

G-Proteine und die Regulation der Adenylat-Cyclase (Nobel-Vortrag)**

Alfred G. Gilman*

Einleitung

Im Frühjahr 1961 machte mir Earl Sutherland, ein Freund meines Vaters, den Vorschlag, an einem M.D.-Ph.D.-Ausbildungsprogramm teilzunehmen, was damals pädagogisches Neuland war. Er hatte es an der Western Reserve University, der heutigen Case Western Reserve University, in Ohio konzipiert. Die Vorstellung, sieben Jahre in Cleveland zu verbringen, reizte mich wenig und so bedankte ich mich bei ihm und lehnte höflich ab. Zum Glück war Sutherland hartnäckig. Im Herbst 1961, dem Beginn meines letzten Collegejahres, schrieb er wieder und ich entschloß mich zu einem Besuch. Damals warf ich meinen ersten Blick auf das cyclische AMP, das Sutherland 1957 entdeckt hatte, wofür ihm 1971 der Nobelpreis verliehen wurde. Das cyclische AMP, Sutherland und das M.D.-Ph.D.-Programm machten einen vielversprechenden Eindruck. Daher war ich bei meiner Ankunft im September 1962 sehr enttäuscht, als ich erfuhr, daß Sutherland im Begriff war, an die Vanderbilt University zu wechseln. Es bot sich jedoch eine günstige Gelegenheit, mit Theodore Rall zusammenzuarbeiten, einem jüngeren Mitarbeiter von Sutherland, der bei den bahnbrechenden Versuchen von 1957 entscheidend beteiligt gewesen war. Ich begann mit meiner Arbeit in seinem Labor und konnte in den folgenden 30 Jahren nie mehr den cyclischen Nucleotiden widerstehen, obwohl ich es mehrmals versuchte. Der stärkste Versuch war mein Entschluß, im neu eröffneten Neurobiologielabor von Marshall Nirenberg als Postdoktorand zu arbeiten. In unserem ersten Gespräch nach meiner Ankunft in den National Institutes of Health in Bethesda bat mich Marshall, ein Testsystem für cyclisches AMP zu entwickeln. Damit saß ich wieder in der Falle, aber ich habe nicht sehr energisch gekämpft, um wieder herauszukommen.

Mit der Entdeckung des cyclischen AMPs (cAMP) und der Adenylat-Cyclase, eines Enzyms, das durch Hormone reguliert wird und das das cyclische Nucleotid aus ATP herstellt, legten Rall und Sutherland den Grundstein für die Vorstellungen, wie Signale durch die Membran gelangen und wie die hormonge-

steuerte Synthese der intrazellulären sekundären Botenstoffe abläuft (Abb. 1). Beide Forscher waren biochemisch ausgebildet worden, Sutherland von Carl Cori und Rall von Albert Lehninger, und zusammen begannen sie mit der Erforschung der Wirkungsweise von Hormonen. Dabei wandten sie die klassische Lehre an, daß aus der Kenntnis der einzelnen Teilschritte die gesamte Reaktion verständlich wird. In den 50er Jahren war über Hormone nur bekannt, daß sie Regulatorverbindungen sind und mit intakten Zellen wechselwirken. Sutherland und Rall entdeckten ein System, in dem eine charakteristische Wirkung von Adrenalin und Glucagon in Homogenaten, die Aktivierung von Phosphorylase, festgestellt werden konnte. Durch eine gereinigte Fraktion wird dabei zunächst cAMP durch eine Stimulierung mit Hormonen synthetisiert, das dann Phosphorylase im Cytosol aktiviert^[1]. Damit gab es einen ersten, allerdings noch arbeitsaufwendigen Assay für die Adenylat-Cyclase, und Hormonwirkungen konnten durch Zugabe von ATP zu Plasmamembranen untersucht werden.

Die Vorstellung, daß es Rezeptoren für endogene Regulatoren und für Wirkstoffe gibt, tauchte um die Jahrhundertwende mit den pharmakologischen Versuchen von Langley und Ehrlich auf. Als cAMP entdeckt wurde, konnten allerdings viele Forscher mit dem damals metaphysisch anmutenden Rezeptor-

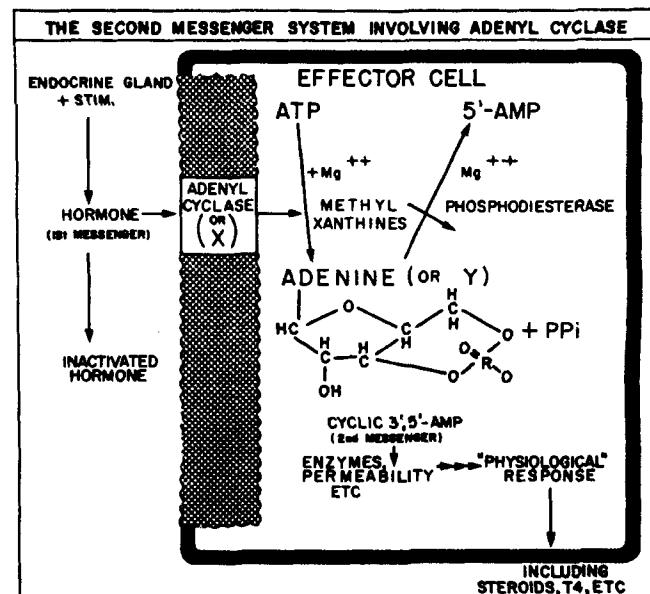


Abb. 1. Frühe Darstellung von Sutherlands Konzept der sekundären Botenstoffe.

* Prof. A. G. Gilman
Department of Pharmacology
The University of Texas Southwestern
Medical Center at Dallas
Dallas, TX 75235 (USA)
Telefax: Int. + 214/648-8812

** Copyright © The Nobel Foundation 1995. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

begriff nichts anfangen. Der Begriff Rezeptor ist im Index von *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, dem Standardwerk der Pharmakologie, in der Ausgabe von 1955 nicht verzeichnet. Es stand jedoch der folgende Satz dort: „Years ago, Langley named the differentiating substance the ‚receptive substance‘; this term is still widely employed, but it must be realized that the ‚receptor‘ may not be a morphologically demonstrable structure.“ Aufgrund der Versuche von Rall und Sutherland wurden Assays für Rezeptoren entwickelt und so bewiesen, daß es Rezeptoren wirklich gibt. Ahlquist führte den Begriff der β -adrenergen Rezeptoren ein. Sein Konzept paßte zu den Wirkungen von Adrenalin und ähnlichen Substanzen auf Adenylat-Cyclase, und der erste neuentdeckte β -adrenerge Antagonist konnte deren Wirkungen blockieren^[2]. Damit begann die biochemische Rezeptorforschung, und die Frage trat auf, in welcher Beziehung der β -adrenerge Rezeptor zur Adenylat-Cyclase steht. Konnte das Enzym der Rezeptor sein? Vielleicht, aber diese Hypothese setzte die Existenz einer Gruppe von Adenylat-Cyclasen mit ganz bestimmten Stellen für die Regulation voraus, da gezeigt werden konnte, daß die Enzymregulation nicht auf Adrenalin und Glucagon beschränkt war: Das andrenocorticotrope Hormon (ACTH), das thyreoidstimulierende Hormon (TSH), das luteinisierende Hormon (LH), das antidiuretische Hormon (ADH) sowie andere Stimulatoren und die Inhibition der Adenylat-Cyclase durch cholinerge Agonisten wurden entdeckt^[3].

Mehr als ein Jahrzehnt nach der Entdeckung der Adenylat-Cyclase lieferten Martin Rodbell et al. starke, allerdings indirekte Beweise, daß Rezeptoren und Adenylat-Cyclasen unterschiedliche Moleküle sind. Die Adenylat-Cyclase aus Fettzellen wird durch sehr viele Hormone stimuliert. Wenn es bestimmte Cyclasen gäbe, die jeweils auch als Rezeptor fungieren könnten, wäre die Wirkung auf die maximal wirksamen Hormonkonzentrationen additiv. Da dies nicht der Fall ist, konnte angenommen werden, daß unterschiedliche Rezeptoren mit vielen Adenylat-Cyclasen wechselwirken können^[4]. Dieser Punkt wurde endgültig in den 70er Jahren geklärt, als Ligandenbindungsassays für Rezeptoren eingeführt wurden. Damit konnten Rezeptoren untersucht werden, ohne auf die Bestimmung ihrer Wirkungen angewiesen zu sein. Adenylat-Cyclasen konnten nun in Lösung gebracht und von den β -adrenergen Rezeptoren getrennt werden. Damit wurde bewiesen, daß es sich um unterschiedliche Makromoleküle handelt^[5, 6].

Die Anfänge der G-Protein-Forschung

Damals stand die Frage nach dem Mechanismus der Wechselwirkung oder „Kopplung“ zwischen Rezeptoren und Adenylat-Cyclase im Vordergrund. Die einfache Annahme, daß ein Agonist-Rezeptor-Komplex ein allosterischer Regulator des Enzyms ist, wurde auch von Rodbell bezweifelt, der als erster die Idee verkündete, ein Überträger könnte zwischen Rezeptor und Adenylat-Cyclase vermitteln^[7]. Zwar war diese Hypothese zunächst eher instinktiv aufgestellt worden, und die Lipiddoppelschicht wurde als möglicher Überträger diskutiert, doch wurden bald Ergebnisse erhalten, die zu genaueren Erkenntnissen führten. Rodbell, Birnbaumer und Mitarbeiter machten die überraschende Entdeckung, daß für die Regulation nur ein Ligand, der Agonist des Rezeptors, nicht ausreichte, um Adenylat-Cyclase zu aktivieren. Ein Hormon konnte das Enzym nur aktivieren, wenn auch GTP vorhanden war^[8]. Dies hatte man mehr als zehn Jahre übersehen, da sowohl die Membranpräparationen als auch das Substrat ATP mit GTP in ausreichend hohen Konzentrationen im μM -Bereich verunreinigt waren. Von dem Zeitpunkt an war klar, daß die Inhibition der Adenylat-Cyclase durch Hormone ebenfalls von GTP abhängt^[9]. Es sei Rodbell überlassen, diese Versuche im Detail zu beschreiben^[*]. Anzumerken ist, daß es an der Bedeutung dieser Ergebnisse erhebliche Zweifel gab (Abb. 2), da es schwierig war, die Ergebnisse zu reproduzieren. Die meisten Forscher arbeiteten nicht mit den ausgezeichneten Membranpräparationen, die im Labor von Rodbell verwendet wurden.

Bereits Mitte der 70er Jahre ergaben mehrere Untersuchungen, daß GTP für die Regulation der hormonabhängigen Aktivität von Adenylat-Cyclase wichtig ist. Am bedeutungsvollsten war der Befund von Cassel und Selinger, daß eine hormonstimulierende GTPase mit der Aktivierung von Adenylat-Cyclase verknüpft zu sein schien. Aus technisch schwierigen kinetischen Untersuchungen zogen sie die richtige Schlußfolgerung, daß GTPase ein hormonvermitteltes Signal beenden kann^[10]. Die Versuche von Londos, Schramm und Mitarbeitern stimmten mit diesen Überlegungen überein. Sie bemerkten, daß nicht-hydrolysierbare Analoga von GTP, wie Gpp(NH)p, die Adenylat-Cyclase deutlich und ohne Hormone aktivieren^[11, 12]. Mein erster Postdoktorand, Michael Maguire, entdeckte, daß GTP

[*] Siehe folgenden Nobel-Vortrag von M. Rodbell.



Alfred G. Gilman wurde 1941 in New Haven, CT (USA), geboren. Er studierte Biochemie an der Yale University und promovierte 1969 in Pharmakologie an der Case Western Reserve University in Cleveland, OH. Nach einem Postdoktorandenforschungsaufenthalt im Laboratory of Biochemical Genetics an den National Institutes of Health in Bethesda, MD, ging er 1971 an die University of Virginia, wo er am Department of Pharmacology als Assistant Professor (1971–1973), Associate Professor (1973–1977) und Professor (1977–1981) tätig war. Seit 1981 ist er Chairman of Pharmacology an der University of Texas Southwestern Medical Center in Dallas, TX. Gilman entdeckte, charakterisierte und reinigte eine Reihe von Guanin-Nukleotid-bindenden Regulatorproteinen (G-Proteinen). Seine Arbeiten sind die Grundlage unseres heutigen Verständnisses von unterschiedlichen Signalübertragungsprozessen auf molekularer Ebene. Gilman wurde vielfach geehrt und seine Arbeit gewürdigt – 1994 erhielt er den Nobel-Preis für Medizin und Physiologie.



Abb. 2. Karikatur von Dr. Pierre DeMeytes aus den 70er Jahren. Daß GTP für die Übermittlung von Transmembransignalen notwendig ist, wurde nicht von allen Forschern gleich erkannt (mit freundlicher Genehmigung von Dr. DeMeytes).

die Affinität der Rezeptoren für Agonisten, aber nicht für Antagonisten selektiv senkt^[13]. Eine Interpretation dieses unerwarteten Befundes gab es nicht, doch war klar, daß dieses Ergebnis wesentlich war.

Während dieser Zeit versuchten einige unermüdliche Mitarbeiter, die Komponenten des hormonabhängigen Adenylyl-Cyclase-Systems in Lösung zu bringen und zu reinigen. Dies war schwierig, denn sobald Detergentien zugefügt wurden, konnte keine Hormonabhängigkeit mehr festgestellt werden. Die Adenylyl-Cyclase erwies sich zudem als sehr labil. Eva Neer war wahrscheinlich die erste, die das Enzymsystem von einem biochemischen Gesichtspunkt aus betrachtete und seine hydrodynamischen Eigenschaften untersuchte^[14]. Eine darüber hinaus gehende konventionelle biochemische Erforschung des Systems erschien schwierig.

