

Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus dem Institut für Pharmakologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. G. Schultz

Biochemische und funktionelle Charakterisierung der G-Protein-Isoform β_5

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Charité-Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von: **Aleksei Babich**
aus Chotin (Ukraine)

Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. Nürnberg

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. K.P. Hofmann

Gedruckt mit Genehmigung der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 27. 05.2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Begriffe	V
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Prinzipien der Signalverarbeitung in lebenden Systemen	1
1.2 G-Protein-abgängige Signaltransduktion	2
1.2.1 Aufbau und Funktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und G-Proteinen	2
1.2.2 G α -Untereinheit	4
1.2.3 G β -Untereinheit	6
1.2.4 G γ -Untereinheit	9
1.2.5 Die G $\beta\gamma$ -regulierten Effektoren.....	10
1.2.6 G-Protein Regulatoren.....	11
1.3 Das G-Protein β_5	13
2 Fragestellung	15
3 Materialien	17
3.1 Hersteller und Lieferanten.....	17
3.2 Chemikalien	17
3.3 Enzyme, Proteine, Peptide und andere biologisch aktive Substanzen	19
3.4 Nukleotide	19
3.5 Zellen, Zellkulturmedien und Zusätze	19
3.6 Proteinstandards	19
3.7 Reinigungs- und Trennmaterialien.....	20
3.8 Membranen/Filter und Filmmaterial	20
4 Methoden	21
4.1 Proteinbiochemische Standardmethoden	21
4.1.1 Proteinbestimmung.....	21
4.1.2 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
4.1.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	22
4.1.4 Immunoblotverfahren.....	23
4.2 Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen	24
4.2.1 Kultivierung von Sf9-Zellen	24
4.2.2 Amplifikation rekombinanter Viren und Titerbestimmung von Viruslösungen.....	25
4.2.3 Infektion von Sf9-Zellen	26
4.3 Reinigung rekombinanter und nativer Proteine	26
4.3.1 Aufschluß von Sf9-Zellen	26
4.3.2 Affinitätschromatographie	27
4.3.3 Anionenaustausch-Chromatographie	28
4.3.4 Gelfiltration	28

4.3.5	Reinigung rekombinanter cytosolischer G β_5 /RGS-Komplexe aus Sf9-Zellen	30
4.3.6	Reinigung der G γ_2 -Untereinheit.....	31
4.3.7	Gewinnung von subzellulären Fraktionen aus Hirngewebe.....	32
4.3.8	Reinigung nativer G β_5 /RGS-Komplexe aus Rinderhirn.....	32
4.4	G-Protein-Funktionsbestimmung.....	34
4.4.1	Bestimmung der Assoziation von G-Proteinen mit Phospholipid-Vesikeln....	34
4.4.2	Nachweis der Bildung von G-Protein-Komplexen durch chromatographische Verfahren.....	35
5	Ergebnisse	36
5.1	Interaktion der G β_5 -Untereinheit mit G α - und G γ -Untereinheiten	36
5.2	Dissoziation von G $\beta_5\gamma_2$ -Komplexen.....	37
5.2.1	Dissoziation von G $\beta_5\gamma_2$ -Komplexen an der Mono Q-Säule	37
5.2.2	Detergenzabhängigkeit der Dissoziation von G $\beta_5\gamma_2$	38
5.2.3	Spezifität von G γ -Isoformen bei der Bildung von G $\beta_5\gamma$ -Dimeren.....	40
5.3	Biophysikalische Eigenschaften des G γ -freien G β_5	41
5.3.1	Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von G β_5	41
5.3.2	Hydrophilie des monomeren G β_5	43
5.4	Reversibilität der Dissoziation von G $\beta_5\gamma_2$ -Komplexen.....	45
5.4.1	Rekonstitution von G β_5 und G γ_2 zu einem G $\beta_5\gamma_2$ -Dimer.....	45
5.4.2	Funktionalität der reassozierten G $\beta_5\gamma_2$ -Komplexe	50
5.4.2.1	Stimulation der PLC- β_2	50
5.4.2.2	Interaktion mit G α -Untereinheiten	52
5.5	Nachweis von G β_5 -haltigen dissoziierbaren Komplexen in Geweben.....	53
5.6	Dissoziierbarkeit von G β_5 /RGS Komplexen.	58
6	Diskussion	64
6.1	Dissoziation von G $\beta\gamma$ -Heterodimeren.....	64
6.2	Stabilität des monomeren G β_5	64
6.3	Reversibilität der Dissoziation von G $\beta_5\gamma_2$ -Komplexen.....	66
6.4	Isolation des G γ -freien G β_5 aus Rinderhirn.....	67
6.5	Mögliche funktionelle Bedeutung der Dissoziierbarkeit von G β_5 /RGS-Komplexe	68
6.6	Weitere Hinweise auf die Existenz der G $\beta_5\gamma$ -Komplexen.....	71
7	Zusammenfassung.....	76
8	Literaturverzeichnis.....	78
9	Lebenslauf.....	88
10	Danksagung.....	90

