

Signaltransduktion: Die Entwicklung einer Idee (Nobel-Vortrag)**

Martin Rodbell*

In general there is no set of observations conceivable which can give enough information about the past of a system to give complete information as to its future.

Norbert Wiener

Think simplicity; then discard it.

Alfred North Whitehead

Einleitung

Ich wurde 1925 geboren, in einer Zeit, als es noch keinen Tonfilm gab und das Radio zu einem populären Medium wurde. Wichtige Nachrichten wurden durch Zeitungen verbreitet, und Bibliotheken dienten der Unterhaltung und der Weiterbildung. Wir wohnten über dem Lebensmittelgeschäft meines Vaters, das nicht nur für Leute aus der unmittelbaren Nachbarschaft ein Treffpunkt war, wo man einkaufte und den neuesten Klatsch auszutauschen pflegte. Wir kannten oder wußten alles über jeden, der in unserer Nachbarschaft wohnte. In der Geborgenheit dieser Gemeinschaft bin ich aufgewachsen. Viel später erst wurde mir bewußt, wie wichtig diese Gemeinschaft mit ihren intensiven zwischenmenschlichen Beziehungen für meine Entwicklung als Wissenschaftler war. In meiner wissenschaftlichen Umgebung sind kulturelle und sprachliche Unterschiede nahtlos zu einer Einheit verschmolzen, wodurch die Kommunikation gefördert, Wissen zielgerecht erweitert und Ideen hervorgebracht werden. In einer solchen Gemeinschaft entstehen und wachsen synergistische Wechselwirkungen zwischen der Natur, die wir häufig mit unserer genetischen Veranlagung gleichsetzen, und der Prägung durch unsere Umgebung. Diese Wechselwirkungen geben dem Leben einen Sinn; d. h. die Frage, was zuerst da war, das Huhn oder das Ei, ist in biologischem Sinne nicht relevant.

Mein Vortrag, der mein Interesse für Wechselwirkungen auf gesellschaftlicher und auf zellulärer Ebene verdeutlichen soll, handelt von dem umfassenden Thema der biologischen Kommunikation. Die erste Hälfte beschäftigt sich mit der Entwicklung des Konzeptes der Transduktoren und deren Rolle in der zellulären Signalübertragung. Da dieses Konzept sich noch in

der Entwicklung befindet, möchte ich im zweiten Teil eine Hypothese vorstellen, die in ihrer einfachsten Form folgendes besagt: Biologische Kommunikation setzt ein komplexes Netzwerk aus G-Proteinen, Oberflächenrezeptoren, der extrazellulären Matrix und dem Cytoskelett innerhalb der Zelle voraus, die in einer zielgerichteten Gemeinschaft vereint sind und für deren Beschreibung mein Leben und das meiner Kollegen als Metapher dienen kann.

Rezeptoren, Allosterie und die Theorie der sekundären Botenstoffe

Das Konzept der Rezeptoren als Sensorelemente auf zellulärer Ebene hat eine lange Geschichte. Bereits Anfang dieses Jahrhunderts erkannte Paul Ehrlich die Bedeutung der Oberflächenrezeptoren und postulierte eine Schlüssel-Schloß-Theorie für die Beschreibung ihrer Wechselwirkungen mit Antigenen und Pharmaka. Heute ist allgemein bekannt, daß Rezeptoren Proteine sind, die wegen ihres Aufbaus und der Formbarkeit ihrer Strukturen zwischen einer außerordentlichen Vielfalt chemischer Signale unterscheiden können. Mein Interesse an Rezeptoren erwachte in den frühen sechziger Jahren, als es mir gelungen war, Adipocyten mit Kollagenase aus ihrem Gewebeverband herauszulösen, und festgestellt hatte, daß Insulin in physiologischen Konzentrationen die Glucoseaufnahme dieser Zellen stimuliert^[1]. Auf der Suche nach dem Angriffspunkt für das Hormon testete ich die Wirkung von Phospholipasen und Proteasen auf Adipocyten. Wenn die Zelloberfläche oder die Plasmamembran Insulinrezeptoren enthält, dann sollte die Wirkung des Insulins durch enzymatische Verdauung unterbunden werden können. Überraschenderweise haben jedoch Phospholipasen die gleiche Wirkung auf die Glucoseverwertung und die Proteinbiosynthese wie Insulin^[2, 3]. Auf der Grundlage dieser Befunde postulierte ich, daß Insulin seine Wirkung über die Stimulierung von Phospholipasen entfaltet^[4]. Unter Berücksichtigung der zahlreichen Hinweise auf die Bedeutung der Phospholipasen für die Vermittlung von Hormonwirkungen^[5] lag ich mit dieser Annahme gar nicht so falsch.

Im Laufe der sechziger Jahre wurde meine Hormonrezeptorforschung hauptsächlich durch zwei Theorien beeinflusst. Eine davon war die Theorie der sekundären Botenstoffe^[6, 7], wonach die Wirkung extrazellulärer oder primärer Botenstoffe (Hormone, Neurotransmitter) durch Rezeptoren vermittelt wird, die die Synthese von Adenosin-3',5'-monophosphat (cyclisches AMP, cAMP) steuern. cAMP wurde als intrazellulärer Botenstoff be-

[*] Prof. M. Rodbell
National Institute of Environmental Health Sciences
Building 18-01
P.O. Box 12333
Research Triangle Park, NC 27709 (USA)
Telefax: Int. +919/541-0669

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

trachtet, der die Hormonwirkung auf sämtliche am Zellstoffwechsel, -wachstum und -differenzierung beteiligten Prozesse überträgt. Die so prägnante Theorie der allosterischen Regulation von Monod et al.^[8] stimmte ausgezeichnet mit der Theorie von Sutherland überein, wonach Rezeptoren bezüglich Struktur und Funktion mit der Regulation der cAMP-Synthese verknüpft sind. Von geradezu überwältigender Überzeugungskraft war die Vorstellung, daß die Adenylat-Cyclase einer allosterischen Regulation unterliegt und zwei unterschiedliche Bindungsstellen enthält – eine für die Rezeptorbindung und eine katalytische. Die asymmetrische Lage dieser beiden Stellen auf der Oberfläche oder Plasmamembran der Zelle – die allosterisch regulierbare Hormonbindungsstelle an der Außenseite und die ATP-umsetzende katalytische Stelle an der Innenseite der Membran – war ein sinnvoller Ansatz für die Erforschung der molekularen Grundlagen der Hormonwirkung. Mein Forschungsinteresse verlagerte sich nun vom Insulin auf die damals bekannten Hormone, die die Produktion von cAMP in Adipocyten stimulieren.

Das Multirezeptor-Adenylat-Cyclase-System von Adipocyten

Zu diesem Zeitpunkt stand für die Bestimmung der cAMP-Synthesegeschwindigkeit nur ein komplizierter, zeitaufwendiger Bioassay zur Verfügung. Krishna^[9] und später Salomon^[10] entwickelten relativ einfache chromatographische Assays, mit denen erstmals schnelle Parallelbestimmungen der Aktivität von Adenylat-Cyclase möglich wurden. Lutz Birnbaumer, ein außerordentlich begabter Mitarbeiter, der 1967 in meine Arbeitsgruppe kam, beherrschte diese Assays meisterlich, so daß bald Ergebnisse erhalten wurden, die die Grundlage für die Entwicklung des Transduktorkonzeptes bildeten. In der Zeit vor Birnbaumers Ankunft hatte ich eine Schnellmethode für die Isolierung von Adipocytenmembranen („Geister“ genannt) entwickelt, die nicht nur auf Insulin ansprachen, sondern auch auf einige Hormone, die die cAMP-Produktion und die resul-

tierende Lipolyse in Fettzellen stimulieren^[11]. Zu diesen Hormonen gehörten Adrenalin, das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), das thyreostimulierende Hormon (TSH), das luteinisierende Hormon (LH) und Sekretin sowie Glucagon und Fluorid-Ionen. Frühere Experimente^[6] hatten gezeigt, daß Fluorid die Adenylat-Cyclase in Membranen unterschiedlicher Zellen stimuliert. Die Mg^{2+} -abhängige Aktivierung des Adipocytensystems durch F^- war durch einen Hill-Koeffizienten von 2.0 charakterisiert, was darauf hindeutete, daß die Magnesium-Ionen ihre Wirkung an mindestens zwei unterschiedlichen Stellen des Systems entfalteten. Eine davon war sicherlich ein Mg-ATP-Komplex in der katalytischen Bindungsstelle der Adenylat-Cyclase. Daß es eine Regulatorstelle für Magnesium-Ionen gibt, ließ sich daraus ableiten, daß sowohl ACTH als auch Fluorid die für die Enzymaktivierung notwendige Mg^{2+} -Konzentration wesentlich herabsetzen^[12]. Die komplizierte Kinetik der ATP-Wirkung konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht interpretiert werden. Da wir nicht ahnten, daß ATP mit GTP verunreinigt war, waren wir nicht in der Lage, die Befunde zu deuten, die sich später mit der aktivierenden und inhibierenden Wirkung von GTP auf Adenylat-Cyclase zufriedenstellend erklären ließen. Heute ist mir die Lektion klar: Versuche nie, eine Hyperbel zu interpretieren; sie beschreibt das Verhalten des gesamten Universums!

