

Interaktionspartner der α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins, $G\alpha_s$

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich
Chemie, Biologie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

von
Kathrin Klass
aus Rathenow

Juni 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Walter Rosenthal
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke
Institut für Chemie - Biochemie
Freie Universität Berlin
Takustraße 6, 14195 Berlin

eingereicht am: 24.06.2008

Disputation am: 15.12.2008

1	Einleitung	11
1.1	Heterotrimere G-Proteine	11
1.1.1	<i>Gα-Untereinheiten</i>	<i>11</i>
1.1.2	<i>Gβ- und Gγ-Untereinheiten</i>	<i>12</i>
1.1.3	<i>Das Heterotrimer</i>	<i>13</i>
1.1.4	<i>Standardmodell der Signaltransduktion</i>	<i>14</i>
1.1.5	<i>Regulation der Signaltransduktion</i>	<i>15</i>
1.1.6	<i>Grenzen des Modells</i>	<i>20</i>
1.2	Bedeutung und Eigenschaften des stimulatorischen G-Proteins	21
1.2.1	<i>Spleiβvarianten des Gα_s</i>	<i>22</i>
1.2.2	<i>Posttranslationale Modifikationen</i>	<i>23</i>
1.2.3	<i>Molekulare Struktur des Gα_s</i>	<i>24</i>
1.3	Signalwege des G α_s	26
1.3.1	<i>Intrazelluläre Lokalisation</i>	<i>26</i>
1.3.2	<i>Interaktionspartner von Gα_s</i>	<i>27</i>
1.3.3	<i>RGS-Proteine als Interaktionspartner von G-Proteinen</i>	<i>29</i>
1.4	Suche nach Interaktionspartnern von G α_s	30
1.4.1	<i>yeast-two-hybrid-Versuche</i>	<i>30</i>
1.4.2	<i>Affinitätsreinigung von Proteinkomplexen</i>	<i>31</i>
2	Zielsetzung	33
3	Material	34
3.1	Chemikalien	34
3.2	Verbrauchsmaterialien	35
3.3	Puffer und Lösungen	35
3.3.1	<i>Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese</i>	<i>36</i>
3.3.2	<i>Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot</i>	<i>36</i>
3.3.3	<i>Lösungen für Coomassie Blau-Färbung</i>	<i>36</i>
3.3.4	<i>Lösungen für Silberfärbung</i>	<i>36</i>
3.3.5	<i>Sonstige Lösungen</i>	<i>36</i>
3.4	Enzyme und Reaktionssysteme	37
3.5	Antikörper	37
3.6	Vektoren, Plasmide und Oligonukleotide	38
3.7	Zelllinien, Bakterienstämme und Kulturmedien	40
3.7.1	<i>Verwendete Bakterienstämme</i>	<i>40</i>
3.7.2	<i>Verwendete Säuger- und Insektenzelllinien</i>	<i>40</i>
3.7.3	<i>Medien und Lösungen für Bakterienkultivierung</i>	<i>40</i>

3.7.4	<i>Medien und Lösungen für Säuger- und Insektenzellkultivierung</i>	41
3.8	Geräte und Sonstiges	42
4	Methoden	43
4.1	Molekularbiologische Methoden.....	43
4.1.1	<i>Plasmidpräparation (analytischer Maßstab)</i>	43
4.1.2	<i>Plasmidpräparation (präparativer Maßstab)</i>	43
4.1.3	<i>Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	44
4.1.4	<i>Ligation</i>	44
4.1.5	<i>DNA-Sequenzierung nach Sanger</i>	44
4.1.6	<i>Herstellung der Expressionsplasmide für Gα_s-Mutanten</i>	45
4.1.6.1	Herstellung von G α _s -s4yHis/pQE60	45
4.1.6.2	Herstellung von G α _s -s4CH/pQE60.....	47
4.1.6.3	Herstellung von G α _s -s4XHS/pQE60.....	48
4.1.6.4	Herstellung der TAP-modifizierte G α _s -Konstrukte	50
4.1.7	<i>Herstellung von RGS-PX1-Expressionsplasmiden</i>	53
4.1.7.1	Herstellung von His ₆ -FLAG-moRGS-PX1/NpT7-5.....	53
4.1.7.2	Herstellung von His ₆ -FLAG-huRGS-PX1/pQE60	54
4.2	Zellbiologische Methoden	54
4.2.1	<i>Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen</i>	54
4.2.2	<i>Herstellung chemisch superkompetenter Bakterienzellen</i>	55
4.2.3	<i>Hitzeschocktransformation von Bakterienzellen</i>	55
4.2.4	<i>Kultivierung und Propagation eukaryotischer Zellen</i>	56
4.2.5	<i>Amplifikation von Baculoviren</i>	56
4.3	Heterologe Proteinexpression	56
4.3.1	<i>Proteinexpression in Bakterienzellen</i>	56
4.3.2	<i>Aufschluß von Bakterienzellen</i>	57
4.3.3	<i>Proteinexpression in Säugerzelllinien</i>	57
4.3.4	<i>Proteinexpression in Insektenzelllinien</i>	58
4.3.5	<i>Aufschluß von eukaryotischen Zellen</i>	58
4.3.6	<i>Membranpräparation und -extraktion</i>	59
4.4	Biochemische und analytische Methoden	60
4.4.1	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i>	60
4.4.2	<i>Konzentrierung von Proteinen durch Fällung</i>	60
4.4.3	<i>Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen</i>	61
4.4.4	<i>Färbemethoden für SDS-Polyacrylamid-Gele</i>	62
4.4.4.1	Coomassie-Blau-Färbung	62
4.4.4.2	Silberfärbung.....	62
4.4.5	<i>Immunchemische Detektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine</i>	62
4.4.6	<i>Funktionsanalyse von Proteinen</i>	63
4.4.6.1	Adenylylcyclase-Assay.....	63
4.4.6.2	cAMP-Akkumulations-Assay	64

4.4.6.3	GTP γ S-Bindungsassay	65
4.4.6.4	„Single-turnover-GTPase“-Assay	65
4.4.6.5	„Steady-State-GTPase“-Assay	66
4.5	Chromatographische Methoden	67
4.5.1	<i>Chromatographische Reinigung von [γ^{32}P]-GTP</i>	<i>67</i>
4.5.2	<i>Reinigung von Gα_s-s4</i>	<i>67</i>
4.5.3	<i>Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)</i>	<i>69</i>
4.5.4	<i>StrepTactin-Affinitätschromatographie</i>	<i>71</i>
4.5.5	<i>Glutathion-Affinitätschromatographie</i>	<i>71</i>
4.5.6	<i>Tandem Affinitäts-Reinigung (Tandem Affinity Purification, TAP)</i>	<i>71</i>
4.6	Proteinidentifizierung mittels Tandem-Massenspektrometrie	73
4.6.1	<i>Ablauf eines Experimentes</i>	<i>73</i>
4.6.2	<i>Durchführung</i>	<i>74</i>
5	Ergebnisse	76
5.1	Reinigung von Gα_s für Interaktionsstudien	76
5.1.1	<i>Reinigung von C-terminal epitopmarkiertem Gα_s</i>	<i>76</i>
5.1.2	<i>Reinigung von intern modifiziertem Gα_s-s4</i>	<i>79</i>
5.1.3	<i>Reinigung von Gα_s-s4</i>	<i>83</i>
5.1.4	<i>Zusammenfassung</i>	<i>84</i>
5.2	RGS-PX1 als Interaktionspartner von Gα_s	85
5.2.1	<i>BLAST-Suche, Klonierung und Expression von Maus-RGS-PX1</i>	<i>85</i>
5.2.2	<i>Reinigung von Maus-RGS-PX1</i>	<i>86</i>
5.2.3	<i>Funktionelle Interaktion von RGS-PX1 und Gα_s-s4</i>	<i>88</i>
5.2.3.1	<i>Maus-RGS-PX1</i>	<i>88</i>
5.2.3.2	<i>Humanes RGS-PX1</i>	<i>89</i>
5.2.4	<i>Zusammenfassung</i>	<i>91</i>
5.3	Charakterisierung von Interaktionspartnern des Gα_s in Säugerzellen	91
5.4	Interaktionspartner des Gα_s aus Säugerzellen: in vitro-Untersuchung	93
5.4.1	<i>Reinigung des Köderproteins Gα_s-s4-XHS</i>	<i>94</i>
5.4.2	<i>Heterotrimerbildung mit G$\beta\gamma$</i>	<i>96</i>
5.4.2.1	<i>Heterotrimerbildung mit isoliertem G$\beta\gamma$</i>	<i>97</i>
5.4.2.2	<i>Heterotrimerbildung mit G$\beta\gamma$ aus Zellmembranextrakten</i>	<i>98</i>
5.4.3	<i>Charakterisierung von Gα_s-bindenden Proteinen aus wtS49-Zellen</i>	<i>100</i>
5.4.3.1	<i>Membranständige Proteine</i>	<i>101</i>
5.4.3.2	<i>Lösliche Proteine</i>	<i>102</i>
5.4.3.3	<i>Massenspektrometrische Analyse</i>	<i>103</i>
5.4.4	<i>Zusammenfassung</i>	<i>105</i>
5.5	Interaktionspartner des Gα_s aus Säugerzellen: in vivo-Untersuchung	106
5.5.1	<i>Tandem Affinity Purification</i>	<i>106</i>
5.5.2	<i>Herstellung der Gα_s-TAP-Konstrukte</i>	<i>107</i>

5.5.3	<i>Charakterisierung der Gα_s-TAP-Fusionsproteine</i>	108
5.5.3.1	Expression der G α_s -TAP-Fusionsproteine	108
5.5.3.2	Signaltransduktion der G α_s -TAP-Fusionsproteine.....	109
5.5.3.3	Heterotrimerbildung der G α_s -TAP-Fusionsproteine.....	111
5.5.4	<i>Isolierung Gα_s-enthaltender Proteinkomplexe</i>	112
5.5.4.1	Analytischer Maßstab.....	112
5.5.4.2	Präparativer Maßstab.....	114
5.5.4.3	Massenspektrometrische Analyse.....	115
5.5.5	<i>Unabhängig vom Gα_s-Aktivierungszustand interagierende Proteine</i>	117
5.5.6	<i>Gα_s-s4-GDP-spezifische Interaktionspartner</i>	117
5.5.6.1	Interaktion von G α_s -s4-GDP mit G γ -Isoformen.....	120
5.5.6.2	Charakterisierung der Interaktion von G α_s mit G γ_{10} und G γ_{12}	122
5.5.7	<i>Charakterisierung Gα_s-AlF$_4^-$-enthaltender Proteinkomplexe</i>	125
5.5.7.1	Charakterisierung der Interaktion von G α_s und Calmodulin	128
5.5.7.1.1	Nachweis der Interaktion mit isolierten Komponenten.....	128
5.5.7.1.2	Funktionelle Charakterisierung der Interaktion von G α_s und Calmodulin	131
5.5.7.2	Charakterisierung der Interaktion von G α_s und 14-3-3-Proteinen	133
5.5.7.2.1	Nachweis der Interaktion mit isolierten Komponenten.....	135
5.5.7.2.2	Interaktion von 14-3-3 mit G α_s aus Säugerzellen.....	136
5.5.8	<i>Zusammenfassung</i>	137
6	Diskussion	138
6.1	Reinigung von G α_s	138
6.1.1	<i>Verwendung von internen Affinitäts-tags</i>	139
6.1.2	<i>Verwendung von Terminalen Affinitäts-tags</i>	142
6.1.3	<i>Schlußfolgerungen</i>	143
6.2	Charakterisierung G α_s -spezifischer Interaktionspartner	144
6.2.1	<i>In vitro-Ansatz mit Gα_s-s4-XHS</i>	144
6.2.2	<i>In vivo-Ansatz mit NTAP-Gα_s-s4</i>	147
6.3	Interaktionspartner des G α_s	149
6.3.1	<i>RGS-PX1 und Gα_s</i>	149
6.3.2	<i>G$\beta\gamma$-Komplexe</i>	152
6.3.3	<i>Calmodulin</i>	155
6.3.4	<i>14-3-3-Proteine</i>	157
6.4	Ausblick	159
7	Zusammenfassung	160
8	Summary	161
9	Literatur	162
Anhang	172

Verwendete Abkürzungen und Fachbegriffe.....	172
Eigene Veröffentlichungen	174
Eidesstattliche Erklärung	175
Danksagung	176

1 Einleitung

Heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine („G-Proteine“) nehmen eine zentrale Stellung in der zellulären Signalübertragung ein und sind für alle höheren Lebewesen von essentieller Bedeutung. Eine Vielzahl extrazellulärer Signale (z.B. Photonen, Hormone, Duftstoffe, Neurotransmitter) werden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) in der Plasmamembran aufgenommen und an Effektoren weitergeleitet, die ihrerseits intrazelluläre Signale (z.B. Veränderung der Konzentration sekundärer Botenstoffe wie Ca^{2+} oder cAMP) auslösen. G-Proteine wirken dabei als Transmitter zwischen Rezeptoren und Effektoren.

Das erste gut untersuchte Rezeptor-Effektor-System war das des β -adrenergen Rezeptors in der Maus-Lymphomzelllinie S49. Die hormonelle Stimulation des Rezeptors führt zu einem Anstieg der Konzentration des intrazellulären Botenstoffs cAMP, der vom Effektor Adenylylcyclase generiert wird. Im Modell ging man zunächst von einer direkten Interaktion zwischen Rezeptor und Effektor aus, jedoch wurde später anhand von Untersuchungen in mutierten S49-Zellen ein GTP-abhängiger Transmitter entdeckt. Dieses Molekül ist das stimulatorische G-Protein Gs. Neben Gs wurden im Laufe der Zeit eine Reihe weiterer G-Proteine beschrieben, die die vielfältigen Funktionen G-Protein-vermittelter Prozesse in der zellulären Signaltransduktion aufzeigten.

1.1 Heterotrimere G-Proteine

Die Stimulation von GPCR führt zu einer Aktivierung heterotrimerer G-Proteine, die daraufhin die Aktivität einer Reihe von Enzymen oder Ionenkanälen regulieren. Die Familie der heterotrimeren G-Proteine gehört zur Superfamilie der GTPasen, zu der auch der ADP-Ribosylierungsfaktor Arf, monomere G-Proteine wie Ras und Rho sowie der Elongationsfaktor EF-Tu gehören (Clan CL0017, Panther Datenbank, <http://pfam.sanger.ac.uk>). Heterotrimere G-Proteine sind aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit aufgebaut. Ihre Eigenschaften und Funktionen werden nachfolgend beschrieben.

1.1.1 $G\alpha$ -Untereinheiten

Im menschlichen Genom sind 16 $G\alpha$ -Gene bekannt, die für 21 verschiedene $G\alpha$ -Proteine kodieren. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten können $G\alpha$ -Proteine in vier Familien unterteilt werden: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12/13}$ (Simon *et al.* 1991). Eine Übersicht über die verschiedenen G-Proteinfamilien und ihre Mitglieder sowie Beispiele für Rezeptoren und Effektoren werden in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1 Einteilung der G-Proteine in Familien. Spleißvarianten einzelner G α -Proteine (beispielsweise für G α_s) sind bei der Auflistung nicht berücksichtigt. Die Angaben wurden aus den *connection maps* der Webseite <http://stke.sciencemag.org> entnommen.

Familie	Mitglieder	koppelnde Rezeptoren (Beispiele)	Effektoren (Beispiele)
G α_s	G α_s G α_{off}	β -adrenerger Rezeptor, Glucagon-Rezeptor	Adenylylcyclase
G $\alpha_{i/o}$	G α_{i1} , G α_{i2} , G α_{i3} G α_o G α_{t-cone} G α_{t-rod} G α_{gust} G α_z	α - und β - adrenerger Rezeptor, Dopaminrezeptor, Melatoninrezeptor, Rhodopsin	Adenylylcyclase Phospholipase C Phosphodiesterase Rap1GAP
G α_q	G α_q G α_{11} G α_{14} , G α_{16}	Angiotensin-1-Rezeptor Vasopressin-1-Rezeptor	Phospholipase C, Proteintyrosinkinase
G $\alpha_{12/13}$	G α_{12} G α_{13}	Thromboxan-A2-Rezeptor Lysophosphatidylsäure-Rezeptor	Proteintyrosinkinase, RhoGEF, Ras1GAP

G α -Proteine haben ein Molekulargewicht von 39 – 52 kDa und besitzen GTP-Phosphohydrolase-Aktivität (EC 3.6.5.1), auf deren Grundlage sie als molekularer Schalter bei der zellulären Signaltransduktion fungieren. Sie tragen N-terminale Lipidmodifikationen, die von zentraler Bedeutung für die Membranlokalisierung des Heterotrimeren sowie für die Interaktion mit G $\beta\gamma$, GPCR und Effektoren sind (Evanko *et al.* 2000). Eine detaillierte Beschreibung der Lipidmodifikation speziell für G α_s wird in Abschnitt 1.2.2 gegeben.

1.1.2 G β - und G γ -Untereinheiten

G β und G γ bilden eine funktionelle Einheit, den G $\beta\gamma$ -Komplex. Dieser Komplex ist an der Membranlokalisierung der G α -Untereinheit beteiligt, fördert deren Interaktion mit GPCRs und stabilisiert G α in der GDP-gebundenen Form, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Rezeptor- oder Ligand-unabhängigen Aktivierung des G-Proteins minimiert wird.