Der Wendepunkt kam für uns, als Daniel et al. die cytotoxische Wirkung von cAMP auf klonale S49-Lymphomzellen beschrieb^[15]. Bald darauf isolierten Bourne et al. eine Variante dieser Zellen, cyc⁻, die keine Adenylyl-Cyclase zu enthalten schien^[16], obwohl laufend eine normale Zahl an β -adrenergen Rezeptoren exprimiert wurde^[17]. Wir konnten eine andere, noch interessantere Variante der S49-Zellen isolieren: eine entkoppelte (uncoupled, UNC) Mutante. Diese schien zwar alle normalen Rezeptoren und Adenylyl-Cyclase zu enthalten, produzierte aber kein cAMP, wenn sie mit geeigneten Hormonen, z.B. mit β -adrenergen Agonisten oder Prostaglandinen, stimuliert wurde^[18]. Durch diese Varianten wurde der Zugang zum Verständnis der biochemischen Vorgänge einfacher, besonders für Elliott Ross, einem begabten und gut ausgebildeten Membranbiochemiker, der 1975 in meine Arbeitsgruppe kam. Ross versuchte, die cyc⁻-Variante in vitro zu rekonstituieren. Dazu extrahierte er Adenylyl-Cyclase aus Zellen, die keine β -adrenergen Rezeptoren besaßen, und versuchte dann, sie wieder mit den Rezeptoren der cyc⁻-Membranen zu kombinieren (Abb. 3). Nach mehreren Anläufen gelang ihm dies: Die cyc⁻-Membranen konnten rekonstituiert werden und wiesen eine catecholaminabhängige Adenylyl-Cyclase-Aktivität auf^[19]. Dies war der erste Schritt zur Aufklärung und Rekonstitution des Systems, der sich schnell bezahlt machen sollte. Die anfänglichen Rekonstitutionsversuche waren aus den erwarteten Gründen nicht erfolgreich gewesen. Wenn die Adenylyl-Cyclase in

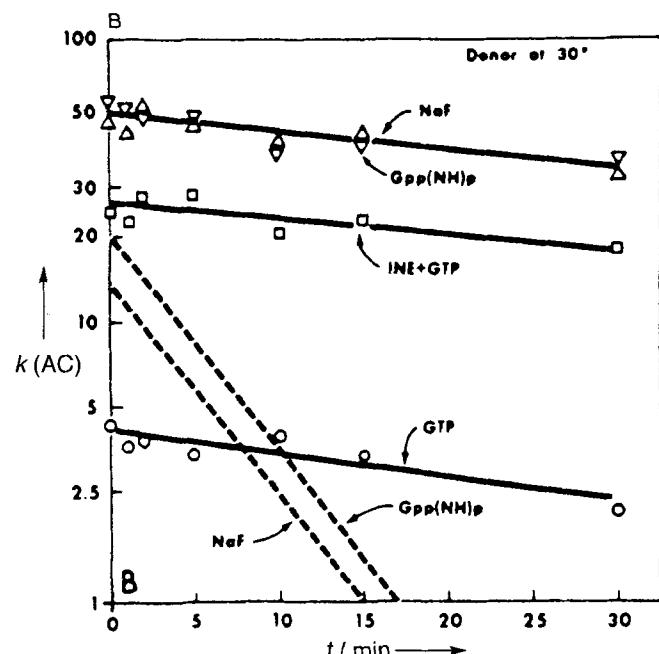
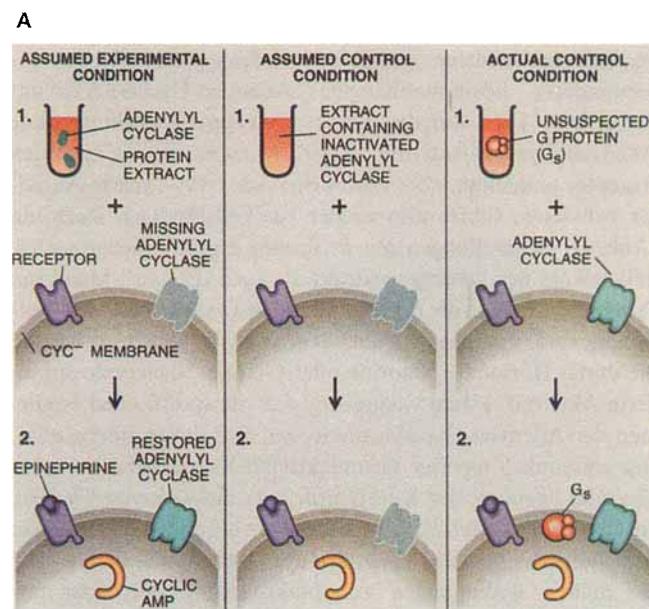


Abb. 3. Versuche, die zur Entdeckung des G_s-Proteins führten. A) Versuchsdarstellungen. Links: 1. Elliott Ross extrahierte Membranproteine mit Detergentien und gab sie zu cyc⁻-Membranen, von denen man annahm, daß sie keine Adenylyl-Cyclase besitzen. 2. Durch Adrenalin (Epinephrin) wurde die Produktion von cAMP stimuliert, was darauf hindeutete, daß Adenylyl-Cyclase in die cyc⁻-Membranen eingeführt worden war. Mitte: In einem Kontrollversuch wurde Adenylyl-Cyclase in den Extrakt inaktiviert. Auch unter diesen Bedingungen konnte durch Adrenalinzugabe zu den cyc⁻-Membranen die Bildung von cAMP stimuliert werden. Rechts: Diese verblüffenden Ergebnisse führten zur Entdeckung, daß die cyc⁻-Membran zwar Adenylyl-Cyclase enthält, aber eine dritte Komponente benötigt, um das Enzym aktivieren zu können: ein auch nach der Inaktivierung der Adenylyl-Cyclase im Extrakt vorhandenes G-Protein. Nach seinem Einbau in die Membran konnte die dort vorhandene Adenylyl-Cyclase cAMP synthetisieren (mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [154]). B) Ergebnisse dieser Versuche: Rekonstitution der durch Hormone regulierten Adenylyl-Cyclase durch Mischung von cyc⁻-Membranen mit Extrakt aus Wildtyp-Membranen, die durch Hitze inaktiviert wurden. Die Detergentienextrakte aus Wildtyp-Membranen wurden für die auf der Abszisse angegebenen Zeit auf 30°C erwärmt, anschließend abgekühlt und mit den cyc⁻-Membranen gemischt. Die Adenylyl-Cyclase-Aktivität, k(AC) [pmol min⁻¹ mL⁻¹], wurde dann nach Zugabe von GTP, von dem mit Adrenalin verwandten Isoprotierenol + GTP, von NaF und von Gpp(NH)p gemessen. Die mit NaF und Gpp(NH)p stimulierte Adenylyl-Cyclase-Aktivität der inkubierten Extrakte vor dem Mischen mit cyc⁻-Membranen ist gestrichelt eingezeichnet (mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [21]).

den Detergens-Zellextrakten, die wir für die Rekonstitutionsversuche verwendeten, inaktiviert wurde, konnten wir eine unverminderte hormonabhängige Adenylat-Cyclase-Aktivität feststellen. Die Zugabe eines Detergens-Extraktes ohne Adenylat-Cyclase-Aktivität zu cyc^- -Membranen, die zwar den Rezeptor enthielten, aber auch keine Adenylat-Cyclase-Aktivität aufwiesen, führte also wieder zur vollständigen Reaktion (Abb. 3). Behandlungen mit Proteasen ergaben wenig später, daß sowohl der Detergensextrakt als auch die cyc^- -Membran Proteine enthalten, die für eine Adenylat-Cyclase-Aktivität notwendig sind, und zwar für die Grundaktivität genauso wie für die durch Hormone, Fluoride oder Guanin-Nucleotide stimulierte Aktivität. Heute wissen wir, daß die spezifischen Isoformen der Adenylat-Cyclase, die in den S49-Zellen überwiegen, eine erstaunlich niedrige Grundaktivität haben. Man brauchte also zwei Proteine, den Katalysator oder die Adenylat-Cyclase, die tatsächlich in den cyc^- -Membranen vorhanden war, und ein stimulierendes Protein, das in den cyc^- -Membranen fehlt, aber die milden Bedingungen zur Inaktivierung der Adenylat-Cyclase in den für die Rekonstitution verwendeten Extrakten überstanden hat. Wir machten den Vorschlag, daß der Hormonrezeptor die Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Komponenten reguliert^[20, 21]. Gleichzeitig gelang Pfeuffer eine teilweise Trennung von Adenylat-Cyclase und einem aktivierenden Protein durch Affinitätschromatographie an einem Guanin-Nucleotid-substituierten Harz^[22].

Dieses neue Protein wurde bald zum Gegenstand unserer Forschung, da es unbekannter und stabiler als die Adenylat-Cyclase war. Zusätzliche Versuche von Ross deuteten an, daß das Protein – zunächst G/F, später G_s genannt – die Bindungsstelle für Guanin-Nucleotide und Fluorid ist^[21]. Diese Annahmen wurden durch hydrodynamische Untersuchungen der Aktivität von Allyn Howlett gestützt. Sie entdeckte Veränderungen, die durch Gpp(NH)p und Fluorid hervorgerufen wurden und andeuteten, daß das Protein nach einer Aktivierung durch diese Liganden in seine Untereinheiten dissoziiert^[23]. Paul Sternweis und John Northup gelang es, das G_s-Protein zu reinigen. Durch Mutationsversuche entdeckten wir es in den S49-Zellen. Da sich die Adenylat-Cyclase durch das Protein aktivieren ließ, gab es eine einfache Nachweismethode. Was wir damals nicht wußten war, daß das G_s-Protein das am wenigsten verbreitete aller G-Proteine ist. Trotzdem führten die Beharrlichkeit und die Fähigkeiten aller Beteiligten zum Erfolg, und wir konnten zeigen, daß G_s ein homogenes Protein ist, das Guanin-Nucleotide binden kann. Außerdem kann es, wenn es mit Gpp(NH)p oder Fluorid aktiviert wird, auch Adenylat-Cyclase aktivieren (Abb. 4)^[24, 25]. Es besitzt eine 35 kDa schwere β -Untereinheit. Eine dritte, 8 kDa schwere γ -Untereinheit wurde damals allerdings noch nicht entdeckt.

Weitere Untersuchungen ergaben, daß ein Äquivalent des Guanin-Nucleotids an die α -Untereinheit des Oligomers bindet. Die Aktivierung durch Gpp(NH)p oder Fluorid ist in der Tat mit einer Dissoziation in die Untereinheiten verbunden und die abgetrennte α -Untereinheit, die Gpp(NH)p gebunden hat, ist notwendig und ausreichend für die Aktivierung der Adenylat-Cyclase (Abb. 5)^[26, 27]. Weitere Versuche zur Aufklärung des Mechanismus, nach dem das G_s-Protein durch Fluorid aktiviert wird, sorgten für Überraschungen. Der Effekt von Fluorid war deutlich, wenn die Versuche in Glasröhren oder mit Kompo-

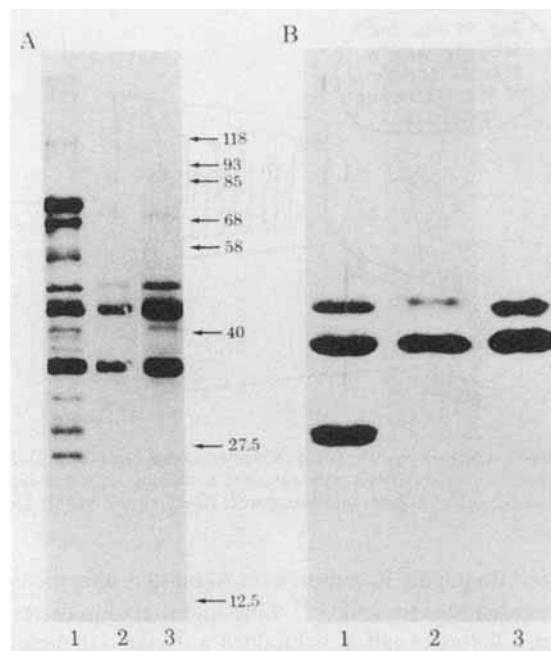


Abb. 4. A) Polyacrylamid-Gelelektrophorese von gereinigten Fraktionen von G_s-Proteinen. Spur 1: Proteinfraction aus einer frühen Reinigungsstufe; Spur 2 und 3: Auftragung von 3 bzw. 8 µg gereinigtem Protein; B) Markierung von gereinigtem G_s-Protein mit Cholera-Toxin und [³²P]NAD. Spur 1: Mit Coomassie-Blau gefärbtes gereinigtes Protein; Spur 2 und 3: Autoradiogramme des mit dem Cholera-Toxin [³²P]ADP-ribosylierten Proteins, die nach 16 bzw. 48 h entwickelt wurden. Die beiden Bänder bei höherem Molekulargewicht entsprechen alternativ gespleißten Formen von G_s-Proteinen. Die Bande bei niedrigerem Molekulargewicht entspricht der β -Untereinheit (mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [24]).

nenten aus dem Adenylat-Cyclase-Assay, z.B. ATP, durchgeführt wurden, verschwand aber bei Versuchen ohne ATP in Plastikröhren^[28, 29]. Paul Sternweis isolierte aus ATP und wäßrigen Extrakten von Einmalglasröhren den Coaktivator. Es gab Hinweise, daß ein Metall beteiligt ist. Eine Neutronenbeugungsanalyse ergab, daß es sich um Al³⁺ handelt^[29]. Die Bedeutung und der Wert dieses Ergebnisses wurde zehn Jahre später offensichtlich.

Damals untersuchten wir, angeregt durch die Arbeiten von Gill^[30], Vaughan^[31] und Bourne^[32] auch die ADP-Ribosylierung des G_s-Proteins durch das Cholera-Toxin, das wir reinigen konnten. Im Verlauf der Reinigung verlor das Cholera-Toxin allerdings die Fähigkeit zur ADP-Ribosylierung des G_s-Proteins. Sie konnte durch die Zugabe eines Proteinfaktors wiederhergestellt werden^[33]. Der Faktor wurde ebenfalls gereinigt und ADP-ribosylierender Faktor (ARF) genannt. Er ist ein Protein mit niedrigem Molekulargewicht, das GTP bindet^[34, 35]. Heute weiß man, daß ARF ein wichtiger Regulator in der Proteinübertragung^[36] und ein Aktivator der Phospholipase D ist^[37]. Seine Verbindung mit dem Cholera-Toxin und/oder dem G_s-Protein ist noch ungeklärt.

Ende der 70er und Anfang der 80er Jahre charakterisierten Michio Ui et al. in Japan aus *Bordetella pertussis* das inselaktivierende Protein (IAP). Wenn Zellen oder Membranen mit diesem Toxin behandelt werden, zeigen sie keine Inhibition der Adenylat-Cyclase durch Hormone mehr; in einigen Fällen wurde die hormonelle Stimulierung des Enzyms allerdings durch IAP gesteigert^[38]. Gleichzeitig wurde entdeckt, daß das Toxin den Einbau der ADP-Ribosyl-Einheit aus NAD in ein 41 kDa

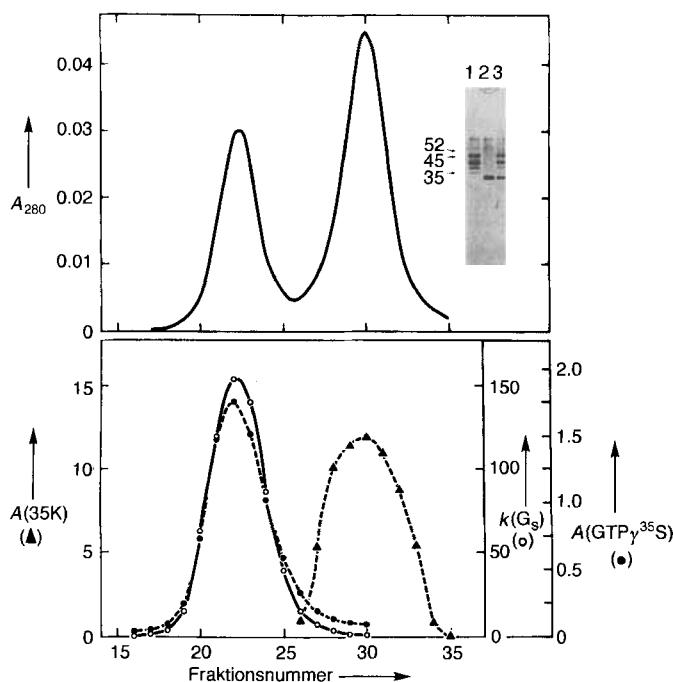


Abb. 5. Trennung der G_s -Protein-Untereinheit durch Gelfiltration. Gereinigtes G_s -Protein wurde durch Inkubation mit $[^{35}\text{S}]G\text{TP}\gamma\text{S}$ radioaktiv markiert. Nach der Entfernung von freien Nucleotiden wurde das Protein durch Hochleistungsgelfiltration untersucht. Das obere Diagramm zeigt die Absorption A (280 nm) der eluierten Proteinfraktionen. Als Einschub ist die Silberfärbung einer an Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid durchgeführten gelelektrophoretischen Trennung der Hauptfraktionen dargestellt: 1. Spur: 1. Peak, 2. Spur: 2. Peak, 3. Spur: reines Protein. Das untere Diagramm zeigt die gemessenen Aktivitäten. Die Aktivität des G_s -Proteins, $k(G_s)$ [$\text{mmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$] (○), wurde über die Aktivierung der Adenylat-Cyclase bestimmt. Darüber hinaus wurde die durch die Bindung von $[^{35}\text{S}]G\text{TP}\gamma\text{S}$ an das G -Protein resultierende Radioaktivität $A(G\text{TP}\gamma^{35}\text{S})$ [Zählrate pro mL] (●) sowie die 35 K-Aktivität A (35 K) bei $14 \text{ min} - t_{1/2}$ (▲) als Maß für die Aktivität der $\beta\gamma$ -Untereinheiten gemessen. Die Nucleotid-Bindungsaktivität und der Fähigkeit, Adenylat-Cyclase zu aktivieren, sind demnach ausschließlich der gelösten α -Untereinheit, die nach Aktivierung des G_s -Proteins durch $G\text{TP}\gamma\text{S}$ von der $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert, zuzuschreiben (mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [27]).

schweres Membranprotein katalysiert^[39]. Die Ähnlichkeiten zum Cholera-Toxin waren bemerkenswert. Zwei meiner Postdoktoranden, Toshiaki Katada, ein ehemaliger Student von Professor Ui, und Gary Bokoch, begannen, mit dem Toxin von Professor Ui zu arbeiten. Dabei fiel John Northup auf, daß ihm bei der Reinigung des G_s -Proteins oft eine 41 kDa schwere Verunreinigung untergekommen war. Er besaß sogar noch eingefrorene Proben, die mit dieser Verunreinigung angereichert waren. Moral: Werfe nie etwas weg! (Siehe auch Abb. 4). Im ersten Versuch erwies sie sich als ausgezeichnetes Substrat für die ADP-Ribosylierung durch IAP, und wir wurden für unsere aufwendigen Versuche zur Reinigung des G_s -Proteins belohnt. Die Reinigung dieses IAP-Substrat genannten Proteins schritt schnell voran^[40], unter anderem auch durch die Tatsache, daß es häufiger vorkommt als das G_s -Protein. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß das IAP-Substrat ein homologes G -Protein ist, und zwar das G_i -Protein, das die Adenylat-Cyclase inhibiert. Dies wurde ein Jahr später durch eine vollständige Charakterisierung des G_i -Proteins bewiesen^[41-44]. Trotzdem sind die tatsächlichen Mechanismen (Plural ist beabsichtigt!), wie Adenylat-Cyclase durch das G_i -Protein inhibiert wird, noch ungeklärt.

