

4 *METHODEN*

4.1 *Proteinbiochemische Standardmethoden*

4.1.1 *Proteinbestimmung*

Die Konzentrationen der eingesetzten Proteinlösungen wurden durch verschiedene Methoden bestimmt, die alle auf der Bildung eines farbigen Komplexes in Abhängigkeit vom Proteingehalt beruhen.

Die BCA-Methode ("Pierce BCA Protein Assay") wurde zur Bestimmung von Proteinpräparationen eingesetzt, die keine Detergenzien enthielten. Dabei reagiert das Protein mit Cu^{2+} und Bicinchoninsäure in alkalischem Medium zu einem Cu^{+} -Bicinchoninsäurekomplex. Dieser Komplex kann daraufhin spektrophotometrisch nachgewiesen werden. Für Detergenz-haltige Präparationen kam die Methode nach Lowry und Mitarbeitern (1951), teilweise modifiziert nach Peterson (1983), zum Einsatz. Diese beruht auf der Reduktion eines Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz durch Proteine, wobei ein farbiger Komplex entsteht, dessen Intensität von der eingesetzten Proteinkonzentration abhängig ist.

Als weitere Bestimmungsmethode wurde die Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue herangezogen. Dazu wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.1.2) und durch Coomassie-Lösung angefärbt. Die entfärbten Gele wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners digitalisiert und mit der Auswertungssoftware TINA 2.09f (Raytest, Straubenhardt) densitometrisch quantifiziert.

Bei allen drei Methoden wurde Rinderserum-Albumin als Mengenstandard verwendet.

4.1.2 *SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer relativen Molekülmasse wurde ein von Lämmli (1970) entwickeltes, denaturierendes, diskontinuierliches Elektrophorese-System verwendet. Dazu werden die Proben in Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl, 10 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -ME, 2 % (w/v) SDS und 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Die Spaltung von Disulfidbrücken durch β -Mercaptoethanol verhindert eine Zusammenlagerung einzelner Untereinheiten zu multimeren Proteinen. SDS, ein anionisches, hydrophiles Detergenz, denaturiert die Proteine und verleiht ihnen durch Anlagerung an ihre Oberfläche eine negative Ladung. Dadurch können die Proteine nahezu unabhängig von ihrer

eigentlichen Ladung und Faltung entsprechend ihrer Molmasse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Elektrophorese wurde in einem Puffer aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS durchgeführt. Für die Konzentrierung der Proteine bei einer Spannung von 100 V diente zunächst ein relativ großporiges Sammelgel, während die Auftrennung bei 150 V in einem kleinerporigen Trenngel erfolgte.

	SAMMELGEL	TRENNGEL	VERSCHLUSSGEL
Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	4,5 % (w/v)	10 % (w/v)*	30 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	
APS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	1,5 % (w/v)
TEMED	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	1,5 % (w/v)
Tris/HCl	125 mM, pH 6,8	375 mM, pH 8,8	

*Für eine bessere Auflösung im Bereich von 80 - 200 kDa wurde ein 8 %-iges, im Bereich 10 - 30 kDa entsprechend ein 12 %-iges Trenngel verwendet.

Für die gelelektrophoretische Trennung und Identifikation von G-Protein γ -Untereinheiten wurden kommerzielle Polyacrylamidgele der Fa. Bio-Rad verwendet. Dabei handelt es sich um ein Tris/Tricin/SDS-Gelsystem mit einem kontinuierlichen Polyacrylamidgradienten von 4 - 20 %. Durch die hohe Auflösung solcher Gelsysteme im Molekulargewichtsbereich von < 10 kDa ist es möglich, verschiedene $G\gamma$ -Isoformen voneinander zu trennen und als separate Proteinbanden zu detektieren. Die Proben wurden in einem mitgelieferten Probenpuffer entsprechend der Anleitung des Herstellers aufgenommen.

4.1.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die über SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennten Proteine (4.1.2) konnten durch Färbung mit 1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 45 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde mit der Coomassie-Lösung mindestens 20 min gefärbt und anschließend mit einem Gemisch aus 20 % Methanol und 10 % Essigsäure entfärbt, wobei Methanol den Farbstoff aus dem Gel herauslöst und Essigsäure den farbigen Proteinkomplex stabilisiert. Die Proteine waren nach Entfärbung des Gels als blaue Bänder sichtbar. Für die kolorimetrische Quantifizierung von Proteinbanden (4.1.1) wurde nur 10 %-ige Essigsäure zum Entfärben eingesetzt.