Nachweis von unterschiedlichen Hormonrezeptoren

Wir verwendeten viel Energie und Zeit darauf, die Hormonrezeptoren des Cyclase-Systems zu untersuchen. Zur Pharmakologie der Peptidhormonrezeptoren war kaum etwas bekannt. Durch indirekte Verfahren, wie die Messung der Wirkung von Proteasen und inhibitorischen Analoga sowie die Bestimmung von Ionenabhängigkeiten, stellte man fest, daß jedes Hormon die Cyclase durch einen eigenen Rezeptortyp aktiviert. Da sich sowohl das Enzym als auch der Rezeptor in derselben Zelle befinden, sollte entschieden werden können, ob alle Hormone ihre Wirkung über das gleiche Enzym entfalten oder es, wie im



Martin Rodbell wurde 1925 in Baltimore, MD (USA), geboren. Er studierte dort Biologie und Chemie an der Johns Hopkins University und promovierte 1954 bei Prof. Hanahan an der University of Washington in Seattle über die Biosynthese von Lecithin. Nach einem Postdoktorandaufenthalt an der University of Illinois in Urbana, wo er sich mit der Biosynthese von Chloramphenicol beschäftigte, ging er an das National Heart Institute, Bethesda, MD, zu Dr. Anfinsen und untersuchte dort Lipoproteine. 1960 wurde er Mitglied in Prof. Jean Brachets Arbeitsgruppe an der Freien Universität Brüssel, Belgien, und wechselte anschließend zu Dr. Peter Gaillard, Leiden, Niederlande. Im Laboratory of Nutrition and Endocrinology am Institute of Arthritis and Metabolic Diseases in Bethesda, MD, untersuchte er Lipoprotein-Lipasen und die Wirkung von Insulin auf die Glucoseverwertung bei Fettzellen. Mitte der sechziger Jahre wurde sein Forschungsinteresse durch Earl Sutherland auf dessen Theorie des sekundären Botenstoffes und die Bedeutung von cyclischem AMP gelenkt. Zusammen mit Lutz Birnbaumer entwickelte er in den folgenden Jahren das Konzept der Transduktoren und das Prinzip der Signaltransduktion. Sein wichtigstes Forschungsinteresse galt 1967–1968 den

Wirkungen von Hormonen auf den Ionen- und Aminosäuretransport in Fettzellen. Er war stellvertretender Leiter des Institut de Biochimie Clinique in Genf und Professor für Biochemie an der dortigen Universität (1981–1983), wo er sich mit der Struktur und der Funktion von Glucagon beschäftigte.

Sutherland-Modell, für jeden Hormonrezeptortyp ein eigenes Cyclase-System gibt. Dazu wurden die Hormone in maximalen oder niedrigeren Konzentrationen getestet, jeweils einzeln oder kombiniert. Bei einigen Kombinationen waren Synergieeffekte zu beobachten, aber – und das war besonders bedeutsam – die Wirkungen bei maximaler Hormonkonzentration verhielten sich nicht additiv^[13]. Dies wurde zur gleichen Zeit auch von einer anderen Gruppe festgestellt^[14]. Zwar stand ein endgültiger Beweis noch aus, doch hielten wir es für sehr wahrscheinlich, daß das Cyclase-System von Fettzellen mehrere Rezeptoren enthält, die mit einer gemeinsamen katalytischen Einheit wechselwirken. Daraus ergab sich folgendes Bild: Alle Rezeptoren haben neben spezifischen Bindungsstellen für ihre Liganden ein gemeinsames Strukturelement, das mit der katalytischen Komponente der Cyclase wechselwirken und die Bildung von cAMP aus MgATP stimulieren kann. Zu diesem Zeitpunkt gingen wir davon aus, daß die katalytische Komponente Angriffspunkt sowohl für die Regulation durch Magnesium- als auch für die durch Fluorid-Ionen ist. Zusätzlich schienen an den Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und katalytischer Einheit Lipide beteiligt zu sein, denn anders als bei der Fluoridwirkung war die Hormonwirkung äußerst empfindlich gegenüber Verbindungen, die die Membranstruktur verändern (Phospholipasen, Detergentien)^[15]. Es war nun klar, daß die Hormone ihre Wirkung über ein hinsichtlich Struktur und Regulation sehr viel komplexeres Enzymsystem entfalteten als ursprünglich angenommen. Für mich war es schwer vorstellbar, daß mehrere Hormonrezeptoren mit dem gleichen Enzym strukturell gekoppelt sind (ich pflegte dieses Problem mit der Redewendung „zu viele Engel auf einem Stecknadelkopf“ zu umschreiben). Demzufolge mußte ein neues Konzept für die Hormonwirkung entworfen werden.

Informationsverarbeitung: das Konzept der Transduktion

Die Informationsverarbeitungstheorie von Norbert Wiener^[16], dem Begründer der Kybernetik, beeinflusste damals erheblich meine Vorstellung von der Übermittlung eines hormonellen Signals durch die Zellmembran und der Umsetzung des Signals. In die Thematik eingeführt wurde ich von Oskar Hechter, der bereits mehrere wichtige theoretische Beiträge zur Hormonwirkung geliefert hatte. Er war der erste, der in Frage stellte, daß Hormone direkt auf die Adenylat-Cyclase wirken^[17]. Am Vorabend einer Zusammenkunft, die ich zu Ehren Sutherlands an den NIH organisiert hatte, war diese Problematik Gegenstand einer ausführlichen Diskussion zwischen Hechter und mir in einer Hotelbar in Washington, D.C. Sie brachte uns schließlich zu dem Konzept der Transduktion als Bindeglied zwischen der Aktivierung des Rezeptors durch ein Signal und der Regulation der Adenylat-Cyclase. Wegen des doch recht spärlichen Wissens, das wir zu jenem Zeitpunkt hatten, kleideten wir das Konzept der Informationsverarbeitung in abstrakte kybernetische Begriffe: ein Diskriminator, der den Rezeptor repräsentiert, ein Transduktor und ein Verstärker als Beschreibung der Adenylat-Cyclase, da deren Aktivierung einen deutlichen Anstieg der cAMP-Produktion bewirkt. Der Transduktor spielt die Rolle des Vermittlers für die Kommunikation zwischen Diskriminator und Verstärker. Ich stellte diese Idee auf der Zu-

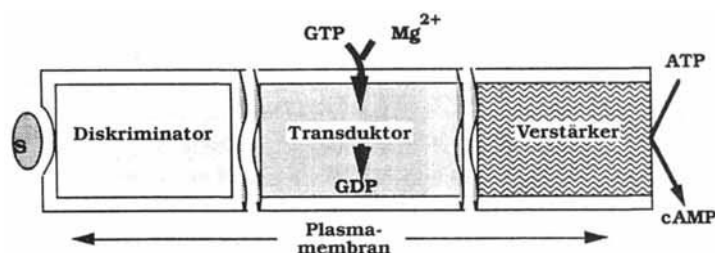


Abb. 1. Kybernetische Beschreibung der Signaltransduktion. S = Signal

sammenkunft vor. Das Konzept (damals noch ohne Berücksichtigung einer Beteiligung von Mg^{2+} und GTP) ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Zwar zogen wir die Möglichkeit in Betracht, daß Magnesium-Ionen und Lipide am Transduktionsprozeß beteiligt sind, aber die Festigung unseres Konzeptes bedurfte weiterer Befunde zu den Beziehungen zwischen Rezeptor und Enzym hinsichtlich ihrer Strukturen und Funktionen.

Die Wirkungen von GTP und Glucagon auf die Adenylat-Cyclase der Leber

Da das Studium des Multirezeptor-Adenylat-Cyclase-Systems an Rattenadipocyten aus experimenteller Sicht sehr komplex war, wandten meine Kollegen Birnbaumer, Pohl sowie Krans und ich unsere Aufmerksamkeit der glucagonabhängigen Adenylat-Cyclase der Leber zu. Dieser Wechsel lag teilweise in der historischen Bedeutung dieses Systems für die Hormonwirkung begründet. Außerdem hatte David Neville^[18] an den NIH unlängst eine relativ einfache Methode zur Reinigung von Plasmamembranen aus Rattenleber veröffentlicht. Durch die Verwendung von ^{125}I -markiertem Glucagon wurde es uns möglich, sowohl die Beschaffenheit des Glucagonrezeptors als auch die Beziehung zwischen Hormonbindung und hormoneller Aktivierung der Adenylat-Cyclase zu untersuchen.