Während dieser Zeit wies uns Bitensky immer wieder auf Parallelen zwischen dem Übertragungsweg beim Sehvorgang

und den hormonabhängigen Adenylat-Cyclasen hin. Bitensky hatte eine cyclische GMP-Phosphodiesterase in der Netzhaut entdeckt, die durch Licht aktiviert werden kann^[45]. Besonders bemerkenswert waren die Beschreibungen einer lichtaktivierbaren GTPase^[46] und die Tatsache, daß für die Aktivierung der Phosphodiesterase ein Guanin-Nucleotid erforderlich ist. Aufgrund dieser Befunde wurde das Protein Transducin isoliert und G_i -Protein genannt^[47, 48]. Man erkannte, daß die G_s -, G_i - und G_t -Proteine eine Gruppe von strukturhomologen, Guanin-Nucleotid-bindenden Proteinen mit verwandten α -Untereinheiten und sehr ähnlichen oder identischen β -Untereinheiten sind (Abb. 6)^[49]. Aufgrund ihres häufigen Vorkommens wurde die γ -Untereinheit im Heterotrimer Transducin früh erkannt; wegen ihrer schlechten Anfärbbarkeit wurde sie aber erst später als Bestandteil der G_s - und G_i -Proteine nachgewiesen^[41, 50].

Für eine kurze Zeit zu Beginn der 80er Jahre schien es ruhiger zu werden. Die G_s - und G_i -Proteine stimulierten bzw. inhibierten Guanin-Nucleotid vermittelt die Adenylat-Cyclase, und mit dem Transducin wurden die Ergebnisse beim Sehvorgang erklärt. In Zusammenarbeit mit Ross konnten wir eine Stimulierung der Adenylat-Cyclase durch Hormone feststellen, indem wir drei gereinigte Proteine verwendeten, die zu Phospholid-Vesikeln rekonstituiert worden waren^[51]: den β -adrenergen Rezeptor, das G_s -Protein und die Adenylat-Cyclase. Gab es weitere G -Proteine? Wichtige Anhaltspunkte sollten bald folgen: Sternweis et al.^[52] sowie Neer et al.^[53] entdeckten das G_o -Protein, das überraschend häufig im Gehirn vorkommt. Fain et al.^[54] sowie Gomperts et al.^[55] beobachteten eine hormon- und GTP-abhängige Stimulierung der Inositol-Triphosphate-Synthese. Es wurden Homologien in der Aminosäuresequenz zwischen den signalübertragenden G -Proteinen und den $p21^{ras}$ -Genprodukten festgestellt^[56], und auch das Klonieren begann^[57, 58]. Es war jetzt an der Zeit das Methodenrepertoire zu erweitern und Forscher anderer Disziplinen hinzuzuziehen.

schweres Membranprotein katalysiert^[39]. Die Ähnlichkeiten zum Cholera-Toxin waren bemerkenswert. Zwei meiner Postdoktoranden, Toshiaki Katada, ein ehemaliger Student von Professor Ui, und Gary Bokoch, begannen, mit dem Toxin von Professor Ui zu arbeiten. Dabei fiel John Northup auf, daß ihm bei der Reinigung des G_s -Proteins oft eine 41 kDa schwere Verunreinigung untergekommen war. Er besaß sogar noch eingefrorene Proben, die mit dieser Verunreinigung angereichert waren. Moral: Werfe nie etwas weg! (Siehe auch Abb. 4). Im ersten Versuch erwies sie sich als ausgezeichnetes Substrat für die ADP-Ribosylierung durch IAP, und wir wurden für unsere aufwendigen Versuche zur Reinigung des G_s -Proteins belohnt. Die Reinigung dieses IAP-Substrat genannten Proteins schritt schnell voran^[40], unter anderem auch durch die Tatsache, daß es häufiger vorkommt als das G_s -Protein. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß das IAP-Substrat ein homologes G -Protein ist, und zwar das G_i -Protein, das die Adenylat-Cyclase inhibiert. Dies wurde ein Jahr später durch eine vollständige Charakterisierung des G_i -Proteins bewiesen^[41-44]. Trotzdem sind die tatsächlichen Mechanismen (Plural ist beabsichtigt!), wie Adenylat-Cyclase durch das G_i -Protein inhibiert wird, noch ungeklärt.

G-Proteine: von Pheromonen bis zu Photonen

An dieser Stelle möchte ich die geschichtlichen Aspekte verlassen und den derzeitigen Stand der Forschung über die G -Protein-vermittelte Transmembran-Signalübertragung beschreiben.

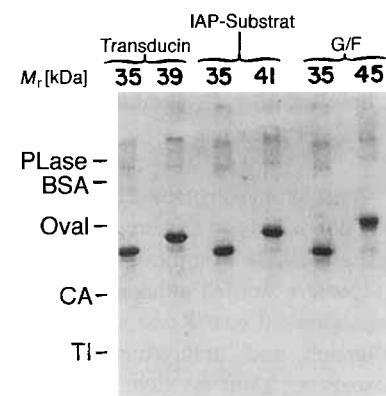


Abb. 6. Elektrophoretische Trennung der gereinigten Untereinheiten von Transducin (G_t), vom IAP-Substrat (G_i) und vom G/F -Protein (G_o). Die α -Untereinheiten aller drei G -Proteine haben unterschiedliche Molekulargewichte, während die der β -Untereinheiten gleich sind. Eine Peptidkartierung und eine Analyse der Aminosäurezusammensetzung der Untereinheiten ergaben, daß die α -Untereinheiten zwar unterschiedlich aber verwandt sind, während die β -Untereinheiten sehr ähnlich oder identisch sind (mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [49]). PLase = Schweineleber-Esterase, BSA = Rinderserumalbumin, Oval = Ovalbumin, CA = Carboanhydrase, TI = Trypsin-inhibitor.

ben. Es ist besonders in den letzten zehn Jahren klar geworden, daß diese relativ große Gruppe von heterotrimeren GTP-bindenden und -hydrolysierenden Proteinen eine wichtige Überträgerrolle spielt, indem sie zwischen Hunderten von Rezeptoren an der Zelloberfläche und Effektorproteinen in der Plasmamembran vermittelt. Solche Systeme kommen in der Natur häufig vor. Sie kontrollieren Vorgänge, die von der Vermehrung in Hefen bis zur Wahrnehmung beim Menschen reichen. Die Rezeptoren, die G-Proteine aktivieren, sind Proteine, die mit Hormonen, Neurotransmittern, Lokalhormonen, Autacoiden, Riech- sowie Geschmacksstoffen, Pheromonen und Photonen wechselwirken. Mehrere Übersichtsartikel^[59-70] zu diesem Gebiet sind empfehlenswert – auch für den Zugang zur Originalliteratur.

Überblick über die Funktion und die Struktur von G-Proteinen

Zwar sind G-Proteine Heterotrimere, doch verhalten sie sich wie dissoziierbare Dimere. Die β - und γ -Untereinheiten bilden fest assoziierte Komplexe, die als Einheit reagieren. G-Protein-Oligomere werden anhand ihrer α -Untereinheiten unterschieden. Obwohl eine Reihe von $\beta\gamma$ -Komplexen offensichtlich erfolgreich und unterschiedslos mit vielen α -Untereinheiten assoziieren kann, ist nicht bekannt, inwieweit dies *in vivo* auftritt.

Sechzehn unterschiedliche Gene codieren die α -Untereinheiten der G-Proteine in Säugetieren. Es werden etwa 20 Proteine synthetisiert, einschließlich der Produkte, die als Folge des alternativen Spleißens von mRNA gebildet werden. Die allgemein anerkannte Einteilung der α -Untereinheiten beruht zwar auf Strukturbeziehungen, doch wird sie (Abb. 7) auch den Funktionen gerecht^[66]. Es werden vier Gruppen unterschieden: 1) die kleine G_s -Gruppe aus G_s und G_{olf} , die als Aktivatoren von Adenylylat-Cyclasen bekannt sind, 2) die große und funktionell verschiedenartige G_i -Gruppe, deren Mitglieder mit Ausnahme von G_z Substrate des Keuchhustentoxins sind, 3) die G_q -Gruppe, deren Mitglieder Aktivatoren der Isoformen von Phospholipase $C\beta$ sind, und 4) die erst kürzlich bekannt gewordene G_{12} -Gruppe aus Proteinen, deren Funktionen noch nicht bestimmt wurden. Es sind fünf Gene bekannt, die β -Untereinheiten codieren, und sechs Gene, die γ -Untereinheiten codieren. Wenn alle Kombinationen zwischen α -, β - und γ -Untereinheiten erlaubt wären, müßte man mit mindestens 600 G-Protein-Oligomeren rechnen. Auch wenn einige Kombinationen zwischen β - und γ -Untereinheiten

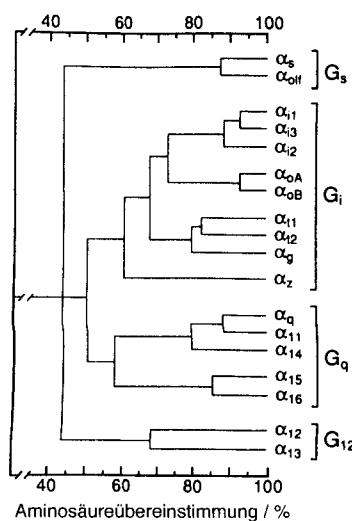


Abb. 7. Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz von α -Untereinheiten der G-Proteine von Säugetieren (modifiziert, nach Lit. [65, 66]).

anscheinend verboten sind und manche α -Untereinheiten einige $\beta\gamma$ -Dimere bevorzugen, ist die Zahl möglicher Oligomere immer noch sehr hoch.

Jede α -Untereinheit eines G-Proteins enthält eine Bindungsstelle mit hoher Affinität für ein Guanin-Nucleotid. Die α -Untereinheit mit gebundenem GDP ist relativ inaktiv und hat eine hohe Affinität zum $\beta\gamma$ -Komplex. Der GDP- $\alpha\beta\gamma$ -Komplex ist daher das inaktive Oligomer. Der durch den Rezeptor katalysierte Guanin-Nucleotid-Austausch führt zur Bildung des GTP- α -Komplexes, und die damit einhergehenden Konformationsänderungen verursachen die Dissoziation der α - von der $\beta\gamma$ -Untereinheit (Abb. 8). Damit werden zwei Regulatoren von stromen-

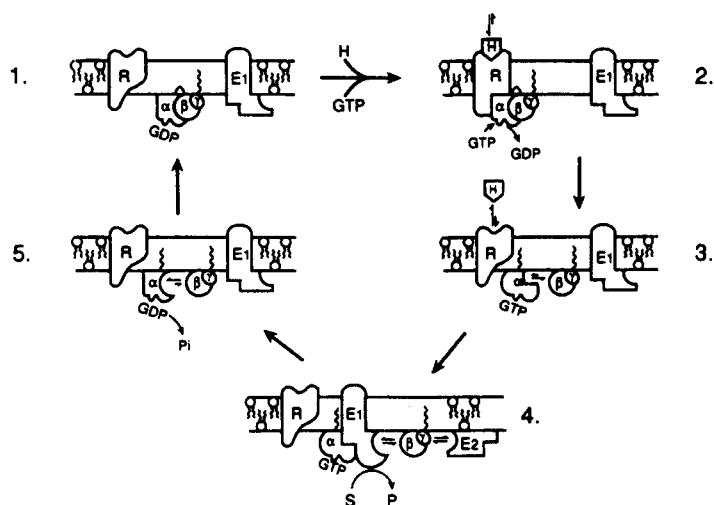


Abb. 8. Die Rolle der G-Proteine in der Übertragung von Transmembransignalen. 1) Im Grundzustand liegen G-Proteine als Heterotrimere vor, wobei GDP fest an die α -Untereinheit gebunden ist. Der Hormonrezeptor R ist frei, und der Effektor E wird nicht reguliert. 2) Bindet ein Hormon (H) an den Rezeptor, wird dieser aktiviert und wechselt mit dem Heterotrimer. Es findet eine Konformationsänderung statt und GDP dissoziert von der Guanin-Nucleotid-Bindungsstelle. Unter normalen zellulären Bedingungen hinsichtlich der Konzentration an Guanin-Nucleotiden wird die freie Stelle sofort von GTP besetzt. Ohne GTP behält das Hormon eine hohe Affinität zum Rezeptor, und der H-R-G-Komplex ist stabil. 3) Wenn GTP an die G_s -Untereinheit bindet, ändert sich die Konformation, was zwei Folgen hat. Erstens dissoziert das G-Protein vom H-R-Komplex und vermindert dadurch die Affinität des Hormons zum Rezeptor, so daß auch dieser Komplex dissoziert und der freie Rezeptor ein benachbartes, noch inaktives G-Protein binden kann. Zweitens vermindert die Bindung von GTP die Affinität der G_z -Untereinheit für die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit, und die Untereinheiten trennen sich. 4) Die freie G_s -GTP-Untereinheit kann jetzt ihre wichtigste Funktion als Regulator des Effektors erfüllen und die enzymatische Umsetzung eines Substrats S zum Produkt P aktivieren. In einigen Systemen kann auch die freie $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit direkt mit Effektoren (E₁) wechselwirken und so deren Aktivität beeinflussen oder davon unabhängig auf andere Effektoren (E₂) wirken. 5) Die G_s -Untereinheit besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität. Die Zerfalls geschwindigkeit der GTPase bestimmt die Lebenszeit der aktiven Spezies und damit Dauer der zugehörigen physiologischen Antwort. Durch die Hydrolyse von GTP durch die G_s -Untereinheit entsteht GDP, der aktive G_s -E₁-Komplex dissoziert und wird inaktiviert. Die G_s -GDP-Form besitzt eine hohe Affinität zur $G_{\beta\gamma}$ -GDP-Untereinheit; sie assoziieren und bilden wieder den Ausgangszustand (mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [68]).

abwärts gelegenen Effektoren, der GTP- α -Komplex und die $\beta\gamma$ -Untereinheit, freigesetzt. Die α -Untereinheiten sind schwache Enzyme mit einer GTPase-Eigenaktivität. Nach einer für jede α -Untereinheit charakteristischen Zeit wird GTP zu GDP hydrolysiert, wonach die Untereinheiten wieder assoziieren, und der Grundzustand wird somit wiederhergestellt. G-Proteine wirken also als Schalter und als Zeitschaltuhren. Die hohe Affinität der α -Untereinheit (und besonders des Oligomers) zu GDP hält

den Schalter in Aus-Stellung; durch den Nucleotidaustausch wird die Enzymaktivität eingeschaltet und durch die Hydrolyse von GTP mit einer charakteristischen Verzögerung aufgrund der langsamen Katalyse (im Bereich von Sekunden bis eventuell sogar Minuten) wieder ausgeschaltet. Diese Zeitschaltuhr ist ein wichtiger Bestandteil der Signalverstärkung.