4.1.4 Immunoblotverfahren

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (4.1.2) wurden durch dieses Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen übertragen (Towbin et al., 1976) und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Leopoldt et al., 1997, Exner und Nürnberg, 1999). Der Proteintransfer (Minigel, 8x10 cm) erfolgte 1 h bei 250 mA mit 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,02 % (w/v) SDS in 20 % (v/v) Methanol. Die Nitrozellulose-Streifen wurden mit Ponceau S-Lösung angefärbt und der überschüssige Farbstoff dann durch Spülung mit demineralisiertem Wasser entfernt. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden dabei durch Bindung des roten Farbstoffs reversibel sichtbar gemacht. Um den Proteinen später eine Molmasse zuordnen zu können, wurde die Position der Standardproteine auf den Membranen markiert. Dann wurden die Membranen bei Raumtemperatur für 1 h in einer 10 % igen Roti-Block[®]-Lösung geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluß daran folgte eine 1-stündige Inkubation mit Polypeptid-Antiseren (Verdünnungen 1:150 – 1:2000), die gegen die nachzuweisenden Proteine gerichtet waren. Die eingesetzten Antikörperhaltigen Lösungen und die zur Herstellung verwendeten Peptidsequenzen sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Antiseren	Peptidsequenz	Literatur
anti- α_{common} (AS 8)	(C)GAGESGKSTIVKQMK	Schmidt et al., 1991
anti- $\alpha_{\text{q/11}}$ (AS 368)	(C)LQLNLKQLMLQ	Spicher et al., 1994
anti-RGS9 (SC 8143)	TIRHQGQQYRPRMAFLQKIC	Santa Cruz USA
anti- β_{common} (AS 398)	(C)TDDGMAVATGSWDDSFLLKIWN	Leopoldt et al., 1997
anti- β_1 (AS 28)	(C)CTTTFTGHTG	Hinsch et al., 1989
anti- β_2 (AS 36)	(C)TVGFAGHSG	Hinsch et al., 1989
anti-RGS11 (SC 9725)	LEMKRRVFTWRPRHSSP	Santa Cruz USA
anti- β_5 (AS 422)	(C)ATDGLHENETLASLKSC	Brunk et al., 1999
anti- $\gamma_{2/3}$ (AS 292)	(C)SENPFREKKFFC	Dietrich et al., 1992
anti- γ_5 (AS 366)	(C)CGVSSSTNPFRPQKV	Spicher, K. et al., unveröff. Befunde
anti- γ_7 (AS 361)	(C)ASSELMSYCEQHARN	
anti-RGS6 (SC 9712)	Nicht angegeben	Santa Cruz USA
anti-RGS7 (SC 8139)	KRKGKTLTSLVQSY	Santa Cruz USA

Tab. 4: Eingesetzte Antiseren zur immunologischen Identifizierung der verwendeten Proteine

(C) Cys-Rest, der zur Kopplung des Antigens an KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) zusätzlich eingeführt wurde.

Nach mehrmaligem Waschen der Nitrozellulose-Streifen mit TBST-Puffer (Tris/HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,05 %, pH 8) wurden diese 1 h mit einem 1:1000 verdünnten Peroxidase-konjugierten Anti-Immunglobulin-Antikörper inkubiert (Anti-Maus-, Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Ziege-IgG). Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden nach erneutem Waschen der Membranen mit TBST-Puffer über die Peroxidase-Aktivität durch Chemolumineszenz nachgewiesen (ECL-Kit, Amersham Buchler, Braunschweig).

4.2 Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen

Eine der am häufigsten verwendeten Insektenzelllinien zur Expression rekombinanter Säuger-Proteine ist die *Sf9*-Zelllinie. Dabei handelt es sich um Ovarienzellen von *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*). Für die Expression von rekombinanten Proteinen werden diese Zellen mit lytischen Baculoviren infiziert. Dies sind doppelsträngige zirkuläre DNA-Viren, die bevorzugt Insektenzellen befallen. Der Vorteil der Expression von Proteinen in *Sf9*-Zellen gegenüber Bakterienzellen ist die korrekte posttranslationale Prozessierung und Faltung der exprimierten Proteine, was für Funktionsuntersuchen von Säugerproteinen wichtig ist. Gegenüber Säuger-Transfektions-Systemen haben *Sf9*-Zellen den Vorzug, daß man in ihnen sehr leicht auch größere Mengen an rekombinanten Proteinen exprimieren kann, da sie Verdopplungszeiten von weniger als einem Tag aufweisen und darüber hinaus große Volumina in Suspension kultiviert werden können. Die Expression von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen wurde in Anlehnung an Methoden der Laborhandbücher von King und Possee (1992) bzw. O'Reilly und Mitarbeiter (1992) durchgeführt.

4.2.1 Kultivierung von *Sf9*-Zellen

Sf9-Zellen wurden sowohl adhärent (Monolayer) als auch in Suspension im Brutschrank bei 27 °C ohne CO₂-Begasung kultiviert. Für die Monolayer-Aufzucht in Zellkulturschalen (175 cm²) wurde TNM-FH-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Antibiotika-Zusätzen (Penicillin/Streptomycin) verwendet. Die Zellen in Suspensionskultur wurden in dem gleichen Medium gehalten. Es wurde jedoch mit 1 % Lipid-Medium-Supplement ergänzt, um die Zellmembranen gegen die Scherkräfte in der Suspensionskultur widerstandsfähiger zu machen.

Zellen in Monolayer-Kultur wurden abhängig von der Zelldichte alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:4 umgesetzt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und durch neues ersetzt. Durch Klopfen wurden die Zellen abgelöst, resuspendiert und anschließend auf zwei

bis vier neue Zellkulturschalen verteilt. Schüttelkulturen wurden in einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml gestartet und durch regelmäßiges Verdünnen mit frischem Medium bis zu einer Zelldichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml gehalten. Unter diesen Umständen sollte sich die Zahl der Sf9-Zellen innerhalb von 18-24 Stunden verdoppeln.