Im humanen Genom sind 5 G β - und 12 G γ -kodierende Gene bekannt, das Molekulargewicht der kodierten Proteine liegt für G β zwischen 35 und 39 kDa, für G γ bei ca. 10 kDa.

Die Isoformen G β_1 -G β_4 zeigen untereinander eine hohe Sequenzähnlichkeit (80% Aminosäureidentität), G β_5 hingegen weist nur eine Aminosäureidentität von 53% im Vergleich zu den anderen G β -Isoformen auf. G β_5 wurde als einzige Isoform *in vivo* ohne assoziiertes G γ isoliert, darüber hinaus kann es mit anderen Molekülen der Signaltransduktion interagieren (z.B. mit *G γ -like* (GGL)-Domänen der RGS-Proteine,

Abschnitt 1.3.3, Snow *et al.* 1998). Die $G\gamma$ -Isoformen unterscheiden sich deutlich voneinander (Aminosäureidentität 27-75 %), jede der Isoformen ist jedoch spezieübergreifend hochkonserviert. Aufgrund der hohen Diversität der $G\gamma$ -Isoformen wird angenommen, dass sie für die funktionelle Spezifität der $G\beta\gamma$ -Komplexe verantwortlich sind. $G\gamma$ wird C-terminal isoprenyliert (Higgins und Casey 1994). Diese Lipidmodifikation ist von Bedeutung für die Membranlokalisierung des $G\beta\gamma$ -Komplexes, die Interaktion sowohl mit GPCR als auch mit Effektoren (Rahmatullah und Robishaw 1994; Cox 1995) und die Assoziation mit $G\alpha$ (Higgins und Casey 1994).

Bei der korrekten Expression, Assoziation und Lokalisation von $G\beta\gamma$ -Komplexen spielen akzessorische Proteine wie Chaperone, Phosducin bzw. das *Phosducin-like Protein* (PhIP) und *Dopamine Receptor-interacting Protein 78* (DRIP78) eine entscheidende Rolle (Mende *et al.* 1995; Humrich *et al.* 2005; Lukov *et al.* 2005; Dupre *et al.* 2007).

1.1.3 Das Heterotrimer

Alle G-Protein-Untereinheiten werden getrennt voneinander im Cytosol exprimiert und gelangen anschließend an die Plasmamembran. Bislang ist unklar, wie und wo $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ assoziieren, die Assoziation ist jedoch essentiell für die Plasmamembranlokalisierung beider Partner (Evanko *et al.* 2000; Evanko *et al.* 2001; Michaelson *et al.* 2002; Takida und Wedegaertner 2003). Auf die intrazelluläre Lokalisation des G_s -Heterotrimers wird in Abschnitt 1.3.1 näher eingegangen.

Die Zusammensetzung des Heterotrimers hat Einfluß auf die Spezifität und Effizienz der Signaltransduktion hinsichtlich seiner Interaktion mit Rezeptoren und Effektoren. Ursprünglich ging man davon aus, dass die Eigenschaften des Heterotrimers allein von der $G\alpha$ -Untereinheit bestimmt werden. Untersuchungen aus verschiedenen Laboren zeigen jedoch, dass auch die Zusammensetzung der $G\beta\gamma$ -Komplexe, insbesondere die $G\gamma$ -Untereinheit, Einfluss auf die Signaltransduktion hat. So erfolgt die Stimulation des Kir3.2-Kanals durch den β_1 -adrenergen Rezeptor am effektivsten über $G\alpha_s\beta_5\gamma_1$ und $\alpha_s\beta_5\gamma_2$, durch den β_2 -adrenergen Rezeptor jedoch über $G\alpha_s\beta_1\gamma_7$, $G\alpha_s\beta_1\gamma_{11}$ und $G\alpha_s\beta_5\gamma_2$. Alle $G\beta\gamma$ -Kombinationen stimulieren die Rezeptor-stimulierte GTPase von $G\alpha_s$ jedoch gleichermaßen (Robillard *et al.* 2000). Die Stimulation der Adenylylcyclase über den β_2 -adrenergen Rezeptor verläuft in HEK293-Zellen ausschließlich unter Beteiligung von $G\alpha_s\beta_1\gamma_7$, obwohl eine Reihe weiterer $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten exprimiert werden (Wang, Q. *et al.* 1999). Die Existenz distinkter Rezeptor – G-Protein-Komplexe wurde für eine Reihe weiterer Signaltransduktionssysteme beschrieben (Rebois und Hebert 2003). Das bedeutet, dass aus heutiger Sicht *in vivo* die Spezifität der intrazellulären Signaltransduktion wesentlich von der

Zusammensetzung der beteiligten Proteinkomplexe (Rezeptor, G-Protein) beeinflusst wird, während in *in vitro*-Untersuchungen kaum funktionelle Unterschiede feststellbar sind.

1.1.4 Standardmodell der Signaltransduktion

Zur Signaltransduktion heterotrimerer G-Proteine wurde anhand verschiedener experimenteller Befunde ein Modell entwickelt, das im folgenden vorgestellt wird.

Im Grundzustand liegen G-Proteine als Heterotrimere an der Plasmamembran in einem Komplex mit einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor vor. Die $G\alpha$ -Untereinheit hat in ihrem katalytischen Zentrum GDP gebunden (Abb. 1, Schritt 1). $G\beta\gamma$ verringert die spontane GDP-Dissoziation und wirkt als Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor (GDI, Brandt und Ross 1985, Higashijima *et al.* 1987), wodurch die $G\alpha$ -Untereinheit im Grundzustand stabilisiert wird. Die Bindung eines Liganden am Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung, die eine effektivere Interaktion des Rezeptors mit dem G-Protein ermöglicht. Der ligandenaktivierte Rezeptor wirkt als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor, GEF) und löst die Dissoziation des GDP vom katalytischen Zentrum der $G\alpha$ -Untereinheit aus. Nukleotidfreies $G\alpha$ bindet daraufhin GTP, das intrazellulär in höheren Konzentrationen als GDP vorliegt (Spiegel 2000) (Abb. 1, Schritt 2). Mit dem Nukleotidaustausch im $G\alpha$ einhergehende Konformationsänderungen mindern die Affinität von $G\alpha$ zu $G\beta\gamma$ und führen zur Dissoziation des $G\alpha\beta\gamma$ -Komplexes. Beide Komponenten sind nun in der Lage, mit einer Reihe von Effektormolekülen (z.B. Enzyme oder Ionenkanäle) zu interagieren, die wiederum sekundäre Botenstoffe (wie z.B. cAMP oder Ca^{2+}) generieren bzw. freisetzen (Abb. 1, Schritt 3). Aktiviertes $G\alpha$ kann sequenziell mehrere Effektormoleküle aktivieren und somit das Signal verstärken. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität des $G\alpha$ wird das im katalytischen Zentrum gebundene GTP zu GDP hydrolysiert, wodurch $G\alpha$ in den Grundzustand zurückkehrt und eine Reassoziations des Heterotrimers eingeleitet wird (Abb. 1, Schritt 4). Kritische Regulationspunkte für die Dauer der Zellantwort sind die Aktivierung des G-Proteins durch den liganden-stimulierten Nukleotidaustausch (Schritt 1) und die Deaktivierung durch die Hydrolyse des GTP am $G\alpha$ (Schritt 4). Der $G\alpha$ -Untereinheit kommt somit eine Schalter-Funktion bei der Signaltransduktion zu.

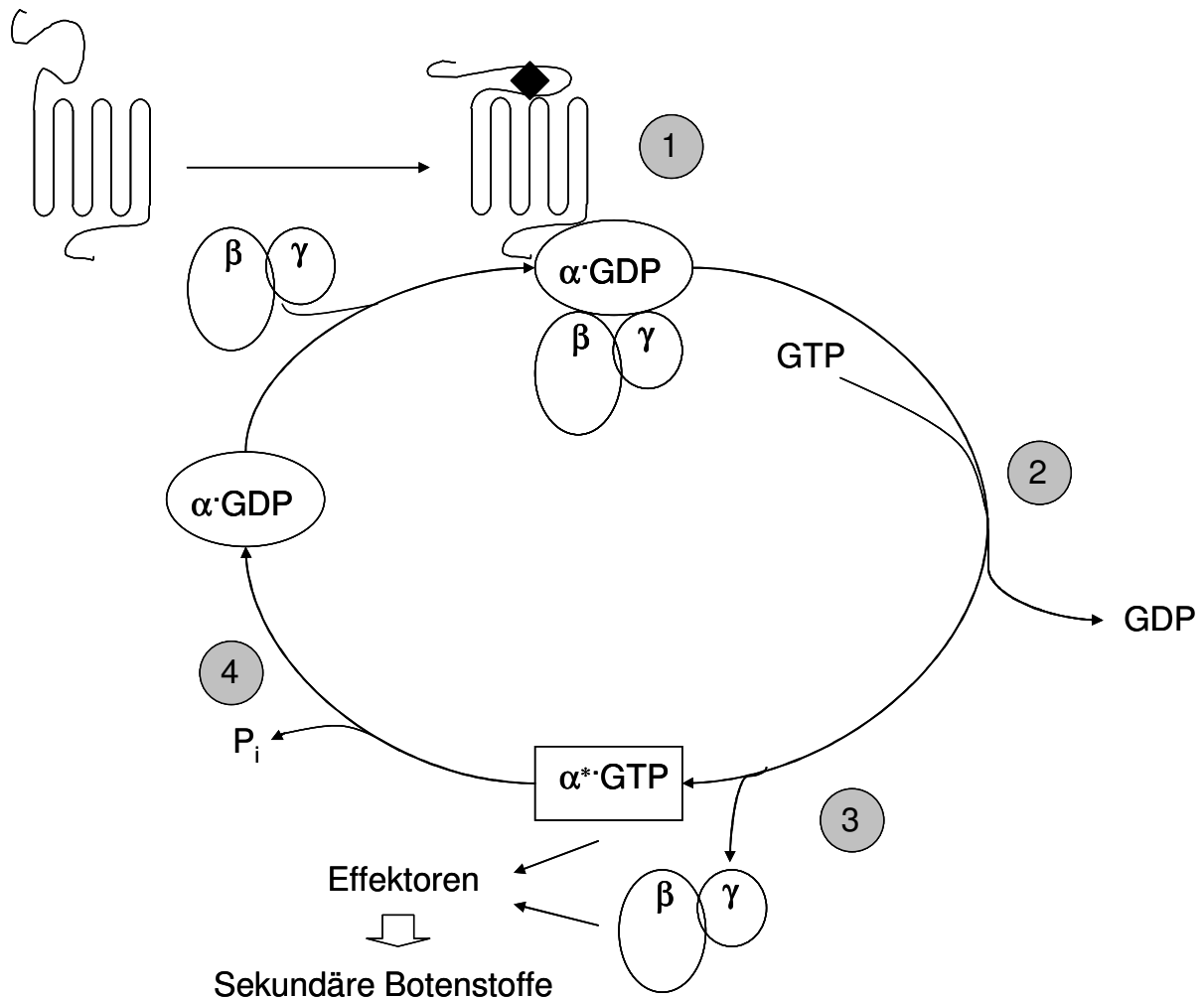


Abb. 1 Schematische Darstellung des GTPase-Zyklus heterotrimerer G-Proteine. Die Bindung eines Liganden durch den Rezeptor führt zu Konformationsänderungen im Rezeptor, die dessen Interaktion mit dem Heterotrimer verändern (Schritt 1). Der ligandenaktivierte Rezeptor schwächt die $G\alpha$ -GDP-Bindung und stimuliert dadurch den Nukleotidaustausch am $G\alpha$ (Schritt 2), der zur Aktivierung des $G\alpha$ führt und eine Dissoziation des Heterotrimeren nach sich zieht (Schritt 3). Sowohl $G\alpha$ als auch $G\beta\gamma$ sind in der Lage, mit Effektoren zu interagieren, die daraufhin sekundäre Botenstoffe erzeugen. Durch seine intrinsische GTPase-Aktivität kehrt $G\alpha$ in den Grundzustand zurück (Schritt 4) und reassoziert mit $G\beta\gamma$.

Rhombus: Ligand; α :GDP: $G\alpha$ im Grundzustand; α^* :GTP: aktiviertes $G\alpha$

1.1.5 Regulation der Signaltransduktion

Die Beeinflussung dieses GTPase-Zyklus an verschiedenen Stellen ermöglicht die genauere Charakterisierung der Funktionsweise heterotrimerer G-Proteine. Dafür werden beispielsweise bakterielle Toxine, nicht hydrolysierbare Guaninnukleotid-Analoga und Fluoro-Aluminat (AlF_4^-) verwendet (vgl. Abb. 2).

Das aus *Bordetella pertussis* isolierbare Pertussis-Toxin besitzt eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität, die den C-Terminus von $G\alpha_{i/o}$ kovalent modifiziert und damit eine Kopplung an den Rezeptor verhindert (Katada *et al.* 1986). Eine hormonelle Modulation des Effektors ist somit nicht mehr möglich. Cholera-Toxin aus *Vibrio cholerae* ist ebenfalls

eine ADP-Ribosyltransferase, die die α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins am Arginin 174 kovalent modifiziert. Dadurch wird dessen intrinsische GTPase-Aktivität gehemmt, so dass es konstitutiv aktiviert wird (Cassel und Selinger 1977, Kahn und Gilman 1986). Dies führt zu einer Dauerstimulation des Effektors Adenylylcyclase und dadurch zu einer stark erhöhten Konzentration des intrazellulären Botenstoffs cAMP. In Darmepithelzellen, die mit *V. cholerae* befallen sind, kommt es dadurch zu einem massiven Transport von Chloridionen in das Darmlumen verbunden mit einem osmotischen Wasserverlust in den Zellen. Sowohl Pertussis- als auch Cholera toxin werden *in vitro* verwendet, um $G\alpha_i$ - bzw. $G\alpha_s$ -vermittelte Prozesse zu untersuchen.

Der Einsatz des nicht hydrolysierbaren Nukleotidanalogs $GTP\gamma S$ ermöglicht ebenfalls Untersuchungen an konstitutiv aktivierten $G\alpha$ -Proteinen. Es kann bei einem Nukleotidaustausch anstelle von GDP gebunden werden, die Hydrolyse erfolgt jedoch so langsam, dass $G\alpha$ dadurch sehr lange in einem Übergangszustand verbleibt (aktivierter Zustand, vgl. Abb. 2).

Zur Untersuchung der Signaltransduktion von konstitutiv aktiven $G\alpha$ -Proteinen kann auch AlF_4^- verwendet werden. AlF_4^- bildet einen quadratisch-planaren Komplex, der mit $G\alpha:GDP$ assoziiert und die Position des γ -Phosphats des GTP einnimmt. Dadurch wird ein beim Phosphoryltransfer auftretender Übergangszustand des $G\alpha$ -Moleküls imitiert (zusammengefasst von Wittinghofer 1997). Durch röntgenkristallographische Strukturaufklärung der entsprechenden Komplexe wurde ersichtlich, dass der $GTP\gamma S$ - und der AlF_4^- -aktivierte Zustand eines $G\alpha$ -Proteins nicht identisch sind, sondern unterschiedliche Übergangszustände des $G\alpha$ während des Phosphoryltransfers einnehmen (Coleman *et al.* 1994). Dies äußert sich biochemisch darin, dass beispielsweise RGS-Proteine (auf die in einem der folgenden Kapitel genauer eingegangen wird) fast ausschließlich die AlF_4^- -aktivierte Form von $G\alpha$ -Proteinen, jedoch kaum die $GTP\gamma S$ -aktivierte Form binden (Sondek *et al.* 1994; Berman *et al.* 1996, Chen *et al.* 1996; Watson *et al.* 1996; Tesmer *et al.* 1997a, siehe auch S. 29).