Michiel Krans begann seine Untersuchungen der Glucagonbindung mit dem auf unseren Ergebnissen basierenden Wissen, daß die hormonelle Aktivierung der Adenylat-Cyclase in Leberzellmembranen innerhalb von Sekunden ansteigt und sehr rasch wieder abnimmt, sobald das Hormon durch einen Antagonisten wie Des-His-Glucagon verdrängt wird. Später stellte sich heraus, daß Des-His-Glucagon ein schwacher partieller Agonist ist. Wir erwarteten, daß ^{125}I -markiertes Glucagon sehr schnell (innerhalb von Sekunden) gebunden und problemlos durch Waschen der Membran mit hormonfreiem Medium wieder abgespalten werden würde. Statt dessen beobachtete Krans, daß das Glucagon extrem langsam gebunden und eine Sättigung erst nach mindestens 20 Minuten erreicht wird. Das gebundene Material konnte auch durch gründliches Waschen unter unterschiedlichen Bedingungen nicht wieder entfernt werden. Keine der dabei erhaltenen Bindungscharakteristiken entsprach der Kinetik der Hormonwirkung. Das Medium, in dem die Bindung durchgeführt wurde, enthielt allerdings nur Salz und Puffer, während das Medium für den Cyclase-Assay mehrere Komponenten, einschließlich des Substrates MgATP, enthielt. Durch den Zusatz aller Komponenten des Cyclase-Assays zum Hormonbindungsmedium wurde die Bindungscharakteristik dramatisch verändert: Der Anteil an gebundenem Hormon im

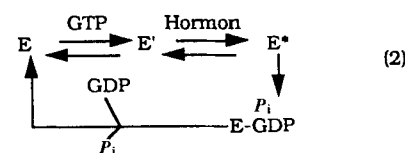
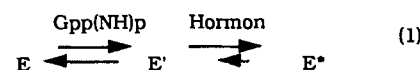
Fließgleichgewicht ging drastisch zurück, und der Sättigungszustand wurde innerhalb von Sekunden erreicht. Später stellten wir fest, daß das verwendete ATP der Hauptübeltäter war. Aus leidvollen Erfahrungen als Doktorand war mir bekannt, daß käufliches ATP normalerweise mit anderen Nucleotiden verunreinigt ist. Also testete ich einige Purin- und Pyrimidinnucleotide. Nur GTP, GDP und ITP wiesen die gleiche Wirkung wie ATP auf. Dabei war entscheidend, daß die Guanin-Nucleotide in viel niedrigeren Konzentrationen (zwei bis drei Größenordnungen) wirksam waren als ATP. GppCp, ein schwer hydrolysierbares Analogon, war ebenfalls, allerdings erst in viel höheren Konzentrationen im Vergleich zu denen von GTP oder GDP wirksam. Jedes der Nucleotide verursachte eine schnelle Freisetzung des gebundenen Glucagons vom Rezeptor. Wir stellten somit fest, daß die Wirkung der Guanin-Nucleotide auf einer Herabsetzung der Rezeptoraffinität für das Hormon beruht^[19].

Nun stellte sich folgende, zentrale Frage: Gibt es eine Beziehung zwischen der Wirkung von GTP auf die Hormonbindung und der von Glucagon auf die Aktivität der Adenylat-Cyclase? Um auszuschließen, daß das Ergebnis des Enzymaktivitätstests durch Spuren von GTP beeinflußt wird, setzten wir biosynthetisch erhaltenes [³²P]App(NH)p als Substrat ein. Dieses Analogon wird von membranständigen ATPasen nicht abgebaut. Unter diesen Bedingungen wurde die Adenylat-Cyclase durch Glucagon nicht stimuliert – es sei denn, GTP wurde in etwa der gleichen Konzentration zugesetzt, wie es für die Herabsetzung der Rezeptoraffinität nötig war^[20]. Michael Lin und Yoram Salomon^[21] zeigten daraufhin, daß das Enzym von dem Hormon + GTP sehr schnell in seine aktive Form überführt wird. Darüber hinaus verminderte Glucagon die kleine Aktivierungsverzögerung, die auftrat, wenn allein das Nucleotid eingesetzt wurde. Die Würfel waren gefallen: Es war nun klar, daß GTP zusammen mit Magnesium-Ionen am Signaltransduktionsprozeß beteiligt ist (Abb. 1). Zwar waren die einzelnen Komponenten des Informationsverarbeitungssystems noch nicht bekannt, doch bestand für uns so gut wie kein Zweifel mehr daran, daß ein Transduktor existiert, der als entscheidender Bestandteil dieses Systems die Informationsübertragung vom Rezeptor zum Enzym vermittelt.

GTP-Hydrolyse

Da GTP sehr leicht von membranständigen Nucleotidasen hydrolysiert wird, war unser nächstes Ziel, GTP durch ein nicht hydrolysierbares Derivat zu ersetzen. Wir griffen auf unsere Erfahrung mit App(NH)p zurück und synthetisierten Gpp(NH)p. Einige Monate später beobachteten wir, daß die Enzymaktivität durch Gpp(NH)p in einem Ausmaß angehoben wurde, wie es nicht einmal durch Fluorid erreicht werden konnte. Zu unserer großen Überraschung war bei der unter normalen Umständen sehr instabilen Cyclase auch nach drei Tagen bei Raumtemperatur noch kein Aktivitätsverlust zu verzeichnen. Anschließend untersuchten wir die Wirkung von Gpp(NH)p auf einige Cyclase-Systeme und setzten dafür jede Zellmembranpräparation ein, die uns zur Verfügung stand. Es war jedesmal das gleiche Phänomen zu beobachten^[22]. Anders als bei der konzentrierten Wirkung von Hormon und GTP aktivierte Gpp(NH)p das Enzym nach einer sehr langen Verzögerung, die durch Zu-

satz des Hormons beträchtlich verkürzt wurde^[21]. Yoram Salomon untersuchte das Bindungsverhalten von [³²P]Gpp(NH)p an Leberzellmembranen und fand, daß eine spezifische Bindung des Guanin-Nucleotids in einem weit höheren Maß stattfand als von der Zahl der Glucagonrezeptoren her erwartet werden konnte^[23]. Diese scheinbare Diskrepanz führte dazu, daß Salomons Ergebnisse von anderen Forschern in ihrer Bedeutung unterschätzt wurden. Schließlich war zu dem Zeitpunkt noch nicht bekannt, daß es mehrere Arten von Glucagonrezeptoren gibt, die mit unterschiedlichen GTP-bindenden Proteinen wechselwirken. Zu dieser Erkenntnis sollte man erst beinahe zehn Jahre später gelangen. Die Ergebnisse führten allerdings zu folgender Aussage über die Schlüsselemente der Signaltransduktion: Gpp(NH)p bindet an Leberzellmembranen auch in Abwesenheit des Hormons, während Glucagon die Aktivierung der Adenylat-Cyclase durch das Nucleotid beschleunigt, und nicht umgekehrt. Auf der Grundlage dieser Erkenntnis und eines Modells für die Kinetik von Gpp(NH)p/Mg^[24] wurde ein Drei-Zustands-Modell für die Hormonwirkung entwickelt, wonach die Adenylat-Cyclase durch Bindung des Nucleotids aus dem Grundzustand E in den Zustand E' überführt wird und Hormone die Umwandlung von E' in den aktivierten Zustand E* fördern [Gl. (1)].



Da dieses Modell jedoch 21 Parameter und nur zwei Variable (Mg²⁺- und Gpp(NH)p-Konzentration) aufweist, war uns bewußt, daß es nur eine grobe Näherung für ein in der Realität sehr viel komplizierteres System liefern konnte.