4.2.2 Amplifikation rekombinanter Viren und Titerbestimmung von Viruslösungen

Für die Amplifikation rekombinanter Viren wurden Sf9-Zellen in einer Dichte von $1,0 \times 10^6$ /ml mit rekombinanten Baculoviren (MOI = 0,1) versetzt und 5 Tage inkubiert. Anschließend wurden Zellen und Zellfragmente bei $7500 \times g$ (4°C , 20 min) abzentrifugiert. Der Virus-haltige Überstand diente nach Titerbestimmung zur Infektion von Sf9-Zellen für die Gewinnung rekombinanter Proteine.

Zur Titerbestimmung von Viruslösungen wurden $0,8-1,0 \times 10^6$ Zellen in Petrischalen (10 cm^2) ausgesetzt und mindestens 30 min bis zur Adhärenz der Zellen gewartet. Eine in der Zwischenzeit hergestellte Verdünnungsreihe der virushaltigen Überstände (4.2.2) setzte sich wie folgt zusammen: $1:10^5$, $1:10^6$ und $1:10^7$. Nachdem nicht adhärente Zellen abgesaugt waren, wurden die adhärennten Zellen mit $800 \mu\text{l}$ der jeweiligen Virus-Verdünnung überschichtet und eine Stunde bei 27°C inkubiert. Eine sterile Agarose-Lösung mit niedrigem Schmelzpunkt (2,5 % (w/v) "low-melting agarose" in Wasser) wurde durch Erwärmen verflüssigt und nach Temperieren auf 37°C mit Medium im Verhältnis 1:2 gemischt. Der virushaltige Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 2,5 ml der Agarose/Medium-Mischung überschichtet. Um ein Austrocknen während der nun folgenden 7-tägigen Inkubationszeit bei 27°C zu verhindern, wurden die Ansätze mit 2 ml Medium überschichtet. Während dieser Zeit vermehrten sich die Viren und bildeten - im Falle einer ausreichend großen Verdünnung des Virusüberstandes - gegeneinander abgrenzbare sog. Plaques, die unter dem Mikroskop in diffusem Seitenlicht sichtbar waren. Ein Plaque bezeichnet dabei eine Gruppe von Viren, die aus einem einzelnen Virus hervorgegangen ist. Diese Plaques wurden nun für die Bestimmung des Virustiters herangezogen. Dieser wird als "plaque forming units" pfu/ml angegeben und entspricht der Konzentration der Viren in der entsprechenden Lösung. Er berechnet sich wie folgt:

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{eingesetztes Volumen der Virusverdünnung (ml)}}$$

Durch Kenntnis des Titers ist es möglich, die Infektion der *Sf9*-Zellen in einem bestimmten Virus-Zell-Verhältnis durchzuführen. Dieses Verhältnis wird als “multiplicity of infection” (MOI) bezeichnet und gibt die pfu pro Zelle an. Für die Gewinnung rekombinanter Säuger-Proteine im Rahmen dieser Arbeit kam üblicherweise eine MOI = 1,0 zum Einsatz.

4.2.3 Infektion von *Sf9*-Zellen

Zur Gewinnung präparativer Mengen rekombinanter Proteine wurden *Sf9*-Zellen in Schüttelkultur bei einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit den berechneten Mengen der entsprechenden Viruslösungen infiziert. Bei Koinfektionen von mehreren G-Protein-Untereinheiten wurde jeder einzelne Virus mit einer MOI von 1,0 zugegeben. Nach einer definierten Infektionszeit (36 h bis 60 h), die von der Zielsetzung der nachfolgenden Untersuchungen abhing, wurden die Zellen abzentrifugiert und mit eiskaltem PBS (12 mM Na_2HPO_4 , 4 mM KH_2PO_4 , 120 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen. Die so erhaltenen Zellsedimente wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

4.3 Reinigung rekombinanter und nativer Proteine

4.3.1 Aufschluß von *Sf9*-Zellen

Bombenpuffer: 50 mM HEPES, pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 3 mM MgCl_2 , 10 mM β -Mercaptoethanol (β -ME), 110 mM NaCl, 10 μM GDP, 0,2 mM Pefabloc SC, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin-Inhibitor und 10 $\mu\text{g/ml}$ TPCK

Waschpuffer: 50 mM HEPES, pH 8,0, 3 mM MgCl_2 , 10 mM β -ME, 50 mM NaCl, 10 μM GDP, 0,2 mM Pefabloc[®] SC, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin-Inhibitor und 10 $\mu\text{g/ml}$ TPCK

Das aus infizierten *Sf9*-Zellen bestehende Zellsediment wurde in eiskaltem Bombenpuffer in einer Konzentration von 30×10^6 Zellen pro ml resuspendiert und anschließend durch N_2 -Überdruck in einer Parr-Bombe (25 bar, 4°C , 30 min) aufgeschlossen. Das so erhaltene Zellysate wurde bei $800 \times g$ für 2 min zentrifugiert, um die Zellkerne abzutrennen. Durch einen anschließenden Ultrazentrifugationsschritt ($100.000 \times g$, 4°C , 40 min) wurden Membranen (Pellet) bzw. Cytosol (Überstand) erhalten. Das Membransediment aus je 750×10^6 Zellen wurde zunächst in 1 ml Waschpuffer durch

mehrmaliges Passieren durch Injektionsnadeln der Größe 22 G gefolgt von 26 G homogenisiert und anschließend auf das siebenfache Volumen verdünnt. In diesem Stadium war es möglich, die Membran-Suspension mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockzufrieren und bis zur weiteren Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu lagern. Die cytosolische Fraktion hingegen wurde unmittelbar nach dem Zentrifugationsschritt zu weiteren Proteinreinigung eingesetzt.