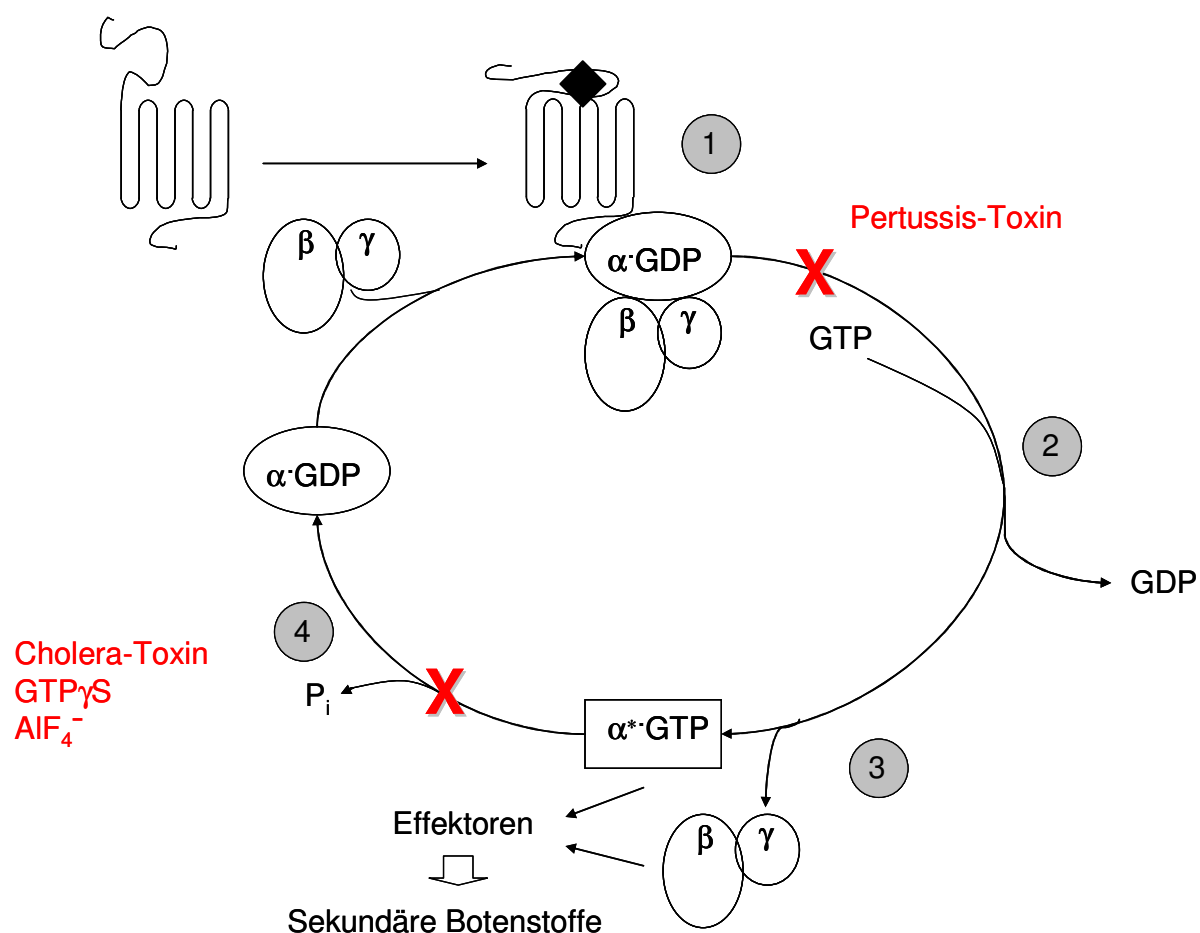


Abb. 2 Einfluß von bakteriellen Toxinen und Nucleotidanaloga auf den GTPase-Zyklus heterotrimerer G-Proteine. Eine ADP-Ribosylierung von $G\alpha_i$ durch Pertussistoxin unterbricht den Zyklus in Schritt 1. Es erfolgt kein ligandenstimulierter Nucleotidaustausch, d.h. die Signaltransduktion ist in diesem Fall von der basalen Nucleotidaustauschrate des $G\alpha_i$ abhängig, wodurch deutlich weniger sekundäre Botenstoffe generiert werden. Die ADP-Ribosylierung von $G\alpha_s$ durch Cholera-Toxin unterbricht den GTPase-Zyklus bei Schritt 4 durch die Inhibition der GTPase-Aktivität. $G\alpha_s$ bleibt daher im aktivierten Zustand, was zu einer kontinuierlichen Stimulation des Effektors Adenylylcyclase und somit zu pathologisch erhöhten Konzentrationen des sekundären Botenstoffes cAMP führt. Der Schritt 4 kann unabhängig von der G-Proteinklasse auch durch Verwendung von $GTP\gamma S$ oder AIF_4^- unterbunden werden.

GTPase-akzelerierende Proteine (GAP)

GTPase-akzelerierende Proteine binden an die aktivierte Form der $G\alpha$ -Untereinheit und stabilisieren einen während der Katalyse auftretenden Übergangszustand. $G\alpha$ kehrt schneller in den Grundzustand zurück und die Signaldauer wird somit verkürzt. Das erste als GAP identifizierte Protein war die γ -Untereinheit der Phosphodiesterase, $PDE\gamma$, der Effektor des Transducin (Arshavsky und Bownds 1992).

Die Lichtaktivierung von Rhodopsin in Säuger-Stäbchenzellen führt zur Aktivierung des Transducin, dessen aktivierte α -Untereinheit an cGMP-gesteuerte Ionenkanäle (Phototransduktionskaskade) bindet und diese schließt. Ende der 1980er Jahre stellte man fest, dass die GTP-Hydrolyserate von Transducin in *Rod Outer Segment* (ROS)-Membranen wesentlich höher ist als die von Transducin in rekonstituierten Systemen (z.B. Arshavsky *et al.* 1989). Dieser Befund führte zu der Annahme, dass GTPase-akzelerierende Proteine (GAP) in den Stäbchen existieren müssen. Der Effektor, $PDE\gamma$, wurde als GAP identifiziert. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, dass $PDE\gamma$ allein nicht ausreicht, um die GTPase-Aktivität von Transducin ausreichend zu beschleunigen. Zusätzlich ist die Anwesenheit von RGS9 (**R**egulators of **G** protein **S**ignalling, s. auch Abschnitt 1.3.3) erforderlich, $PDE\gamma$ verstärkt dabei die GAP-Wirkung des RGS-Proteins (He *et al.* 1998).

Auch in anderen Fällen wurde bestätigt, dass Effektoren von $G\alpha$ -Proteinen eine GAP-Aktivität aufweisen und somit in Form einer Rückkopplung auf die $G\alpha$ -Untereinheit die Signaldauer verkürzen. In Säugerzellen wurde für $PLC\beta$ -1 (Effektor des $G\alpha_q$, Berstein *et al.* 1992, Biddlecome *et al.* 1996), später auch für $G\alpha_s$ und seinen Effektor Adenylylcyclase eine solche Beziehung gezeigt (Scholich *et al.* 1999).

Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF)

Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (**G**uanine nucleotide **E**xchange **F**actors, GEF) beschleunigen die Guaninnukleotid-Austauschrate der $G\alpha$ -Proteine und führen so zum Anschalten der Signaltransduktionskaskade (Abb. 3, Schritt 1). Der klassische GEF ist der ligandenaktivierte Rezeptor, der das Heterotrimer bindet. Andere GEF, z.B. das Protein Ric-8A (Tall *et al.* 2003), binden jedoch nicht das Heterotrimer, sondern die $G\alpha$:GDP-Untereinheit. Damit Ric-8A als GEF agieren kann, ist demnach ein initialer Nukleotidaustausch erforderlich, der zur Aktivierung und Dissoziation des Heterotrimers und seiner Inaktivierung führt, ohne dass es zu einer Re-Assoziation des Heterotrimers kommt. Bislang ist jedoch unklar, wie – abgesehen vom Basalaustausch - dieser initiale Nukleotidaustausch in Abwesenheit eines ligandenaktivierten GPCR eingeleitet wird.

Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDI)

Der klassische Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor ist der $G\beta\gamma$ -Komplex (Higashijima *et al.* 1987). Neben $G\beta\gamma$ binden auch andere Proteine wie z.B. AGS3 an die GDP-gebundene Form von $G\alpha$ und verringern den Nukleotidaustausch im $G\alpha$. Die Kontaktfläche von AGS3 und $G\alpha$ überlappt teilweise mit der $G\beta\gamma$ -Bindungsstelle, so dass $G\beta\gamma$ - und AGS3-Bindung sich daher gegenseitig ausschließen. Ein GDI kann theoretisch auf diese Weise die Verfügbarkeit von freiem $G\beta\gamma$ in der Zelle und somit dessen Signaldauer unabhängig vom Aktivierungszustand des $G\alpha$ verlängern.

Die Angriffspunkte für GEFs, GAPs und GDIs im Signalzyklus sind schematisch in Abb. 3 dargestellt.

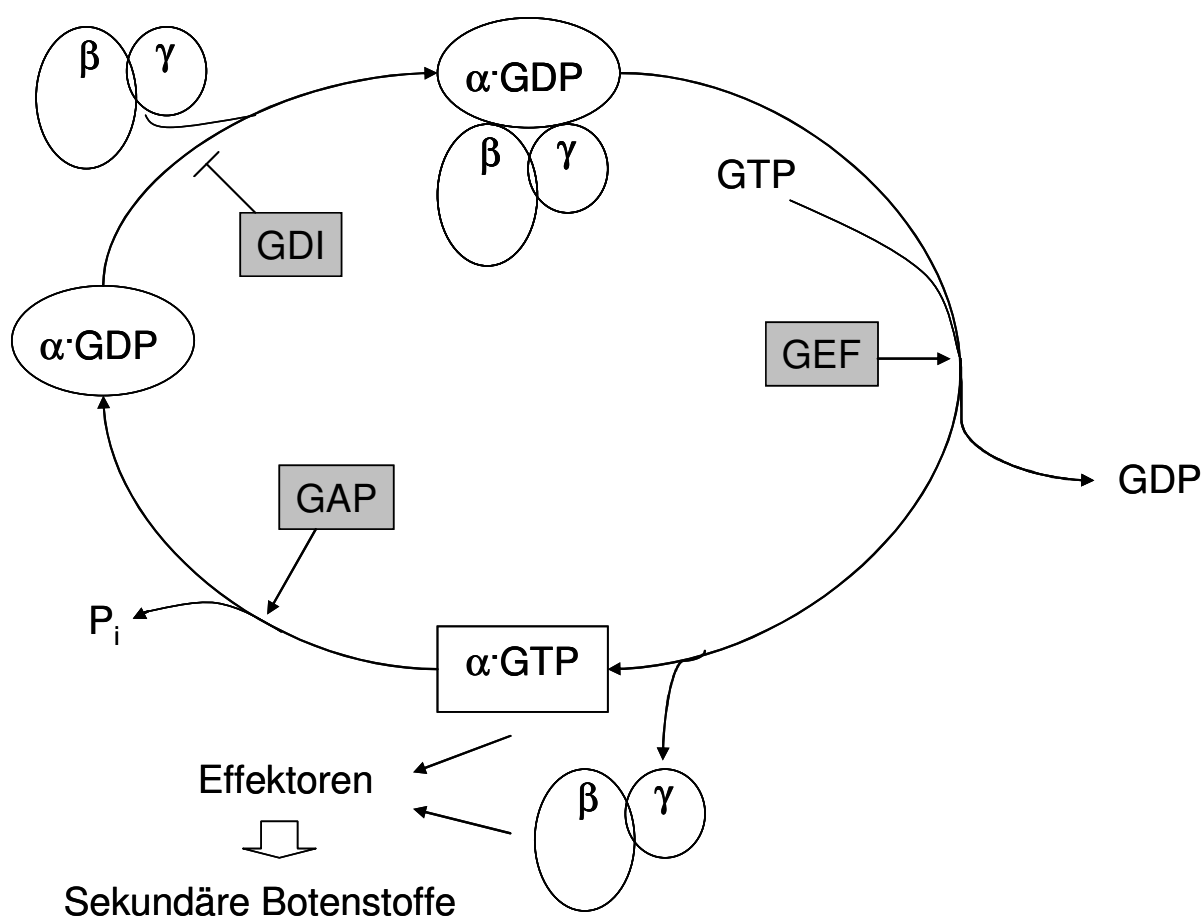


Abb. 3 Regulation des GTPase-Zyklus heterotrimerer G-Proteine. GEF bewirken einen Nukleotidaustausch in der $G\alpha$ -Untereinheit und führen zum Anschalten des Signalweges. GAP beschleunigen die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Proteine, forcieren so die Abschaltung der $G\alpha$ -vermittelten Effektoraktivierung und führen das Signalsystem schneller in den Ausgangszustand zurück, als es mit der $G\alpha$ -katalysierten GTP-Hydrolyse allein möglich wäre. GDI binden nach Abschluss der GTP-Hydrolyse an GDP-gebundene $G\alpha$ -Proteine und können somit die Dauer $G\beta\gamma$ -vermittelter Prozesse verlängern. GEF: *Guanine nucleotide Exchange Factor*, GAP: *GTPase Accelerating Protein*, GDI: *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*. $\blacksquare \longrightarrow$: Stimulatorische Wirkung, $\blacksquare \dashv$: Inhibitorische Wirkung.

1.1.6 Grenzen des Modells

Obwohl das Standardmodell der Signaltransduktion heterotrimerer G-Proteine weitestgehend in der Wissenschaft anerkannt wird, können einige Befunde nicht damit in Einklang gebracht werden.

So ist beispielsweise noch nicht eindeutig geklärt, ob das Heterotrimer nach der Aktivierung tatsächlich dissoziiert. Bar-Sinai und Mitarbeiter zeigten eine Ko-Reinigung der Adenylylcyclase mit dem G_s-Heterotrimer in Anwesenheit eines nicht hydrolysierbaren GTP-Analogons (Bar-Sinai *et al.* 1992). In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Stimulation der Adenylylcyclase in S49 *cyc*⁻-Membranen durch das aktivierte G_s-Heterotrimer erfolgt (Ganpat *et al.* 2000). In Immunpräzipitationsexperimenten konnten Komplexe aus β_2 -adrenergem Rezeptor, Ca_v1.2-Kanal, Adenylylcyclase, G α_s , G β sowie Proteinkinase A und Proteinphosphatase 2A dargestellt werden (Davare *et al.* 2001). Andererseits gibt es Berichte in der Literatur, die eine Dissoziation des G_s-Heterotrimers nach dessen Aktivierung postulieren, verbunden mit einer Umverteilung des aktivierten G α_s in das Cytosol (z.B. die Arbeitsgruppen Rasenick und Ransnäs/Insel: Yu und Rasenick 2002, Ransnas und Insel 1988). Andere Arbeitsgruppen konnten diese Umverteilung jedoch nicht beobachten (z.B. Ganpat *et al.* 2000).

Wie in jüngeren Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-basierten Studien gezeigt wurde, ist zumindest für einige G-Proteine eine Neustrukturierung des Heterotrimers wahrscheinlicher als eine Dissoziation (Hughes *et al.* 2001; Bunemann *et al.* 2003, Frank *et al.* 2005; Tang *et al.* 2006). Die aktivierungsabhängige Dissoziation der Heterotrimere ist möglicherweise abhängig von der G-Protein-Klasse. Während fluoreszenzmarkiertes aktiviertes G α_o von G $\beta\gamma$ dissoziierte, blieben die G_s- und G_i-Heterotrimere nach Aktivierung assoziiert (Digby *et al.* 2006).

Alle diese Beobachtungen legen nahe, dass die an einer Signalkette beteiligten Proteine bereits als größere Komplexe assoziiert vorliegen können (Prä-Assoziations-Modell) und die G α -Proteine nicht in allen Fällen frei zwischen Rezeptoren und Effektoren diffundieren (klassisches *Shuttle*-Modell). Dadurch werden interessante Fragen hinsichtlich der in diesen Komplexen vorhandenen Interaktionspartner aufgeworfen, die bis heute nicht eindeutig geklärt werden konnten. Wenn, wie in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, die genaue Zusammensetzung des Heterotrimers entscheidenden Einfluß auf die Spezifität der Signaltransduktion hat, wie wird in der Zelle sichergestellt, dass nach Beendigung des GTP-Zyklus wieder ein identisches Heterotrimer assoziiert, das wiederum mit dem gleichen Rezeptor interagieren muß? Wenn vorgeformte Komplexe in der Zelle bestehen, wie erfolgt die kontrollierte Zusammensetzung dieser Komplexe? Sind weitere (akzessorische oder gerüstbildende) Proteine an der Ausrichtung der Signalkomplexe beteiligt? Wenn ja, welche?

1.2 Bedeutung und Eigenschaften des stimulatorischen G-Proteins

Die α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins wird ubiquitär exprimiert und spielt eine zentrale Rolle im gesamten Säugerorganismus. $G\alpha_s$ vermittelt viele zentrale Zellantworten wie Zellwachstum, -differenzierung und -proliferation, Membranumbau, Modulation der Herzfrequenz und -kontraktilität, Wasserresorption in der Niere, Knochenresorption, Hormonsekretion und Glycogenabbau (Helms 1995; Morris und Malbon 1999). Mutanten, in denen beide Kopien des $G\alpha_s$ -kodierenden Gens *GNAS* in der Keimbahn inaktiviert sind, sind nicht lebensfähig (Yu *et al.* 1998). Somatische Mutationen eines *GNAS*-Allels haben aufgrund der gewebespezifischen Expression des $G\alpha_s$ schwerwiegende Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit verschiedener Gewebe und Organe. Man unterscheidet zwischen aktivierenden und deaktivierenden Veränderungen am $G\alpha_s$, die durch Mutationen im Gen oder kovalente Modifikationen des Proteins verursacht werden können.

Daueraktives $G\alpha_s$ entsteht durch *missense*-Mutationen, bei denen die Aminosäure Arg²⁰¹ durch Cys oder His (RC-Mutante) oder die Aminosäure Gln²²⁷ durch Arg (QR-Mutante) ausgetauscht wird. Diese Aminosäuren sind bei der Katalyse von großer Bedeutung, ihre Substitution zieht eine Hemmung der GTPase-Aktivität nach sich. $G\alpha_s$ verbleibt dadurch im aktivierten Zustand (vgl. auch Abschnitt 1.1.5), so dass die intrazellulären cAMP-Konzentrationen erhöht sind. Diese $G\alpha_s$ -Mutationen sind häufig in Hypophysen-Tumoren zu finden (Landis *et al.* 1989), aber auch bei Patienten mit McCune-Albright-Syndrom und Fehlbildungen der Knochen.

Choleratoxin verursacht durch ADP-Ribosylierung der katalytisch bedeutsamen Aminosäure Arg²⁰¹ des $G\alpha_s$ dessen dauerhafte Aktivierung, was in befallenen Darmepithelzellen zu einer Dauerstimulation der Adenylylcyclase und somit zu einer massiven Erhöhung des intrazellulären sekundären Botenstoffes cAMP führt (vgl. Abschnitt 1.1.5 S.15). Über noch nicht vollständig geklärte Prozesse werden daraufhin Chlorid- und Hydrogencarbonationen aus den Zellen ins Darmlumen transportiert, Wasser folgt osmotisch nach und es kommt zu den klassischen Dehydrationserscheinungen.

