signaling* 1: re5

Leaney JL, Benians A, Brown S, Nobles M, Kelly D, Tinker A (2004) Rapid desensitization of G protein-gated inwardly rectifying K⁺ currents is determined by G protein cycle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: 182-191

Levitzi A (1988) From epinephrine to cyclic AMP. *Science* 241: 800-806

Liebman PA, Sitaramayya A (1984) Role of G-protein-receptor interaction in amplified phosphodiesterase activation of retinal rods. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 17: 215-225

Liebman PA, Parker KR, Dratz EA (1987) The molecular mechanism of visual excitation and its relation to the structure and composition of the rod outer segment. *Annu Rev Physiol* 49: 765-791

Limbird LE, Hardman JG (2001) Goodman and Gilman's: The Pharmacological basis of Therapeutics 10th Edition. *McGraw-Hill, New York*

Lober RM, Pereira MA, Lambert NA (2006) Rapid activation of inwardly rectifying potassium channels by immobile G-protein-coupled receptors. *J Neurosci* 26:12602-12608

Lodowski DT, Pitcher JA, Capel WD, Lefkowitz RJ, Tesmer JJ (2003) Keeping G proteins at bay: A complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and G $\beta\gamma$. *Science* 300: 1256-1262

Luetje CW, Gierschik P, Milligan G, Unson C, Spiegel A, Nathanson NM (1987) Tissue-specific regulation of GTP-binding protein and muscarinic acetylcholine receptor levels during cardiac development. *Biochemistry* 26: 4876-4884.

Lukyanov KA, Chudakov DM, Lukyanov S, Verkhusha VV (2005) Innovation: Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 885-891

Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20: 87-90

Mackinnon AC, Brown CM, Spedding M, Kilpatrick AT (1989) [3H]-idazoxan binds with high affinity to two sites on hamster adipocytes: an alpha 2-adrenoceptor and a non-adrenoceptor site. *Br J Pharmacol* 98: 1143-1150

Malbon CC (2005) G Proteins in Development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 689-701

Marci B, Salahpour A, Didriksen M, Ghisi V, Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG (2008) Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2

interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:13656-13661

McIntire WE (2009) Structural determinants involved in the formation and activation of G protein betagamma dimers. *Neurosignals* 17: 82-99

Mao J, Wang X, Chen F, Wang R, Rojas A, Shi Y, Piao H, Jiang C (2004) Molecular basis for the inhibition of G protein-coupled inward rectifier K⁺ channels by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1087-1092

Milligan G (2004) G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Mol Pharmacol* 66: 1-7

Motomura S, Deighton NM, Zerkowski HR, Khamssi M, Brodde OE (1990) Differential regulation of human cardiac beta-adrenergic and muscarinic receptors by chronic beta-adrenoceptor antagonist treatment. *Br J Clin Pharmacol* 30:1125-1145

Neher E, Sakmann B, Steinbach JH (1978) The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* 375: 219-228

Neubig RR (1994) Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J* 8: 939-946

Nobles M, Benians A, Tinker A (2005) Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18706-18711

Oldham WM, Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 60-71

Okada T, Ernst OP, Palczewski K, Hofmann KP (2001) Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem Sci* 26:318-324

Onaran HO, Costa T, Rodbard D (1993) Beta gamma subunits of guanine nucleotide-binding proteins and regulation of spontaneous receptor activity: thermodynamic model for the interaction between receptors and guanine nucleotide-binding protein subunits. *Mol Pharmacol* 43:245-56.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G-protein-coupled receptor. *Science* 289: 739-745

Perez DM, Karnik SS (2005) Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev* 57: 147-161

- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 639-650
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67: 653-692
- Pippig S, Andexinger S, Lohse MJ(1995) Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol* 47: 666-676
- Philip F, Sengupta P, Scarlata S (2007) Signaling through a G Protein-coupled receptor and its corresponding G protein follows a stoichiometrically limited model. *J Biol Chem* 282:19203-19216
- Premont RT (2005) Once and future signaling: G protein-coupled receptor kinase control of neuronal sensitivity. *Neuromolecular Med* 7: 129-147
- Premont RT, Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69: 511-534
- Qin K, Sethi PR, Lambert NA (2008) Abundance and stability of complexes containing inactive G protein –coupled receptors and G proteins. *FASEB J* 22: 2920-2927
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human β 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450: 383-387
- Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Brian T DeVree BT, Daniel M Rosenbaum DM, Foon Sun Thian FS, Tong Sun Kobilka, Andreas Schnapp, Ingo Konetzki, Roger K Sunahara, Samuel H Gellman, Alexander Pautsch, Jan Steyaert, William I Weis, Brian K Kobilka (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the β (2) adrenoceptor. *Nature* 469: 175-180
- Raveh A, Cooper A, Guy-David L, Reuveny E (2010) Nonenzymatic Rapid Control of GIRK Channel Function by a G Protein-Coupled Receptor Kinase. *Cell* 143: 750-760
- Rebois RV, Robitaille M, Gales C, Dupré DJ, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M, Hébert TE(2006) Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J Cell Sci* 119: 2807-2818
- Reiter E, Lefkowitz RJ (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17:159-165

Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, García-Hoz C, Jurado-Pueyo M, Aymerich I, Mayor F (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768: 913-22

Riven I, Iwanir S, Reuveny E (2006) GIRK channel activation involves a local rearrangement of a preformed G protein channel complex. *Neuron* 51: 561-573

Rivkees SA (1995) The ontogeny of cardiac and neural A1 adenosine receptor expression in rats. *Dev Brain Res* 89: 202-213

Rochais F, Vilardaga JP, Nikolaev VO, Bünemann M, Lohse MJ, Engelhardt S (2007) Real-time optical recording of beta1-adrenergic receptor activation reveals supersensitivity of the Arg389 variant to carvedilol. *J Clin Invest* 117: 229-235

Roberts DJ, Waelbroeck M (2004) G protein activation by G protein coupled receptors: ternary complex formation or catalyzed reaction? *Biochem Pharmacol* 68: 799-806

Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459: 356-363

Rosenzweig DH, Nair KS, Wei J, Wang Q, Garwin G, Saari JC, Chen CK, Smrcka AV, Swaroop A, Lem J, Hurley JB, Slepak VZ (2007) Subunit dissociation and diffusion determine the subcellular localization of rod and cone transducins. *J Neurosci* 27: 5484 -5494

Ross EM, Wilkie TM (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 69: 795-827

Saitoh O, Kubo Y, Miyatani Y, Asano T, Nakata H (1997) RGS8 accelerates G-protein-mediated modulation of K⁺ currents. *Nature* 390: 535-529

Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe HW, Hofmann KP, Ernst OP (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455: 497-502

Schmidt CJ, Thomas TC, Levine MA, Neer EJ (1992) Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J Biol Chem* 267: 13807-13810

Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2: 905-909

- Shea L, Linderman JJ (1997) Mechanistic model of G-protein signal transduction. Determinants of efficacy and effect of precoupled receptors. *Biochem Pharmacol* 53: 519-530
- Shein HM, Enders JF (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 1164-1172
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239
- Signorini S, Liao YJ, Duncan SA, Jan LY, Stoffel M (1997) Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 271-276
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam, N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252: 802-808
- Sprang SR (2011) Cell signalling: Binding the receptor at both ends. *Nature* 469: 172-173
- Sternweis PC, Robishaw JD (1984) Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem* 259: 13806-13813
- Stryer L (1986) Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev Neurosci* 9: 87-119
- Takigawa T, Alzheimer C (1999) Variance analysis of current fluctuations of adenosine- and baclofen-activated GIRK channels in dissociated neocortical pyramidal cells. *J Neurophysiol* 82: 1647-1650
- Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR (1997) Structure of RGS4 bound to AIF4-activated G α 1: Stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* 89: 251-261
- Tolkovsky AM, Levitzki A (1978) Mode of coupling between the β -adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes. *Biochemistry* 17: 3795
- Traut TW (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* 140: 1-22
- Tsien RY (1989) Fluorescent probes of cell signaling. *Annu Rev Neurosci* 12: 227-253
- Turcotte M, Tang W, Ross EM (2008) Coordinate regulation of G protein signaling via dynamic interactions of receptor and GAP. *PLoS Comput Biol* 4: e1000148

- Verkhusha VV, Lukyanov KA (2004) The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol* 22: 289-296
- Villardaga JP, Bünemann M, Krasel C, Castro M, Lohse M (2003) Measurement of the millisecond activation switch of G protein–coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* 21: 807-812
- Villardaga JP, Nikolaev VO, Lorenz K, Ferrandon S, Zhuang Z, Lohse MJ (2008) Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol* 4: 126-131
- Violin JD, Lefkowitz RJ (2007) Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 416-422
- Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AG, Tate CG, Schertler GF (2008) Structure of a β 1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454: 486-491.
- Warne T, Moukhametzianov R, Baker JG, Nehmé R, Edwards PC, Leslie AG, Schertler GF, Tate CG (2011) The structural basis for agonist and partial agonist action on a β (1)-adrenergic receptor. *Nature* 469: 241-244
- Weis W, Kobilka BK (2008) Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. *Curr Opin Struct Biol* 18: 734-740
- Wess J (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* 11: 346-354
- Wess J (1998). Molecular basis of receptor/ G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* 80: 231-264
- Wettschureck N, Moers A, Offermanns S (2004) Mouse models to study G-protein-mediated signaling. *Pharmacol Ther* 101: 75-89
- Wettschureck N, Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85: 1159-1204
- Wickenden A (2002) Potassium channels as anti-epileptic drug targets. *Neuropharmacology* 43: 1055-1060
- Wickman K, Krapivinsky G, Corey S, Kennedy M, Nemeč J, Medina I, Clapham DE (1999) Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated K^+ channel, I_{KACH} . *Ann N Y Acad Sci* 868: 386-398