4.3.2 Affinitätschromatographie

- Puffer A: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 3 mM MgCl_2 , 10 mM β -ME, 150 mM NaCl, 10 μM GDP, 0,2 mM Pefabloc[®] SC, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin-Inhibitor und 10 $\mu\text{g/ml}$ TPCK
- AMF-Puffer: 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2 , 0,9 % Natriumcholat (für $\text{G}\beta_{1\gamma 2}\text{-His}$ und $\text{G}\alpha_{\text{x}}\text{-His}$) bzw. 0,1 % Lubrol PX (für $\text{G}\beta_{5\gamma 2}\text{-His}$), 10 mM β -ME, 10 μM GDP, 30 μM AlCl_3 und 10 mM NaF, pH 8,0
- Puffer B: 20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 0,4 % Natriumcholat (für $\text{G}\beta_{1\gamma 2}\text{-His}$) bzw. 0,37 % Octylthioglukosid (für $\text{G}\beta_{5\gamma 2}\text{-His}$) und 10 mM β -ME, pH 8,0.
- Puffer C: 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM β -ME, pH 8,0

Rekombinante Proteine können mit einer bestimmten zusätzlichen Aminosäuresequenz (Affinitätsmarkierung) versehen werden, die eine spezifische aber reversible Bindung an geeignete chromatographische Medien (Affinitätsmatrix) ermöglicht und dadurch eine schnelle und effiziente Reinigung gestattet. Hierzu verwendeten wir hexahistidinmarkierte rekombinante Proteine.

Nach diesen Verfahren wurden $\text{G}\beta_{\text{x}\gamma 2}\text{-His}$, $\text{G}\alpha_{\text{x}}\text{-His}$, $\text{G}\beta_{5\text{-His}}/\text{RGS6}$, $\text{G}\beta_{5\text{-His}}/\text{RGS7}$ und $\text{G}\beta_{5\text{-His}}/\text{RGS9}$. Die membranassoziierten Proteine ($\text{G}\beta_{\text{x}\gamma 2}\text{-His}$, $\text{G}\alpha_{\text{x}}\text{-His}$) wurden aus den präparierten Membran-Suspensionen (4.3.1.) mit 0,5 % Lubrol PX bzw. mit 0,9% Natrium-Cholat zunächst solubilisiert ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h) und dann durch Ultrazentrifugation ($100.000 \times g$, 1 h) geklärte Extrakte gewonnen. Die Membranextrakte wurden auf das 5-fache Volumen mit Puffer A verdünnt und auf Ni-NTA-Agarose-Säule (1 ml Säulenmaterial/ $7,5 \times 10^8$ Zellen) geladen. Anschließend wurde die Säule mit Puffer A (5 CV) und zur Entfernung der endogenen *Sf9*- $\text{G}\alpha$ -bzw. *Sf9*- $\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheiten mit 10 Säulenvolumina AMF-Puffer gewaschen. Dann wurden die hexahistidinmarkierten Proteine bzw. Komplexe mit acht Säulenvolumina in Puffer B eluiert.

Für die Reinigung von G β ₅-His/RGS6, G β ₅-His/RGS7, G β ₅-His/RGS9 wurde cytosolische Fraktion (siehe 4.3.1.) von den entsprechend infizierten *Sf9*-Zellen mit Puffer C dreifach verdünnt, auf eine Konzentration von 20 mM Imidazol eingestellt und auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule (0,5 ml Säulenmaterial/7,5 x 10⁸ Zellen) geladen. Nach dem Waschen der Säule mit 20 mM Imidazol in Puffer C (5 CV) wurden die gebundenen Proteine mit 150 mM Imidazol in Puffer C eluiert (10 CV). Nach Analyse des Säulenprofils wurden entsprechende Fraktionen vereinigt, verdünnt und mit Hilfe einer 1 ml Source 15Q Säule fraktioniert bzw. aufkonzentriert (4.3.3).

Die erhaltenen Proteine wurden durch Immunoblotverfahren (4.1.4) identifiziert und nach der Coomassie-Färbung der SDS-Gelen quantifiziert.

4.3.3 Anionenaustausch-Chromatographie

Puffer D: 20 mM Tris/HCl, 10 mM β -ME, pH 8

Dieses Reinigungsverfahren wurde nach der Affinitätschromatographie als *Polishing*-Schritt durchgeführt, bei dem die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen negativen Nettoladung aufgetrennt wurden. Es wurden Fraktionen, die das gewünschte Protein beinhalteten vereinigt und zur Reduzierung der Ionenstärke auf das 3-5-fache Volumen mit Puffer D (bei den Membranproteine wurde 0,2 % (w/v) Lubrol PX zugegeben) verdünnt. Danach wurde die Lösung auf eine 1 ml Source 15Q Säule geladen, die zuvor mit Puffer D äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit 5 CV Puffer D wurden die Proteine mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten (0-500 mM in Puffer D innerhalb von 10 CV) eluiert und fraktioniert. Die Reinheit und Konzentration der gereinigten Proteine wurde nach SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung mit nachfolgender Coomassie-Färbung bestimmt (4.1.1). Die Lagerung der aufgereinigten Proteine erfolgte bei -70 °C.