Inaktivierende Mutationen im $G\alpha_s$ -kodierenden Gen, *GNAS*, werden beispielsweise durch *nonsense*-Mutationen oder Spleißstellen-Mutationen verursacht und führen zu unzureichenden Mengen an intrazellulärem $G\alpha_s$ und in der Folge zu Resistenz gegen die Hormone PTH, TSH und Gonadotropin (*Albrights Hereditary Osteodystrophy*, AHO; Pseudohypoparathyroidismus) sowie skeletalen Defekten. *GNAS* unterliegt dem sogenannten *imprinting*, d.h. neben der biallelischen Expression wird in einigen Geweben nur die maternale, in anderen nur die paternale Kopie des Gens für die Expression verwendet. Im Gegensatz zur paternalen Vererbung, die nur die Ausprägung von AHO zur Folge hat, kommt es bei maternaler Vererbung des defekten *GNAS* zu AHO sowie zusätzlich

zu multiplen Resistenzen gegen die genannten Hormone in den Geweben, in denen ausschließlich das maternale Allel exprimiert wird.

1.2.1 Spleißvarianten des $G\alpha_s$

Das Gen *GNAS* ist komplex aufgebaut, durch Verwendung unterschiedlicher Promotoren und alternatives Spleißen der 13 Exons werden mehrere Genprodukte generiert. Das vorwiegende *GNAS*-Genprodukt ist $G\alpha_s$, von dem 4 Spleißvarianten bekannt sind ($G\alpha_s$ -s3, $G\alpha_s$ -s4, $G\alpha_s$ -l1, $G\alpha_s$ -l2). Durch Verwendung eines alternativen Exons 1 entsteht $XL\alpha_s$, das einen verlängerten N-Terminus besitzt und nur in neuroendokrinen Geweben exprimiert wird. Eine $XL\alpha_s$ -Defizienz hat im Menschen geringe Auswirkungen, zeigt in Mäusen jedoch einen pathologischen Phänotyp (Weinstein *et al.* 2004).

Die vier Spleißvarianten des ubiquitär exprimierten $G\alpha_s$ unterscheiden sich in der An- oder Abwesenheit des Exons 3. Durch Verwendung einer alternativen Spleißstelle kann außerdem ein Serin in der Sequenz enthalten sein (Bray *et al.* 1986). Eine schematische Darstellung der Spleißvarianten wird in Abb. 4 gegeben.

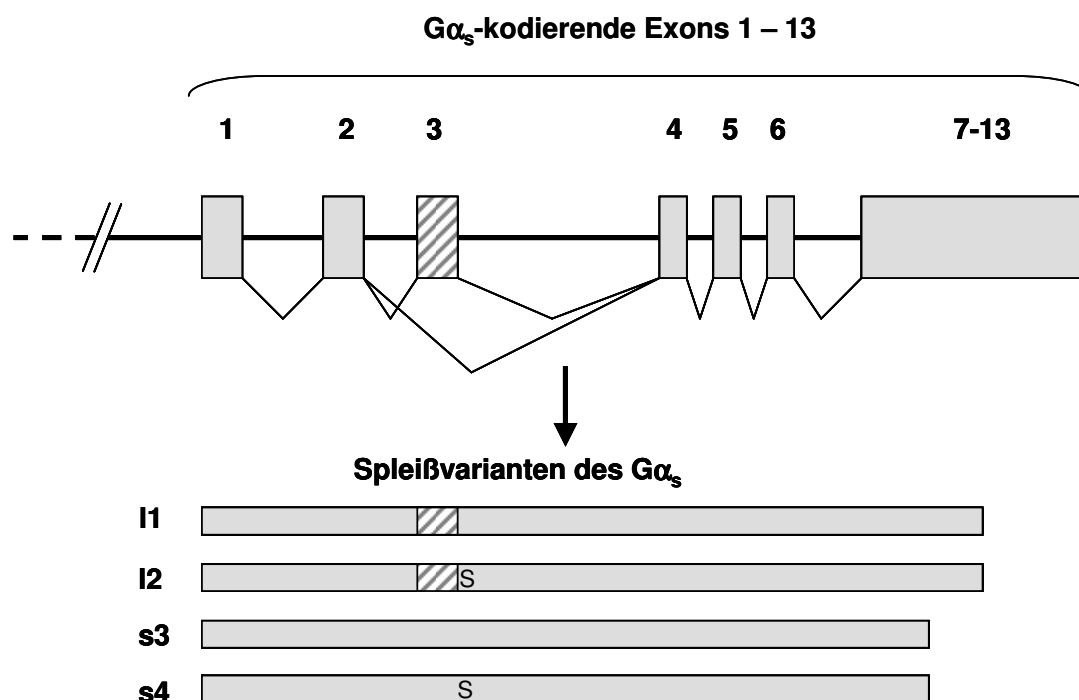


Abb. 4 $G\alpha_s$ -kodierender Bereich des komplexen *GNAS*-Locus (nach Bastepe und Juppner 2005). Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA entstehen vier $G\alpha_s$ -Isoformen (lange Spleißvarianten $G\alpha_s$ -l1 und $G\alpha_s$ -l2, kurze Spleißvarianten $G\alpha_s$ -s3 und $G\alpha_s$ -s4). Den kurzen Spleißvarianten fehlt der von der Exon3-Region kodierte Bereich (schraffierte Fläche). Die beiden langen und die beiden kurzen Spleißvarianten unterscheiden sich jeweils in der An- oder Abwesenheit eines für Serin kodierenden Triplets am 5'-Ende des Exons 4 („S“).

Die Spleißvarianten werden sowohl gewebespezifisch als auch in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium unterschiedlich exprimiert (Ihnatovych *et al.* 2001; Ihnatovych *et al.* 2002). Sie zeigen in *in vitro*-Experimenten keine Unterschiede in ihrer GTP-Hydrolyserate, jedoch ist die Nukleotid-Austauschrate der langen Spleißvarianten um den Faktor 2,5 höher als die der kurzen Spleißvarianten (Graziano *et al.* 1989). Unterschiede in der Rezeptorkopplung der beiden Spleißvarianten wurden postuliert, sind jedoch bislang nur anhand von Fusionsproteinen mit dem β_2 -adrenergen Rezeptor nachgewiesen (Seifert *et al.* 1998).

1.2.2 Posttranslationale Modifikationen

Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 erwähnt, trägt $G\alpha_s$ an seinem N-Terminus eine Lipidmodifikation. Es handelt sich um einen permanent über eine N-Acylierung am Gly² (Kleuss und Krause 2003) und einen reversibel über eine Thio-Acylierung am Cys³ (Mumby und Linder 1994) gebundenen Palmitoylrest. Die permanente Palmitoylierung erhöht die Potenz des $G\alpha_s$ zur Aktivierung der Adenylylcyclase (Kleuss und Krause 2003) während die reversible Palmitoylierung des $G\alpha_s$ möglicherweise von Bedeutung für die Membranlokalisation und Interaktion mit Rezeptoren und Effektoren ist (Mumby und Linder 1994, Evanko *et al.* 2000). Der Palmitoylierungsstatus des $G\alpha_s$ steht in Zusammenhang zur intrazellulären Lokalisation, auf die im Abschnitt 1.3.1 näher eingegangen wird.

Phosphorylierungen sind reversible Modifikationen an Serin- oder Tyrosin-Seitenketten, die die enzymatische Aktivität oder intermolekulare Wechselwirkungen von Proteinen regulieren können. $G\alpha_s$ kann durch Proteinkinase A und C phosphoryliert werden (Pyne *et al.* 1992b, Pyne *et al.* 1992a). In die Spleißvariante s4, die gegenüber der Spleißvariante I1 ein zusätzliches Serin besitzt (vgl. 1.2.1), wurde doppelt so viel Phosphat inkorporiert wie in Spleißvariante I1. Die physiologische Bedeutung dieser Phosphorylierung ist bislang nicht bekannt.

Die Src-Tyrosin-Kinase pp60^{c-src} phosphoryliert die Aminosäuren Tyr³⁷ und Tyr³⁷⁷ von $G\alpha_s$ -GDP (Moyers *et al.* 1995, Hausdorff *et al.* 1992), wodurch sowohl die GTP-Hydrolyserate als auch die Rezeptorkopplungseigenschaften des $G\alpha_s$ verändert werden. Der EGF-Rezeptor phosphoryliert $G\alpha_s$ an zwei noch nicht charakterisierten Tyrosin-Seitenketten, die jedoch nicht mit den von pp60^{c-src} phosphorylierten Tyr³⁷ und Tyr³⁷⁷ identisch sind (Liebmann *et al.* 1996). Die *Steady-State*-GTPase-Geschwindigkeit des $G\alpha_s$ sowie seine Fähigkeit zur Stimulation der Adenylylcyclase nach Rekonstitution in *cyc*⁻-Membranen werden durch die vom EGF-Rezeptor katalysierte Phosphorylierung erhöht (Popleton *et al.* 1996). Die Tyrosinphosphorylierung spielt möglicherweise eine Rolle beim *crosstalk* verschiedener GPCR-Signalwege (Liebmann *et al.* 1996).

1.2.3 Molekulare Struktur des G_s

Die dreidimensionale Struktur heterotrimerer G-Proteine und einzelner Untereinheiten wurde durch Röntgenstrukturanalyse in verschiedenen Konformationen und Aktivierungszuständen aufgeklärt. Überwiegend wurde dafür das Transducin verwendet. Man geht davon aus, dass die aus dieser Modellstruktur gewonnenen Informationen aufgrund von konservierten Sequenzen in den G-Protein-Familien auch auf andere α -Untereinheiten übertragen werden können. Für $G\alpha_s$ existieren Kristallstrukturen in Anwesenheit von $GTP\gamma S$ (pdb-Struktur 1azt, Sunahara *et al.* 1997) und im Komplex mit der katalytischen Domäne der Adenylylcyclase (ebenfalls in Anwesenheit von $GTP\gamma S$, z.B. pdb-Struktur 1azs, Tesmer *et al.* 1997b).

Die α -Untereinheit ist aus einer helicalen und einer *ras*-ähnlichen Domäne aufgebaut. Die *ras*-ähnliche Domäne weist Ähnlichkeit zu monomeren GTPasen wie *ras* auf. Rezeptor- und Effektor-Interaktionsstellen sowie das katalytische Zentrum sind auf dieser Domäne lokalisiert. Bezogen auf *ras* p21 kann die helicale Domäne als Insertion in die *ras*-ähnliche Domäne betrachtet werden (Rens-Domiano und Hamm 1995). In der zwischen den beiden Domänen gebildeten Spalte befindet sich die Guaninnukleotid-Bindungsstelle. Die helicale Domäne ist ausschließlich bei heterotrimeren G-Proteinen zu finden. Sie besitzt GTPase-akzelerierende Aktivität (Markby *et al.* 1993) und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Nukleotidbindung (Noel *et al.* 1993).

Der katalytische Zyklus geht mit Konformationsänderungen des $G\alpha_s$ einher, die in drei Molekülregionen besonders ausgeprägt sind, den sogenannten Schalter- oder „*switch*“-Regionen I-III (vgl. Abb. 5).

$G\beta$ besitzt N-terminal eine ca. 20 Aminosäuren lange Helix, an die sich ein siebenfach wiederholtes Sequenzmotiv anschließt. Dieses Sequenzmotiv, „WD *repeat*-Motiv“ genannt, enthält β -Faltblätter, die sich zu einem Ring formieren und dem $G\beta$ -Molekül eine Propellerstruktur verleihen. Der C-Terminus und der N-terminale Bereich, der sich direkt an die N-terminale Helix anschließt, bilden das 7. Propellerblatt, so dass das Molekül in sich geschlossen und stabilisiert wird. $G\gamma$ besteht aus zwei Helices. Sein N-Terminus bildet eine *coiled-coil*-Struktur mit dem helicalen N-Terminus von $G\beta$ und geht ausschließlich intermolekulare Kontakte ein (Sondek *et al.* 1996).

Die $G\alpha$ -Untereinheit hat im Heterotrimer sowohl zur $G\beta$ - als auch zur $G\gamma$ -Untereinheit Kontakt (Yi *et al.* 1991, Rahmatullah und Robishaw 1994). Dabei ist der C-Terminus des $G\gamma$ -Moleküls $G\alpha$ zugewandt. Der N-Terminus des $G\alpha$ und der C-Terminus des $G\gamma$ tragen jeweils Lipidmodifikationen, die eine enge räumliche Orientierung zueinander ermöglichen. Die Stelle der Rezeptor- und Effektorbindung und die Stellen der Lipidmodifikationen im Heterotrimer gehören zur selben hydrophoben Oberfläche, die die Orientierung des Heterotrimers an der Membran definieren.

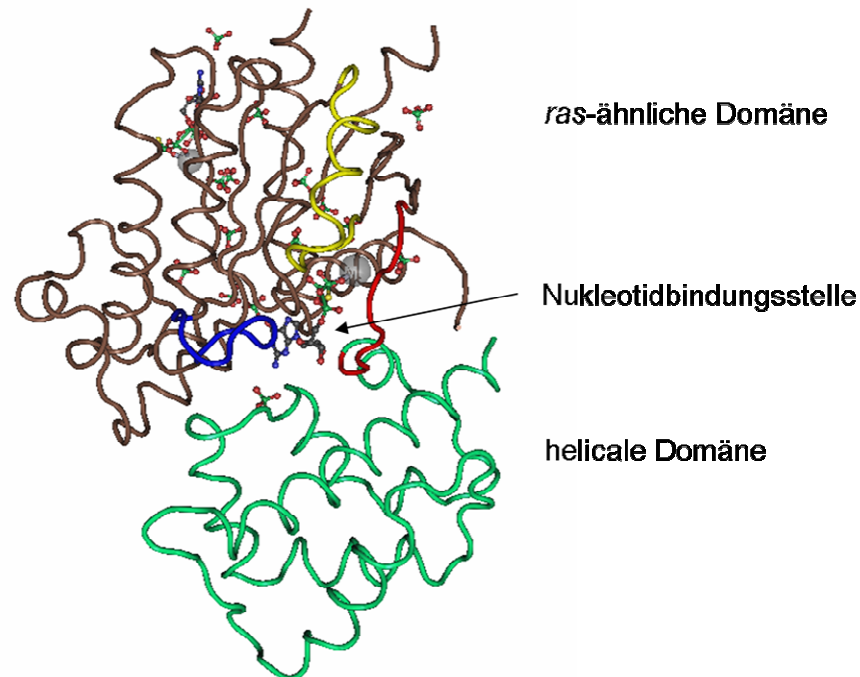


Abb. 5 Kristallstruktur des $G\alpha_s$ im Komplex mit $GTP\gamma S$ (Sunahara *et al.* 1997, pdb 1AZT). Die Nukleotidbindungsstelle befindet sich zwischen helicaler und *ras*-ähnlicher Domäne. Hervorgehoben sind die flexiblen Schalter-Regionen *switch* I (rot), *switch* II (gelb) und *switch* III (blau).

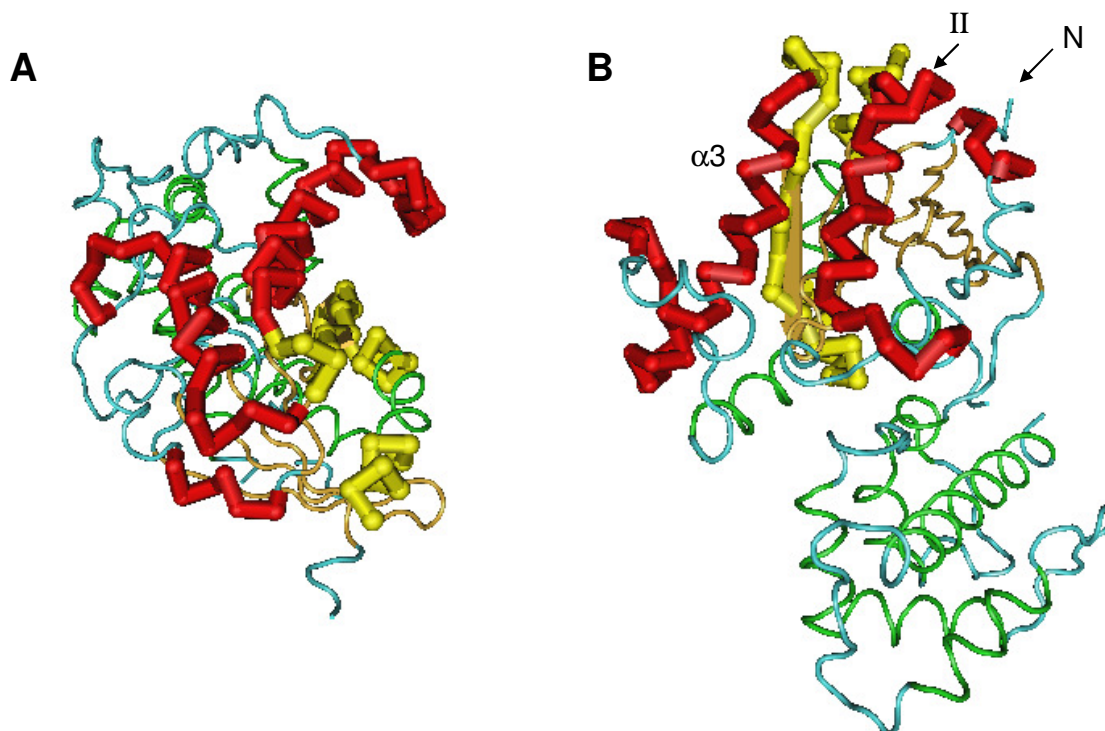


Abb. 6 Kristallstruktur von $G\alpha_s$ im Komplex mit $GTP\gamma S$ (nach Sunahara 1997, pdb 1AZT). Die Interaktionsstellen mit Effektoren sind rot, Rezeptorinteraktionsstellen gelb hervorgehoben, sie befinden sich auf der *ras*-ähnlichen Domäne (nach Noel *et al.* 1993 am Beispiel des $G\alpha_t$). **A**: Apikale Perspektive, **B**: Laterale Perspektive. Der mit „N“ bezeichnete Pfeil deutet auf die am weitesten N-terminal gelegene, in der Kristallstruktur aufgelöste Aminosäure hin. Die für die Interaktion des $G\alpha_s$ mit der Adenylylcyclase wichtigen Interaktionsregionen *switch* II und Helix $\alpha 3$ sind in **B** angegeben („II“, „ $\alpha 3$ “)

An der intermolekularen Wechselwirkung mit der katalytischen Domäne der Adenylylcyclase sind vor allem die *switch II*-Region und die $\alpha 3$ -Helix des $G\alpha_s$ beteiligt. In Abb. 6 sind die Rezeptor- und Effektorinteraktionsdomänen in der Kristallstruktur des $G\alpha$ hervorgehoben.