Die Untereinheiten von G-Proteinen können sowohl physiologisch als auch pathologisch kovalent modifiziert sein. Besonders offensichtlich sind Modifikationen durch kovalente Verknüpfungen mit Lipiden. G_i-Proteine sind mit Myristinsäure verknüpft, wobei die C₁₄-Fettsäure über eine Amidbindung an aminotermrale Glycinreste gebunden ist^[71–73]. Diese Modifikation ist ein wichtiger Faktor für die Affinität der α - zu den $\beta\gamma$ -Untereinheiten und der G_{ia}-Untereinheiten zur Adenylyl-Cyclase^[74, 75] (siehe unten). Alle α -Untereinheiten mit Ausnahme der G_{ia}-Untereinheit enthalten einen, einige sogar zwei Palmitinsäurereste. Die C₁₆-Fettsäure ist über eine Thioesterbindung an Cysteinreste in der Nähe des N-Terminus^[76] eingebaut. Bei Proteinen der G_i-Gruppe befindet sich der mit Palmitinsäure verknüpfte Cysteinrest direkt neben dem mit Myristinsäure verknüpften Glycinrest. Während die Verknüpfung mit Myristinsäure wahrscheinlich cotranslational abläuft und die Modifikation irreversibel ist, wird Palmitinsäure posttranslational eingebaut und relativ schnell umgesetzt. Die Umsetzung von Palmitinsäure ist von besonderem Interesse. Sie wird durch einen Rezeptor reguliert, der offensichtlich die Abspaltung der Palmitinsäure von der α -Untereinheit kontrolliert^[77, 78]. Die Bedeutung dieses Vorgangs wurde noch nicht vollständig verstanden. Es könnte sich aber um einen Teil eines Prozesses handeln, durch den Transmembransignale abgeschwächt werden. Die γ -Untereinheiten haben typische CAAX-Boxen an ihren C-Termini und sind prenyliert. Die γ_1 -Untereinheit, die in der Netzhaut vorkommt, ist farnesyliert^[79], die anderen γ -Untereinheiten geranylgeranyliert^[80, 81]. Zwar ist die Prenylierung für die Bildung von $\beta\gamma$ -Dimeren mit hoher Affinität nicht notwendig, doch ist sie ausschlaggebend für die Wechselwirkungen zwischen der $\beta\gamma$ - und der α -Untereinheit sowie einigen Effektoren (z.B. Adenylyl-Cyclasen)^[82]. Alle Modifikationen durch Lipide könnten bei der Bindung der G-Protein-Untereinheiten an die Membran eine wichtige Rolle spielen. Die Mechanismen allerdings, die die Spezifitäten dieser Protein-Membran-Wechselwirkungen festlegen, müssen erst noch entdeckt werden. Wir vermuten, daß die G_{sa}-Untereinheit durch eine bis jetzt noch nicht identifizierte Gruppe kovalent modifiziert ist, denn das natürliche Protein, das aus Leber oder Gehirn isoliert wird, hat eine wesentlich höhere Affinität für die Adenylyl-Cyclase als das rekombinante G_{sa}-Protein, das in Bakterien synthetisiert wird^[83].

Eine besonders interessante, irreversible Modifikation von pathologischer Bedeutung ist die ADP-Ribosylierung von α -Untereinheiten durch bakterielle Toxine. Das Darmtoxin, das Durchfall hervorruft und von *Vibrio cholerae* produziert wird, sowie das hitzelabile Toxin, das von einigen *E. coli*-Stämmen synthetisiert wird, sind ADP-Ribosyl-Transferasen mit einer hohen Spezifität für die G_{sa}-Untereinheit. Dabei ist NAD der Lieferant für die ADP-Ribosyl-Einheit, die auf einen Argininrest im aktiven Zentrum des Substrates übertragen wird^[84]. Die sich daraus ergebende Inhibition der GTPase-Aktivität der G_{sa}-Untereinheit führt zu einer permanenten Aktivierung der Ade-

nylat-Cyclase durch die G_{sa}-Untereinheit. Aufgrund der Lokalisation der Infektion im Darm ist Durchfall das vorherrschende Symptom der Krankheit. Ein Toxin (ein inaktivierendes Protein), das von *Bordetella pertussis* produziert wird, katalysiert die ADP-Ribosylierung eines Cysteinrestes am C-Terminus in α -Untereinheiten von G_i-Proteinen^[85]. Durch diese Reaktion werden Wechselwirkungen zwischen G-Proteinen und Rezeptoren gestört, so daß die beteiligten Prozesse einschließlich der, die eine Inhibition der Adenylyl-Cyclase verursachen, wirkungsvoll inhibiert werden. Nebenbei sei angemerkt, daß andere Mikroorganismen davon abweichende Strategien entwickelt haben, um die Konzentrationen an cyclischem AMP in ihren Wirtszellen zu erhöhen. So sind ein Toxin aus *Bacillus anthracis* und eines aus *Bordetella pertussis* selbst Adenylyl-Cyclasen, die durch Calmodulin aktiviert werden und in Säugetierzellen eindringen.

Kürzlich wurden hochauflöste Kristallstrukturen von zwei α -Untereinheiten, G_{ia} und G_{ia1}, in unterschiedlichen Liganden-zuständen beschrieben^[86–88]. Die prinzipielle Bauweise dieser eng verwandten Proteine ist im wesentlichen identisch (Abb. 9).

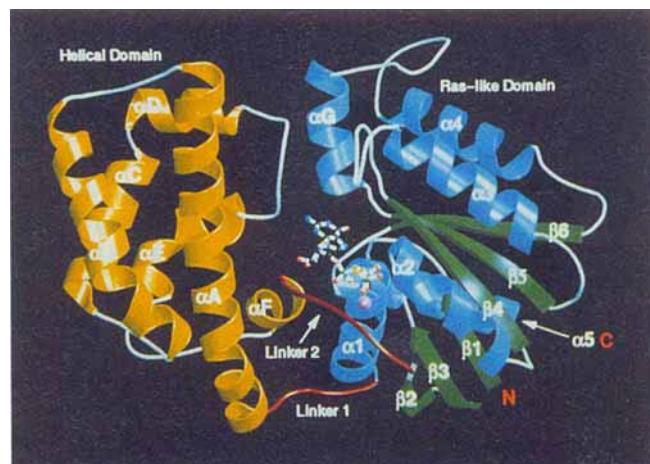


Abb. 9. Schematische Darstellung der G_{ia1}-Untereinheit als Bänder und Spalten. Die Helix-Domäne ist gelb, die p21^{ras}-ähnliche Domäne grau sowie blau, und die Linker-1- und -2-Stränge sind rot eingezeichnet. GTPyS ist als Kugel-Stab-Modell und das Magnesium-Ion als violette Kugel dargestellt. Elemente der Sekundärstruktur sind gekennzeichnet. Die roten Buchstaben N und C markieren die Positionen der ersten geordneten Reste am N- und C-Terminus (mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [88]).

Jede der beiden Untereinheiten besteht aus zwei sehr unterschiedlichen Domänen: einer p21^{ras}-ähnlichen $\alpha\beta$ -Domäne und einer bei G-Proteinen einmaligen α -Helix-Domäne, die diese flankiert. Sie sind durch zwei Linker-Peptidstränge verbunden. Obwohl alle direkten Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Guanin-Nucleotid durch die p21^{ras}-ähnliche Domäne oder durch das Linker-2-Peptid gebildet werden, befindet sich das Nucleotid in der Spalte zwischen den beiden Hauptdomänen. Die Konformationsänderungen, die vom Rezeptor vermittelt werden und die für den Guanin-Nucleotid-Austausch ausreichen, könnte möglicherweise zu einer deutlichen Trennung der Helix- und der p21^{ras}-ähnlichen Domäne führen.

Obwohl mehrere ausgezeichnete Kristallstrukturen von p21^{ras}-Proteinen und von p21^{ras}-Mutanten ohne GTPase vorliegen, ist es schwierig, auf den Mechanismus der Hydrolyse von

GTP zurückzuschließen. Dies ist hauptsächlich deswegen der Fall, weil die Proteine ohne Aktivatoren (GTPase-aktivierende Proteine, GAPS) schlechte Katalysatoren sind. Dasselbe gilt für die $G_{i\alpha}$ - und $G_{i\beta\gamma}$ -Untereinheiten mit gebundenem GTP γ S. Glücklicherweise sind die Konformationen dieser Proteine, wenn sie AlF $_4^-$ gebunden haben, aufschlußreicher. Wie bereits bemerkt, wurde unerwarteterweise herausgefunden, daß Al $^{3+}$ ein notwendiger Cofaktor für die Aktivierung von G-Proteinen durch F $^-$ ist. Daraus wurde geschlossen, daß AlF $_4^-$ wahrscheinlich an G_{α} -Proteine in der Nähe von GDP gebunden ist und so die γ -Phosphorylgruppe von GTP nachahmt^[28, 89, 90]. Die Kristallstruktur zeigt, daß diese Hypothese fast richtig ist^[88]. Dabei scheint GDP-AlF $_4^-$ allerdings eher ein Analogon des Übergangszustandes zu sein, als nur einfach GTP nachzuahmen. Mit GDP-AlF $_4^-$ wurde damit die Bedeutung von Aminosäureresten im aktiven Zentrum demonstriert.

Zwei Aminosäurereste, Arg 178 (Numerierung nach $G_{i\beta\gamma}$) und Gln 204 spielen bei der Katalyse eine Rolle. Dies ist das Ergebnis der Isolierung oder Konstruktion von GTPase-freien Proteinen mit Mutationen an diesen Stellen^[91–94]. Dabei entspricht Arg 178 dem Arg in der $G_{\alpha\beta}$ -Untereinheit, das durch das Cholera-Toxin ADP-ribosyliert worden ist. Gln 204 entspricht dem für die Katalyse wichtigen Aminosäurerest Gln 61 in p21^{ras}. (Für Arg 178 gibt es keine homologe Aminosäure in p21^{ras}; Arg 178 liegt im Linker-2-Peptid.) Die unterschiedlichen Positionen dieser beiden Aminosäurereste in GDP-AlF $_4^-$ und im GTP γ S-gebundenen Protein enthalten ihre Funktionen bei der Katalyse (Abb. 10). Gln 204 scheint das hydrolysierende Wassermoleköl im trigonal-bipyramidalen Übergangszustand zu stabilisieren und zu orientieren, während Arg 178 die negative Ladung an den äquatorialen Sauerstoffatomen der Phosphat-Zwischenstufe mit pentakoordiniertem Phosphoratom stabilisiert. Da dieser Arg-Rest nur in G_{α} -Proteinen vorkommt, kann seine Gegenwart die höhere hydrolytische Aktivität der G_{α} -Proteine im Vergleich zu der von p21^{ras}-Proteinen erklären.

Die Hydrolyse von GTP durch die $G_{i\beta\gamma}$ -Untereinheit wird von einer Lockerung sowohl des Linker-2-Strangs als auch eines Segments aus 20 Resten begleitet, das Gln 204 enthält. Der Verlust von jeglicher geordneter Konformation in diesen Resten, die in der Elektronendichtekarte nicht sichtbar sind, führt zu Änderungen in den für das GDP-gebundene Protein charakteristischen Eigenschaften: zum Verlust der Mg $^{2+}$ -Bindungsstelle, zu einer etwas herabgesetzten Affinität für das Guanin-Nucleotid, zu einer erhöhten Anfälligkeit für Proteolyse in dieser Region und zu einer Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz.

Eine überraschende Konsequenz der Hydrolyse von GTP ist, daß sich die N- und C-Termini in einer klar erkennbaren, deutlichen α -Helix-Domäne anordnen. Diese Strukturänderung tritt nahezu 30 Å vom katalytischen Zentrum entfernt auf, und es ist schwierig, sie mit einer Folge von intramolekularen Konformationsänderungen zu erklären. Noch überraschender ist die Entdeckung, daß diese neue Domäne im Kristall eine außerordentlich komplementäre und ausgedehnte Packungsgrenzschicht zur α -Helix-Domäne und zum Linker-2-Strang eines Nachbarmoleküls bildet (Abb. 11). Daher könnten Strukturänderungen zwischen der GTP-Bindungsstelle und dem N- sowie dem C-Terminus, die einen Teil der mutmaßlichen Bindungsfläche für den $\beta\gamma$ -Untereinheiten-Komplex ausmachen, durch intermolekulare Wechselwirkungen weitergegeben werden^[95]. Diese Be-

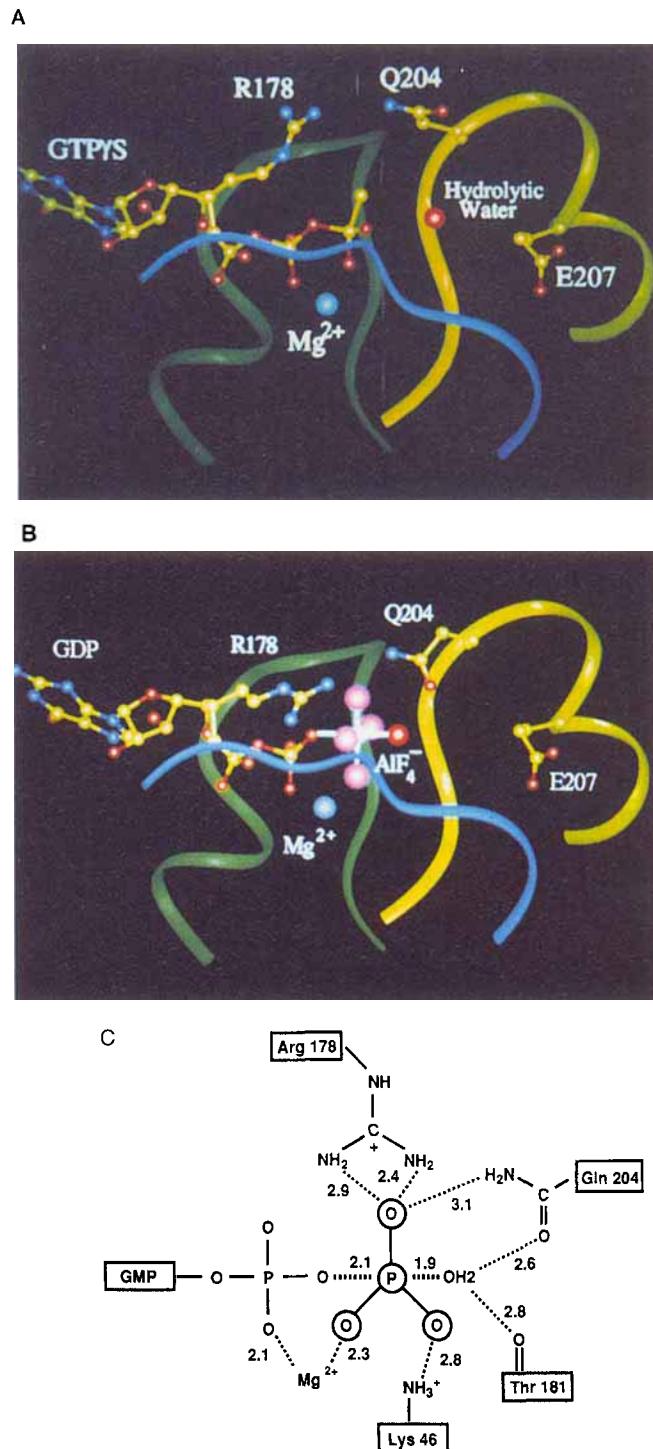


Abb. 10. A) Schematische Darstellung des aktiven Zentrums im GTP γ S- $G_{i\beta\gamma}$ -Komplex. Sie zeigt die Positionen von Arg 178 und Gln 204. Diese Aminosäuren liegen außerhalb der Reichweite der Wasserstoffbrückenbindungen des Nucleotids. Das nucleophile Wassermoleköl ist *trans*-axial bezüglich des O-Atoms des P-O-P-Brücke mit einem O(H $_2$ O)-P-Abstand von 3.85 Å angeordnet. Die β_1 - α_1 -Schleife ist grün, das β_2 - α_2 -Schalterpeptid gelb und der Linker-2-Strang blau eingezeichnet. B) Der GDP-AlF $_4^-$ -Komplex aus derselben Perspektive. Arg 178 und Gln 204 haben sich gedreht, um mit AlF $_4^-$ zu wechselwirken. Das nucleophile Wassermoleköl befindet sich in der Koordinationsphäre des Aluminium-Ions. C) Modell des aktiven Zentrums des $G_{i\beta\gamma}$ -Proteins im Übergangszustand der Phosphorylierung. Das Modell basiert auf der Struktur des GDP-AlF $_4^-$ -Komplexes (mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [88]).

funde sind vermutlich auch für die Überlegungen von Rodbell zur Möglichkeit der G-Protein-Oligomerisierung relevant^[96].

