

Rezeptor/G-Protein – Interaktion in einzelnen lebenden Zellen

Peter Hein, Monika Frank, Martin J. Lohse,
Moritz Bünemann

Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Universität Würzburg

► G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle in der zellulären Kommunikation. Nach Bindung des Agonisten interagieren diese Rezeptoren mit heterotrimeren G-Proteinen. Diese Interaktion des aktivierten Rezeptors mit G-Proteinen ist für die meisten Signalwege essenziell. Mangels geeigneter Methoden war es jedoch nicht möglich, dies in lebenden Zellen und in Echtzeit zu untersuchen. Vor allem ist der Mechanismus der Interaktion nicht klar: Sind Rezeptoren und G-Proteine vorgekoppelt (precoupled), oder diffundieren sie frei in der Membran und interagieren erst nach Agonist-Stimulation (collision coupling)? Auch ist nicht klar, ob Rezeptor und G-Protein während der Signalübertragung zusammen bleiben, oder ob ein Rezeptor mehrere G-Proteine aktivieren kann.

Um diese Fragestellungen in intakten Zellen und in Echtzeit zu untersuchen, haben wir einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) basierten Assay entwickelt und die Interaktion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors mit Gi-Proteinen gemessen (Abb. 1). Hierzu wurden genetisch kodierte Fluorophore C-terminal mit dem α_{2A} -Rezeptor (YFP) und N-terminal mit $G\gamma_2$ (CFP) fusioniert und zusammen mit $Gi\alpha_1\beta_2$ in HEK-Zellen exprimiert. Der Rezeptor und das G-Protein co-lokalisierten an der Plasmamembran. Der Agonist Noradrenalin wurde mit einem schnellen Superfusionssystem in einem Einzelzell-Photometrie-Setup appliziert.

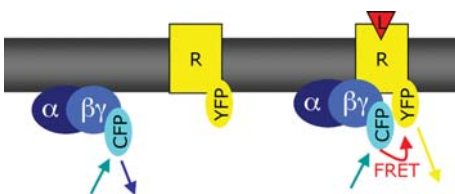


Abb. 1: Schematische Darstellung des FRET-Assays. R, Rezeptor; L, Ligand; α , β , γ G-Protein-Untereinheiten

Agonist-Stimulation führte zu einer Abnahme der CFP- und einer Zunahme der YFP-Fluoreszenz, was einer Zunahme des FRET entspricht. Diese FRET-Änderung war reversibel und in ihrer Amplitude und Kinetik abhängig von der Agonistkonzentration.

Unsere Daten zeigen, dass α_{2A} -Rezeptoren und Gi-Proteine nicht vorgekoppelt sind. Die Kinetik der Rezeptor/G-Protein-Interaktion ist nicht von der Kinetik der Rezeptor-Aktivierung unterscheidbar. G-Proteine interagieren nur mit aktivierten Rezeptoren,

jedoch tut dies pro Zeiteinheit nur ein kleiner Teil. Ein Rezeptor kann mehrere G-Proteine nacheinander aktivieren.

Korrespondenzadresse:

Peter Hein
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universität Würzburg
Versbacher Straße 9
D-97078 Würzburg
Tel.: 0931-201 48854
Fax: 0931-201 48539
pehein@toxi.uni-wuerzburg.de

Lebenslauf:

Peter Hein hat Humanmedizin an der Universität Essen studiert und approbierte **2002** zum Arzt. Seine medizinische Doktorarbeit über inversen Agonismus an α_{1B} -adrenergen Rezeptoren hat er im Labor von Prof. Martin C. Michel angefertigt. Ebenfalls **2002** wurde er als Stipendiat in das Würzburger MD/PhD-Programm aufgenommen, wo er im Institut für Pharmakologie und Toxikologie bei Prof. Martin J. Lohse in der Arbeitsgruppe von Dr. Moritz Bünemann an seiner biologischen Promotion arbeitet.