1.3 Signalwege des $G\alpha_s$

1.3.1 Intrazelluläre Lokalisation

Ausgehend vom klassischen Modell der Signaltransduktion (Abschnitt 1.1.4) sind Gs-Heterotrimeren an der Plasmamembran lokalisiert. Bei der Plasmamembran-Lokalisation spielen die Lipidmodifikationen an $G\alpha$ und $G\gamma$ eine Rolle, sie sind jedoch nicht ausreichend: $G\alpha_s$ -Mutanten, die nicht in der Lage sind, $G\beta\gamma$ zu binden, befinden sich im Cytosol (Evanko *et al.* 2000). Ebenso ist rekombinant exprimiertes $G\beta\gamma$ in Abwesenheit von $G\alpha$ diffus intrazellulär lokalisiert. Erst eine Ko-Expression von $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ führt zu einer Membranlokalisation des Heterotrimers (Evanko *et al.* 2001).

Das in Abschnitt 1.1.4 beschriebene klassische Modell der Aktivierung und Deaktivierung von G-Proteinen postuliert eine Dissoziation des Heterotrimers nach Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit. Im Unterschied zu anderen G-Proteinen wird für $G\alpha_s$ zusätzlich eine aktivierungsabhängige Depalmitoylierung beschrieben, die nach der Aktivierung zu einer Umverteilung von $G\alpha_s$ in das Cytosol führt (Wedegaertner und Bourne 1994, Ransnas und Insel 1988, Thiyagarajan *et al.* 2002). Eine solche Umverteilung konnte nicht von allen Arbeitsgruppen bestätigt werden. Daher werden alternativ zur Dissoziation des Komplexes eine Umstrukturierung des Heterotrimers (Bunemann 2003) oder eine Umverteilung in andere Membranbereiche (*lipid rafts*, Huang *et al.* 1999) diskutiert (vgl. Abschnitt 1.1.6).

Neben der Plasmamembran wurde $G\alpha_s$ auch in anderen intrazellulären Kompartimenten lokalisiert. Immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen eine Verteilung des $G\alpha_s$ am trans-GOLGI-Netzwerk von PC12-Zellen (Leyte *et al.* 1992), an Endosomen (Denker *et al.* 1996, Van Dyke 2004), im Nucleus von S49-Zellen (Saffitz *et al.* 1994) und an Cytoskelettstrukturen wie Actin und Tubulin (Willard und Crouch 2000) bzw. Stressfasern (Hansen *et al.* 1994). $G\beta\gamma$ -Untereinheiten sind durch subzelluläre Fraktionierung am Cytoskelett (Carlson *et al.* 1986; Wu *et al.* 1998), im Zellkern (Saffitz *et al.* 1994), am Endoplasmatischen Reticulum und am GOLGI nachgewiesen worden. Für $G\gamma_{12}$ ist eine direkte Assoziation mit F-Actin gezeigt worden. Diese Interaktion ist phosphorylierungsabhängig (Ueda *et al.* 1999). Aus den Untersuchungen geht häufig nicht hervor, ob die intrazellulären Proteine als Heterotrimer vorliegen, da zumeist nur Antikörper gegen eine der Untereinheiten verwendet wurden.

Gs ist an der Regulation des intrazellulären Vesikeltransports beteiligt (Bomsel und Mostov 1993; Pimplikar und Simons 1993; Colombo *et al.* 1994; Nurnberg und Ahnert-Hilger 1996). Über seine Assoziation mit dem Cytoskelett, von dem es aktivierungsabhängig dissoziieren kann (Sarndahl *et al.* 1993), ist Gs wahrscheinlich an der Modulation des Cytoskeletts durch extrazelluläre Signale beteiligt (Hirshman *et al.* 2005). Es wurde gezeigt, dass GTP von Tubulin auf Gs übertragen werden kann (Rasenick und Wang 1988; Yan *et al.* 2001), jedoch ist die physiologische Bedeutung dieser Transaktivierung nicht vollständig geklärt.

Die Bedeutung der intrazellulären Lokalisation von Gs wird vor allem im Zusammenhang mit alternativer, d.h. nicht plasmamembranständiger Signaltransduktion klar. Da in diesen Kompartimenten GPCRs als Nukleotidaustauschfaktoren nicht in Frage kommen, müssen andere Proteine existieren, die in Abwesenheit von GPCRs die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion regulieren können. Detailfragen dieser Zusammenhänge sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

1.3.2 Interaktionspartner von $G\alpha_s$

Der klassische Interaktionspartner des $G\alpha_s$ auf Effektorebene ist die Adenylylcyclase. Alle neun plasmamembranständigen AC-Isoformen können von $G\alpha_s$ stimuliert werden, wodurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration ansteigt und die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktiviert wird. Später wurde auch eine direkte, cAMP-unabhängige Regulation von Calcium- und Natriumkanälen beschrieben (Mattera *et al.* 1989; Yatani und Brown 1989; Schubert *et al.* 1989; Hamilton *et al.* 1991, Lu *et al.* 1999; Matsuda *et al.* 1992). Auf die Interaktion mit Tubulin wurde bereits eingegangen (vgl. Abschnitt 1.3.1).

Caveolin ist ein integrales Membranprotein, das vor allem in speziellen Membrandomänen, den Caveolae, vorkommt und unter anderem als Gerüstprotein fungiert (Okamoto *et al.* 1998). Eine direkte Interaktion von $G\alpha_s$ mit Caveolin wurde von der Arbeitsgruppe um Lisanti durch Interaktionsstudien mit gereinigten Fusionsproteinen gezeigt (Li *et al.* 1995), konnte jedoch von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Huang *et al.* 1997). Immunpräzipitationsexperimente zeigten die Anwesenheit von $G\alpha_s$ in Caveolin-enthaltenden Proteinkomplexen (Rybin *et al.* 2000; Balijepalli *et al.* 2006). Eine Caveolin-Bindungssequenz wurde identifiziert und unter anderem in $G\alpha$ -Proteinen nachgewiesen (Couet *et al.* 1997; Aminosäuren 212-222 im $G\alpha_s$), ein Einfluß von Caveolin auf die $G\alpha_s$ -Funktion wurde nicht gezeigt. Caveolin-3 und $G\alpha_s$ sind an der Regulation der Anzahl aktiver Natrium-Kanäle im Herzen beteiligt (Palygin *et al.* 2008).

Die Existenz weiterer Effektoren wurde erst viel später erkannt. So fand man, dass die Stimulation des β -adrenergen Rezeptors in Thymocyten und Fibroblasten ohne Beteiligung von Adenylylcyclasen in der Signalkaskade zur Induktion von Apoptose führt. Das Signal

wird stattdessen von $G\alpha_s$ auf die Src-Kinasen weitergeleitet, deren Aktivität durch Bindung des $G\alpha_s$ an die katalytische Domäne stimuliert wird. Die Interaktion selbst wurde bereits früher beschrieben (z.B. mit c-Src, vgl. Abschnitt 1.2.2), ihre Bedeutung in alternativen Signalwegen jedoch erst im Jahr 2000 aufgezeigt (Ma *et al.* 2000, Gu, Chenghua *et al.* 2000).

$G\alpha_s$ ist an der Differenzierung von embryonalen Mausfibroblasten zu Adipocyten beteiligt (Wang und Malbon 1999). Durch Ko-Immünpräzipitationsexperimente wurde in Abwesenheit von Induktoren der Adipogenese eine Interaktion von $G\alpha_s$ mit der Proteinkinase Syk nachgewiesen. Nach Zugabe von Induktoren wie Insulin sinkt die intrazelluläre $G\alpha_s$ -Konzentration, während die Konzentration und Aktivität von Syk ansteigen. Die Adipogenese der Fibroblasten wird folglich durch $G\alpha_s$ reprimiert und erst in Anwesenheit von Induktoren dereprimiert (ibd.). Die für die Repression der Adipogenese wichtigen Aminosäuren des $G\alpha_s$ wurden von Liu und Mitarbeitern in Regionen lokalisiert, die nur im $G\alpha_s$ -GTP γ S-Komplex exponiert sind (Liu *et al.* 1998).

Interaktionspartner des $G\alpha_s$, die zu Beginn oder im Zeitraum der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2 Interaktionspartner des $G\alpha_s$. Einzelheiten zu den Interaktionspartnern werden im Text erläutert. Die zweite Spalte bezieht sich auf Einflüsse des $G\alpha_s$ auf die Funktion des Interaktionspartners oder umgekehrt.

Interaktionspartner	Regulation durch $G\alpha_s$	zellulärer / physiologischer Effekt
Adenylylcyclase	Stimulation	[cAMP]↑, Aktivierung der PKA
Tubulin	Transaktivierung des $G\alpha_s$	möglicherweise Regulation des Cytoskeletts
Caveolin	keine	Modulation der Signaltransduktion von Ionenkanälen
Src-Tyrosinkinasen (Src, Lck, Hck)	Stimulation der Kinase-Aktivität durch $G\alpha_s$	Apoptose
Syk-Kinase	verringerte Syk-Kinase-Aktivität, geringere Syk-Konzentrationen ¹	Repression der Adipogenese
Axin	keine	Modulation der Genexpression

In neuesten Untersuchungen spielt $G\alpha_s$ eine Rolle im Wnt-Signalweg. Prostaglandin E2, das proinflammatorisch wirkt und die Progression von Dickdarmkrebs begünstigt, bindet an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor EP2 und aktiviert Gs. Castellone und Mitarbeiter zeigten, dass darüber sowohl cAMP/PKA-abhängige als auch -unabhängige Signalwege angeschaltet werden (Castellone *et al.* 2005). $G\alpha_s$ bindet nach seiner Aktivierung nicht nur

¹ Die Interaktion beider Proteine wurde durch Immunpräzipitation nachgewiesen. Die Inhibition der Kinase-Aktivität von Syk durch $G\alpha_s$ wurde immunchemisch anhand der Immunpräzipitate, jedoch nicht mit gereinigten Proteinen *in vitro* gezeigt. Es ist daher nicht klar, ob diese Inhibition direkt erfolgt oder weitere Proteine beteiligt sind.

die Adenylylcyclase, sondern auch die RGS-Domäne des Proteins Axin (vgl. auch Abschnitt 1.3.3). Axin liegt cytosolisch in einem Proteinkomplex mit β -Catenin und Glycogensynthase-Kinase-3 β (GSK3 β) vor. Durch Interaktion von $G\alpha_s$ mit der RGS-Domäne des Axin kommt es zur Freisetzung von GSK3 β aus diesem Komplex sowie in der Folge zur Stabilisierung und Umverteilung von β -Catenin in den Zellkern, was eine veränderte Genexpression nach sich zieht.

Während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurden von einzelnen Arbeitsgruppen weitere Interaktionspartner beschrieben (*Cysteine String Protein*, CSP, Natochin *et al.* 2005; *G $\alpha_{i/s}$ interacting vesicle-associated protein*, GIV, Le-Niculescu *et al.* 2005). Die physiologische Relevanz dieser Interaktionen für intrazelluläre Signalwege konnte noch nicht vollständig geklärt werden.

1.3.3 RGS-Proteine als Interaktionspartner von G-Proteinen

RGS-Proteine (*Regulators of G Protein Signalling*) sind eine Klasse von mehr als 30 Proteinen in 8 Subfamilien, die durch Beschleunigung der GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine die Signaldauer modulieren. Sie sind strukturell sehr unterschiedlich, allen gemeinsam ist jedoch die Anwesenheit einer ca. 120 Aminosäuren großen RGS-Domäne, die für die GTPase-beschleunigende Aktivität notwendig und hinreichend ist (Popov *et al.* 1997). Zusätzlich zu dieser Domäne können eine Reihe von anderen Domänen (z.B. PDZ, DEP, GoLoco, GGL) vorhanden sein, die für weitere Funktionen des jeweiligen RGS-Proteins verantwortlich sind und z.B. als Gerüstdomäne zur Komplexbildung mit weiteren Molekülen dienen. RGS-Proteine stabilisieren einen während der Phosphoryltransferase-Reaktion auftretenden Übergangszustand der $G\alpha$ -Proteine, indem sie mit Molekülregionen interagieren, die während des GTPase-Zyklus den größten Konformationsänderungen unterworfen sind („*switch*-Regionen“, speziell *switch II*, vgl. Abschnitt 1.2.3). Experimentell wird dieser Übergangszustand durch Bindung von AlF_4^- an $G\alpha:GDP$ in Anwesenheit von Mg^{2+} erreicht, der Übergangszustand $G\alpha:GTP\gamma S$ wird überwiegend schlechter bzw. gar nicht gebunden (z.B. Berman *et al.* 1996, Watson *et al.* 1996, vgl. dazu auch Abschnitt 1.1.5). Die bislang charakterisierten RGS-Proteine besitzen eine gegenüber allen $G\alpha$ -Klassen (siehe Tabelle 1) relativ unspezifische GTPase-akzelerierende Wirkung – mit Ausnahme des $G\alpha_s$, für das bislang kein RGS-Protein beschrieben worden ist.

Eine RGS-Domäne besitzt auch das Protein Axin, das im Wnt-Signalweg eine zentrale Rolle spielt. Neueste Untersuchungen zeigten, dass $G\alpha_s:AlF_4^-$ an die RGS-Domäne des Axin bindet und darüber am Wnt-Signalweg teilnimmt (Castellone *et al.* 2005, vgl. Abschnitt 1.3.2). Eine GTPase-akzelerierende Wirkung der Axin-RGS-Domäne wurde nicht nachgewiesen.

1.4 Suche nach Interaktionspartnern von $G\alpha_s$

In der Literatur finden sich bereits früh Hinweise auf das Vorliegen von $G\alpha_s$ innerhalb größerer Proteinkomplexe, die zumeist nach Rezeptorstimulation assoziieren (z.B. Mollner *et al.* 1992; Negishi *et al.* 1992; Ferreira *et al.* 1999). Die Zusammensetzung dieser Komplexe ist nicht in allen Fällen geklärt worden und wahrscheinlich abhängig von der untersuchten Zellart. In Ko-Immünpräzipitationsversuchen wurde $G\alpha_s$ an der Plasmamembran als Bestandteil größerer Signalkomplexe aus β_2 -adrenergem Rezeptor, Adenylylcyclase, dem Calciumkanal $Ca_v1.2$, Proteinkinase A, Proteinphosphatase 2A sowie Caveolin-3 nachgewiesen (Rybin *et al.* 2000; Balijepalli *et al.* 2006). Inwieweit $G\alpha_s$ mit allen Bestandteilen direkt interagiert, geht aus diesen Experimenten jedoch nicht hervor. Die Interaktion mit Caveolin konnte nicht von allen Arbeitsgruppen gezeigt werden (Huang *et al.* 1997; Oh und Schnitzer 2001 im Gegensatz zu Li *et al.* 1995, vgl auch Abschnitt 1.3.2), was aber möglicherweise auf experimentelle Ursachen wie die Art der Membranpräparation zurückzuführen ist.

Die meisten der bislang identifizierten Interaktionspartner des $G\alpha_s$ wurden empirisch ermittelt. Eine systematische Suche („*Screening*“) mit Hilfe neuer Technologien ist mit der nachfolgend beschriebenen *yeast-two-hybrid*-Methode erfolgt.

1.4.1 *yeast-two-hybrid*-Versuche

Die *yeast-two-hybrid*-Technologie ist eine weit verbreitete Möglichkeit zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen (Fields 1989). Sie nutzt die modulare Natur eukaryotischer Transkriptionsfaktoren, die jeweils eine sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne und eine transkriptionsaktivierende Domäne besitzen. Werden beide Domänen separat exprimiert, können sie dennoch assoziieren und einen aktiven Transkriptionsfaktor bilden. Für *yeast-two-hybrid*-Versuche werden Proteine A und B hergestellt, die mit der DNA-Bindungsdomäne (A) oder mit der transkriptionsaktivierenden Domäne (B) fusioniert sind. Eine Interaktion der Fusionsproteine A und B rekonstituiert die Aktivität des Transkriptionsfaktors, der daraufhin die Expression von Reportergenen initiiert. In der Praxis wird untersucht, welche Fusionsproteine B einer Bibliothek (Beuteproteine, *prey*) mit einem Köderprotein A (*bait*) interagieren und so die Expression des Reportergens ermöglichen.