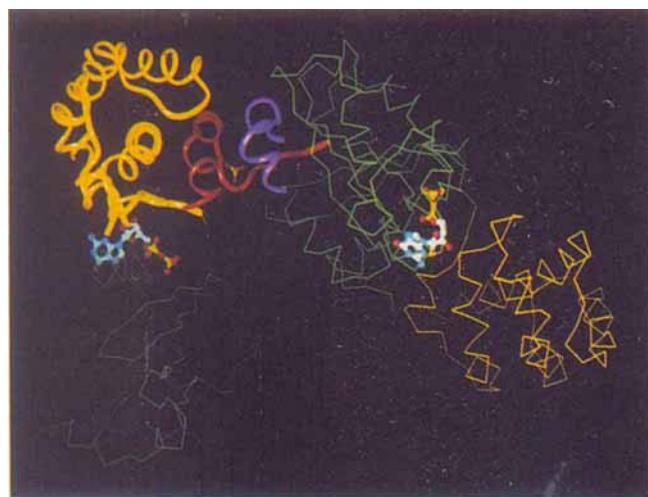
Die Eigenschaften der α -Untereinheiten der G-Proteine

Abb. 11. Symmetrische GDP-G_{i1}-Moleküle ordnen sich im kristallinen Zustand helical an. Im GTP-Komplex sind der C- und der N-Terminus der G_{i1}-Untereinheit ungeordnet, aber wenn das Nucleosid-Triphosphat hydrolysiert wird, falten sie sich zu einer eigenständigen Mikrodomäne, die ungefähr 40 Aminosäuren umfaßt. Es wird angenommen, daß ein Phosphat-Ion, das mit drei Argininresten des N-terminalen Endes und mit Lys 180 vom Linker-2-Strang wechselwirkt, als Kristallisationskeim dieser Mikrodomäne fungiert. In Kristallen des GDP-G_{i1}-Proteins übernimmt ein Sulfat-Ion diese Funktion. Die Mikrodomäne bildet eine ausgedehnte, komplementäre Grenzschicht mit der α -Helix-Domäne und dem Linker-2-Strang des Nachbarmoleküls. Dadurch wird eine lösungsmittelzugängliche Oberfläche von über 1800 Å² blockiert; Grenzschichten von dieser Größe weisen auch viele Antigen-Immunglobulin-Komplexe auf.

Homogene Proben nahezu aller bekannten α -Untereinheiten (Tabelle 1) und vieler unterschiedlicher $\beta\gamma$ -Untereinheiten wurden aus Gewebeproben oder nach ihrer Expression in *E. coli* oder in SF9-Zellen isoliert. Die Eigenschaften mehrerer Untereinheiten wurden auch durch In-transfekt-Versuche – eine neuartige biochemische Methode – bestimmt. Jedes System hat Vor- und Nachteile. Während den aus *E. coli* stammenden Proteinen bestimmte kovalent gebundene Modifikationen fehlen können, auch wenn eine Verknüpfung mit Myristinsäure durch Coexpression von N-Myristoyl-Transferase möglich ist, haben diese Proteine den Vorteil, daß sie eindeutig keine anderen G-Protein-Untereinheiten enthalten. Dies nachzuweisen kann bei G-Proteinen aus anderen Quellen schwierig sein.

Die α_s - und α_{olf} -Untereinheiten der G_s-Gruppe aktivieren durch direkte Wechselwirkungen unterschiedliche Adenylyl-Cyclasen. Alle bekannten Isoformen der membrangebundenen Adenylyl-Cyclase in Säugetieren werden von den G_s-Proteinen aktiviert. Es werden als Folge des alternativen Spleißens einer Vorläufer-mRNA vier G_s-Polypeptide exprimiert, die sich in den Resten, die im Exon 3 codiert werden, und einem Serin-Rest an der Spleißstelle unterscheiden. Die Funktionen dieser Varianten konnten bis jetzt noch nicht unterschieden werden^{197–99}. Die α -Untereinheit des G_{olf}-Proteins wird überwiegend im Neuroepithel des Riechzentrums exprimiert, wo sie wahrscheinlich Riechrezeptoren und eine hauptsächlich ge-

Tabelle 1. Eigenschaften der α -Untereinheiten von G-Proteinen in Säugetieren.

Gruppe/ Untereinheit	<i>M</i> , [kDa]	Aminosäureüber- einst. [%] [a]	Toxin [b]	Lipid [c]	Vorkommen in Geweben	Repräsentative Rezeptoren [d]	Effektor [f]
G _s							
$\alpha_{s(S)}$ (2 \times) [e]	44.2	100	CT	P	überall	β AR, Glucagon,	↑ Adenylyl-Cyclase
$\alpha_{s(L)}$ (2 \times) [e]	45.7	–	CT	P	überall	TSH, andere	↑ Ca ²⁺ -Kanäle, ↓ Na ⁺ -Kanäle.
α_{olf}	44.7	88	CT	P?	Riechneuroepithel	Riechstoffe	↑ Adenylyl-Cyclase
G _i							
α_{i1}	40.3	100	PT	M, P	weit verbreitet		↓ Adenylyl-Cyclase
α_{i2}	40.5	88	PT	M, P	überall	M ₂ Cho, α_2 AR,	↑ K ⁺ -Kanäle (?)
α_{i3}	40.5	94	PT	M, P	weit verbreitet	andere	↑ Phospholipase A ₂ (?)
α_{i4}	40.0	73	PT	M, P	Gehirn, andere	Met-Enk,	↓ Ca ²⁺ -Kanäle
α_{iB}	40.1	73	PT	M, P	Gehirn, andere	α_2 AR, andere	↓ Adenylyl-Cyclase, andere (?)
α_{i1}	40.0	68	CT, PT	M	Netzhautstäbchen	Rhodopsin	↑ cGMP-spezifische Phosphodiesterase
α_{i2}	40.1	68	CT, PT	M	Netzhautäpfchen	Opsine	↑ cGMP-spezifische Phosphodiesterase
α_s	40.5	67	CT (?), PX	?	Geschmacksknospen	Geschmack (?)	?
α_2	40.9	60	–	M, P	Gehirn, Nebennieren, Blutplättchen	M ₁ Cho (?), andere (?)	↓ Adenylyl-Cyclase, andere (?)
G _q							
α_q	42	100	–	P	weit verbreitet	M ₁ Cho, α_1 AR, andere	
α_{11}	42	88	–	P	weit verbreitet		
α_{14}	41.5	79	–	P	Lunge, Niere, Leber	C _{5a} , IL-8, andere	↑ Phospholipase C β , andere (?)
α_{15}	43	57	–	P?	B-Zellen, Knochenmarkzellen	IL-8, andere (?)	
α_{16}	43.5	58	–	P	T-Zellen, Knochenmarkzellen	IL-8, andere (?)	
G ₁₂							
α_{12}	44	100	–	P	überall	?	?
α_{13}	44	67	–	P	überall	?	?

[a] Vergleich mit der in einer Gruppe jeweils zuerst genannten Untereinheit. [b] Das Cholera- und das Keuchhustentoxin (CT bzw. PT) katalysieren die ADP-Ribosylierung eines Arginin- bzw. Cystein-Restes in der aufgeführten α -Untereinheit. [c] Modifikationen durch Verknüpfungen mit Palmitinsäure (P) und/oder Myristinsäure (M). [d] β AR = β -adrenerger Rezeptor, M₁Cho = M₁-muscarinisch cholinerg Rezeptor, M₂Cho = M₂-muscarinisch cholinerg Rezeptor, α_1 AR = α_1 -adrenerger Rezeptor, α_2 AR = α_2 -adrenerger Rezeptor, Met-Enk = Methionin-Enkephalin, C_{5a} = C_{5a}-Teil des C3-Proteins, IL-8 = Interleukin-8. [e] $\alpha_{s(S)}$ = kurze, $\alpha_{s(L)}$ = lange Spleißvarianten von α_s . [f] ↑ = Aktivierung, ↓ = Inhibition.

ruchsspezifische Isoform der Adenylat-Cyclase (Typ III) verknüpft^[100]. Gereinigtes G_{α_2} -Protein aktiviert auch Ca^{2+} -Kanäle, die auf Dihydropyridin und Änderungen im Membranpotential reagieren, in Gewebestückchen aus Skelett- und Herzmuskeln^[101], und inhibiert Na^+ -Kanäle im Herz^[102]. Die physiologische Bedeutung dieser beiden Wirkungen läßt sich schwer beurteilen. Das G_{α_2} -Protein wird von Rezeptoren aktiviert, die die Adenylat-Cyclase stimulieren; β -adrenerge Rezeptoren sind dafür der Prototyp.

Mitgliedern der G_i -Gruppe begegnete man zuerst als Transducine in der Netzhaut und dann als Substrate für das inselaktivierende Protein. Die beiden Isoformen von Transducin werden selektiv in den Netzhautstäbchen und -zäpfchen exprimiert^[103]. Sie werden durch photolysiertes Rhodopsin oder den Opsinen aktiviert, und jede stimuliert eine Phosphodiesterase, die für cyclisches GMP spezifisch ist. So wird die intrazelluläre Konzentration an cyclischem GMP bei Lichteinwirkung vermindert. Ein dem Transducin ähnliches G-Protein, das Gusducin (α_g), wird nur in Geschmacksknospen exprimiert^[104]. Die Verwandtschaft von Gusducin und den Transducinen ist sehr eng. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, daß eine Cyclo-Nucleotid-Phosphodiesterase der Effektor bei der Antwort auf einige Geschmacksstoffe ist.

Drei eng verwandte Gene codieren die drei G_{i_2} -Untereinheiten. Diese Proteine weisen in vitro sehr ähnliche Wirkungen auf, obwohl sich sowohl ihre zellulären als auch subzellulären Verteilungen unterscheiden. Aus mehreren Gründen konnte man lange nicht zeigen, daß diese α -Untereinheiten Inhibitoren der Adenylat-Cyclasen sind. So brauchte man vergleichsweise hohe Konzentrationen, die α -Untereinheit mußte mit Myristinsäure verknüpft werden, und man stellte unterschiedliche Wirkungen auf die Isoformen der Adenylat-Cyclase fest^[75, 105]. Zunächst hatte man angenommen, daß G_{i_2} -Proteine K^+ -Kanäle in Herzmuskelzellen und im Nervengewebe aktivieren^[106], doch ist dies derzeit sehr umstritten. G_{i_2} -Proteine könnten im Vergleich zu den $\beta\gamma$ -Untereinheiten hier sogar von untergeordneter Bedeutung sein^[107]. Darüber hinaus gibt es Ergebnisse, nach denen zumindestens einige G_{i_2} -Proteine beim Schleusen durch Membranen eine Rolle spielen^[108-110]. Die Beteiligung dieser Proteine an solch unterschiedlichen zellulären Prozessen ist verwirrend.

Das G_{α_2} -Protein unterscheidet sich erheblich von den G_{i_2} -Proteinen, inhibiert allerdings auch die Adenylat-Cyclase-Aktivität in transfizierten Zellen^[111] oder in vitro^[112]. Auffallend ist, daß G_{α_2} kein Substrat für das Keuchhustentoxin ist und GTP sehr langsam hydrolysiert^[113].

Wie erwähnt, war die Entdeckung des G_{α_2} -Proteins sehr aufschlußreich, da es in hoher Konzentration im Gehirn vorkommt (1-2% aller Membranproteine im Gehirn) und anscheinend nicht an den bekannten Guanin-Nucleotide regulierten Systemen beteiligt ist. Das G_{α_2} -Protein scheint nicht nur eine wichtige Rolle als Inhibitor von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen^[114] zu spielen, sondern hat unserer Meinung nach noch andere, bedeutende Aufgaben. Hinweise darauf sind die hohe Konzentration in den Wachstumszapfen im Nervengewebe^[115] und die offensichtlichen Wechselwirkungen mit GAP-43, einem Ca^{2+} -bindenden Protein, das ebenfalls in diesen Geweben in hohen Konzentrationen vorliegt^[116].

Eindeutige Hinweise für eine Regulation der phosphoinositidspezifischen Phospholipase C waren schon lange, bevor die relevanten G-Proteine identifiziert wurden, bekannt^[54, 55]. Es handelt sich in den meisten Zellen um einen Prozeß, der nicht durch das Keuchhustentoxin beeinflußt wird. Die Klonierung von G_{α_2} -Untereinheiten auf Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion lieferte Proteine, die als Regulatoren in Frage kamen^[117]. Fast gleichzeitig wurden G-Proteine mit Regulatoreigenschaften durch bewährte Rekonstituierungsmethoden entdeckt^[118, 119] und neuartige α -Untereinheiten durch Affinitäts- und Austauschchromatographie isoliert^[120]. Mit diesen drei Methoden wurden zunächst die G_{α_2} - und dann die $G_{11\alpha_2}$, $G_{14\alpha_2}$ - und $G_{15/16\alpha_2}$ -Untereinheiten als Aktivatoren von Isoformen der Phospholipase C β identifiziert. Mit den gereinigten G_{α_2} -Proteinen wurde gezeigt, daß sie mit den Phospholipasen an deren C-Terminus direkt wechselwirken. Interessanterweise verhalten sich die Phospholipasen C β gegenüber den G_{α_2} -Untereinheiten wie GTPase-aktivierende Proteine^[121]. Ohne den Effektor ist der k_{kat} -Wert für die Hydrolyse von GTP durch diese Proteine sehr niedrig, mit ihm wird er auf einen über 50fach höheren Wert erhöht. Dies kann am einfachsten damit erklärt werden, daß die Phospholipase C β ihre eigene Aktivierung blockieren kann. Jedoch ergaben kinetische Untersuchungen, daß der Rezeptor, das G_{α_2} -Protein und die Phospholipase einen Komplex bilden, der GTP schnell bindet und hydrolysiert. Dies führt zu einer erheblichen Aktivierung der Phospholipase C im Fließgleichgewicht, die mit besonders schnellen Antworten verbunden ist.