ABKÜRZUNGEN, BEGRIFFE

β-ARK	β-adrenerge Rezeptorkinase
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AMF	Komplex aus Aluminium-, Magnesium- und Fluoridionen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	(engl.) bovine serum albumin; Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-3':5'-monophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonsäure
Ci	Curie
cpm	(engl.) counts per minute; gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
CTX	Choleratoxin, Exotoxin von <i>Vibrio cholerae</i>
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Konzentration eines Wirkstoffs, bei der die Hälfte des maximal möglichen Effektes erreicht wird
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Bis(aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'-tetraessigsäure
engl.	englisch, Bezeichnung im Englischen
(x) g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GIRK	(engl.) G protein-gated inwardly rectifying K ⁺ -channel; G-Protein-regulierter einwärts gleichrichtender K ⁺ -Kanal
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	(engl.) hours, Stunden
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	(engl.) high pressure liquid chromatography; Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilodalton
Lubrol PX	Polyoxyethylen-(9)-laurylether
M	mol pro Liter
min	Minuten

MOI	(engl.) multiplicity of infection; Virus/Zellverhältnis
MS	Massenspektrometrie
NAD	β -Nicotinamid-adenin-dinukleotid (oxidiert)
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotetraacetat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	(engl.) phosphate-buffered saline; NaCl/Phosphatpuffer
pfu	Anzahl der Viren, die zur Bildung von Plaques führen (plaque forming unit)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration in wäßriger Lösung
PLC	Phospholipase C
PI3K und PI-3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PTX	Pertussistoxin, Exotoxin von <i>Bordetella pertussis</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
s	Sekunden
S.D.	(engl.) standard deviation; Standardabweichung
SDS	(engl.) sodium dodecyl sulfat; Natriumdodecylsulfat
S.E.M.	(engl.) standard error of the mean; mittlerer Fehler des Mittelwertes
<i>Sf9</i> -Zellen	Ovarialzelllinie des Insekts <i>Spodoptera frugiperda</i>
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-monolaurat
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent (Gewicht/Volumen)

Aminosäuren sind im Text im Dreibuchstaben-Code abgekürzt; in Tabellen und Abbildungen wird auch der Einbuchstaben-Code verwendet:

A Ala	Alanin	C Cys	Cystein	D Asp	Asparaginsäure
E Glu	Glutaminsäure	F Phe	Phenylalanin	G Gly	Glycin
H His	Histidin	I Ile	Isoleucin	K Lys	Lysin
L Leu	Leucin	M Met	Methionin	N Asn	Asparagin
P Pro	Prolin	Q Gln	Glutamin	R Arg	Arginin
S Ser	Serin	T Thr	Threonin	V Val	Valin
W Trp	Tryptophan	Y Tyr	Tyrosin		