

Katrin Madeleine Knorr

Dr. med.

**Der Einfluss einer Überexpression inhibitorischer  $\alpha$ -Untereinheiten Guaninnukleotidbindender Proteine auf endogene Subfamilien in vitro.  
Crosstalk zwischen  $G\alpha$ -Proteinen?**

Geboren am 16.01.1978 in Freiburg im Breisgau

Reifeprüfung am 18.06.1997 in Freiburg im Breisgau

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1997/98 bis SS 2003

Physikum am 16.09.1999 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg und Frankfurt

Staatsexamen am 26.11.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. F. Niroomand

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Frage eines möglichen Crosstalks zwischen den Adenylylcyclase(AC)-regulierenden stimulatorischen und inhibitorischen G-Proteinen  $G\alpha_i$  und  $G\alpha_s$  bei erhöhten  $G\alpha_i$ -Membrankonzentrationen nachgegangen. Im Vergleich hierzu wurde der Einfluss eines gesteigerten  $G\alpha_i$ -Gehaltes auf  $G\alpha_o$ , ein G-Protein ohne Auswirkung auf die AC, untersucht.

Es wurde weiterhin geprüft, weshalb es bei der Nukleosiddiphosphatkinase (NDPK)-abhängigen Aktivierung inhibitorischer und stimulatorischer G-Proteine bei NDPK-Überexpression nicht zu Veränderungen der AC-Aktivität kommt.

Die beiden am Herzen vorkommenden  $G\alpha_i$ -Isoformen  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_{i3}$  wurden in H10-Zellen, einer von neonatalen Rattenkardiomyocyten abstammenden Zelllinie, mit Hilfe adenoviralen Gentransfers überexprimiert. Der Einfluss der erhöhten  $G\alpha_{i2}$ -

beziehungsweise  $G\alpha_{i3}$ -Proteinkonzentration auf den Membranproteingehalt der jeweils anderen  $G\alpha_i$ -Isoform, auf  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_o$  sowie  $G\beta$  wurde mittels quantitativer Western Blot Analyse untersucht. Der funktionelle Einbau der überexprimierten  $\alpha$ -Untereinheiten in heterotrimere G-Proteine konnte mittels Co-Immunpräzipitation von  $G\alpha$  und  $G\beta$  nachgewiesen werden.

Der Basalgehalt der untersuchten  $G\alpha$ -Proteine wurde in den Membranen kontrollinfizierter H10-Zellen mittels Western Blots von Standardreihen der jeweiligen rekombinanten Proteine absolut quantifiziert.

Veränderungen der mRNA-Expression bei  $G\alpha_i$ -Infektion wurden mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression inhibitorischer  $\alpha$ -Untereinheiten an der Membran zu Transregulationen zwischen inhibitorischen und stimulatorischen G-Proteinen führt. Gesteigerte  $G\alpha_{i2}$ -Konzentrationen (bis zum 5-fachen des Membranbasalgehaltes) führten zu einer Verminderung der  $G\alpha_{i3}$  und  $G\alpha_s$  Membranproteinkonzentration auf bis zu 30% ihres Ausgangswertes. Umgekehrt ließen sich bei  $G\alpha_{i3}$ -Überexpression keine Veränderungen der Membrankonzentrationen der untersuchten  $G\alpha$ -Proteine beobachten. Die Konzentration von  $G\alpha_o$  an der Membran blieb bei gesteigerten  $G\alpha_{i2}$ - sowie  $G\alpha_{i3}$ -Konzentrationen konstant.

Mit Hilfe der quantitativen mRNA-Bestimmungen ließ sich eine Veränderung der Transkriptions- oder mRNA-Degradationsrate als Ursache der beobachteten Proteintransregulation weitestgehend ausschließen. Wir gingen deshalb von einem Regulationsmechanismus auf Proteinebene aus. Durch die  $G\alpha_{i2}$ -Überexpression könnte es zu einer Konkurrenz zwischen inhibitorischen und stimulatorischen  $G\alpha$ -Proteinen um  $\beta\gamma$ -Untereinheiten kommen. Als hierfür notwendige Bedingungen konnten wir den Einbau überexprimierter  $\alpha$ -Untereinheiten in heterotrimere G-Proteine und einen bei  $G\alpha_i$ -Überexpression konstanten  $G\beta$ -Membrangehalt nachweisen. Da die Assoziation mit  $G\beta\gamma$ -Proteinen für die Membranbindung der  $G\alpha$ -Proteine eine bedeutende Rolle spielt, könnte eine  $\beta\gamma$ -Konkurrenz zu den beobachteten Veränderungen der Membrankonzentrationen führen.

Da es sich bei den  $G\alpha_o$ -Proteinen im Unterschied zu  $G\alpha_i$  und  $G\alpha_s$  nicht um AC-regulierende G-Proteine handelt, sind zwei Gründen denkbar warum diese nicht an der  $\beta\gamma$ -

Kompetition teilnehmen und ihr Membrangehalt dementsprechend konstant bleibt: Zum einen könnten  $G\alpha_o$ -Proteine eine andere Selektivität für bestimmte  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aufweisen, zum anderen könnten sie in von  $G\alpha_{i/s}$  unterschiedlichen, effektorabhängigen Membranmikrodomänen lokalisiert sein.

Aufgrund der gemessenen Membrankonzentrationen, insbesondere bei einem Verhältnis  $G\alpha_{i2}:G\alpha_s$  von ungefähr 1:1 und  $G\alpha_{i2}:G\alpha_{i3}$  von 2:1, gehen wir davon aus, dass die Überexpression von  $G\alpha_{i3}$  keine wesentliche  $\beta\gamma$ -Kompetition auslöst und daher zu keiner Herabregulierung von  $G\alpha_{i2}$  oder  $G\alpha_s$  führt.

Die fehlende Auswirkung einer NDPK-Überexpression auf die Aktivität der AC könnte durch die ähnlichen Membrankonzentrationen der inhibitorischen und stimulatorischen G-Proteine erklärt werden. Bei ihrer gleichzeitigen vermehrten Aktivierung durch überexprimierte NDPK würde es somit zu einem Nettonulleffekt auf die AC kommen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Transregulation zwischen inhibitorischen und stimulatorischen  $G\alpha$ -Proteinen bei  $G\alpha_i$ -Überexpression gezeigt werden.

In H10-Zellen scheinen bei  $G\alpha_i$ -Überexpression Crosstalkmechanismen zwischen AC-regulierenden  $G\alpha$ -Proteinen, möglicherweise über eine  $\beta\gamma$ -Kompetition im Sinne eines  $\beta\gamma$ -Scavenging, zu existieren.