Die Bedeutungen der $G_{12\alpha_2}$ - und $G_{13\alpha_2}$ -Untereinheiten sind nicht bekannt. Beide sind von ihrer Struktur her mit einem Protein aus *Drosophila concertina* verwandt, das eine Rolle in der Gastrulation zu spielen scheint^[122]. Eine Transfektion von NIH-3T3-Zellen mit der cDNA der $G_{12\alpha_2}$ -Untereinheit führt zu einer Transformation der Zellen^[123, 124].

Die Eigenschaften der $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine

Erst seit kurzem wird allgemein anerkannt, daß die stromabwärts stattfindende Regulation von Effektoren durch die $\beta\gamma$ -Untereinheiten (Tabelle 2) erfolgt^[69, 70]. Zunächst glaubte man, daß diese Untereinheiten weniger wichtig seien. Die Bindung von GDP und der $\beta\gamma$ -Untereinheit an die α -Untereinheit ist positiv kooperativ. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit stabilisiert so die inaktive α -Form, die GDP gebunden hat, indem sie die Dissoziationsgeschwindigkeit des α -Untereinheit-Nucleotid-Komplexes herabsetzt^[125]. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit fungiert also als ein Rauschunterdrücker^[126]. Im Gegensatz dazu weisen die Wechselwirkungen von GTP und der $\beta\gamma$ -Untereinheit mit der α -Untereinheit eine negative Kooperativität auf. Es wurde vorgeschlagen, daß die $\beta\gamma$ -Untereinheit die Inaktivierung der α -Untereinheit beschleunigen und dadurch die stromabwärts stattfindenden Antworten inhibieren könnte^[127]. Die Bedeutung dieser Möglichkeit ist noch ungeklärt, aber als schließlich die Inhibitorwirkungen der G_{i_2} -Proteine auf die Adenylat-Cyclase beobachtet wurden, brauchte man diese Hypothese nicht mehr. Für den Austausch von GDP durch GTP an der α -Untereinheit, der durch den Rezeptor ausgelöst wird, ist die $\beta\gamma$ -Untereinheit als Katalysator erforderlich^[128]. Der Rezeptor

Tabelle 2. Eigenschaften der β - und der γ -Untereinheiten von G-Proteinen in Säugetieren.

Unter- einheit	M_r [kDa]	Aminosäure- übereinst. [%] [a]	Vorkommen in Geweben	Effektor/Funktion [b]
β				
β_1	37.3	100	überall	Unterstützung der Phosphorylierung und Desensibilisierung des Rezeptors durch Agonisten
β_2	37.3	90	weit verbreitet	für Wechselwirkungen zwischen G_α und Rezeptor benötigt
β_3	37.2	83	weit verbreitet	
β_4	37.2	89	weit verbreitet	Inhibitierung der Aktivierung von G_α
β_5	38.7	52	Gehirn	
γ				
γ_1	8.4	100	Netzhautstäbchen	\uparrow oder \downarrow Adenylat-Cyclase (isoformspezifische Wirkungen)
γ_2	7.9	38	Gehirn, Nebennieren	\uparrow Phospholipase $C\beta_2, \beta_3$
γ_3	8.5	36	Gehirn, Hoden	
γ_4	(? teilweise)	(34)	(Niere, Netzhaut (?))	$\uparrow K^+$ -Kanäle
γ_5	7.3	25	überall	
γ_7	7.5	35	überall	\uparrow Phospholipase A_2 (?)

[a] Vergleich mit der in einer Gruppe jeweils zuerst genannten Untereinheit. [b] \uparrow = Aktivierung, \downarrow = Inhibition.

erkennt also nur das Heterotrimer aus G-Proteinen und die Assoziation der Untereinheiten ist eine Voraussetzung für die Aktivierung.

Der erste deutliche Hinweis auf eine Wechselwirkung zwischen der $\beta\gamma$ -Untereinheit und Effektoren kam von Logothetis et al.^[107], die entdeckten, daß die K^+ -Kanäle in Herzkammermuskelzellen nur durch die $\beta\gamma$ - und nicht durch die $G_{\alpha\alpha}$ -Untereinheit aktiviert werden. Über die Bedeutung dieser Ergebnisse herrschte Unstimmigkeit, und so wurden die $\beta\gamma$ -Untereinheiten mehrere Jahre nicht beachtet, obwohl mit genetischen Methoden bewiesen wurde, daß sie die eigentlichen Mediatoren bei der stromabwärts gelegenen Signalübertragung der Pheromonantwort bei keimender Hefe sind^[1129]. In den letzten Jahren wurden mit einfachen biochemischen Assays interessante, direkte Wechselwirkungen zwischen $\beta\gamma$ -Untereinheiten und Effektoren, wie Adenylat-Cyclasen^[130–132] und Phospholipasen^[133, 134] festgestellt. Die Ergebnisse waren reproduzierbar, und dieser Punkt scheint geklärt. Die Wirkungen von $\beta\gamma$ -Untereinheiten auf Adenylat-Cyclasen werden im folgenden Abschnitt behandelt.

Die Frage nach der Spezifität der unterschiedlichen $\beta\gamma$ -Untereinheiten bleibt kompliziert. Abgesehen von Ergebnissen, nach denen nichtretinale α -Untereinheiten und Effektoren mit retinalen $\beta_1\gamma_1$ -Untereinheiten weniger gut wechselwirken als mit anderen, konnte nur eine geringe Spezifität der $\beta\gamma$ -Untereinheiten gegenüber vielen α -Untereinheiten und Effektoren festgestellt werden^[82, 135, 136]. Diese In-vitro-Ergebnisse sind in Einklang mit der von Kleuss et al. an intakten Zellen festgestellten Spezifität^[82, 135–139]. In GH_3 -Zellen werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle von M_4 -muscarinischen und Somatostatin-Rezeptoren inhibiert. Eine selektive Unterdrückung von jeder der beiden Spleißvarianten des $G_{\alpha\alpha}$ -Proteins mit Antisense-Oligonucleotiden deutet darauf hin, daß die muscarinische Antwort von der Expression des $G_{\alpha 1\alpha}$ - und nicht der des $G_{\alpha 2\alpha}$ -Proteins und die Antwort auf Somatostatin selektiv nur vom $G_{\alpha 2\alpha}$ -Protein abhängt. Eine ähnliche Unterdrückung von β - oder γ -Untereinheiten ergab erstaunliche Ergebnisse, die mit der muscarinischen Signalübertragung durch das $\alpha_1\beta_3\gamma_4$ -Protein und der durch Somatostatin durch das $\alpha_2\beta_1\gamma_3$ -Protein übereinstimmen. Die gegenwärtig beste Erklärung ist, daß die Spezifität durch die Re-

zeptor-G-Protein-Wechselwirkungen erreicht wird, aber Beweise dafür, z.B. durch Rekonstitution der gereinigten Komponenten in vitro, sind noch nicht überzeugend.

Adenylat-Cyclasen

Unser Interesse galt immer den Adenylat-Cyclasen, auch wenn wir uns durch die G-Proteine ablenken ließen und seit einiger Zeit nur ein Mitarbeiter mit Adenylat-Cyclasen arbeitete. 1989 änderte sich dies.

Adenylat-Cyclasen aus Säugetieren werden durch Forskolin aktiviert, ein Diterpen, das in den Wurzeln von *Coleus forskolii* gefunden wird. Pfeuffer und Metzger entwickelten eine Forskolin-Affinitätsmatrix, mit der eine – wenn auch schwierige – Enzymreinigung möglich wurde^[140]. Als erster reinigte Smigaj in unserem Labor eine calmodulinabhängige Adenylat-Cyclase aus Rinderhirn durch Pfeuffers Methode^[141]. Krupinski et al. reinigten später eine ausreichende Menge an Protein, um die Aminosäuresequenzen zu bestimmen^[142]. Mit der Hilfe von Randall Reed am John Hopkins Hospital, den wir um Unterstützung gebeten hatten, da Adenylat-Cyclase besonders im Neuroepithel des Riechzentrums im Gehirn vorkommt, erhielten wir cDNAs, die Adenylat-Cyclasen vom Typ I codieren, aus einer Rinderhirn-Bibliothek. Inzwischen wurden weitere sechs Klone in voller Länge, die Typen II–VI und VIII, durch nicht-stringente Hybridisierung und PCR-Methoden von mehreren Arbeitsgruppen isoliert. Alle genannten Proteine konnten exprimiert und ihre Regulatoreigenschaften bestimmt werden^[143–145].

Die membrangebundenen Adenylat-Cyclasen in Säugetierzellen haben eine komplexe Struktur, die an viele Transporter und Kanäle erinnert (Abb. 12). Ihre topographische Verwandtschaft zum P-Glycoprotein und zum Regulator der Transmembranleitfähigkeit bei der Mukoviszidose ist auffallend, obwohl es keine Homologien in den Aminosäuresequenzen dieser Proteine gibt. Auf einen kurzen cytoplasmatischen N-Terminus folgen sechs, vermutlich Transmembran-Domänen M_1 und eine ungefähr 40 kDa schwere cytoplasmatische Domäne C_1 . Diese Struktur-einheit wird wiederholt: Auf einen zweiten Satz aus sechs Trans-

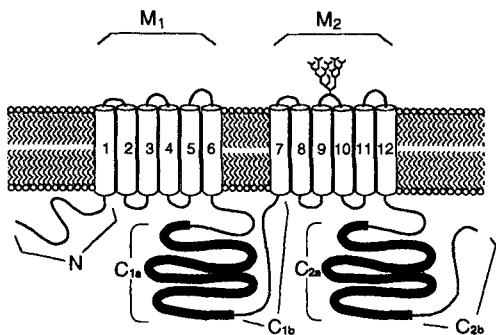


Abb. 12. Angenommene Topographie von membrangebundenen Adenylat-Cyclasen. Die Zylinder stellen die membran durchspannenden Regionen dar, die fettgedruckten Linien kennzeichnen Regionen mit hoher Aminosäureübereinstimmung bei allen Adenylat-Cyclasen. N: aminoterminal Domäne; M₁, M₂: membran durchspannende Regionen; C_{1a}, C_{1b}, C_{2a}, C_{2b}: große intrazelluläre cytoplasmatische Domänen (mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [145]).

membran-Domänen M₂ folgt wieder eine große cytoplasmatische Domäne, C₂. Obwohl diese Struktur für ein „einfaches“ Enzym einmalig ist, ist ihre Bedeutung nur schwer abzuschätzen. Für mich ist es faszinierend, daß das regulatorische Prinzip der Adenylat-Cyclasen, die Aktivierung durch ein GTP-bindendes Protein, auch in *Saccharomyces cerevisiae* auftritt. Obwohl diese Art der Regulation von Hefen bis Säugetieren konserviert worden ist, haben sich die Proteine, die diese Regulation bewirken, verändert. Die Adenylat-Cyclase von *Saccharomyces* ist ein sehr großes peripheres Membranprotein, das wenig Ähnlichkeit mit seinem Gegenstück in Säugetieren hat^[146]. Das GTP-bindende Protein in Hefen, das die Synthese von cAMP stimuliert, weist Homologien zum p21^{ras}-Protein in Säugetieren auf^[147], obwohl Hefen heterotrimeren G-Proteine enthalten. Die Evolution geht bisweilen sonderbare Wege.

Die C_{1a}- und die C_{2a}-Region – beide ungefähr 200 Aminosäuren lang – sind bei den Adenylat-Cyclasen der Säugetiere hochkonserviert. Diese Verwandtschaft reicht auch bis zu den topographisch ähnlichen Enzymen in *Drosophila* und *Dictyostelium*. Die beiden Domänen sind aber auch einander sowie den katalytischen Domänen der membrangebundenen und der löslichen Guanylat-Cyclasen sehr ähnlich. Diese Verwandtschaften deuten darauf hin, daß eine oder beide Domänen der Ort der Katalyse sind.

Wenn diese vermutlich katalytischen Domänen als separate Proteine exprimiert werden, ist keine signifikante Adenylat-Cyclase-Aktivität feststellbar. Das ist auch der Fall, wenn die beiden Hälften des Moleküls jeweils in Sf9-Zellen exprimiert werden. Erst die gemeinsame Expression der M₁C₁- und M₂C₂-Regionen führt zu einer beträchtlichen Adenylat-Cyclase-Aktivität, die durch G-Protein-Untereinheiten oder im Falle des Typ-I-Enzyms durch Calmodulin charakteristisch reguliert werden kann^[148]. Wir nehmen vorläufig an, daß eine Wechselwirkung zwischen den C₁- und C₂-Domänen für die Katalyse notwendig ist. Dies stimmt mit den Tatsachen überein, daß beide Untereinheiten der heterodimeren, löslichen Guanylat-Cyclasen, deren Untereinheiten zu C_{1a} und C_{2a} homologe Sequenzen enthalten^[148], für die Katalyse benötigt werden und daß die membrangebundenen Guanin-Cyclasen Homooligomere sind^[149]. Es ist auch interessant, daß durch Punktmutationen sowohl in der C_{1a}- als auch in der C_{2a}-Domäne die Aktivität der Adenylat-Cyclase stark beeinträchtigt und durch Mutationen in

jeder Domäne der K_m-Wert für ATP angehoben werden kann. Beide Domänen können möglicherweise ATP binden und die Synthese von cAMP katalysieren. Alternativ könnte eine Domäne der Hauptkatalysator sein, während die andere eine Regulationsfunktion hat.

Regulation der Adenylat-Cyclasen durch G-Protein-Untereinheiten

Die sieben bis heute identifizierten Isoformen der Adenylat-Cyclase werden durch das G_{αs}-Protein und Forskolin aktiviert. Überraschenderweise sind dies und die Inhibierung der P-Bindungsstelle durch Adenosin-Analoga die einzigen gemeinsamen Regulationsmotive. Die Typ-I-Isoform wird auch durch Calmodulin aktiviert, während sie durch die βγ-Untereinheit stark inhibiert wird. Dies wurde zunächst auf eine Verdrängung von Calmodulin durch die βγ-Untereinheit zurückgeführt, doch wurde nach Reinigung der exprimierten Cyclase festgestellt, daß sie direkt mit der βγ-Untereinheit wechselwirkt^[142]. Die drei Isoformen der G_{αi}- sowie die beiden G_{αo}-Untereinheiten können ebenfalls Typ-I-Adenylat-Cyclase inhibieren; der Effekt ist allerdings schwächer im Vergleich zu dem der βγ-Untereinheit mit Calmodulin als Aktivator des Enzyms und verschwindet fast, wenn die Cyclase durch die G_{αs}-Untereinheit aktiviert wird^[105].

Die Adenylat-Cyclase vom Typ I ist bis heute die einzige beschriebene Isoform, die durch die βγ-Untereinheit inhibiert wird. Als wir andere Isoformen daraufhin untersuchten, stellten wir überraschenderweise fest, daß die Enzymaktivität der Isoformen II und IV stark durch die βγ-Untereinheit stimuliert wird^[131, 150]. Diese stimulierenden Wirkungen der βγ-Untereinheit hängen allerdings von einigen Voraussetzungen ab: Jede Untereinheit hat allein nur einen geringen oder keinen Einfluß auf die Adenylat-Cyclase-Aktivität; erst der Komplex stimuliert in Gegenwart der G_{αs}-Untereinheit die Enzymaktivität um das fünf- bis zehnfache. Für eine Stimulation der Isoformen II und IV muß die βγ-Untereinheit im Vergleich zur G_{αs}-Untereinheit in wesentlich höheren Konzentrationen eingesetzt werden. Wir nehmen daher an, daß wirksame Konzentrationen von beiden Aktivatoren nicht durch Dissoziation des G_s-Oligomers erreicht werden, sondern daß die βγ-Untereinheiten aus den G_i- oder G_o-Oligomeren stammen, die im Gehirn in hohen Konzentrationen vorkommen. Die Typ-II- und Typ-IV-Adenylat-Cyclasen sind demnach Moleküle, die eine gleichzeitige Aktivierung von zwei Regulationswegen durch ein eindeutiges Signal markieren. Mit den biochemischen Eigenschaften dieser Adenylat-Cyclasen können Phänomene, die 1975 von Rall et al. beschrieben wurden^[151], ausgezeichnet erklärt werden. Sie beobachteten eine bemerkenswert synergistische Stimulierung der Anreicherung von cAMP in Gehirnschnitten durch Paare von Neurotransmittern. Von diesen weiß man heute, daß sie an Stoffwechselwegen beteiligt sind, die durch G_s- und G_i-Proteine reguliert werden. Nimmt man an, daß die Typ-II-Adenylat-Cyclase durch die βγ-Untereinheit aktiviert wird, die wahrscheinlich aus dem G_i-Protein stammt, wäre es problematisch, wenn die G_{αi}-Untereinheit das Enzym inhibieren würde; dies ist glücklicherweise nicht der Fall.