Woolf PJ, Linderman JJ (2004) An algebra of dimerization and its implications for G-protein coupled receptor signaling. *J Theor Biol* 229:157-168

Wu G, Benovic JL, Hildebrandt JD, Lanier SM (1998) Receptor docking sites for G-protein $\beta\gamma$ subunits. Implications for signal regulation. *J Biol Chem* 273: 7197-7200

Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC (2010) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330: 1066-1071

Xiao RP (2001) beta-Adrenergic Signaling in the Heart: Dual Coupling of the beta2-Adrenergic Receptor to Gs and Gi Proteins. *Science's STKE* 104: re15

Yao XJ, Vélez Ruiz G, Whorton MR, Rasmussen SGF, DeVree BT, Deupi X, Sunahara RK, Kobilka B (2009) The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9501-9506

Yatani A, Codina J, Brown AM, Birnbaumer L (1987) Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein Gk. *Science* 235: 207-211

Yi TM, Kitano H, Simon MI (2003) A quantitative characterization of the yeast heterotrimeric G protein cycle. *Proc Natl Acad Sci* 100: 10764-10769

8. Abkürzungsverzeichnis

α_{2A} -AR	α_{2A} -adrenerger Rezeptor
ACh	Acetylcholin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BRET	Biolumineszenz Resonanz Energy Transfer
cAMP	Adenosin-3',5'-monophosphat
CFP	Englisch: cyan fluorescent protein
cGMP	Guanosin-3',5'-monophosphat
DMEM	Englisch: dulbecco's modified eagle medium
DNA	Englisch: deoxyribonucleic acid
EDTA	Englisch: ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	Englisch: ethylene glycol tetraacetic acid, auch Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure)
FRAP	Englisch: fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GFP	Englisch: green fluorescent protein
GIRK	Englisch: G protein coupled inwardly rectifying K ⁺
GPCR	Englisch: G protein coupled receptor
GRK	Englisch: G protein coupled receptor kinase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-O-[gamma-thio]triphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEK	Englisch: human embryonic kidney
IRES	Englisch: internal ribosomal entry site
LB	Englisch: lysogeny broth
NA	Noradrenalin
NMDA	N-methyl-D-aspartat Säure
PBS	Englisch: phosphat buffered saline
PI3K	Phosphoinositid-3 Kinase

PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PP2A	Phosphoprotein Phosphatase 2A
PVDF	Polyvinylidenflourid
RGS	Englisch: regulators of G protein signaling
RKIP	Raf Kinase Inhibitor Protein
SDS	Sodium Duodecyl Sulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, auch 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TM	Transmembrandomäne
YFP	Englisch: yellow fluorescent protein

9. Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, die durch den offenen und herzlichen Umgang miteinander die Grundlage für erfolgreiches wissenschaftliches Arbeiten und damit für die Durchführung der Arbeit ermöglicht haben. Ich möchte insbesondere M. Lohse für die Möglichkeit der Promotion an seinem Institut und M. Bünemann für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe und für die Überlassung eines Themengebietes zur unabhängigen Erarbeitung, sowie beiden für die nicht zu ersetzenden Erfahrungen, die anhaltende Unterstützung und alle resultierenden Inspirationen danken. Ich danke T. Dandekar und allen Mitarbeitern des Instituts für Bioinformatik, die mir in der Initiierung der Modellierung stets hilfreich zu Seite standen.

Ich danke darüber hinaus den Folgenden, da sie alle direkt und indirekt auf ihre besondere Art und Weise während der Arbeit im Geflecht verschiedenster Interaktionen letztendlich zum Erfolg beigetragen haben, was ich niemals missen möchte und mich auf meinem Lebensweg stets begleiten wird: J.S. Bach, A. Basedow, H. Beck, L. van Beethoven, C. Dees, M. Frank, W. Furtwängler, C. Gross, C. Ives, K. Hadamek, K. von Hayn, P. Hein, W. Hommers, F. Klauschen, C. Klenk, W.A. Mozart, S. Reich, S. Röckl, A. Schnittke, A. Schoenberg, D. Schostakowitsch, R. Wagner, R. Werthmann, F. Zappa, A. Zürn.

10. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre, dass ich diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ich habe im November 2009 an der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg promoviert (Dr. med.).

Würzburg, 11. März 2011