Etwa zur gleichen Zeit zeigte Michael Schramm durch elegant ausgeführte Experimente, daß die Wirkung von Gpp(NH)p pseudo-irreversibel ist, d.h., die hohe Cyclaseaktivität blieb auch nach Entfernung des Nucleotids aus dem inkubierten Medium erhalten^[25]. Zusammen mit dem Befund, daß GTP allein das Enzym nicht aktivieren kann, schlossen wir daraus, daß der Transduktor in der Lage sein muß, GTP zu hydrolysieren. Wurde in das Modell zur Kinetik des Lebersystems GTP statt Gpp(NH)p eingesetzt [Gl. (2)], ergaben die Daten, daß der aktivierte Zustand E* der Zustand ist, in dem GTP zu GDP und P_i gespalten wird. In diesem Licht war verständlich, wieso die Aktivierung durch GTP und Hormon im wesentlichen ohne Verzögerung ablief, während die Aktivierung durch Gpp(NH)p und Hormon mit einer kürzeren, aber anhaltenden Verzögerung eintrat. Der GTP-Umsatz ist in diesem Modell eine grundlegende Voraussetzung für die schnelle und reversible Wirkung des Hormons. Einige Jahre später lieferten Cassel und Selinger mit einer Reihe brillanter Experimente den endgültigen Beweis dafür, daß Hormone die Hydrolyse von GTP zu GDP und P_i stimulieren. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse entwickelten sie eine

Theorie, derzufolge die Hydrolyse von GTP zu GDP als „Abschaltreaktion“ dient und das resultierende gebundene GDP den Transduktor in seinen Inhibitorzustand versetzt^[26]. Hormone fördern die Verdrängung von GDP und seinen Austausch gegen GTP; diese Austauschreaktion ist wesentlich für die hormonelle Aktivierung von G-Proteinen. Der Nucleotidaustausch und die GTP-Hydrolyse sind von grundlegender Bedeutung für die Regulation aller Typen von G-Proteinen, die bislang untersucht worden sind. In dieser Theorie blieb allerdings unberücksichtigt, daß der Gesamtumsatz von GTP eine komplexe Reaktionsfolge umfaßt, einschließlich Hydrolyse und nachfolgender Freisetzung des Phosphates aus einem gebundenen Zustand. Die Ergebnisse einer detaillierten Untersuchung des lichtaktivierbaren Rhodopsinsystems^[27] wiesen darauf hin, daß die Hydrolyse von GTP äußerst schnell abläuft. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist somit die Freisetzung des anorganischen Phosphates von seiner Bindungsstelle an Transducin, dem G-Protein, das die Phosphodiesterase im äußeren Stäbchenbereich aktiviert. Zu dieser Vorstellung paßt auch die langanhaltende Aktivierung durch Fluorid (als Komplex mit Al^{3+} oder Mg^{2+}). Dessen Wirkung beruht sehr wahrscheinlich darauf, daß es an die Magnesiumphosphat-Bindungsstellen an Transducin gebunden wird.

Stimulierende und inhibierende Wirkungen von GTP und Fluorid

Das Multirezeptor-Adipocyten-System war nicht nur für die Untersuchung der vielen Hormonwirkungen von unschätzbarem Wert. Es ermöglichte außerdem einen ersten Einblick in die komplexe Regulation der Adenylat-Cyclase, die unter Beteiligung von GTP und Fluorid durch zwei voneinander unabhängigen Prozesse sowohl inhibiert als auch aktiviert wird. Hans Löw und Jim Harwood stellten fest, daß Fluorid und sowohl GTP als auch Gpp(NH)p in höheren Konzentrationen das Enzym stimulieren und inhibieren können^[28, 29]. Der Mechanismus dieser Wirkungen blieb ungeklärt, bis Hirohei Yamamura^[30] herausfand, daß sich die Eigenschaften der Aktivierungs- und die der Inhibitionsphase deutlich unterscheiden. Eine Charakterisierung dieses dualen Prozesses^[31] und die Entdeckung^[32], daß die Adipocyten Adenosinrezeptoren enthalten, die die Hemmung der Adenylat-Cyclase nur unter Beteiligung von GTP induzieren, führten zu der Erkenntnis, daß die inhibierende Wirkung der Guanin-Nucleotide ebenso wichtig ist wie die stimulierende. Auf der Grundlage dieser Studien entstand ein neues Konzept für die duale Regulation der Adenylat-Cyclase durch Hormone, Guanin-Nucleotide und Fluorid-Ionen^[33]. Es beruhte auf der Voraussetzung, daß für eine Transduktion, die sowohl zur Aktivierung als auch zur Inhibierung führen kann, unterschiedliche GTP-bindende Proteine nötig waren. Wir nannten sie Nucleotid-Regulatorproteine, N, denn ITP wies die gleiche Wirkung auf. So entstand die N_s/N_i -Nomenklatur, die heute allgemein als G_s/G_i -Nomenklatur bekannt ist. Als logische Konsequenz dieser Ergebnisse müssen G-Proteine sowohl vom Rezeptor als auch von der Adenylat-Cyclase unabhängig sein. Pfeuffer isolierte ein 42-kDa-Protein, das er durch Inkubation von Membranen mit [^{32}P]NAD und Cholera-Toxin radioaktiv markieren konnte^[34, 35]. Er lieferte damit den ersten handfesten Beweis für

die Existenz des cyclasestimulierenden Transduktors G_s . Schon seit längerer Zeit war bekannt, daß Cholera-Toxin – vermutlich durch Aktivierung des Adenylat-Cyclase-Systems – die cAMP-Produktion in Darmzellen erhöht^[36]. Später wurden durch Untersuchungen mit dem Pertussis(Keuchhusten)-Toxin^[37] G_i - und G_o -Proteine entdeckt und gereinigt. In der Zwischenzeit war von Gordon Tompkins et al. entdeckt worden, daß die Behandlung kultivierter Lymphomzellen (Ratte S49) mit cAMP zu deren Zelltod führt^[38]. Mehrere überlebende Mutanten wurden isoliert. Bei einer davon ließ sich das Enzym durch Gpp(NH)p und Fluorid-Ionen nicht mehr stimulieren; Adrenalin war ebenfalls wirkungslos^[39]. Mit der mutanten Zelllinie AC⁻ (die Bezeichnung entstammt der irrümlichen Annahme, daß die Zellen keine Adenylat-Cyclase enthalten) wiesen Gilman et al.^[40, 41] daraufhin nach, daß durch Zusatz von Wildtyp-Zellextrakten sowohl die GTP-abhängige Hormonwirkung als auch die Wirkung von Gpp(NH)p und Fluorid-Ionen wiederhergestellt werden konnte. Dieser Test war sehr nützlich für die erste Reinigung des G/F-Faktors, eines Adenylat-Cyclase-stimulierenden Proteins, das heute unter dem Namen G_s bekannt ist.

Unsere damaligen Studien^[42, 43] ergaben, daß die physikalischen und kinetischen Eigenschaften von Hormonrezeptoren, die G_s -Proteine gebunden hatten, sich sehr von denen der mit dem G_s -Protein verknüpften, aktivierten Adenylat-Cyclase unterschieden. Dies ließ auf unterschiedliche Stadien oder unterschiedliche Formen des durch GTP regulierten Prozesses schließen. Entscheidend war schließlich die Entdeckung von Bitensky et al.^[44], daß die Lichtaktivierung einer cGMP-Phosphodiesterase im äußeren Stäbchenbereich durch einen Guanin-Nucleotid-abhängigen Prozeß vermittelt wird, der der Wirkung von Guanin-Nucleotiden auf Adenylat-Cyclase sehr ähnelt. 1980 war endgültig geklärt, daß die Wirkungen von Guanin-Nucleotiden nicht auf Adenylat-Cyclasen beschränkt waren. In einer kurzen Zusammenfassung^[33] postulierte ich die Existenz mehrerer Typen von GTP-bindenden Proteinen, die ich mit N_s , N_i , N_t (Transducin) und N_x bezeichnete und von denen ich annahm, daß sie die Hormonwirkung auf mehrere Effektorsysteme übertragen. Der Vorschlag für die Existenz von N_x folgte aus der Entdeckung, daß GTP die Bindung von Agonisten an Rezeptoren beeinflusst, die die Calciumaufnahme in Leberzellen modulieren^[45]. Etwa zehn Jahre später waren diese Vorhersagen mit Beweisen untermauert. Die Zahl und die Vielfalt der an der Signaltransduktion beteiligten GTP-bindenden Proteine sind allerdings größer, als ich mir vorgestellt hatte.

Allgemeine Eigenschaften der Guanin-Nucleotid-Wirkung

In den siebziger Jahren wurden einige der grundlegenden Eigenschaften von Rezeptoren aufgezeigt, die mit GTP-bindenden Proteinen verknüpft sind. Die Arbeiten aus den folgenden 20 Jahren lieferten eine genaue Beschreibung der unterschiedlichen Typen von G-Proteinen, von denen heute etwa 20 bekannt sind. Am Beispiel von Transducin^[46] wurde erstmals gezeigt, daß G-Proteine aus drei Untereinheiten bestehen: einer α -Untereinheit, die GTP binden und hydrolysieren kann, und einem Komplex aus den fest miteinander verknüpften β - und γ -Untereinheiten. Diese Entdeckung, deren Gültigkeit für alle an Rezeptoren

gekoppelte G-Proteine inzwischen erwiesen ist^[47], eröffnete ein neues Kapitel in der Geschichte der Signaltransduktion und trug während der letzten Jahre entscheidend zur Erklärung der pleiotropen Wirkungen von Hormonen bei.