4.3.4 Gelfiltration

Dieses chromatographisches Verfahren, das auch als Molekularsiebanalyse bezeichnet wird, trennt Moleküle entsprechend ihrer Größe, wobei die kleinen Moleküle die Säule langsamer passieren als die großen und daher in späteren Fraktionen erscheinen. Die Gelfiltration wird üblicherweise in folgenden Situationen verwendet:

Für die **Proteinreinigung** meistens erst in den späteren Reinigungsschritten, da die Gelfiltration sehr zeitaufwendig ist und zudem die Konzentration der eingesetzten

Proteinlösung reduziert. Dabei verwendeten wir üblicherweise Säulen mit einem Matrixvolumen ab 60 ml (Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min). Das Volumen der aufzutrennenden Probe betrug 2 - 5% des Säulenvolumens (Matrixvolumen).

Bei der **Umpuffern** bzw. Abtrennung der Probe von niedermolekularen Kontaminationen eluiert das Protein bzw. Proteingemisch von Interesse im Ausschlussvolumen, während niedermolekulare Verbindungen und Salze von der Säule zurückgehalten werden und erst in späteren Fraktionen freigesetzt werden. Das Volumen der aufzutrennenden Probe kann bis zu 30% des Säulenvolumens betragen und Elution erfolgt bei höherer Flussgeschwindigkeit.

Die **Bestimmung des Molekulargewichtes** von Proteinen ist ebenfalls ein verbreitetes Einsatzgebiet der analytischen Gelfiltration. Dabei sind die Säulen mit einem Matrixvolumen bis etwa 25 ml sinnvoll. Das Volumen der untersuchten Probe darf 2 % des Säulenvolumens nicht überschreiten und für eine hohe Trennqualität ist eine geringe Flussgeschwindigkeit von Vorteil (Amersham Pharmacia Biotech, 1999).

Für die Bestimmung des Molekulargewichtes mittels Molekularsiebanalyse macht man sich zunutze, dass bei jeder Gelfiltrationssäule in einem bestimmten Bereich eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit zwischen dem Elutionsvolumen und dem Logarithmus des Molekulargewichtes des Proteins besteht (Abb. 3).

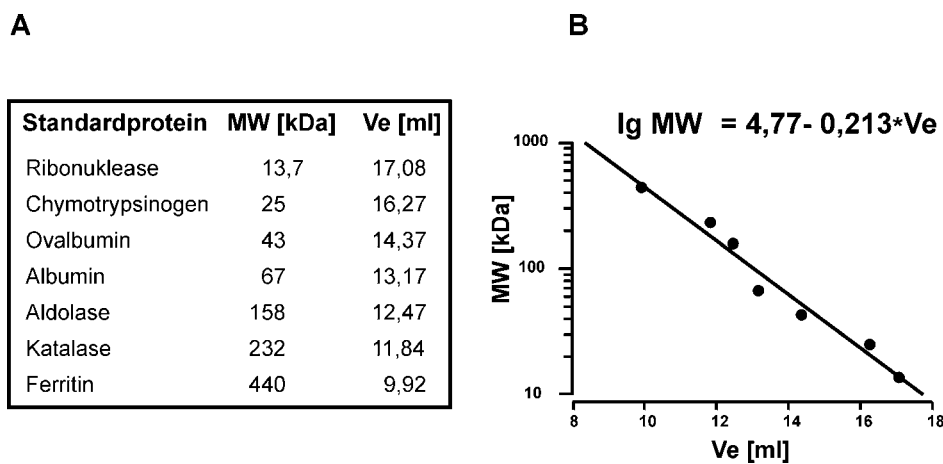


Abb. 3: Kalibration der Gelfiltrationssäule

(A) Die Superdex 200 HR 10/30 Säule wurde mit den angezeigten Standardproteinen kalibriert. Dazu wurden jeweils 10-20 µg der angezeigten Proteine in 100 µl Puffer C auf die Säule geladen und mit Puffer M isokratisch eluiert. Dabei wurde das Elutionsvolumen bzw. die Retentionszeit des jeweiligen Standardproteins ermittelt. (B) Elutionsvolumen des Standardproteins (Abszisse) wurde gegen sein Molekulargewicht (Ordinate) aufgetragen, wobei für die Ordinate die logarithmische Skalierung gewählt wurde.