Die *yeast-two-hybrid*-Technologie ist sehr flexibel und sensitiv, auch schwache und transiente Interaktionen können nachgewiesen werden, ohne dass die Reinigung von Proteinkomplexen erforderlich ist, die während der verschiedenen Reinigungsstufen eine ausreichende Stabilität aufweisen müssen. Die Methode birgt jedoch auch einige Nachteile. So werden nicht alle *bait*- und *prey*-Proteine exprimiert. Posttranslationale Modifikationen werden nicht immer korrekt ausgeführt. Die Fusionsproteine interagieren im Kern der Hefezellen, d.h. membranständige oder sezernierte Proteine entziehen sich größtenteils

dieser Methode. Der Nachweis der Interaktion erfolgt indirekt über die Expression von Reporter Genen, so dass Transkriptionsfaktoren nicht mit dieser Technologie untersucht werden können. Es können nur Interaktionen zwischen zwei Proteinen nachgewiesen werden, Proteinkomplexe mit mehr als zwei Komponenten sind dieser Methode nicht zugänglich. Ein hoher Anteil an falsch positiven Interaktionspartnern erschwert zudem die Auswertung.

Dennoch beschleunigte die *yeast-two-hybrid*-Technologie maßgeblich die Charakterisierung der RGS-Proteine als Interaktionspartner von $G\alpha$ -Untereinheiten (z.B. De Vries *et al.* 1995). Auch die Interaktion von $G\alpha_s$ mit dem EGF-Rezeptor wurde mit dieser Technologie dargestellt (*bait*: cytosolische Domäne des EGF-Rezeptors, *prey*: $G\alpha_s$ -GDP; Sun *et al.* 1997). Eine *yeast-two-hybrid*-Untersuchung mit dem Ziel, neue G-Protein-Signalfaktoren aus einer cDNA-Bank von embryonalem Rattenhirn zu charakterisieren, wurde erstmals von Tall und Mitarbeitern 2003 durchgeführt (Tall *et al.* 2003). Als *bait* wurden wildtypisches und konstitutiv aktives (Q227L) $G\alpha_s$ und $G\alpha_o$ eingesetzt, mit denen die Identifizierung zweier Säugerhomologe des Ric-8-Proteins von *C.elegans* als Interaktionspartner gelang (Ric-8A und Ric-8B). Die Isoform Ric-8A/Synembryon bindet $G\alpha_o$ und ist einer der lange postulierten intrazellulären, Nicht-Rezeptor-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF, vgl. dazu Abschnitte 1.1.5 und 1.1.6). Das andere Protein, Ric-8B, bindet an $G\alpha_s$, eine GEF-Wirkung wurde jedoch nicht gezeigt. Für $G\alpha_o$ wurden 240 Positivklone, unter ihnen eine Reihe bekannter Interaktionspartner, identifiziert, während für $G\alpha_s$ nur 23 Positivklone isoliert werden konnten, unter denen kein bekannter $G\alpha_s$ -Interaktionspartner war. In einer fast zeitgleich veröffentlichten Untersuchung von Klattenhoff und Mitarbeitern wurde mit der gleichen Methode ebenfalls Ric8/Synembryon als $G\alpha_s$ -Interaktionspartner aus einer cDNA-Bank von humanem Hirn identifiziert (Klattenhoff *et al.* 2003).

Außer Ric-8B sind mit der *yeast-two-hybrid*-Methode bislang keine weiteren $G\alpha_s$ -Interaktionspartner identifiziert worden.

1.4.2 Affinitätsreinigung von Proteinkomplexen

Eine andere Methode zur Charakterisierung von Interaktionspartnern ist die Anreicherung und Reinigung von Proteinkomplexen über Affinitätsepitope und die anschließende Identifizierung der einzelnen Komponenten (Übersichtsartikel von Zhu *et al.* 2003). Die zu untersuchenden Proteine oder Proteindomänen werden dafür als Fusionsprotein mit einem Affinitätsepitop wie z.B. Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert, an einer Affinitätsmatrix immobilisiert und anschließend mit entsprechenden komplexen Proteingemischen (meist Zell-Lysaten) inkubiert. Nach dem Waschen der Affinitätsmatrix werden die Fusionsproteine sowie die mit ihnen assoziierten Proteine eluiert und analysiert. Die Analyse erfolgt meist über SDS-PAGE in Kombination mit Massenspektrometrie. Mit dieser Methode können

Proteinkomplexe einfach und schnell unter nahezu physiologischen Bedingungen gebildet und angereichert werden. Selbst schwache Interaktionen können gezeigt werden, da das zu untersuchende epitopmarkierte Protein in sehr hohen lokalen Konzentrationen auf der Affinitätsmatrix eingesetzt werden kann. Im Gegensatz zur *yeast-two-hybrid*-Methode hat sie außerdem den Vorteil, auch Proteinkomplexe mit mehr als zwei Komponenten zu erfassen. Die Wahl der experimentellen Bedingungen erlaubt mit dieser Methode die Analyse von Proteinkomplexen aus allen zellulären Kompartimenten. Mittels Affinitätsreinigung über GST-Fusionsproteine wurden bereits erfolgreich Interaktionspartner für den EGF-Rezeptor und CSF-1R identifiziert (Blagoev *et al.* 2003; Cross *et al.* 2005).

Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist die *Tandem Affinity Purification* (TAP), die von Rigaut und Mitarbeitern durch Evaluierung einer Reihe von Affinitätsmodifikationen für Hefen entwickelt und erfolgreich eingesetzt worden ist (Rigaut *et al.* 1999; Puig *et al.* 2001; Gavin *et al.* 2002). Später wurde dieses System beispielsweise auch für Säugerzelllinien (Knuesel *et al.* 2003; Drakas *et al.* 2005), Trypanosomatide (Schimanski *et al.* 2005) und Arabidopsis (Rubio *et al.* 2005) adaptiert.

Bei der TAP wird das interessierende Protein als Fusionsprotein mit zwei IgG-Bindungsdomänen, die vom Protein A aus *Staphylococcus aureus* stammen, sowie einem Calmodulin-bindenden Peptid (CBP) exprimiert. Zwischen der Protein A- und der CBP-Domäne befindet sich eine Erkennungssequenz für die *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease. In einer zweistufigen Reinigung über eine IgG-Matrix und eine Calmodulin-Matrix werden Fusionsproteine zusammen mit assoziierten Proteinen aus Lysaten gereinigt. Zunächst werden die Proteinkomplexe über den Protein A-Teil der TAP-Modifikation an einer IgG-Matrix gebunden und gewaschen. Danach erfolgt durch Proteolyse mit der TEV-Protease eine sehr spezifische Elution, die nur Proteine mit einer TEV-Erkennungssequenz erfasst. Unspezifisch an der Matrix gebundene Proteine werden nicht eluiert. Die TEV-Protease und andere Verunreinigungen werden im zweiten Reinigungsschritt über die Calmodulin-Matrix entfernt und die hoch gereinigten Proteinkomplexe anschließend in Anwesenheit von EGTA eluiert. Die Proteinkomplexe werden konzentriert, elektrophoretisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert.

In einer Untersuchung von Shevchenko und Mitarbeitern wurden die oben beschriebene *yeast-two-hybrid*-Methode und die TAP-Methode hinsichtlich der identifizierten Interaktionspartner miteinander verglichen (Shevchenko *et al.* 2002). Mit Hilfe der TAP-Methode identifizierten sie Interaktionspartner für 38 Hefeproteine und verglichen ihre Ergebnisse mit denen aus bereits veröffentlichten *yeast-two-hybrid*-Experimenten. Es stellte sich heraus, dass nur 14 % der identifizierten Interaktionspartner mit beiden Methoden gleichermaßen gefunden wurden. TAP und *yeast-two-hybrid*-Methode können also als komplementäre Methoden bei der Suche nach Interaktionspartnern angesehen werden.

2 Zielsetzung

Das stimulatorische G-Protein, insbesondere seine α -Untereinheit $G\alpha_s$, wird in vielen Geweben exprimiert und ist an wichtigen zellulären Prozessen wie Transkription, Differenzierung, Wachstum und Apoptose beteiligt. Im klassischen Modell der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion ist $G\alpha_s$ plasmamembranständig und interagiert mit G-Proteingekoppelten Rezeptoren, $G\beta\gamma$ sowie den Adenylylcyclasen, es ist jedoch auch in anderen intrazellulären Kompartimenten wie dem Nucleus, im ER und GOLGI lokalisiert sowie mit Cytoskelettstrukturen assoziiert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es dort unter Beteiligung anderer Proteine an weiteren, noch unbekanntem Signalwegen beteiligt ist. Systematische Untersuchungen zur Charakterisierung neuer $G\alpha_s$ -Interaktionspartner können zur Aufdeckung alternativer Signalwege des $G\alpha_s$ führen und somit mögliche Ansatzpunkte für Therapeutika aufzeigen. Bisherige systematische Untersuchungen waren mittels der *yeast-two-Hybrid*-Technologie durchgeführt worden, der methodenbedingt nicht alle Interaktionspartner zugänglich sind. Erst kurz vor Beginn dieser Arbeit wurde der erste $G\alpha_s$ -spezifische Regulator, RGS-PX1, aus menschlichen Herzmuskelzellen beschrieben und grob charakterisiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher

1. die Herstellung von murinem RGS-PX1 und die genaue Charakterisierung seines Einflusses auf die $G\alpha_s$ -vermittelte Signaltransduktion im Maus-System
2. die Identifizierung neuer Interaktionspartner des $G\alpha_s$ unter Berücksichtigung der Dynamik der Signalprozesse heterotrimerer G-Proteine.

Um den physiologischen Bedingungen in der Zelle möglichst nahe zu kommen, sollten die dazu verwendeten Methoden direkte Wechselwirkungen von Molekülen darstellen und auf indirekte Nachweise möglichst verzichtet werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid/ Bisacrylamidlösung (37,5:1)	Roth
Agarose	ICN
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Ammoniumthiosulfat	Merck
Ampicillin, Natrium-Salz	Roth
Aprotinin	Sigma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
BSA	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Calmodulin	Boehringer-Ingelheim; Alexis
DMSO	Sigma
Dithiothreitol	Sigma
DMEM	Biochrom
DNase I	Roche
dNTPs, je 2,5 mM	MBI Fermentas
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA	Applichem
Essigsäure	Applichem
Fötale Kälberserum	Biochrom
Ficoll-400	Amersham Biosciences
Formaldehyd	Merck
Forskolin	Calbiochem, ICN
D-Glucose	Merck
L-Glutamin, 200 mM	Biochrom
L-Glutathion, reduced	Fluka
Glycerol	Sigma
Glycin	Applichem
Guanosin-5'-O-(3-thio)-triphosphat (GTP γ S)	Boehringer-Ingelheim
Hefeextrakt	Applichem
HEPES	Roth
IPTG	Applichem
Kanamycin	Sigma
Luria Broth (Pulver)	Applichem
Leupeptin	Sigma
Lysozym	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumthiosulfat	Merck
Nonidet P-40	ICN
PBS (Lösung, steril)	Biometra
PBS (Pulver, ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺)	Dulbecco
Pefabloc [®] SC Protease-Inhibitor	Roche
Penicillin / Streptomycin für die Zellkultur (100fach)	Biochrom

Pepstatin A	Sigma
Phosphate buffered Saline (Dulbecco)	Biochrom
Radionukleotide ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 2,8- $[\text{}^3\text{H}]\text{-Adenin}$)	Perkin Elmer
RNase A, DNase-frei	Applichem
RotiBlock (10fache Stammlösung)	Roth
Salzsäure	Roth
Scintillationsflüssigkeit Aquasafe 500 PLUS	Zinsser Analytic
Silbernitrat	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Sigma
Terrific Broth	International Diagnostics Group plc
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypsin Inhibitor Type II-L (Lima Bean)	Sigma
Trypton / Pepton	Roth
Tween-20	Sigma

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *pro analysi* von den Firmen Roth, Sigma oder Merck bezogen.

3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
1 kb-DNA-Standard	Gibco; MBI Fermentas
Vorgefärbter Molekulargewichtsmarker für Proteingele	MBI Fermentas
Calmodulin-Sepharose, MS <i>grade</i>	Stratagene
Calmodulin-Agarose	Sigma
Centricon [®] Plus-30, Centricon [®] -20	Millipore
Dialysekassetten (MWCO 20kDa)	Perbio
Einweg-Chromatographiesäulen	BioRad
FuGene6 transfection reagent	Roche Applied Sciences
Glutathion-Sepharose [™] 4B	Amersham Pharmacia
Hydroxyapatit	BioRad
IgG-Sepharose 6 Fast Flow	Amersham Biosciences
MonoQ	Amersham Pharmacia
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Nitrocellulose-Membranen Protran (45 μm)	Schleicher&Schuell
PVDF-Membranen	BioRad
ResourceQ	Amersham Pharmacia
StrepTactin [®] -Sepharose	IBA
StrepMag Magnetobeads	IBA
Whatman Blotpapier	Schleicher&Schuell
Zellkulturflaschen und -schalen	Greiner, NEN

3.3 Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Lösungen werden zusammen mit der Methode beschrieben, für die sie verwendet wurden.

3.3.1 Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

Ficollpuffer	500 µL 50 % (w/v) Ficoll-400, 500 µL TAE-Puffer, 20 µL 2,5 % (w/v) Bromphenolblau
TAE-Puffer (50fache Stammlösung)	242 g Tris-Base, 57,1 mL Essigsäure, 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0 mit NaOH eingestellt), ad 1 L Aqua bidest. (pH ca. 8,5)

3.3.2 Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

SDS-Probenpuffer (4fache Stammlösung)	1 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 1 mL Glycerol, 1 mL 10 % (w/v) SDS, 150 µL 2 % (w/v) Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer (10fache Stammlösung)	120 g Tris-Base, 576 g Glycin, 40 g SDS, ad 4 L Aqua bidest.
Transferpuffer	6,05 g Tris-Base, 28,8 g Glycin, 400 mL Methanol, ad 2 L mit Aqua bidest.
Ponceau-Färbelösung	0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure
PBST	1 % (v / v) Tween-20, 9,55 g / L PBS in Aqua bidest.

3.3.3 Lösungen für Coomassie Blau-Färbung

Coomassie Blau-Färbelösung	30 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250 in Aqua bidest.
Entfärbelösung	30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in Aqua bidest.

3.3.4 Lösungen für Silberfärbung

Fixierlösung	50 % (v/v) Ethanol, 12 % (v/v) Essigsäure, 0,5 % (v/v) Formaldehyd in Aqua bidest.
Waschlösung	50 % (v/v) Ethanol in Aqua bidest.
Imprägnierlösung	0,01 % (w/v) Natriumthiosulfat in Aqua bidest.
Silberfärbelösung	0,1 % (w/v) Silbernitrat mit 0,075 % (v/v) Formaldehyd in Aqua bidest.
Entwicklerlösung	3 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,05 % (v/v) Formaldehyd, 0,002 % (w/v) Natriumthiosulfat in Aqua bidest.
Stopplösung	50 mM EDTA in Aqua bidest.

3.3.5 Sonstige Lösungen

Protease-Inhibitor-Mix (PI-Mix)	100 µM PMSF, 3,21 µg/mL Leupeptin-Proteaseinhibitor, 3,21 µg/mL Limabohnen-Trypsininhibitor, 4 µg/mL Aprotinin im jeweils verwendeten Lysispuffer
HMED	20 mM Na-HEPES (pH 8,0 mit NaOH), 2 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 1 mM DTT in Aqua bidest.
HMEDBNL	20 mM Na-HEPES (pH 8,0 mit NaOH), 2 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 µg/mL BSA, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) C ₁₂ E ₁₀ in Aqua bidest.

3.4 Enzyme und Reaktionssysteme

Enzym / Kit	Bezugsquelle
T4-DNA Ligase	New England Biolabs
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	Stratagene
<i>Pfu</i> Turbo Cx DNA Polymerase	Stratagene
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB
AcTEV-Protease	Invitrogen
Ca ²⁺ /Calmodulin Kinase II, <i>rat brain</i> , 500 ng	Calbiochem
DYEnamic ET terminator, cycle sequencing kit	Amersham Biosciences
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Jetsorb Gel Extraction Kit	Genomed
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
SignaTECT [®] Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase (CaMKII) Assay System (#V8161)	Promega
Super Signal West Pico Substrate und Dura Substrate (ECL)	Pierce

Alle anderen in der Arbeit verwendeten Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, entweder von der Firma MBI Fermentas oder New England Biolabs bezogen und immer mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

3.5 Antikörper

Mit Ausnahme von PRB-156C (Fa. Covance) wurden alle primären Antikörper bei Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, gekauft. Alle sekundären Antikörper wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 3 In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Primäre Antikörper			
Name	Antigen	Spezies	Verdünnung in PBST
C-18	G α_s /olf	Kaninchen	1:1000
T-20	pan-G β	Kaninchen	1:1000
I-20	pan-G α_i	Kaninchen	1:200
C-12	Raf-1	Kaninchen	1:500
K-19	pan14-3-3	Kaninchen	1:500
B-14	GST	Maus	1:1000
PRB-156C	(His) ₆	Kaninchen	1:1000
AS-16	G γ_2	Kaninchen	1:200
Sekundäre Antikörper			
Name	Spezies	Verdünnung in PBST	
Anti-Kaninchen-IgG-POD	Ziege	1:50 000	
Anti-Maus-IgG-POD	Schaf	1:50 000	

3.6 Vektoren, Plasmide und Oligonukleotide

Alle während der Arbeit in diesem Labor hergestellten Konstrukte wurden in den Vektoren NpT7-5, pQE60 (Invitrogen), T-Vektor bzw. T-Easy (Promega) oder pcDNA3 (Invitrogen) generiert.