Ein Großteil der Arbeiten über die Struktur der G-Proteine wird von Dr. Gilman vorgestellt werden^[*], einschließlich der neueren Kristallstrukturanalysen von G_s. Daher werde ich mich im folgenden einem Thema zuwenden, das während der letzten 15 Jahre Schwerpunkt meiner Forschung war.

Die Topographie der Komponenten der Signaltransduktionskette

Zu den schwierigsten Problemen der Membranbiologie gehören die Aufklärung der Organisation und der Anordnung der einzelnen Komponenten in der Membran sowie die Bestimmung der topographischen Beziehungen zwischen Membranproteinen und extra- sowie intrazellulären Komponenten. Das Konzept des „mobilen Rezeptors“ baut auf der Vorstellung auf, daß Rezeptorproteine sich innerhalb der Membran mit hoher Geschwindigkeit frei bewegen können. Auf die mit G-Proteinen gekoppelten Rezeptoren angewendet, führte dieses Konzept zu der Hypothese, daß Hormone wirken, indem sie die Verknüpfung zwischen Rezeptoren und G-Proteinen stimulieren. Das „Kollisions-Kopplungs“-Modell^[48] bringt den Grad der Cyclase-Aktivierung in direkten Zusammenhang mit Häufigkeit und Effizienz der Zusammenstöße zwischen dem durch den Agonisten aktivierten Rezeptor und dem G-Protein. Wegen der uneingeschränkten Beweglichkeit aller Komponenten kann so jeder Rezeptor mehrere G-Proteine aktivieren. Das Maß der Aktivierung der G-Proteine (und damit der Adenylat-Cyclase) ist der Zahl der durch Agonisten aktivierten Rezeptoren direkt proportional.

Zwar erhält man durch kinetische Untersuchungen wichtige Einblicke in den Mechanismus der Aktivierung, doch ist entscheidend, wie die Komponenten aufgebaut und in der Membran verteilt sind, um mit der beobachteten Effizienz und Geschwindigkeit wechselwirken zu können. Die Zahl der Begegnungen wird offensichtlich um so größer, je mehr Rezeptoren die Membran enthält. Das wird am Beispiel des Rhodopsins deutlich, das in Stäbchen und Zäpfchen in einer weit größeren Menge vorkommt als G-Proteine und Effektoren. Die Konzentration der Hormonrezeptoren ist in den meisten Zellen jedoch relativ niedrig. Das brachte mich auf den Gedanken, daß zwischen Rezeptor und G-Protein eine Vorkopplung bestehen könnte, die durch das Hormon verändert wird. Später wurden diese Vorstellungen durch biophysikalische Studien bestätigt, die ergaben, daß Rezeptoren durch G-Proteine komplexiert werden und sich diese Komplexe innerhalb von matrixähnlichen, speziellen Membranbereichen befinden^[49]. In der Tat scheinen die an rezeptorvermittelten Signaltransduktionsprozessen beteiligten Verbindungen etwas Buddhahafes zu haben, sowohl wegen ihrer Ortsfestigkeit als auch wegen ihres Aufbaus aus mehreren Komponenten, die miteinander flackerartig wechselwirken, und darüber hinaus besonders wegen der Ähnlichkeit ihrer Wechselwirkungen zur flüchtigen Beziehung zwischen Aktion und Ruhe, zwischen Leben und Tod.

Gegen Ende der siebziger Jahre beschäftigte sich meine Arbeitsgruppe vorrangig mit der Strukturaufklärung von hormonabhängigen Cyclase-Systemen in ihrer nativen Membranumgebung. Damals erfuhr ich, daß die Wechselwirkungen zwischen den Komponenten des glucagonabhängigen Systems in Leberzellmembranen durch Target-Analyse (Inaktivierung des Enzyms durch Bestrahlung) untersucht worden waren^[50], deren Ergebnisse mit der Theorie des mobilen Rezeptors interpretiert wurden. Für diese Studien war gefriergetrocknetes Material eingesetzt worden. Uns war jedoch bekannt, daß die hormonelle Regulation der Adenylat-Cyclase, beispielsweise in Leberzellmembranen, durch Gefriertrocknung erheblich beeinträchtigt wird. Daher entschlossen wir uns, beim Einsatz dieser Methode auf die Gefriertrocknung zu verzichten.

Glücklicherweise arbeitete im Stockwerk über unserem Labor ein Wissenschaftler, Ellis Kempner, der sich in seiner Doktorarbeit über die Target-Analyse einschlägige Kenntnisse angeeignet hatte und sich mit den Stärken und Schwächen dieser Methode bestens auskannte. Er begann, sich für unser Problem zu interessieren. Etwa zur gleichen Zeit kam Werner Schlegel, ein junger Biophysiker aus der Schweiz, in unsere Arbeitsgruppe. Zusammen starteten die beiden Wissenschaftler ein Projekt, das sich während der letzten 15 Jahre zum Brennpunkt unserer Forschung entwickelte.

Target-Analyse

Schlegel und Kempner gelang schließlich die Entwicklung einer Methode, bei der die Enzymaktivität nicht beeinträchtigt wird. Das Ergebnis ihrer Arbeit war die erste genaue Beschreibung der „funktionellen Struktur“ jeder Komponente des glucagonabhängigen Systems in Leberzellmembranen und der hormonabhängigen, stimulierenden und inhibierenden Verbindungen in Rattenadipocyten^[51, 52]. Ich betone den Begriff „funktionelle Struktur“, denn die durchgeführte Analyse beruht auf der Bestimmung des exponentiellen Aktivitätsabfalls in Abhängigkeit von der Energie, die dem System durch Elektronenbeschuß zugeführt wird. Dieser Zusammenhang liefert die „funktionelle Masse“. Wie von Kempner zusammengefaßt^[53], führt der Beschuß komplexer Multikomponenten-Enzymsysteme nicht zur Zerstörung der Komplexe, sondern verursacht Brüche im Proteinrückgrat jeder Kette des Komplexes. Die resultierende Aktivitätsabnahme spiegelt genau den Verlust an funktioneller Masse wider.

Der Elektronenbeschuß sowohl von Leberzell- als auch von Adipocytenmembranen vor der Inkubation mit regulatorisch wirksamen Liganden – Hormonen, Fluorid-Ionen, Guanin-Nucleotiden – lieferte ein sehr überraschendes und anfangs verwirrendes Ergebnis: eine funktionelle Masse von etwa 1500 kDa beim stimulierenden Prozeß unter Beteiligung von Glucagon und GTP sowie eine noch größere funktionelle Masse bei der Adenosinrezeptor-vermittelten Inhibierung in Adipocyten. Diese hohen Werte stimmten in keiner Weise mit den für Rezeptoren, G-Proteinen und Adenylat-Cyclase abgeschätzten Werten überein. Wurden die Membranen vor dem Elektronenbeschuß mit aktivierenden Liganden inkubiert, waren die funktionellen Massen deutlich kleiner. Beispielsweise betrug die funktionelle Masse in Gegenwart von Glucagon und GTP etwa 350 kDa

[*] Siehe vorangehenden Nobel-Vortrag von A. G. Gilman.

und in Gegenwart von Fluorid-Ionen oder Gpp(NH)p etwa 250 kDa. Mit MnATP als Substrat wurde für die Adenylat-Cyclase eine Masse von etwa 120 kDa bestimmt. Dieser Wert wurde inzwischen durch Klonierung der Cyclasen bestätigt.