4.3.5 **Reinigung rekombinanter cytosolischer $G\beta_5$ /RGS-Komplexe aus *Sf9*-Zellen**

- Puffer E: 20 mM HEPES, 20 mM NaCl, 4 mM EDTA, 10 mM β -ME, 10 μ g/ml TPCK und 0.2 mM Pefabloc[®] SC pH 7,5
- Puffer F: 20 mM HEPES, 4 mM EDTA, 10 mM β -ME, pH 7,5
- Puffer I: 20 mM Tris, 4 mM EDTA, 10 mM β -ME, pH 8

Zur Reinigung rekombinanter $G\beta_5$ /RGS6- und $G\beta_5$ /RGS7-Komplexe wurden *Sf9*-Zellen mit Viren, die für die entsprechenden Untereinheiten kodieren, wie in 4.2.3 beschrieben, infiziert. Die Reinigungsstrategie basierte auf der Besonderheit dieser Protein-Komplexe an eine Kationenaustauschmatrix im pH-Bereich von 7,5 - 8 zu binden (Cabrera et al., 1998). Im pH-Bereich von pH 7,5 - 8 hat die überwiegende Anzahl von Proteinen eine negative Nettoladung und bindet im Gegensatz zu $G\beta_5$ /RGS6- und $G\beta_5$ /RGS7-Komplexen nicht oder nur sehr schwach an der Kationenaustauschmatrix. Aufgrund ihrer relativ hohen Bindungsselektivität für $G\beta_5$ /RGS6- und $G\beta_5$ /RGS7-Komplexen, wurde Kationenaustauschmatrix für den ersten Reinigungsschritt gewählt.

Das Cytosol aus 3×10^9 infizierten *Sf9*-Zellen in Puffer E wurde auf eine SP-Sepharose Säule (20 ml) geladen (Tab. 5). Nach Waschen mit Puffer F wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0-500 mM NaCl in Puffer F eluiert. Säulenprofile wurden durch SDS-PAGE-Analyse nach Coomassie-Färbung erstellt. Fraktionen, die $G\beta_5$ /RGS-Komplexe enthielten, wurden vereinigt, auf das fünffache Volumen mit Puffer I verdünnt und auf eine Source 15Q Säule 2 ml geladen. Nach Waschen mit Puffer I wurden gebundene Proteine mit einem linearen Gradienten von 0-500 mM NaCl in Puffer I eluiert. Bei dem nächsten Schritt wurden vereinigte und mit dem Puffer F fünffach verdünnte Fraktionen, die etwa 90% der eluierten $G\beta_5$ /RGS-Komplexe enthielten auf eine 1 ml Source 15S Säule geladen. Nach Waschen mit Puffer F wurden gebundene Proteine mit einem linearen Gradienten von 0-500 mM NaCl in Puffer F eluiert und à 0,5 ml fraktioniert. Die Ausbeute lag bei etwa 2 mg $G\beta_5$ /RGS-Komplexen mit einer Höchstkonzentration von 2 mg/ml. Vor den funktionellen Untersuchungen wurde mittels Gelfiltration zusätzlich geprüft, ob $G\beta_5$ und RGS-Proteine tatsächlich als heterodimere Komplexe vorliegen und keine Puffer- bzw. Lagerungs-bedingte Dissoziation auftritt (Abb. 24).

Reinigungs-schritt	Verwendete Säule	Geladenes Gesamtvolumen [ml]	Geladene Proteinmenge [mg]	Ausbeute [mg]	Nach der Fraktionierung erzielte Reinheit [%]
1	SP-Sepharose (20 ml)	400	320	~6	~20
2	Resource Q-30 (2 ml)	20	16	~3	~60
3	Resource S-15 (1 ml)	2,5	2,5	2	~95

Tab. 5: Übersicht der Reinigung der rekombinanten G β ₅/RGS6-Komplexe

Die Proteinmenge in den Fraktionen bzw. erzielte Reinheit wurden densitometrisch von Coomassie-gefärbten SDS-Gelen ermittelt (4.1.1.) Rinderserum-Albumin (BSA) wurde als Standard verwendet. Da G β ₅/RGS6- bzw. G β ₅/RGS7-Komplexe ähnliche chromatographische Eigenschaften haben, war die Ausbeute bzw. Reinheit nach den entsprechenden Reinigungsschritten bei beiden Proteinkomplexen vergleichbar.

4.3.6 Reinigung der G γ ₂-Untereinheit

Puffer J: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 0,37 % Octylthioglukosid und 10 mM β -ME, pH 8,0

Puffer K: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % C₁₂E₁₀ und 10 mM β -ME, pH 8,0

Sf9-Zellen wurden mit Baculoviren, die für G β ₁ γ ₂-His, G β ₁ γ ₂(C68S)-His oder G β ₂-His γ ₂ kodieren, infiziert. Der Membranextrakt wurde wie in Kapitel 4.3.2.1 beschrieben, präpariert und auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule geladen. Nach Waschen der Säule wurden die Komplexe mit Puffer J (8 CV) eluiert und einem Einfrier-Auftau-Zyklus unterzogen. Bei diesem Verfahren dissoziieren die G β γ -Komplexe in ihre monomeren Untereinheiten, wobei die G β -Untereinheit ausfällt und die G γ -Untereinheit löslich bleibt. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (14.000 x g) wurden die G γ -haltigen Überstände mittels Gelfiltration (z.B. Sephadex 25; CV 5ml) in Puffer K umgepuffert.