Eine deutliche Inhibition von Adenylat-Cyclasen durch die G_{αi}-Untereinheit konnte erstmals bei den Isoformen V und VI

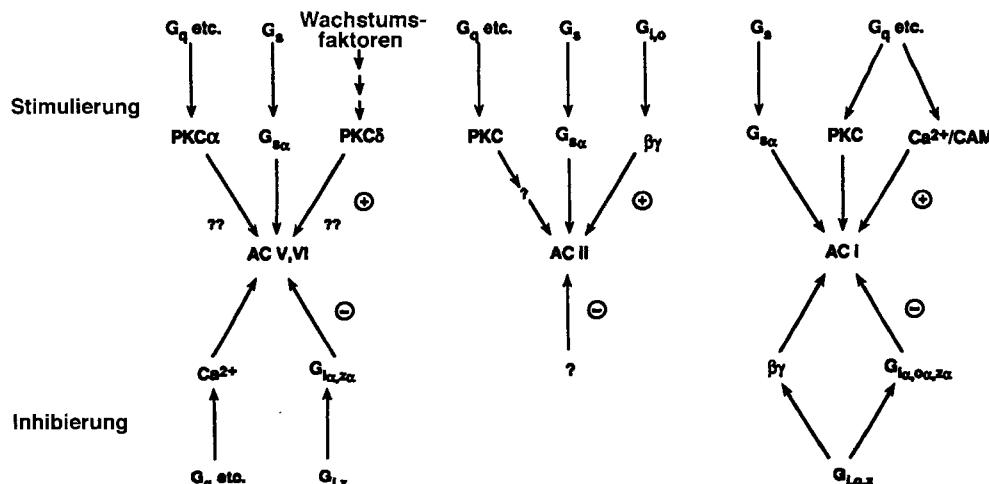


Abb. 13. Möglichkeiten, wie die Adenylat-Cyclase-Aktivität reguliert wird. PKC = Protein-Kinase C, CAM = Calmodulin, AC = Adenylat-Cyclase. Weitere Erklärungen im Text (mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [145]).

festgestellt werden^[75, 105]. Dabei hängt die Inhibition von der Verknüpfung dieser α -Untereinheiten mit Myristinsäure ab und erfordert hohe Proteinkonzentrationen im Bereich von nm bis μ M, die unserer Meinung nach noch vernünftig erscheinen. Die Typ-V- und Typ-VI-Adenylat-Cyclasen werden auf dem, wie man annahm, Standardweg – Aktivierung durch G_q-Untereinheiten und Inhibition durch G_i-Untereinheiten – reguliert. Aber auch diese Isoformen waren für Überraschungen gut: Sie werden durch Ca²⁺ in geringer Konzentration (μ M-Bereich) inhibiert.

Offensichtlich gibt es drei Arten der Regulation von Adenylat-Cyclasen in Säugetieren (Abb. 13). Alle Isoformen werden durch die G_q-Untereinheit aktiviert, woran zwei andere Unterklassen der G-Proteine, die G_i- und G_q-Proteine, direkt oder indirekt beteiligt sind. G_q-Proteine wirken über die Freisetzung von Ca²⁺, das allein, mit Calmodulin oder mit der Protein-Kinase C agiert. Durch G_i- und G_q-Proteine können jeweils in Verbindung mit der G_q-Untereinheit Adenylat-Cyclasen vom Typ II und wahrscheinlich auch solche vom Typ IV aktiviert werden. Darüber hinaus können diese G-Proteine einer Aktivierung entgegenwirken, wie es bei den Isoformen V und VI der Fall ist. Beim Typ-I-Enzym sind die Wirkungen der G_i- und G_q-Proteine antagonistisch. Die Untersuchungen, wie Adenylat-Cyclasen reguliert werden, befinden sich zwar noch im Anfangsstadium, doch ist bereits klar, daß diese Enzyme entstanden, um Signalübertragungswege miteinander zu verbinden und eine Kommunikation zwischen ihnen zu ermöglichen. Die Adenylat-Cyclasen sind Brennpunkte für das Zusammentreffen vieler Regulationsinformationen.

Zukünftige Wege in der Adenylat-Cyclase-Forschung

Adenylat-Cyclasen sind labile, intrinsische Membranproteine. Sie werden auch unter künstlichen Bedingungen nur in geringem Ausmaß exprimiert. Um ihre Strukturen und Regulationsmechanismen weiter untersuchen zu können, werden neue Methoden gebraucht. So versuchte Wei-Ju Tang eine lösliche Adenylat-Cyclase mit allen charakteristischen Regulatoreigenschaften zu erhalten, die in großen Mengen hergestellt und genetisch untersucht werden kann^[152]. Derzeit verfügen wir über

eine Chimäre der C_{1a}-Domäne aus Typ-I-Adenylat-Cyclase, die durch ein Verbindungsstück mit der C₂-Domäne aus dem Typ II verbunden ist. Das Molekül wird von *E. coli* produziert, wo es sich im Cytoplasma anreichert. Es wird, ausgehend von einer sehr niedrigen Grundaktivität, durch die G_q-Untereinheit und überraschenderweise durch Forskolin sehr stark aktiviert. *E. coli*-Stämme, denen Cyclasen fehlen, sind auf die Expression und die Aktivierung der Adenylat-Cyclase angewiesen, um auf einem maltosehaltigen Medium wachsen zu können. Daher scheint eine genetische Selektion von Mutanten mit aussagekräftigen Phänotypen möglich zu sein, ebenso eine Reinigung, eine genaue Charakterisierung und hoffentlich auch eine Strukturanalyse. Wir hoffen, daß wir durch diesen Ansatz bald in der Lage sein werden, diese wichtigen Proteine wirklich zu verstehen.

Warum G-Proteine?

Warum, so mag man sich fragen, sind G-Proteine an Signalübertragungswegen beteiligt? Warum sind die Strukturen der beteiligten Systeme so komplex? Signalübertragungen durch Membranen werden offensichtlich durch einfachere, allerdings normalerweise oligomere molekulare Assoziate erreicht, z.B. durch Tyrosin-Kinasen, durch Ionenkanäle, die durch die Bindung eines Liganden reguliert werden, und durch Rezeptoren der Guanylat-Cyclasen. Ich glaube, daß es mehrere Gründe dafür gibt, daß ein so komplexes Signalübertragungssystem entwickelt wurde. So ist mit molekularen Schaltern und Zeitschaltuhren eine enorme Signalverstärkung möglich. Ein einziger Agonist-Rezeptor-Komplex kann in der Zeit, in der eine α -Untereinheit im aktiven Zustand bleibt, die Aktivierung vieler G-Proteine katalysieren^[153]. Eine verzögerte Inaktivierung der α -Untereinheit führt zu einer weiteren Verstärkung auf der Stufe der katalytischen Effektmoleküle. Darüber hinaus könnten sehr komplexe Regulationsmechanismen vorliegen, durch die die Signalübertragung sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht gesteuert wird, indem die Synthese- und Abbau-Geschwindigkeiten von vielen Genprodukten beeinflußt werden. Eine spezifischere Regulation ist durch kovalente Modifizierungen dieser Proteine möglich. Am wichtigsten ist vielleicht, daß

wegen des Aufbaus dieser Signalsysteme aus drei Komponenten sehr viele unterschiedliche Antworten resultieren können. Jeder Schritt der durch G-Proteine regulierten Signalwege ist durch Konvergenz und Divergenz gekennzeichnet. So können ganz verschiedene Arten von Rezeptoren einen G-Protein-Typ aktivieren und ein Rezeptortyp kann mit mehreren G-Protein-Typen wechselwirken, was zu mehreren Ereignissen führt. Entsprechend können unterschiedliche G-Proteine die Aktivität eines Effektors additiv, synergistisch oder antagonistisch ändern und ein einzelnes G-Protein mit mehr als einem Effektor wechselwirken. G-Proteine können darüber hinaus über ihre α - oder $\beta\gamma$ -Untereinheiten Wirkungen ausüben. Die Komplexität der zellulären „Schalttafel“ scheint groß genug zu sein, daß jede Zelle ein eigenes maßgeschneidertes Signal-Repertoire durch Expression einer relativ geringen Zahl an Bausteinen aufbauen kann. Im Laufe des kommenden Jahrzehnts werden sicherlich alle Bausteine identifiziert werden. Damit werden wir verstehen können, wie die „Verdrahtung“ der Schalttafel für die Signalübertragung in jedem Zelltyp aussieht. Dieses Wissen wird zusammen mit immer raffinierteren Methoden zum Wirkstoffdesign und zur Untersuchung von großen chemischen Bibliotheken die Pharmakologie und die medizinische Therapie revolutionieren.

Mein Dank gilt meinem Vater, der meinen Hang zur Wissenschaft durch eigenes Beispiel förderte, sowie meinem Doktorvater und meinem Betreuer während der Postdoktorandenzeit: Theodore W. Rall, der eines Nobelpreises würdig gewesen wäre, und Marshall W. Nirenberg, der ihn verliehen bekam. Wesentliche Beiträge zur Forschung leistete auch jeder meiner Studenten und Postdoktoranden: David Berman, Gary Bokoch, Lawrence Brunton, Patrick Casey, Francoise Coussen, Carmen Dessauer, Alex Duncan, Kenneth Ferguson, Michael Freissmuth, Boning Gao, Michael Graziano, Tatsuya Haga, Emanuel Hanski, Bruce Harris, John Hepler, Tsutomu Higashijima, Allyn Howlett, Jorge Iñiguez-Lluhi, Hiroshi Itoh, Richard Kahn, Toshiaki Katada, Christiane Kleuss, Tohru Kozasa, John Krupinski, Ethan Lee, Hsin Chieh (Calvin) Lin, Maurine Linder, Michael Maguire, David Manning, Pamela Middleton, Susanne Mumby, John Northup, Bruce Posner, Lynn Quarmby, Andre Raw, Janet Robishaw, Elliott Ross, Leonard Schleifer, Joseph Schwarzmeier, Murray Smigel, Paul Sternweis, Roger Sunahara, Wei-Jen Tang, Ronald Taussig und Natsuo Ueda. Auch viele meiner fest angestellten Mitarbeiter wirkten entscheidend mit, darunter vor allem Pamela Sternweis und Wendy Deane. Weiterhin danke ich Susanne Mumby, Elliott Ross, Stephen Sprang und Paul Sternweis für ihre gute Zusammenarbeit. Seit 1972 wurde unsere Arbeit von den National Institutes of Health (zuerst durch das National Institute of Neurological Disorders and Stroke, danach durch das National Institute of General Medical Sciences) und seit 1977 auch von der American Cancer Society gefördert. Weitere Unterstützungen erhielten wir von Mr. und Mrs. Peter O'Donnell, vom Lucille P. Markey Charitable Trust, vom Raymond Willie Chair of Molecular Neuropharmacology, von der Perot Family Foundation, von der Meadows Foundation und von der Robert A. Welch Foundation.

Eingegangen am 16. Januar 1995 [A 102]
Übersetzt von Dr. Susanne Baade, Odenthal

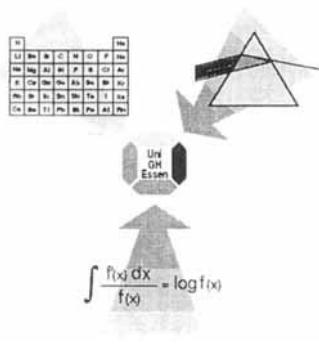
Stichworte: Adenylat-Cyclasen · G-Proteine · Nobel-Vortrag

- [1] T. W. Rall, E. W. Sutherland, J. Berhet, *J. Biol. Chem.* **1957**, *224*, 463–475.
- [2] F. Murad, Y.-M. Chi, T. W. Rall, E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 1233–1238.
- [3] T. W. Rall, E. W. Sutherland, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1961**, *26*, 347–354.
- [4] L. Birnbaumer, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 3477–3482.
- [5] L. E. Limbird, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 799–802.
- [6] T. Haga, K. Haga, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 5776–5782.
- [7] M. Rodbell, L. Birnbaumer, S. L. Pohl in *The Role of Adenyl Cyclase and Cyclic 3',5'-AMP in Biological Systems* (Hrsg.: T. W. Rall, M. Rodbell, P. Condliffe) (Fogarty Int. Cent. Proc. n4). National Institutes of Health, Bethesda, MD, **1969**, S. 59–76.
- [8] M. Rodbell, L. Birnbaumer, S. L. Pohl, H. M. J. Krans, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1877–1882.
- [9] K. H. Jakobs, K. Aktories, G. Schultz, *Arch. Pharm. (Weinheim Ger.)* **1979**, *310*, 113–119.
- [10] D. Cassel, Z. Selinger, *Biochem. Biophys. Acta* **1976**, *452*, 538–551.
- [11] C. Londos, Y. Salomon, M. C. Lin, J. P. Harwood, M. Schramm, J. Wolff, M. Rodbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 3087–3090.
- [12] M. Schramm, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 2232–2237.
- [13] M. E. Maguire, P. M. Van Arsdale, A. G. Gilman, *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 335–339.
- [14] E. J. Neer, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 6527–6531.
- [15] V. Daniel, G. Litwack, G. M. Tomkins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 76–79.
- [16] H. R. Bourne, P. Coffino, G. M. Tomkins, *Science* **1975**, *187*, 750–752.
- [17] P. A. Insel, M. Maguire, A. G. Gilman, H. R. Bourne, P. Coffino, K. L. Melmon, *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1062–1069.
- [18] T. Haga, E. M. Ross, H. J. Anderson, A. G. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 2016–2020.
- [19] E. M. Ross, A. G. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 3715–3719.
- [20] E. M. Ross, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 6966–6969.
- [21] E. M. Ross, A. C. Howlett, K. M. Ferguson, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6401–6412.
- [22] T. Pfeuffer, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 7224–7234.
- [23] A. C. Howlett, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 2861–2866.
- [24] J. K. Northup, P. C. Sternweis, M. D. Smigel, L. S. Schleifer, E. M. Ross, A. G. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 6516–6520.
- [25] P. C. Sternweis, J. K. Northup, M. D. Smigel, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11517–11526.
- [26] J. K. Northup, M. D. Smigel, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 11416–11423.
- [27] J. K. Northup, M. D. Smigel, P. C. Sternweis, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 11369–11376.
- [28] A. C. Howlett, P. C. Sternweis, B. A. Macik, P. M. Van Arsdale, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 2287–2295.
- [29] P. C. Sternweis, A. G. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 4888–4891.
- [30] D. M. Gill, R. Meren, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 3050–3054.
- [31] J. Moss, M. Vaughan, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 2455–2457.
- [32] H. R. Kaslow, Z. Farfel, G. L. Johnson, H. R. Bourne, *Mol. Pharmacol.* **1979**, *15*, 472–483.
- [33] L. S. Schleifer, R. A. Kahn, E. Hanski, J. K. Northup, P. C. Sternweis, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 20–23.
- [34] R. A. Kahn, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6228–6234.
- [35] R. A. Kahn, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7906–7911.
- [36] J. E. Rothman, *Nature (London)* **1994**, *372*, 55–63.
- [37] H. A. Brown, S. Gutowski, C. R. Moomaw, C. Slaughter, P. C. Sternweis, *Cell* **1993**, *75*, 1137–1144.
- [38] O. Hazeaki, M. Ui, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 2856–2862.
- [39] T. Katada, M. Ui, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7210–7216.
- [40] G. M. Bokoch, T. Katada, J. K. Northup, E. L. Hewlett, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 2072–2075.
- [41] G. M. Bokoch, T. Katada, J. K. Northup, M. Ui, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3560–3567.
- [42] T. Katada, G. M. Bokoch, J. K. Northup, M. Ui, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3568–3577.
- [43] T. Katada, J. K. Northup, G. M. Bokoch, M. Ui, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3578–3585.
- [44] T. Katada, G. M. Bokoch, M. D. Smigel, M. Ui, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3586–3595.
- [45] N. Miki, J. J. Keirns, F. R. Marcus, J. Freeman, M. W. Bitensky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 3820–3824.
- [46] G. L. Wheeler, M. W. Bitensky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 4238–4242.
- [47] H. Kuhn, *Nature (London)* **1980**, *283*, 587–589.
- [48] B. K.-K. Fung, J. B. Hurley, L. Stryer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 152–156.
- [49] D. R. Manning, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 7059–7063.