Die Desaggregationstheorie für die Wirkungsweise von Hormonen + GTP

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse postulierten wir einen Aufbau des hormonabhängigen Cyclase-Systems als oligomeren Komplex aus Rezeptoren und G-Proteinen, der nach Wechselwirkung mit einem Hormon und GTP in den Rezeptor und die G-Protein-Monomere dissoziiert^[33]. Vor allen Dingen zog ich aus der Target-Analyse den Schluß, daß die Hormonwirkung zunächst in ein Proteinsignal umgesetzt wird und daß dieses Protein auf jeden Fall eine Bindungsstelle für GTP aufweist. Ohne zu wissen, daß G-Proteine Heterotrimer sind, schätzten wir die Masse des Monomers – korrigiert um die Masse der Cyclase – auf 120 (nach Aktivierung durch Fluorid oder Gpp(NH)p) bis 220 kDa (nach Glucagon-Behandlung). Die geschätzten Werte nach Fluorid- oder Gpp(NH)p-Behandlung waren viel höher als die Masse von G_{sz} (43–50 kDa). Den noch höheren Wert nach Glucagon-Behandlung schrieb ich der Bildung eines Rezeptor- G_s -Protein-Monomer-Komplexes zu. Dieser wird als der eigentliche „Bote“ der Hormonwirkung betrachtet, der die Adenylat-Cyclase aktiviert (durch G_s) oder hemmt (durch G_i). Diese Theorie bezeichnete ich als „Desaggregationstheorie für die Hormonwirkung“^[33]. Sie beinhaltet die grundlegenden Annahmen, daß der Rezeptor-G-Protein-Komplex als Multimer vorliegt, daß die Adenylat-Cyclase mit diesem Komplex nicht in Verbindung steht und daß durch den Zerfall des Multimers Monomere freigesetzt werden, die die Signalübertragung vom hormone gebundenen Rezeptor-G-Protein-Komplex auf den Effektor oder das Enzym vermitteln.

Als ich dieses Modell aufstellte, ging ich davon aus, daß Rezeptoren und G-Proteine in etwa gleichen Mengen vorliegen und stöchiometrisch verknüpft sind. Erst sehr viel später, als für die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen von Rezeptoren und G-Proteinen genaue Methoden zur Verfügung standen, wurde deutlich, daß in den meisten Zellen G-Proteine und Rezeptoren etwa im Verhältnis 10:1 vorkommen. Unser Modell wurde daraufhin modifiziert, indem der größte Teil der Masse der glucagonabhängigen Adenylat-Cyclase (oder des adenosinabhängigen inhibierenden Systems in Adipocyten) den G-Proteinen zugeschrieben wurde. G-Proteine lagen demnach multimer vor.

Die Desaggregationstheorie fiel bald darauf in Ungnade, als gezeigt wurde, daß G-Protein-Heterotrimer durch Behandlung mit Gpp(NH)p oder dem später gebräuchlichen GTP γ S in freie α -Untereinheiten und $\beta\gamma$ -Komplexe dissoziieren^[54, 55]. So entstand 1988 die Dissoziationstheorie von Gilman. Die Desaggregationstheorie mußte nun mit einem biochemischen Beweis für die Existenz von G-Protein-Multimeren untermauert werden. Dazu begaben wir uns auf eine Odyssee, an deren Beginn zwei Ansätze standen: Vernetzungsstudien mit Synaptoneurosomen aus Rattenhirn sowie die Extraktion von G-Proteinen mit Detergentien und nachfolgende Analyse der hydrodynamischen Eigenschaften des extrahierten Materials im Saccharosegradienten.

Vernetzungsstudien

Wir wählten Synaptoneurosommembranen für die meisten Untersuchungen, da Hirngewebe einen Großteil der bekannten G-Protein-Typen enthält. Bei unserer Studie wurden wir von mehreren auf demselben Gebiet tätigen Kollegen (besonders von Dr. Alan Spiegel an den NIH) großzügig unterstützt, die uns polyklonale Antikörper gegen Peptidsequenzen der α - und β -Untereinheit einiger G-Protein-Typen (G_s , G_i , G_o und G_q) und weiterer Subtypen zur Verfügung stellten.

Wir testeten unterschiedliche Vernetzungsreagentien auf ihre Wirksamkeit und Selektivität bei niedrigen Konzentrationen. *N,N'*-(1,4-Phenyl)dimaleinimid (1,4-Dimaleinimidobenzol) erwies sich als am besten geeignet. Neben allen untersuchten G-Proteinen waren polymeres Tubulin und F-Actin die einzigen membranassoziierten Proteine mit einer meßbaren Vernetzung^[56]. Nach der Vernetzung wurden die G-Proteine mit Natriumdodecylsulfat aus ihrer Membran herausgelöst und durch Gelfiltrations-Chromatographie nach ihrer Größe getrennt. So stellten wir fest, daß sowohl die α - als auch die β -Untereinheiten von G_s -, G_i -, G_o - und G_q -Proteinen zu Multimeren vernetzt waren, deren Größe der von vernetztem Tubulin oder Actin entspricht. Wir schlossen daraus, daß G-Proteine, vermutlich in ihrer intakten heterotrimeren Form, als membranassoziierte Multimere vorliegen. Diese Ergebnisse stützten die Grundaussagen unserer Desaggregationstheorie in hohem Maße. Vor allen Dingen schienen die G-Protein-Multimere für die bei der Target-Analyse beobachteten hohen Massen im Grundzustand verantwortlich zu sein.

Detergensstudien

Die G-Protein-Multimere mußten nun isoliert werden. Zu ihrer Solubilisierung waren zunächst geeignete Detergentien notwendig. Mit Natriumcholat und mit Lubrol ließen sich zwar intakte Heterotrimer, d. h. die Monomere der mutmaßlichen Multimere, extrahieren^[57], aber diese Detergentien zerstörten möglicherweise die Multimere. Wir testeten also eine Reihe von Detergentien und bestimmten jeweils die Größen der extrahierten G-Proteine durch Messung ihrer hydrodynamischen Eigenschaften im Saccharosegradienten. Mit drei der sieben getesteten Detergentien, mit Octyl- β -glucosid (OG), Tween 20 und Digitonin, ließen sich Multimere extrahieren, die nach ihrem hydrodynamischen Verhalten größer waren als die durch Extraktion mit Cholat oder Lubrol erhaltenen Monomere^[58]; bei diesem Ergebnis wurde die Micellenbildung durch das Detergens berücksichtigt. Die Extraktion von Leberzellmembranen mit OG ergab heterodispers gelöste Teilchen, von denen sich etwa 10% im Saccharosegradienten sedimentieren ließen, während der Hauptanteil in Lösung blieb. Wurden die Membranen in Gegenwart von [³²P]NAD (zur spezifischen Markierung von G_{sz}) mit Cholera-Toxin behandelt, reichernte sich das markierte Material hauptsächlich in der unlöslichen Fraktion an^[59, 60]. Ein großer Teil davon wurde löslich und wies im Saccharosegradienten ein ähnliches Verhalten wie gereinigtes heterotrimeres G_s -Protein auf, wenn die Membranen nach der Markierung in Gegenwart einer geringen Konzentration von GTP γ S mit Glucagon inkubiert wurden.

Aus den Vernetzungsstudien und den hydrodynamischen Experimenten ergaben sich folgende Schlußfolgerungen: G_s liegt in Leberzell- und in Synaptoneurosommembranen vermutlich als Multimer vor; nur Multimere werden in Leberzellmembranen durch Glucagon und geringe Konzentrationen von $GTP\gamma S$ verändert; eine der unmittelbaren Wirkungen von Glucagon und $GTP\gamma S$ ist der Zerfall der Multimere in Monomere, wie durch die Desaggregationstheorie vorhergesagt. Hohe Konzentrationen von $GTP\gamma S$ verursachten in Synaptoneurosomen nur dann eine Dissoziation der heterotrimeren G-Proteine in freie α -Untereinheiten und $\beta\gamma$ -Komplexe, wenn die Solubilisierung mit Natriumcholat oder Lubrol durchgeführt wurde. Mit Digitonin war dieser Effekt nicht zu beobachten^[58]. Das bestätigte unsere Befürchtung, daß Detergentien, mit denen heterotrimere G-Proteine gereinigt werden können, die native multimere Form dieser Proteine zerstören.

Eine erweiterte Desaggregationstheorie für die Hormonwirkung

Die Target-Analyse lieferte den ersten Impuls zur Entwicklung der Desaggregationstheorie. Um jedoch der Tatsache Rechnung zu tragen, daß G-Proteine den Hauptanteil der hohen funktionellen Masse ausmachen, d. h., daß sie als Multimere vorliegen, mußte die ursprüngliche Theorie modifiziert werden. Wir hatten außerdem festgestellt, daß die Regulation der G-Proteine durch die mit diesen verknüpften Rezeptoren sich deutlich von der Regulation der Adenylat-Cyclase durch G-Proteine unterscheidet^[42, 43]. Auf der Grundlage der beschriebenen Strukturen und Regulatoreigenschaften der Adenylat-Cyclase^[61] sowie besonders der Tatsache, daß es sich hierbei um Transmembranproteine mit einer Zwei-Cassetten-Struktur handelt (einer Struktur mit zwei unterschiedlichen Domänen auf 12 membran-durchspannenden Segmenten), konnte eine schlüssigere Theorie für die Regulation der Cyclase aufgestellt werden^[62]. In Abbildung 2 sind zwei Regulationscyclen dargestellt: Cyclus A für die Regulation der G-Proteine und der Bildung der Monomere aus dem Polymer und Cyclus B für die Regulation der Cyclase durch ein monomeres G-Protein (G_s).