4.3.7 Gewinnung von subzellulären Fraktionen aus Hirngewebe

PBS:	0,9 % (w/v) NaCl, 1,5 g/l NaH ₂ PO ₄ , pH 8
Homogenisierungspuffer:	250 mM Saccharose, 20 mM Tris-Cl pH 8, 4 mM EDTA, 20 mM (β-ME)
Puffer L:	20 mM Tris, 31,25 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM β-ME, pH 8,0
Extraktionspuffer:	20 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA, 20 mM β-ME, 80 mM NaCl

Das Hirn eines frisch geschlachteten Rindes wurde nach Entfernen der Arachnoidea in kleine Stücke zerschnitten und mit 4 l PBS gewaschen. Das Gewebe wurde dann in 4 l Homogenisierungspuffer aufgenommen und im Waring-Homogenisator zerkleinert. Im Anschluß daran erfolgte der Aufschluß der Zellen mit Hilfe eines rotierenden Teflonstempels in einem 100 ml Potter-Elvehjem-Glas-Zylinder. Nach Homogenisierung mit dem Ultra-Thurrax wurde zur Entfernung nicht aufgeschlossenen Gewebes das Homogenat in einem Kontron TGA 6-Rotor bei 125 x g für 15 min zentrifugiert. Das entstandene weiße Membranpellet wurde dann zusammen mit dem Überstand mit Puffer L 1:1 verdünnt und für 30 min zentrifugiert (Rotor Beckmann A 6.14, 14.000 x g). Der Überstand wurde anschließend für 40 min ultrazentrifugiert (Rotor TI-70, 100.000 x g). Der entstandene Überstand (Cytosol) wurde 1:4 in Puffer I verdünnt und sofort weiter verwendet. Der Niederschlag wurde in 8 l Puffer L aufgenommen, mit dem Ultra-Thurrax homogenisiert und erneut pelletiert. Nach erneutem Homogenisieren in etwa 1,5 bis 2 l Puffer I erfolgte der Zusatz einer 10 %igen (w/v) Lösung C₁₂E₁₀ (pH 8), so dass sich eine Endkonzentration von 0,5 % (w/v) C₁₂E₁₀ ergab. Die Lösung wurde 2 Stunden bei 4 °C gerührt und anschließend 1:1 mit Extraktionspuffer verdünnt und ultrazentrifugiert (Rotor TI-70, 100.000 x g). Der entstandene Überstand (Membranextrakt) wurde sofort für die Reinigung verwendet.

4.3.8 Reinigung nativer Gβ₅/RGS-Komplexe aus Rinderhirn

Puffer M: 20 mM Tris, 150mM NaCl, 10 mM β-ME, pH 8

Native Gβ₅/RGS-Komplexe wurden aus Rinderhirncytosol durch ein sequentielles, mehrstufiges, säulenchromatographisches Verfahren isoliert (Cabrera et al., 1998). Die cytosolische Fraktion (2400 ml) aus 2 Rinderhirnen (0,64 mg/ml Protein in Puffer L) wurde

auf eine Q-Sepharose Säule (300 ml) geladen. Nach Waschen mit Puffer I wurden die gebundenen Proteine mit einem 10 Säulenvolumina umfassenden linearen Gradienten von 0-500 mM NaCl in Puffer I eluiert.

Im Anschluß an die Immunoblotanalyse des Säulenprofils wurden entsprechende Fraktionen vereinigt, auf das fünffache Volumen mit Puffer F verdünnt und auf eine 8 ml Source 15S Säule (HR 10/10) geladen. Nach dem Waschen mit Puffer F wurden die gebundenen Proteine mit einem 10 Säulenvolumina umfassenden linearen Gradienten von 0-500 mM NaCl in Puffer F eluiert. Im Anschluß an die Immunoblotanalyse des Säulenprofils wurden die Peakfraktionen vereinigt und mittels eines Centricon-10 Konzentrators von 6 ml auf etwa 0,5 ml aufkonzentriert. Ein Teil dieser konzentrierten Fraktion (0,2 ml) wurde im nächsten Schritt auf eine Gelfiltrationsäule (Superdex 200, HR 10/30) geladen und isokratisch in Puffer M eluiert. Das scheinbare Molekulargewicht der detektierten Proteinkomplexe wurde mit Hilfe von Standardproteinen ermittelt (siehe 4.3.4). Für die weiteren Untersuchungen wurden Fraktionen verwendet, die Proteinkomplexe mit einem Molekulargewicht von 100 kDa enthielten. G β ₅/RGS-Komplexe wurden mittels Immunoblotverfahren identifiziert und nach elektrophoretischer Auftrennung mit anschließender Coomassie-Färbung (4.3.1) quantifiziert. Die Ausbeute der so gereinigten G β ₅/RGS-Komplexe lag bei ungefähr 4 μ g, bei einer Höchstkonzentration von 3 μ g/ml (Tab. 6).

Reinigungsschritt	Verwendete Säule	Geladenes Gesamtvolumen [ml]	Geladene Proteinmenge [mg]	Ausbeute [μ g]	Nach der Fraktionierung erzielte Reinheit [%]
1	Q-Sepharose (300 ml)	2400	1540	n. b.	n. b.
2	Source S-15 (8 ml)	75	68	n. b.	n. b.
3	Centricon 10 Konzentrator	6	0,75	n. b.	n. b.
4	Superdex 200 (24 ml)	0,2	0,3	~4	~75 %

Tab. 6: Übersicht der Reinigung der nativen G β ₅/RGS-Komplexe.

Die Proteinmenge wurde nach BCA-Methode bestimmt (4.1.1). Die Menge der G β ₅/RGS-Komplexen und Reinheit der Präparation wurde nach dem letzten Reinigungsschritt densitometrisch bestimmt (4.1.1). n. b.: nicht bestimmt.