Tabelle 4 In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Baculoviren

Plasmide	kodiertes Protein	Literatur / Quelle
CK34CH/pQE60	wtG α_s -s4 mit C-terminalem His ₆ -Epitop (bovin)	Kleuss und Gilman 1997
CK34/pQE60	wtG α_s -s4 (bovin)	Kleuss und Gilman 1997
MTV	eGFP (<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>)	Schakowski <i>et al.</i> 2001
G α_s -wt-HA/pcDNA3	wtG α_s -s4 mit C-terminalem HA-Epitop (bovin)	Levis und Bourne 1992
β_2 AR/pcDNA1	β_2 -adrenerger Rezeptor	Hendrik Falk (AG Kleuss)
G α_s -s4yHis/pQE60	Maus-G α_s -s4 mit interner Hexahistidinmodifikation	diese Arbeit
moG α_s -s4CH/pQE60	Maus-G α_s -s4 mit C-terminaler Hexahistidinmodifikation	diese Arbeit
G α_s -s4-XHS/pQE60	Rind-G α_s -s4 mit C-terminaler Modifikation aus Xa-Proteasespaltstelle, Hexahistidinmodifikation und StrepTagII	diese Arbeit
G α_s -s4-C-TAP/pcDNA3	Rind-G α_s -s4 mit C-terminaler TAP-Modifikation	diese Arbeit
N-TAP- G α_s -s4/pcDNA3	Rind-G α_s -s4 mit N-terminaler TAP-Modifikation	diese Arbeit
NTAP-tag/pcDNA3	TAP-Peptid bestehend aus 2 IgG- und 2 calmodulinbindenden Sequenzen sowie weiteren, in der Vektorsequenz kodierten Aminosäuren	diese Arbeit
pZOME-1-C	---	Rigaut <i>et al.</i> 1999
pZOME-1-N	---	Rigaut <i>et al.</i> 1999
RGS-PX1/pCMV-Script	RGS-Domäne von humanem RGS-PX1	Prof. Dr. Thomas Wieland (zum damaligen Zeitpunkt Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg)
His ₆ -FLAG-moRGS-PX1/NpT7-5	RGS-Domäne des murinen RGS-PX1 mit N-terminaler Modifikation aus sequenziellem Hexahistidin- und FLAG-tag	diese Arbeit
His ₆ -FLAG-huRGS-PX1/pQE60	RGS-Domäne des humanen RGS-PX1 mit N-terminaler Modifikation aus sequenziellem Hexahistidin- und FLAG-tag	diese Arbeit
GST-14-3-3 β / pGEX4-T-2	humanes 14-3-3 β mit N-terminalem GST-tag	Dr. Angelika Hausser (Universität Stuttgart)
GST-14-3-3 γ / pGEX4-T-2	humanes 14-3-3 γ mit N-terminalem GST-tag	Dr. Angelika Hausser (Universität Stuttgart)

GST-14-3-3ζ/ pGEX4-T-2	humanes 14-3-3ζ mit N-terminalem GST-tag	Dr. Angelika Hausser (Universität Stuttgart)
Baculoviren	kodiertes Protein	Literatur / Quelle
Gα _s -s4-His	Gα _s His ₆ -Epitop in der Exon-3-Region (bovin)	Levis und Bourne 1992
wtGα _s -s4	wtGα _s -s4 (bovin)	Dr. Kleuss (AG Kleuss)
Gβ ₁	wtGβ ₁ (bovin)	Dr. Kleuss (AG Kleuss)
His ₆ -FLAG-Gβ ₁	wtGβ ₁ , N-terminales His ₆ - und FLAG-Epitop (bovin)	Dr. Kleuss (AG Kleuss)
Gγ ₁	wtGγ ₁ (bovin)	Dr. Kleuss (AG Kleuss)
Gγ ₂	wtGγ ₂ (bovin)	Dr. Kleuss (AG Kleuss)
His ₆ -Gγ ₂	wtGγ ₂ , N-terminales His ₆ -Epitop (bovin)	Dr. Kleuss (AG Kleuss)
Gγ ₁₀	wtGγ ₁₀ (bovin)	Yasuda <i>et al.</i> 1998
Gγ ₁₂	wtGγ ₁₂ (bovin)	Yasuda <i>et al.</i> 1998

Die kodierende Sequenz für das Maus-Protein (Plasmide Gα_s-s4yHis/pQE60 und moGα_s-s4CH/pQE60) basiert auf dem Datenbankeintrag P63094-2 (UniProt-Datenbank). Die für Rind-Gα_s kodierenden Sequenzen (Gα_s-Proteine CK34CH, CK34 und Gα_s-wt-HA) basieren auf dem Datenbankeintrag P40896 (UniProt-Datenbank). Das Protein CK34CH wird nachfolgend auch als Gα_s-s4CH bezeichnet. RGS-PX1 wurde von Zheng und Mitarbeitern unter dem Datenbankeintrag AC420470 (GeneBank) veröffentlicht (Zheng *et al.* 2001).

Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Qiagen bzw. Biotex mit HPLC-Reinheitsgrad synthetisiert.

Tabelle 5 Verwendete Oligonukleotide für Mutagenesen

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
CK249	GGAGGTCACCATCATCACCACCATGCGGCCGGTCCACCTGAGTTCTA TGAGCATGCCAAGGC	Herstellung von Gα _s -s4yHis
CK250	GAACTCAGGTGGACCGCCGCATGGTGGTGATGATGGTGACCTCCAG GTGGGAAGTCAAAGTCG	
KK006-1	TAACCATGGCCGCCCTCGGAAACAGCAAGACCGAGGACC	Herstellung von Gα _s -s4-XHS
KK006-2	TAACCATGGGCTGTCTCGGAAACAGCAAGACCGAGGACC	
KK007-1	GTGCCTTCCCTCGATTGCCCGAGCAGCTCATACTGACGGAGG	Herstellung von N-TAP-Gα _s -s4
KK007-2	GCTAGCACCATGGTGATGGTGATGGTGCCCTTCCCTCGATTGCCCC	
KK008-1	[P] CTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATA	Herstellung von RGS-PX1
KK008-2	[P] AGCTTATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAG	
CK287	CCACGTGAAGACTGGATCCATGGGCTGTCTCGGAAAC	Herstellung von Gα _s -s4-C-TAP
CK288	CCACGTGAAGACTGGATCCGAGCAGCTCATACTGACG	
CK289	CCACGTGAAGACAGAATTCGGCTGTCTCGGAAACAGC	Herstellung von N-TAP-Gα _s -s4
CK290-2	CCACGTGAAGACAGAATTCCTTAGAGCAGCTCATACTGAC	
CK246	GACTACAAAGATGATGATGACAAGATCAACACTATCAAAAATC	Herstellung von RGS-PX1
CK247	GCACCATGGCACATCACCATCACCATCACGACTACAAAGATGATGAT GAC	
CK248	CGGAAGCTTATCCTCTGAACTAGGATC	

Die Oligonukleotide KK008-1 und KK008-2 sind zueinander komplementär und 5' phosphoryliert, da sie als Oligonukleotid-Doppelstrang direkt in eine Ligationsreaktion eingesetzt wurden.

Tabelle 6 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Name	Sequenz 5' → 3'	Lokalisation, Richtung
pQE60prom	GCGTATCACGAGGCCCTTTTCG	5'-Polylinkersequenz, <i>sense</i>
pQE60rev	CATTACTGGATCTATCAACAGG	3'-Polylinkersequenz, <i>antisense</i>
CK74	CTGCTCCGCTGCCGTGTCC	Nt 577-595 G α_s -s4, <i>sense</i>
CK157	CTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTAC	Nt 88-111 G α_s -s4, <i>sense</i>
CK264	AGCATGCCAAGGCTCTCTGG	Nt 431-450 G α_s -s4, <i>sense</i>
CK258	GTGCAACATTGTCTACAAGAATGCTGTCC	Nt RGS-PX1, <i>antisense</i>
CK259	TAGCAGATACTTTGAATCATGAAG	Nt RGS-PX1, <i>sense</i>

3.7 Zelllinien, Bakterienstämme und Kulturmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden von Novagen gekauft. Alle Säugerzelllinien sowie die Sf9-Zellen wurden von der *American Type Culture Collection* bezogen.

3.7.1 Verwendete Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue rekombinations- und endonuklease-defizienter Stamm, verwendet für die Amplifikation aller Plasmide
E. coli BL21(DE3)/pREP4 proteasedefizienter Stamm, der zusätzlich das Repressorplasmid pREP4 (Fa. Qiagen) enthält. Verwendet für die bakterielle Expression rekombinanter Proteine.

3.7.2 Verwendete Säuger- und Insektzelllinien

HEK293 humane embryonale Epithelzelllinie aus Nierenzellen
 COS-7 Fibroblastenzelllinie aus Nieren der Grünen Meerkatze
 2B2 phänotypisch G α_s -defiziente Maus-Zelllinie (Bastepe *et al.* 2002)
 S49 Lymphomzelllinie aus der Maus
 S49 cyc⁻ Lymphomzelllinie aus der Maus, genotypisch G α_s -defizient
 Sf9 Insektzelllinie aus dem Ovar von *Spodoptera frugiperda*

3.7.3 Medien und Lösungen für Bakterienkultivierung

Alle Medien wurden durch Autoklavieren oder Sterilfiltration sterilisiert.

LB-Medium 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl in Aqua bidest.
Terrific Broth-Medium entsprechend den Herstellerangaben hergestellt
T7 Enriched-Medium 2 % w/v Trypton / Pepton, 1 % w/v Hefeextrakt, 0,5 % w/v NaCl, 0,2 % w/v Glycerol, in Aqua bidest. Zugabe von 50 mM KH₂PO₄ (steril, pH 7,2 mit NaOH) nach dem Autoklavieren des Mediums

LB-Agarplatten	1,5 % w/v Agar-Agar in LB-Medium
SOB-Medium	20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L NaCl, 2,6 mM KCl in Aqua bidest. pH 7,0 (NaOH)
SOC-Medium	20 g/L Trypton/ Pepton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L NaCl, 10 mL/L 250 mM KCl, in Aqua bidest., pH 7,0 (NaOH). Vor Gebrauch Zugabe von 5 mL/L 2 M MgCl ₂ (steril) und 20 mL/L 1 M Glucose (steril)
Tfbl-Lösung	0,59 g CH ₃ COOK, 2,42 g RbCl ₂ , 0,29 g CaCl ₂ · 2H ₂ O, 1,98 g MnCl ₂ , 80 mL 37,5 % Glycerol, ad 200 mL Aqua bidest., pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt
Tfbll-Lösung	0,42 g MOPS, 2,21 g CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0,24 g RbCl ₂ , 60 mL 50 % Glycerol, ad 200 mL Aqua bidest., pH 6,5 mit 1 N KOH eingestellt
TB-Lösung	10 mM Pipes, 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl, 55 mM MnCl ₂ in Aqua bidest.; pH 6,7 mit KOH

Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotikum	Stammkonzentration	eingesetzte Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/mL in Aqua bidest.	50 µg/mL
Kanamycin	10 mg/mL in Aqua bidest.	10 µg/mL

3.7.4 Medien und Lösungen für Säuger- und Insektenzellkultivierung

Die Medien und Zusätze wurden bei den Firmen Biochrom oder Gibco BRL bezogen und wie im folgenden beschrieben eingesetzt. Die Stammkonzentrationen der verwendeten Lösungen sind unter 3.1 angegeben. Fetales Kälberserum wurde vor der Verwendung durch Inkubation bei 57 °C für 15 min hitzeinaktiviert.

Medium für COS-7 und S49(cyc⁻)	DMEM mit 4,5 g/L Glucose, 2 % (v/v) L-Glutamin, 1 % (v/v) Penicillin / Streptomycin, 10 % (v/v) fetales Kälberserum
Medium für HEK293	MEM-Earle's mit 1 % (v/v) L-Glutamin, 1 % (v/v) Penicillin / Streptomycin, 2 % (v/v) fetales Kälberserum
Medium für 2B2	Medium zu gleichen Volumenteilen gemischt aus DMEM mit 4,5 g/L Glucose und HAM's F12. Dem Gemisch wurden 1 % (v/v) Penicillin / Streptomycin, 1,25 % (v/v) L-Glutamin, 5 % (v/v) fetales Kälberserum zugesetzt.
Medium für Sf9	TNM-FH mit 1 % (v/v) Penicillin / Streptomycin, 1 % (v/v) Lipid Supplement, 10 % (v/v) fetales Kälberserum. Das Medium wurde mit Glutaminzusatz geliefert.
HEG-Lösung	118 mM NaCl, 4,6 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 10 mM D-Glucose, 20 mM Na-HEPES (pH 7,2 mit NaOH), 5 mM EDTA in Aqua bidest. sterilfiltriert

3.8 Geräte und Sonstiges

Gerät

FPLC-Anlage „ÄKTA purifier 10/100“
FPLC-Anlage (Pumpen P-500, Gradientenmischer GP-250,
UV-Detektor UV-1, Fraktionssammler RediFrac)
Fluoreszenz-Meßgerät LS50
Flüssigkeitsscintillationszähler LS 6500
Mini-Protean Gelsysteme
Kodak X-OMAT XUV6 Röntgenfilm
DNA Sequenzierer ABI PRISM 377
PCR Thermocycler Trio
Stickstoff-Dekompressionskammer
Thermomixer

Bezugsquelle

Amersham Biosciences
Pharmacia
Perkin Elmer
Beckmann-Coulter
BioRad
Kodak
ABI PRISM
Biometra
Parr Instrument Company
Eppendorf

Verwendete Software und Datenbanken

MacMolly Tetra Version 3.9 (Februar 1999)

CN3D Version 4.1

Graph Pad Prism 2004

National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Swiss Institute for Bioinformatics, Switzerland

<http://www.expasy.org>

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Standardmethoden wie horizontale Agarose-Gelelektrophorese, Phenol-Chloroform-Extraktion und Präzipitation von DNA wurden entsprechend den Vorschriften in Sambrook und Russell 2001 durchgeführt.

4.1.1 Plasmidpräparation (analytischer Maßstab)

Für die Präparation von Plasmiden aus *E.coli* XL1-Blue wurden die Bakterienzellen aus 1,5 mL einer Übernachtskultur durch Zentrifugation (1 min 13000 x *g*) sedimentiert und das Zellsediment nach Bedarf entweder sofort weiterverarbeitet oder eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Zellsedimente wurden in jeweils 200 µL GTE-Lösung resuspendiert und durch Zugabe von 400 µL Lysispuffer alkalisch lysiert. Anschließend wurden durch Mischen mit 300 µL Salzlösung (7,5 M Ammoniumacetat) und 10-minütige Inkubation auf Eis Proteine, RNA und genomische DNA präzipitiert und durch Zentrifugation sedimentiert (10 min 13000 x *g*). Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde nach Überführen in ein neues Reaktionsgefäß mit Isopropanol gefällt und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung wurde die Plasmid-DNA in 50 µL RNase A-Lösung gelöst.

Tabelle 7 Für Plasmidpräparationen (analytischer Maßstab) benötigte Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
GTE-Lösung	25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM D-Glucose, 10 mM EDTA in Aqua bidest.
Lysispuffer	200 mM NaOH, 1 % SDS in Aqua bidest.
RNase A	20 µg/mL RNase A (DNase-inaktiviert) in TE
TE	10 mM Tris-HCl (pH 8,0 mit HCl), 1 mM EDTA

4.1.2 Plasmidpräparation (präparativer Maßstab)

Die Präparation von Plasmiden im Mikrogramm-Maßstab erfolgte aus 200 mL einer Übernachtskultur mit MaxiPrep-Kits der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben.

Die Menge und Reinheit der präparierten DNA wurden spektrometrisch bestimmt. Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=260$ nm auf, das zur Konzentrationsbestimmung nach dem Lambert-Beerschen Gesetz genutzt wird ($\epsilon_{260} = 0,02$ cm²/µg, eine OD₂₆₀=1 entspricht bei einer Küvettendicke von 1cm einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA). Der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (dem Absorptionsmaximum von Proteinen) ist ein Maß für die Reinheit der

Plasmidpräparation und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. In dieser Arbeit verwendete Plasmidpräparationen wiesen einen OD_{260}/OD_{280} -Quotienten von 1,5 bis 1,8 auf.

4.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die enzymatische Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde mit 1-2 U Enzym pro μg DNA durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug für analytische Maßstäbe 10 μL , für präparative Maßstäbe 20 – 50 μL . Abhängig von Maßstab und Reaktionsvolumen wurden 0,5-10 μg DNA eingesetzt. Nach 1-2stündiger Inkubation bei den Temperaturoptima der verwendeten Enzyme wurden die Spaltprodukte analytisch oder präparativ über Agarosegelelektrophorese getrennt.