- [50] J. D. Hildebrandt, J. Codina, R. Risinger, L. Birnbaumer, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 2039–2042.
- [51] D. C. May, E. M. Ross, A. G. Gilman, M. D. Smigel, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 15829–15833.
- [52] P. C. Sternweis, J. D. Robishaw, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 13806–13813.
- [53] E. J. Neer, J. M. Lok, L. G. Wolf, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 14222–14229.
- [54] I. Litosch, C. Wallis, J. N. Fain, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 5464–5471.
- [55] S. Cockcroft, B. D. Gomperts, *Nature (London)* **1985**, *314*, 534–536.
- [56] J. B. Hurley, M. I. Simon, D. B. Teplow, J. D. Robishaw, A. G. Gilman, *Science* **1984**, *226*, 860–862.
- [57] M. A. Lochrie, J. B. Hurley, M. I. Simon, *Science* **1985**, *228*, 96–99.
- [58] K. Yatsunami, H. G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 4316–4320.
- [59] A. G. Gilman, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 615–649.
- [60] E. M. Ross, *Neuron* **1989**, *3*, 141–152.
- [61] A. M. Brown, L. Birnbaumer, *Annu. Rev. Physiol.* **1990**, *52*, 197–213.
- [62] H. R. Bourne, D. A. Snanders, F. McCormick, *Nature (London)* **1990**, *348*, 125–132.
- [63] H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, *Nature (London)* **1991**, *349*, 117–127.
- [64] H. G. Dohlman, J. Thorner, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 653–688.
- [65] Y. Kaziro, H. Itoh, T. Kozasa, M. Nakafuku, T. Satoh, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 349–400.
- [66] M. I. Simon, M. P. Strathmann, N. Gautam, *Science* **1991**, *252*, 802–808.
- [67] A. M. Spiegel, P. S. Backlund, Jr., J. E. Butrynski, T. L. Z. Jones, W. F. Simonds, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 338–341.
- [68] J. R. Hepler, A. G. Gilman, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 383–387.
- [69] D. E. Clapham, E. J. Neer, *Nature (London)* **1993**, *365*, 403–406.
- [70] J. Iñiguez-Lluhi, C. Kleuss, A. G. Gilman, *Trends Cell Biol.* **1993**, *3*, 230–236.
- [71] J. E. Buss, S. M. Mumby, P. J. Casey, A. G. Gilman, B. M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7493–7497.
- [72] S. M. Mumby, R. O. Heuckeroth, J. I. Gordon, A. G. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 728–732.
- [73] T. L. Z. Jones, W. F. Simonds, J. J. Merendino, Jr., M. R. Brann, A. M. Spiegel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 568–572.
- [74] M. E. Linder, I.-H. Pang, R. J. Duronio, J. I. Gordon, P. C. Sternweis, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4654–4659.
- [75] R. Taussig, J. Iñiguez-Lluhi, A. G. Gilman, *Science* **1993**, *261*, 218–221.
- [76] M. E. Linder, P. Middleton, J. R. Hepler, R. Taussig, A. G. Gilman, S. M. Mumby, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3675–3679.
- [77] S. M. Mumby, C. Kleuss, A. G. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2800–2804.
- [78] P. B. Wedegaertner, H. R. Bourne, *Cell* **1994**, *77*, 1063–1070.
- [79] Y. Fukada, T. Takao, H. Ohguro, T. Yoshizawa, T. Akino, Y. Shimonishi, *Nature (London)* **1990**, *346*, 658–660.
- [80] H. K. Yamane, C. C. Farnsworth, H. Xie, W. Howald, B. K.-K. Fung, S. Clarke, M. H. Gelb, J. A. Glomset, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5868–5872.
- [81] S. M. Mumby, P. J. Casey, A. G. Gilman, S. Gutowski, P. C. Sternweis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5873–5877.
- [82] J. A. Iñiguez-Lluhi, M. I. Simon, J. D. Robishaw, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 23409–23417.
- [83] M. P. Graziano, M. Freissmuth, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 409–418.
- [84] C. Van Dop, M. Tsubokawa, H. R. Bourne, J. Ramachandran, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 696–698.
- [85] R. E. West, Jr., J. Moss, M. Vaughan, T. Liu, T.-Y. Liu, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14428–14430.
- [86] J. P. Noel, H. E. Hamm, P. B. Sigler, *Nature (London)* **1993**, *366*, 654–663.
- [87] D. G. Lambright, J. P. Noel, H. E. Hamm, P. B. Sigler, *Nature (London)* **1994**, *369*, 621–628.
- [88] D. E. Coleman, A. M. Berghuis, E. Lee, M. E. Linder, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Science* **1994**, *265*, 1405–1412.
- [89] J. Bigay, P. Deterre, C. Pfister, M. Chabre, *FEBS Lett.* **1985**, *191*, 181–185.
- [90] T. Higashijima, M. P. Graziano, H. Suga, M. Kainosh, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 3396–3401.
- [91] M. P. Graziano, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 15475–15482.
- [92] C. A. Landis, S. B. Masters, A. Spada, A. M. Pace, H. R. Bourne, L. Vallar, *Nature (London)* **1989**, *340*, 692–696.
- [93] M. Freissmuth, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21907–21914.
- [94] S. B. Masters, R. T. Miller, M.-H. Chi, F.-H. Chang, B. Beiderman, N. G. Lopez, H. R. Bourne, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 15467–15474.
- [95] M. Mixon, D. E. Coleman, A. M. Berghuis, E. Lee, A. G. Gilman, S. R. Sprang, **1994**, unveröffentlicht.
- [96] S. Coulter, M. Rodbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5842–5846.
- [97] J. D. Robishaw, M. D. Smigel, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 9587–9590.
- [98] P. Bray, A. Carter, C. Simons, V. Guo, C. Puckett, J. Kamholz, A. Spiegel, M. Nirenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8893–8897.
- [99] T. Kozasa, H. Itoh, T. Tsukamoto, Y. Kaziro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 2081–2085.
- [100] D. T. Jones, R. R. Reed, *Science* **1989**, *244*, 790–795.
- [101] A. Yatani, J. Codina, Y. Imoto, J. P. Reeves, L. Birnbaumer, A. M. Brown, *Science* **1987**, *238*, 1288–1292.
- [102] B. Schubert, A. M. J. VanDongen, G. E. Kirsch, A. M. Brown, *Science* **1989**, *245*, 516–519.
- [103] C. L. Lerea, D. E. Somers, J. B. Hurley, I. B. Klock, A. H. Bunt-Milam, *Science* **1986**, *234*, 77–80.
- [104] S. K. McLaughlin, P. J. McKinnon, R. F. Margolskee, *Nature (London)* **1992**, *357*, 563–569.
- [105] R. Taussig, W.-J. Tang, J. R. Hepler, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 6093–6100.
- [106] J. Codina, A. Yatani, D. Grenet, A. M. Brown, L. Birnbaumer, *Science* **1987**, *236*, 442–444.
- [107] D. E. Logothetis, Y. Kurachi, J. Galper, E. J. Neer, D. E. Clapham, *Nature (London)* **1987**, *325*, 321–326.
- [108] J. L. Stow, J. B. de Almeida, N. Narula, E. J. Holtzman, L. Ercolani, D. A. Ausiello, *J. Cell. Biol.* **1991**, *114*, 1113–1124.
- [109] J. G. Donaldson, R. A. Kahn, J. Lippincott-Schwartz, R. D. Klausner, *Science* **1991**, *254*, 1197–1199.
- [110] N. T. Ktistakis, M. E. Linder, M. G. Roth, *Nature (London)* **1992**, *356*, 344–346.
- [111] Y. H. Wong, B. R. Conklin, H. R. Bourne, *Science* **1992**, *255*, 339–341.
- [112] T. Kozasa, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1734–1741.
- [113] P. J. Casey, H. K. W. Fong, M. I. Simon, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 2383–2390.
- [114] J. Hescheler, W. Rosenthal, W. Trautwein, G. Schultz, *Nature (London)* **1987**, *325*, 445–447.
- [115] S. M. Strittmatter, D. Valenzuela, T. E. Kennedy, E. J. Neer, M. C. Fishman, *Nature (London)* **1990**, *344*, 836–841.
- [116] S. M. Strittmatter, D. Valenzuela, Y. Sudo, M. E. Linder, M. C. Fishman, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 22465–22471.
- [117] M. Strathmann, T. M. Wilkie, M. I. Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7407–7409.
- [118] S. J. Taylor, J. A. Smith, J. H. Exton, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17150–17156.
- [119] G. L. Waldo, J. L. Boyer, A. J. Morris, T. K. Harden, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14217–14225.
- [120] A. V. Smrcka, J. R. Hepler, K. O. Brown, P. C. Sternweis, *Science* **1991**, *251*, 804–807.
- [121] G. Bernstein, J. L. Blank, D. Y. Jhon, J. H. Exton, S. G. Rhee, E. M. Ross, *Cell* **1992**, *70*, 411–418.
- [122] S. Parks, E. Wieschaus, *Cell* **1991**, *64*, 447–458.
- [123] A. M. L. Chan, T. P. Fleming, E. S. McGovern, M. Chedid, T. Miki, S. A. Aaronson, *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 762–768.
- [124] N. Z. Xu, L. Bradley, I. Ambdukar, J. S. Gutkind, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6741–6745.
- [125] T. Higashijima, K. M. Ferguson, P. C. Sternweis, M. D. Smigel, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 762–766.
- [126] R. A. Cerione, C. Staniszewski, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, J. Codina, L. Birnbaumer, *Nature (London)* **1985**, *318*, 293–295.
- [127] A. G. Gilman, *Cell* **1984**, *36*, 577–579.
- [128] V. A. Florio, P. C. Sternweis, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3477–3483.
- [129] C. Dietzel, J. Kurjan, *Cell* **1987**, *50*, 1001–1010.
- [130] W.-J. Tang, J. Krupinski, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 8595–8603.
- [131] W.-J. Tang, A. G. Gilman, *Science* **1991**, *254*, 1500–1503.
- [132] R. Taussig, L. M. Quarimby, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 9–12.
- [133] M. Camps, C. Hou, D. Sidiropoulos, J. B. Stock, K. H. Jakobs, P. Gierschik, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *206*, 821–831.
- [134] M. Camps, A. Carozzi, P. Schnabel, A. Scheer, P. J. Parker, P. Gierschik, *Nature (London)* **1992**, *360*, 684–686.
- [135] N. Ueda, J. A. Iñiguez-Lluhi, E. Lee, A. V. Smrcka, J. D. Robshaw, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 4388–4395.
- [136] O. Kisselov, N. Gautam, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24519–24522.
- [137] C. Kleuss, J. Hescheler, C. Ewel, W. Rosenthal, G. Schultz, B. Wittig, *Nature (London)* **1991**, *353*, 43–48.
- [138] C. Kleuss, H. Scherubl, J. Hescheler, G. Schultz, B. Wittig, *Nature (London)* **1992**, *358*, 424–426.
- [139] C. Kleuss, H. Scherubl, J. Hescheler, G. Schultz, B. Wittig, *Science* **1993**, *259*, 832–834.
- [140] T. Pfeuffer, H. Metzger, *FEBS Lett.* **1982**, *146*, 369–375.
- [141] M. D. Smigel, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1976–1982.

- [142] J. Krupinski, F. Coussen, H. A. Bakalyar, W.-J. Tang, P. G. Feinstein, K. Orth, C. Slaughter, R. R. Reed, A. G. Gilman, *Science* **1989**, *244*, 1558–1564.
- [143] W.-J. Tang, A. G. Gilman, *Cell* **1992**, *70*, 869–872.
- [144] R. Iyengar, *FASEB J.* **1993**, *7*, 768–775.
- [145] R. Taussig, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1–4.
- [146] T. Kataoka, D. Brock, M. Wigler, *Cell* **1985**, *43*, 493–505.
- [147] T. Toda, I. Uno, T. Ishikawa, S. Powers, T. Kataoka, D. Brock, S. Cameron, J. Broach, K. Matsumoto, M. Wigler, *Cell* **1985**, *40*, 27–36.
- [148] M. Nakane, K. Arai, S. Saheki, T. Kuno, W. Buechler, F. Murad, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 16841–16845.
- [149] M. Chinkers, E. M. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18589–18597.
- [150] B. Gao, A. G. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10178–10182.
- [151] A. Sattin, T. W. Rall, J. Zanella, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1975**, *192*, 22–32.
- [152] W.-J. Tang, A. G. Gilman, *Science*, im Druck.
- [153] D. R. Brandt, E. M. Ross, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1656–1664.
- [154] M. E. Linder, A. G. Gilman, *Sci. Am.* **1992**, *267*(1), 56–65.

Interdisziplinäres Symposium für junge Wissenschaftler in Essen 29.09. - 01.10.95



In Essen wird zum zweitenmal eine Tagung mit Beiträgen junger Naturwissenschaftler stattfinden. Dieses interdisziplinäre Symposium bietet Möglichkeiten zur Entwicklung und zur Diskussion spezieller Arbeitsgebiete in der Chemie und Physik. Diese und künftige Veranstaltungen sollen die Teilnehmer zum Meinungsaustausch anregen, um so ein tieferes interdisziplinäres Zusammenwirken zu fördern. Als Teilnehmerkreis der Veranstaltungsreihe sind junge Wissenschaftler aus der Bundesrepublik angesprochen, die kurz vor Beendigung ihrer Promotion stehen, post-docs, Habilitanten oder Habilitierte sind.

Der 2. Workshop der Tagungsreihe hat das Thema:

Das Studium von Oberflächenprozessen in Chemie und Physik.

Dazu sind Diskussionsbeiträge zu den folgenden Themenkreisen vorgesehen:

- Stöchiometrische und katalytische Prozesse an Festkörperoberflächen
- Spektroskopie und Abbildung von Festkörperoberflächen
- Korrosionsprobleme an Oberflächen
- Strukturierung von Oberflächen im Nanobereich

Weitere Informationen sowie Anmeldung von Beiträgen zur Veranstaltung:

Priv.-Doz. Dr. J.J. Schneider und Dr. U. Simon · Institut für Anorganische Chemie der Universität/GH-Essen
Universitätsstraße 5-7 · 45117 Essen · Tel. (0201) 183-2413/23 98 · Fax (0201) 183-2402/2417