Bei den angereinigten Komplexen handelt es sich wahrscheinlich um ein Gemisch aus unterschiedlich posttranslational modifizierten G β ₅/RGS6- und G β ₅/RGS7-Komplexen (Zhang und Simonds, 2000). Man beachte zwei immunoreaktiven Banden auf dem anti-RGS Blotstreifen und korrespondierenden Banden auf Coomassie Blue SDS-Gel (Abb. 21), die wegen der Kreuzreaktivität der anti-RGS6- bzw. anti-RGS7-Antikörper nicht eindeutig einzuordnen waren. Die gereinigten Proteine wurden bei -70 °C gelagert

Das verwendete Reinigungsverfahren ist nicht optimal für die präparative Isolation von G β ₅/RGS6- und G β ₅/RGS7-Komplexen. Zukünftig sollte für die präparative Isolation von G β ₅/RGS6- und G β ₅/RGS7-Komplexen aus Geweben eine Kationenaustauschmatrix bei dem ersten Reinigungsschritt gewählt werden (4.3.5).

4.4 *G-Protein-Funktionsbestimmung*

4.4.1 *Bestimmung der Assoziation von G-Proteinen mit Phospholipid-Vesikeln*

Puffer N: 40 mM HEPES, pH 7,4, 120 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 7 mM MgCl₂, 1 mM β -glycerophosphate, 0.01 % BSA

Eine grundlegende Eigenschaft von G-Proteinen ist ihre Assoziation mit Lipidmembranen der Zelle. Diese Eigenschaft kann auch an künstlichen Phospholipid-Vesikeln untersucht werden, die einen Ersatz für biologische Membranen darstellen.

Bei einem Standardansatz wurden zu 100 μ l einer Lipidvesikelsuspension (320 μ M PtdEtn, 300 μ M PtdSer, 140 μ M PtdCho, 30 μ M Sphingomyelin) in Puffer N das gereinigte G β ₅, G β ₅ γ ₂-His, G β ₁ γ ₂-His oder G β ₁ γ ₂(C68S)-His (jeweils 1 - 2 μ g) zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation dieser Vesikel-Protein Mischung bei 37 °C wurden die Proben auf Eis gestellt (2 min) und anschließend zentrifugiert (1000 x g, 4 °C, 2 min). Dabei werden Lipidvesikel mit gebundenen Proteinen sedimentiert und nicht gebundene Proteine verbleiben in dem Überstand. Das Lipidsediment, die Vesikel-Protein Mischung (Suspension) und der Überstand (1/10 von Gesamtvolumen) wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung visualisiert und quantifiziert.

4.4.2 *Nachweis der Bildung von G-Protein-Komplexen durch chromatographische Verfahren*

Puffer O: Puffer K, der 20 mM Imidazol enthält

Diese Methode beruht auf einer Koreinigung bzw. Koelution derjenigen Proteinen, die sich an der Komplexbildung beteiligen. Streng genommen kann nicht jede Koelution der untersuchten Proteinen als Indikator für ihre Assoziation betrachtet werden. Denn oft können Proteine zufällig ein ähnliches oder sogar gleiches Elutionsverhalten aufweisen. Dieses Problem kann folgendermaßen gelöst werden:

1) Bei rekombinanten Proteinen wird ein Affinitätsmarker eingefügt, der zu einer selektiven Bindung des markierten Proteins an die Affinitätsmatrix führt, während die nicht markierten Proteine üblicherweise eine wesentlich geringere Affinität zu dieser Matrix aufweisen. Die unterschiedlichen Affinitäten zu der Matrix bzw. Säule äußert sich schließlich in dem unterschiedlichen Retentions- bzw. Elutionsverhalten markierter und nicht markierter Proteine, sofern sie miteinander nicht interagieren.

In einem typischen Experiment wurden die zu untersuchenden Proteine mit $G\gamma_{2-His}$ in 0,5-1 ml Puffer M, der zusätzlich 20 mM Imidazol enthielt, bei 4°C 15-30 min inkubiert und auf eine mit Puffer M äquilibrierte Ni-NTA-Agarose-Säule (200 μ l CV) geladen. Nach dem Waschen der Säule mit Puffer M (5-10 CV) wurden spezifisch gebundene Proteine (in diesem Fall $rG\gamma_{2-His}$) mit 200 mM Imidazol in Puffer M eluiert. Die so erhaltenen Eluate wurden mit Hilfe des Immunoblotverfahren analysiert. Eine Koelution des affinitätsmarkierten Proteins (in diesem Fall $G\gamma_{2-His}$) mit Proteinen, die keine Affinitätsmarkierung tragen, wird als spezifische Komplexbildung interpretiert.

2) Bei nativen Proteinen bzw. Proteinen, die keine Affinitätsmarkierung tragen, kann die Koelution verschiedener Proteine erst dann als spezifische Assoziation interpretiert werden, wenn sie an mehreren chromatographischen Medien auftritt. Dabei sollen chromatographische Verfahren gewählt werden, die auf alternativen Trennprinzipien beruhen (z.B. Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, Immunpräzipitation, hydrophobe Interaktions-Chromatographie) (s. 4.3.5).