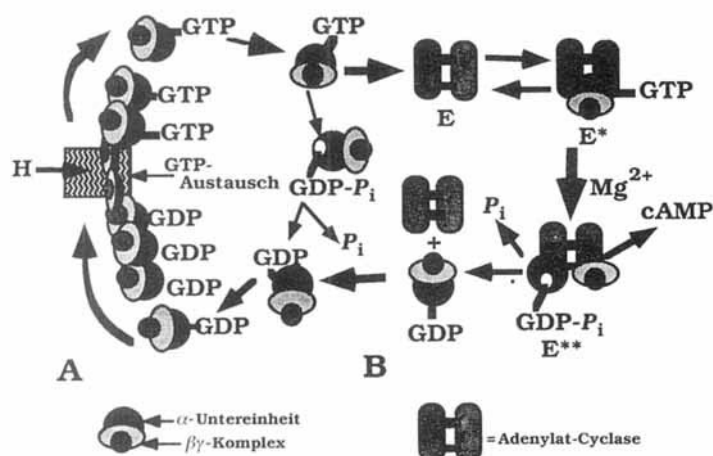


Abb. 2. Regulationscyclen der Signaltransduktion. A) Rezeptorvermittelte Aktivierung der G-Proteine. B) G_s -vermittelte Aktivierung der Adenylat-Cyclase. H = Hormon. E = Enzym (Adenylat-Cyclase), E^* = Enzym-G-Protein-GTP-Komplex, E^{**} = Enzym-G-Protein-GDP- P_i -Komplex.

Das Entlanggleiten des Rezeptors an der G-Protein-Multimer-Kette wird durch den hormoninduzierten Austausch von GTP und GDP gesteuert: An einem Ende des Multimers wird ein mit GTP besetztes Monomer frei, um entweder mit der Cyclase in Wechselwirkung zu treten oder um sich, nach Hydrolyse von GTP zu GDP, am anderen Ende des Multimers wieder anzulagern. Im Cyclus B wechselwirkt das mit GTP besetzte Monomer mit dem Enzym E, ohne notwendigerweise eine signifikante Änderung der Enzymaktivität zu verursachen (E^*). Die Aktivität wird durch die Mg^{2+} -abhängige Hydrolyse von gebundenem GTP zu GDP und P_i gesteuert. Dieser Theorie zufolge induziert die Hydrolyse die Dissoziation der α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex; die daraus resultierenden getrennten Untereinheiten wechselwirken jede für sich mit den beiden Cassetten oder Domänen der Adenylat-Cyclase (E^{**}). In Abhängigkeit vom Typ der mit dem G-Protein assoziierten Cyclase kann ihre Aktivität durch drei Mechanismen gesteuert werden: ausschließlich durch die α_s -Untereinheit, synergistisch durch eine Kombination der α_s - und der $\beta\gamma$ -Untereinheit oder durch eine Hemmung der von der α_s -Untereinheit bewirkten Aktivierung durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Wird P_i von seiner Bindungsstelle an der α_s -Untereinheit freigesetzt, treten die α_s - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit wieder zusammen. Das mit GDP besetzte G_s -Protein lagert sich wieder an das Multimer an und tritt erneut in den hormone-gesteuerten Cyclus ein. Es muß betont werden, daß beide Cyclen an der Plasmamembran ablaufen. Diese Theorie unterscheidet sich in einem wesentlichen Punkt von anderen Theorien zur hormonellen Regulation von Cyclasen: Für die Trennung der α_s - von der $\beta\gamma$ -Untereinheit ist das Zusammenwirken von Enzym, Mg^{2+} und GTPase erforderlich. Das Maß und die Dauer der Enzymaktivierung werden unabhängig voneinander von den getrennten Untereinheiten sowie der GTP-Hydrolysegeschwindigkeit, d. h. von der Freisetzung von P_i kontrolliert.

Viele Kollegen werden das Argument anführen, daß die Hydrolyse für die Aktivierung nicht notwendig sei, da auch nicht-hydrolysierbare GTP-Analoga die Cyclase ebenso stark stimulieren können. Meiner Meinung nach könnte jedoch die allosterische Regulation durch $Gpp(NH)p$, ein langsamer Hysterese-prozeß, die Mg^{2+} -induzierte Dissoziation von G_s stabilisieren, die normalerweise nur kurzzeitig vorliegen. Dieser Prozeß verläuft ohne Mitwirkung der Adenylat-Cyclase bei der Dissoziation. In diesem Sinne haben die nichthydrolysierbaren Analoga von GTP vermutlich viele zu der Annahme verleitet, daß die Hydrolyseenergie von GTP für die Signaltransduktion nicht erforderlich sei.

Im Zusammenhang mit dieser erweiterten Desaggregationstheorie sollte folgendes beachtet werden: Die Desaggregation der Multimere und die Dissoziation der (heterotrimeren) Monomere sind zwar getrennte, aber miteinander in Verbindung stehende Phänomene, die beide zur Gesamtdynamik der Signaltransduktion beitragen.

Die verwandten Strukturen und Regulationsmechanismen von G-Proteinen und Cytoskelett-Proteinen

Im Laufe dieser Untersuchungen fiel mir auf, daß G-Proteine und die Hauptkomponenten des zellulären Cytoskeletts, Tubu-

lin und Actin, sehr ähnliche Eigenschaften haben^[63]. Beispielsweise sind G-Proteine, ebenso wie Actin und Tubulin, mit der inneren Seite der Plasmamembran – wahrscheinlich sowohl über integrale Membranproteine wie Rezeptoren als auch über Wechselwirkungen mit Membranlipiden – assoziiert. Besonders interessant ist, daß jedes dieser drei multimeren Proteine durch GTP (im Falle von G-Proteinen und Tubulin) oder ATP (im Falle von Actin) sowie durch deren Hydrolyseprodukte, Dinucleotide und P_i , reguliert wird. Hormonrezeptoren steuern und katalysieren den Austausch der gebundenen Nucleotide (GDP gegen GTP). Ganz ähnlich wird während der Muskelkontraktion die Fortbewegung eines Myosinmoleküls entlang des Actinmultimers durch den Austausch von gebundenem ADP gegen ATP und die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i gesteuert. Wie bereits erwähnt, ist der GTP-Umsatz, also die Bildung von GDP und P_i , für eine schnelle und anhaltende Hormonwirkung essentiell. Die Freisetzung des anorganischen Phosphats ist der entscheidende geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Gesamtdynamik der Signalweiterleitung. Das Gleiche gilt für die Wechselwirkungen zwischen Myosin und Actin^[64].

Auf der Grundlage dieser Analogien hinsichtlich Struktur und Regulation können G-Proteine als Bestandteile der Cytoskelettmatrix angesehen werden. Ein Unterschied besteht primär in der Funktion: G-Proteine leiten Informationen auf chemischer Ebene weiter, Tubulin und Actin sind an einem mechanischen Signalübertragungsprozeß beteiligt. Die Freisetzung von Monomeren aus dem Multimer ist die Grundlage für die chemische Signalweiterleitung durch G-Proteine. Ebenso werden die Wechselwirkungen und die Bewegungen spezialisierter Zellkomponenten durch dynamische Veränderungen im Desaggregations- und Aggregationszyklus der Actin- und Tubulin-Multimere gesteuert. Die Forschung des vergangenen Jahrzehnts hat zahlreiche Hinweise dafür geliefert^[63], daß alle drei Typen von Cytoskelett-Proteinen mit unterschiedlichen Signalübertragungssystemen gekoppelt sind, die sich in der Cytoskelettmatrix befinden. Dazu gehören heterotrimere G-Proteine, G-Proteine mit geringer Molekülmasse, Protein-Kinasen, Phosphatasen und andere Proteine oder Systeme, die zwischen der Oberfläche der Plasmamembran und dem Zellinneren vermitteln. Diese Komponenten bilden Netzwerke, die möglicherweise nach Aktivierung der Membranrezeptoren – einschließlich der Rezeptoren, die an der Steuerung von Wachstumsprozessen beteiligt sind – flackerartig miteinander wechselwirken.

Für die Erforschung von Signalübertragungsprozessen sind wegen ihrer aus biochemischer Sicht außerordentlichen Komplexität ganz eindeutig die Entwicklung und Anwendung neuer Untersuchungsmethoden. Einen vielversprechenden Ansatz in dieser Richtung liefern Mikroskopiermethoden in Verbindung mit Immunfluoreszenz zur spezifischen Markierung und Sichtbarmachung von Verbindungen in ihrer natürlichen Umgebung. Ich hoffe, daß die Reduktionisten mit ihrem außerordentlichen Können in Molekularbiologie und Kristallstrukturanalyse und die, deren Hauptziel es ist, Einblick in die Vorgänge des Lebens auf zellulärer Ebene zu erhalten, durch diese Anhäufung von Ideen und Erfahrungen zusammengeführt werden. Die vereinten Bemühungen einer solch großen und vielseitigen Gemeinschaft werden sicherlich eine neue, glänzende Ära wissenschaftlicher Entdeckungen einleiten.

Mein Dank gilt all meinen ehemaligen und derzeitigen Kollegen, die maßgeblich zum Konzept der Signaltransduktion beigetragen haben und deren Bemühungen die Erforschung der G-Proteine erst möglich gemacht haben. Ihnen widme ich diesen Aufsatz und das folgende „Gedicht“.

Meinen Freunden: Gedanken aus „On High“

Life on a roller coaster, oscillating from hither to yon,
no respite for the iconoclast, wandering from dusk to dawn.
Conjuring strange thoughts foreign and twice forbidden,
like Prometheus unbound, this Nobelist climbs in vain
to Andean peaks, seeking what most would proclaim insane.
Why, he ponders, are there no answers to protean questions
when others thinking cleanly and simply with Occam's
sharp razor
proclaim what seems obvious given the beam of their
unerring laser.
Nature, happily unfettered with philosophy, or with cunning,
or with intent
moves relentlessly onward or even backward with energy
unspent
while we mortals test and probe with twinkling machines
blinking precisely at each movement, striving to unravel its
irresolute randomness, its fathomless, unlimited, meaningless
rush into spiraling chaos,
oblivious of its multitudinous trials & errors which we
pontifically believe must be unerring truth & resolution.
The laugh is on those who, burdened with pretensions of truth,
believe they can fathom within 15 minutes of human existence
what has transpired over eons of space and time in this
Universe.
So, I extol the intuitions encapsulated in the folds of my
mind from whence occasionally they hurtle to the forebrain
and in a twinkling of a proton's discharge bring to fruition a
thought, an idea borne on the feathery appendages of teeming
neurons wedded in a seamless synergy. Those fleeting moments
are cherished, as are those precious impulses imparted
by the innumerable individuals who nurtured and instilled
unknowingly their encrypted thoughts in mine.
So, with these fanciful thoughts in mind I give praise to
you—my friends, my colleagues, my soul-mates, my loved
ones—for letting my soul and thoughts meander hither and
yonder in this attempt at philosophy and poetry. We now belong
to the gods on high who praise us for our frailties and
our achievements.

Eingegangen am 16. Januar 1995 [A 101]
Übersetzt von Dr. Margrit Schwarz, Köln

Stichworte: G-Proteine · Nobel-Vortrag · Signaltransduktion

- [1] M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 375–380.
- [2] M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 130–139.
- [3] M. Rodbell, A. B. Jones, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 140–143.
- [4] M. Rodbell, A. B. Jones, E. E. Chiappe de Cingolani, L. Birnbaumer, *Recent Progr. Horm. Res.* **1968**, 24, 215.
- [5] M. J. Berridge, R. F. Irvine, *Nature (London)* **1984**, 312, 315–321.
- [6] E. W. Sutherland, T. W. Rall, T. Menon, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 1220–1227.
- [7] E. W. Sutherland, G. A. Robison, *Pharmacol. Rev.* **1966**, 18, 145–161.
- [8] J. Monod, J. P. Changeux, F. Jacob, *J. Mol. Biol.* **1963**, 6, 306–329.
- [9] G. Krishna, B. Weiss, B. B. Brodie, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1968**, 163, 379–386.
- [10] Y. Salomon, C. Londos, M. Rodbell, *Anal. Biochem.* **1974**, 58, 541–548.
- [11] M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 5757.
- [12] L. Birnbaumer, S. L. Pohl, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 3468–3476.
- [13] L. Birnbaumer, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 3477–3482.

- [14] H. P. Bär, O. Hechter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, 63, 350–356.
- [15] L. Birnbaumer, S. L. Pohl, H. M. J. Krans, M. Rodbell, *Biochem. Psychopharmacol.* **1970**, 185–208.
- [16] N. Wiener, *Cybernetics*, MIT, Cambridge, MA, **1961**.
- [17] O. Hechter, I. D. K. Halkerton in *The Hormones*, Vol. V, (Hrsg.: G. Pincus, K. V. Thiman, E. B. Astwood), Academic Press, New York, **1964**, S. 697–825.
- [18] D. Neville, *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, 154, 540–546.
- [19] M. Rodbell, H. M. J. Krans, S. L. Pohl, L. Birnbaumer, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 1872–1876.
- [20] M. Rodbell, L. Birnbaumer, S. L. Pohl, H. M. J. Krans, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 1877–1882.
- [21] M. Rodbell, M. C. Lin, Y. Salomon, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 59–65.
- [22] 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.
- [23] Y. Salomon, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 7245–7250.
- [24] M. S. Rendell, M. Rodbell, M. Berman, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 7909–7912.
- [25] M. Schramm, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 2233–2237.
- [26] D. Cassel, H. Levkovitz, Z. Selinger, *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1977**, 3, 393–406.
- [27] T. D. Ting, Y. K. Ho, *Biochemistry* **1991**, 30, 8996–9007.
- [28] J. P. Harwood, H. Low, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1973**, 254, 6239–6245.
- [29] J. P. Harwood, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 4901–4904.
- [30] H. Yamamura, P. M. Lad, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 7964–7966.
- [31] D. M. F. Cooper, W. Schlegel, M. C. Lin, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 8927–8931.
- [32] C. Londos, J. Wolff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 5482–5486.
- [33] M. Rodbell, *Nature (London)* **1980**, 284, 17–22.
- [34] T. Pfeuffer, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 7224–7234.
- [35] T. Pfeuffer, J. M. Helmreich, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 867–876.
- [36] D. M. Gill, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1977**, 8, 85–118.
- [37] T. Katada, M. Ui, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 3129–3133.
- [38] V. Daniel, G. Litwack, G. M. Tomkins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, 70, 76–79.
- [39] H. R. Bourne, P. Coffino, G. M. Tomkins, *Science* **1975**, 187, 750–752.
- [40] E. M. Ross, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 6966–6969.
- [41] E. M. Ross, A. C. Howlett, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 6401–6412.
- [42] P. M. Lad, A. F. Welton, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 5942–5946.
- [43] A. E. Welton, P. M. Lad, A. C. Newby, H. Yamamura, S. Nicosia, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 5947–5950.
- [44] M. W. Bitensky, G. L. Wheeler, B. Aloni, S. Veturly, Y. Matuo, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1978**, 9, 553–572.
- [45] M. Goodhardt, N. Ferry, P. Geynet, J. Hanoune, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 11 577–11 582.
- [46] B. K. K. Fung, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 10 495–10 502.
- [47] A. G. Gilman, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, 56, 615–650.
- [48] A. M. Tolkovsky, A. Levitzki, *Biochemistry* **1978**, 17, 3795–3810.
- [49] R. R. Neubig, *FASEB J.* **1994**, 8, 939–946.
- [50] G. A. Houslay, J. C. Ellory, G. A. Smith, T. R. Hesketh, J. M. Stein, G. B. Warren, J. C. Metcalfe, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 467, 208–219.
- [51] W. Schlegel, E. Kempner, M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 5168–5176.
- [52] W. Schlegel, D. M. F. Cooper, M. Rodbell, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, 201, 678–682.
- [53] E. S. Kempner, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, 18, 236–239.
- [54] J. Codina, J. D. Hildebrandt, L. Birnbaumer, R. D. Sekura, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 22 408–11 418.
- [55] J. K. Northup, P. C. Sternweiss, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 11 369–11 376.
- [56] S. Coulter, M. Rodbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 5842–5846.
- [57] P. C. Sternweis, J. K. Northup, M. D. Smigel, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 11 517–11 527.
- [58] S. Jahangeer, M. Rodbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 87, 8782–8786.
- [59] S. Nakamura, M. Rodbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 6413–6417.
- [60] S. Nakamura, M. Rodbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7150–7154.
- [61] W. J. Tang, A. G. Gilman, *Science* **1991**, 254, 1500–1503.
- [62] M. Rodbell, S. Jahangeer, S. Coulter in *GTPases in Biology II* (Hrsg.: B. F. Dickey, L. Birnbaumer), Springer, Berlin, **1993**, S. 3–14.
- [63] M. Rodbell, *Curr. Top. Cell. Regul.* **1992**, 32, 1–47.
- [64] M. F. Carrier, *Adv. Biophys.* **1990**, 26, 51–73.