Für Restriktionsansätze mit 2 Enzymen wurde, wenn möglich, ein Puffer gewählt, in dem beide Enzyme gleiche Aktivität aufwiesen. Wenn dies nicht möglich war, wurde die geringere Aktivität eines Enzyms durch Erhöhung seiner Menge im Reaktionsansatz ausgeglichen. Bei Inkompatibilität der Reaktionspuffer beider Enzyme wurde zunächst mit einem der beiden Enzyme gespalten, die DNA über Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung gereinigt und anschließend mit dem zweiten Enzym gespalten.

4.1.4 Ligation

Aus Agarosegelen isolierte Restriktionsfragmente und linearisierte Vektoren wurden in einer durch T4-DNA-Ligase katalysierten Reaktion kovalent verknüpft. Um sowohl eine Religation des linearisierten Vektors zu vermeiden als auch eine gerichtete Insertion der Restriktionsfragmente zu ermöglichen, wurde wenn möglich doppelsträngige DNA mit zwei verschiedenartigen Überhängen verwendet.

Die Reaktion fand in einem Volumen von 10 μL statt und enthielt 1 mM ATP, 2 U T4-DNA-Ligase, ca. 100 ng linearisierte Vektor-DNA sowie einen mindestens dreifachen molaren Überschuß Restriktionsfragment bezogen auf den linearisierten Vektor.

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 8-16°C inkubiert und die DNA anschließend in superkompetente Zellen transformiert (4.2.3).

4.1.5 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Alle Sequenzierungen wurden unter Verwendung des DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit nach der Sanger-Methode durchgeführt (Sanger *et al.* 1977). Die vier zum basenspezifischen Kettenabbruch der DNA-Synthese eingesetzten Didesoxynukleotide sind unterschiedlich fluoreszenzmarkiert und dienen zur Bestimmung der Nukleotidabfolge eines DNA-Abschnittes.

Entsprechend den Herstellerangaben wurden für die jeweilige zu sequenzierenden DNA spezifische Oligonukleotide in einer PCR-Reaktion verlängert. Das bei der Reaktion entstandene Gemisch von DNA-Molekülen unterschiedlicher Länge wurde anschließend

elektrophoretisch aufgetrennt und anhand der Fluoreszenzmarkierung deren Nukleotidsequenzen bestimmt. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen ABI Prism und MacMolly Tetra.

4.1.6 Herstellung der Expressionsplasmide für $G\alpha_s$ -Mutanten

4.1.6.1 Herstellung von $G\alpha_s$ -s4yHis/pQE60

Für die gerichtete Insertion eines Hexahistidinepitops in die $G\alpha_s$ -s4-Sequenz wurde der PCR-basierte QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet.

Die Mutagenese mit Hilfe dieses Kits umfasst drei Schritte. In einer PCR-Reaktion werden Oligonukleotide eingesetzt, die sowohl zueinander komplementär sind als auch mit der *template*-DNA hybridisieren können. Ihre Sequenz enthält dabei die einzuführende Mutation. Die Produkte dieser PCR-Reaktion sind lineare, zueinander komplementäre DNA-Moleküle, die hybridisieren und aufgrund der Struktur der eingesetzten Oligonukleotide auch zirkularisieren können (vgl. auch Abb. 7 A). Im zweiten Schritt wird die *template*-DNA aus dem Reaktionsansatz entfernt. Da sie im Gegensatz zum PCR-Produkt methyliert ist, wird sie von der methylierungsabhängig arbeitenden Restriktionsendonuklease *DpnI* erkannt und abgebaut. Das PCR-Produkt bleibt intakt und wird in einem dritten Schritt in *E.coli* transformiert, wo der Ringschluß erfolgt und das so entstandene Plasmid propagiert werden kann.

In die für $G\alpha_s$ -s4 kodierenden DNA wurde zwischen den Nukleotiden 390 und 391 eine für die Aminosäuresequenz GGHHHHHAAGPP kodierende Nukleotidsequenz eingeschoben (vgl. dazu Abb. 7 B). Die zusätzlichen, das Hexahistidin-*tag* flankierenden Aminosäuren Glycin und Alanin dienen der Flexibilisierung des Epitops und werden im folgenden „Linker“ genannt. Die Einschubstelle des Epitops befindet sich am Beginn einer Helix, direkt nach zwei aufeinanderfolgenden Prolin-Seitenketten. Um strukturelle Einflüsse dieses starren Diprolin-Motivs auf die Helix zu gewährleisten, wurde es am C-Terminus des Epitops wiederholt.

Die 5'-Enden der mutagenen Oligonukleotide kodierten die Hexahistidinsequenz und waren zueinander komplementär. Die 3'-Enden beider Oligonukleotide hybridisierten mit Bereichen der $G\alpha_s$ -s4-cDNA, die die einzuführende Mutation flankierten. Über die Sequenzen der Oligonukleotide wurden außerdem zwei weitere, stille Mutationen in die $G\alpha_s$ -s4-Sequenz eingeführt, die die anschließende Analyse erleichtern sollten. Zum einen wurde eine unitäre *EagI*-Schnittstelle generiert, zum anderen eine in der *template*-DNA vorhandene *EcoRI*-Schnittstelle entfernt.

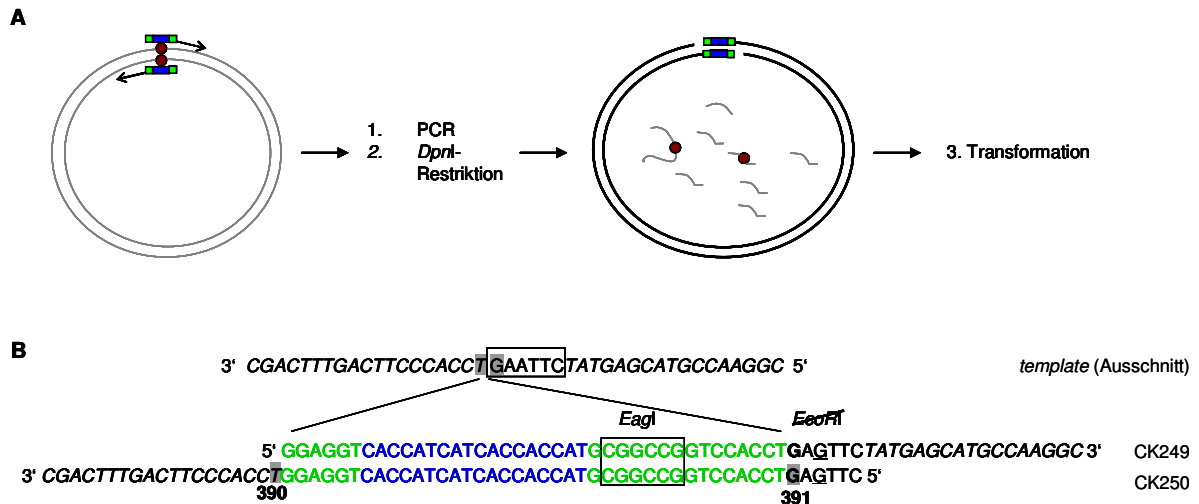


Abb. 7 Mutagenese zur Herstellung von $G\alpha_s$ -s4yHis/pQE60. A: Kurzdarstellung der Mutageneseschritte (nach: QuikChange Mutagenesis Handbook, Stratagene). Das bei der PCR-Reaktion entstandene Gemisch aus parentaler und neu synthetisierter (mutierter) DNA wird mit *DpnI* abgebaut, so dass nur die mutierten DNA-Moleküle intakt bleiben. Die Reaktionsprodukte sind lineare DNA-Moleküle, die hybridisieren und aufgrund der Primerstruktur zirkularisieren können. Grau: parentale DNA, schwarz: neu synthetisierte (mutierte) DNA-Moleküle, dunkelrot: zu mutierender Bereich. **B: Alignment der Mutageneseprimer CK249 und CK250.** Beide Oligonukleotide hybridisieren miteinander in den übereinanderliegenden Bereichen bzw. mit der $G\alpha_s$ -s4-cDNA in den schwarz und kursiv markierten Bereichen. Zwischen den Nukleotiden 390 und 391 von $G\alpha_s$ -s4 (grau hinterlegt) erfolgte die Insertion. Die *EcoRI*-Schnittstelle (GAATTC) in der parentalen Sequenz (schwarz umrahmt) wurde durch die Mutagenese (GAGTTC) zerstört, die unitäre *EagI*-Schnittstelle wurde über die Linkersequenz eingeführt. Blau markiert ist die für die 6 sequenziellen Histidine kodierende Sequenz, die Linkersequenzen sind grün dargestellt. Die $G\alpha_s$ -s4-cDNA-Sequenz ist schwarz und kursiv dargestellt.

Die PCR-Reaktion für die Mutagenese wurde in 50 μ L durchgeführt und setzte sich wie folgt zusammen:

5 μ L	10fach konzentrierter Reaktionspuffer
10 bzw. 50 ng	<i>template</i> -DNA
je 10 pmol	Oligonukleotide CK249 bzw. CK250
1 μ L	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
1 μ L	<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase (2,5 U/ μ L)

Die Reaktionsbedingungen für die PCR-Reaktion sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Im Anschluß an die PCR-Reaktion wurde die methylierte, parentale DNA durch Zugabe von 10 U *DpnI* und Inkubation für 1 h bei 37 °C abgebaut. Die neu synthetisierte DNA wurde anschließend in *E.coli* XL1-Blue superkompetente Zellen transformiert. Diese reparaturkompetenten Zellen sind in der Lage, die hybridisierten und zirkularisierten DNA-Einzelstränge zu ligieren. Die korrekte Nukleotidabfolge wurde durch Sequenzierung bestätigt (4.1.5).

Tabelle 8 PCR-Reaktionsbedingungen für die Mutagenese zur Herstellung von $G\alpha_s$ -s4yHis/pQE60.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95 °C	30 s
2	18	95 °C	30 s
		55 °C	1 min
		68 °C	10 min
3	1	68 °C	10 min

4.1.6.2 Herstellung von $G\alpha_s$ -s4CH/pQE60

$G\alpha_s$ -s3 und -s4 unterscheiden sich lediglich in der An- bzw. Abwesenheit des Codons AGT (Nt 214-216 in $G\alpha_s$ -s4). Das Plasmid $G\alpha_s$ -s4CH/pQE60 konnte daher leicht durch Austausch eines DNA-Fragmentes einer $G\alpha_s$ -s3CH-kodierenden gegen eine $G\alpha_s$ -s4-kodierende Sequenz hergestellt werden (vgl. Abb. 8).

Vom 5'-Ende der kodierenden Sequenz von $G\alpha_s$ -s3CH wurde ein 920 bp großes Fragment durch Restriktion mit den singular in diesem Konstrukt schneidenden Enzymen *NcoI* und *XmaI* entfernt und durch ein ebenso hergestelltes Fragment („insert“) aus $G\alpha_s$ -s4/pQE60 ersetzt (siehe 4.1.3). Um eine Religation des einfach geschnittenen Plasmids $G\alpha_s$ -s3CH/pQE60 zu verhindern, wurde dessen 920 bp-Fragment zusätzlich mit *BclI* in zwei kleinere Fragmente von 600 bzw. 320 bp gespalten.

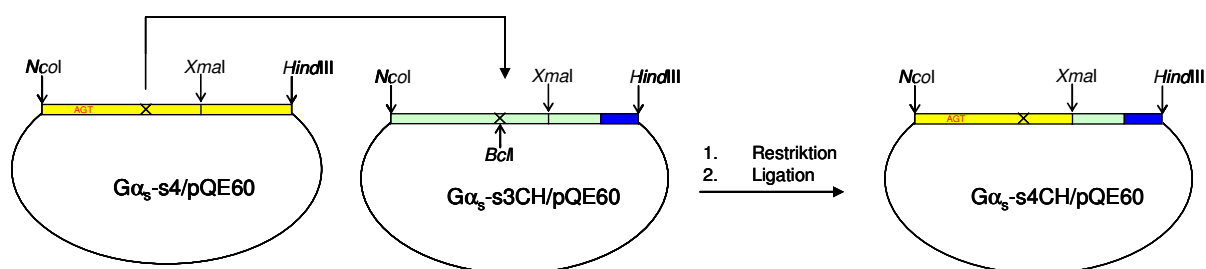


Abb. 8 Herstellung von $G\alpha_s$ -s4CH/pQE60 durch Austausch von Restriktionsfragmenten. Das 920bp große, mit *NcoI* und *XmaI* freigesetzte Fragment aus $G\alpha_s$ -s4/pQE60 wurde in das mit den gleichen Enzymen geöffnete Plasmid s3CH/pQE60 ligiert. Das neue Konstrukt enthält die für $G\alpha_s$ -s4CH kodierende Sequenz. Die für die Hexahistidinsequenz kodierende Nukleotidfolge ist blau markiert. Wie bereits beschrieben, sind s4 und s3 bis auf An- bzw. Abwesenheit des Triplets AGT (rot) sequenzgleich. Die unterschiedlichen Farben für s3 und s4 dienen lediglich der Veranschaulichung der Klonierungsstrategie und stellen keine Sequenzunterschiede dar.

Die Restriktionsfragmente (*insert*: 920 bp, Plasmid: 3500 bp) wurden über ein 1%iges Agarosegel elektrophoretisch getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Jetsorb-Kit (Genomed) nach Herstellerangaben aus den Gelstücken eluiert. Die Ligation des 3500 bp-Fragments von $G\alpha_s$ -s3CH/pQE60 und des 920 bp-Fragments von $G\alpha_s$ -s4/pQE60 erfolgte

anschließend für 2 h bei Raumtemperatur (siehe 4.1.4). Das resultierende Plasmid $G\alpha_s$ -s4CH/pQE60 wurde in *E.coli* XL1-Blue-Zellen transformiert und amplifiziert. Die korrekte Basenabfolge wurde durch Sequenzierung bestätigt (4.1.5).

4.1.6.3 Herstellung von $G\alpha_s$ -s4XHS/pQE60

Die XHS-Modifikation ist ein Peptid, das sequenziell aus der Konsensus-Sequenz für die **X**a-Protease, einer **H**exahistidinsequenz und einer **S**trep-tagII-Sequenz zusammengesetzt ist. Es wurde als C-terminale Affinitätsmodifikation des $G\alpha_s$ -s4 konstruiert.

Die Mutagenese zur Herstellung des Plasmids $G\alpha_s$ -s4XHS/pQE60 wurde in mehreren Schritten durchgeführt. In zwei aufeinanderfolgenden PCR-Schritten wurden die für die Xa-Protease-Konsensussequenz und die Hexhistidinsequenz kodierende DNA an die $G\alpha_s$ -s4-cDNA angefügt (siehe Abb. 9, Sequenzen Nr. 2 und 3; Oligonukleotid-Paare KK006-1 und -2 sowie KK007-1 und -2, vgl. S. 39). Das Reaktionsprodukt wurde in T-Easy ligiert, kloniert und amplifiziert („ $G\alpha_s$ -s4XH/T-Easy“). Die $G\alpha_s$ -s4XH-cDNA wies aufgrund des Oligonukleotiddesigns eine *Nco*I- und eine *Nhe*I-Schnittstelle an 5'- bzw 3'-Position auf. Die das Strep-tagII kodierende Sequenz war auf zwei an 5'-Position phosphorylierten, zueinander komplementären Oligonukleotiden kodiert (Abb. 9, Sequenz Nr. 4). Nach der Hybridisierung dieser Oligonukleotide wies der resultierende DNA-Doppelstrang zwei unterschiedliche 5'-Überhänge (CTAG bzw. AGCT) auf, so dass er im folgenden gerichtet ligiert werden konnte (CTAG hybridisiert mit einem von *Nhe*I erzeugten, AGCT mit einem von *Hind*III erzeugten 5'-Überhang).

Die für $G\alpha_s$ -s4XH codierende DNA wurde mit *Nco*I (5') und *Nhe*I (3') aus $G\alpha_s$ -s4XH/T-Easy freigesetzt. Der Zielvektor pQE60 wurde mit *Nco*I und *Hind*III geöffnet. In einer Drei-Komponenten-Ligation wurden das *Nco*I-*Nhe*I-Fragment, die hybridisierten Oligonukleotide und der geöffnete Zielvektor eingesetzt. Das resultierende Plasmid $G\alpha_s$ -s4XHS/pQE60 wurde in *E.coli* XL1 Blue transformiert und amplifiziert. Die korrekte Basenabfolge des *inserts* wurde durch Sequenzierung bestätigt (4.1.5).

Die PCR-Reaktionen

Für die erste PCR-Reaktion setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

5 μ L	10fach konzentrierter Puffer für Pfu-Polymerase
5 μ L	dNTPs (je 2,5mM)
48,4 ng	<i>template</i> -DNA
je 0,5 μ M	Oligonukleotide (KK006-2 und KK007-1)
2,5 U	<i>Pfu</i> Polymerase
ad 50 μ L	Aqua bidest.

Die Reaktionsbedingungen für die PCR sind in Tabelle 9 aufgeführt.

A

1. 5'... C CTC CGT CAG TAT GAG CTG CTC TAA 3'
 2. 5' C CTC CGT CAG TAT GAG CTG CTC GGG GCA ATC GAG GGA AGG CAC 3'
 3. 5' GGG GCA ATC GAG GGA AGG CAC CAT CAC CAT CAC CAT GGT GCT AGC 3'
 4. 5' CTA GC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA T A 3'
3' G ACC TCG GTC CGC GTC AAG CTT TTT A T TCGA 5'
 5. 5' ...C CTC CGT CAG TAT GAG CTG CTC GGG GCA ATC GAG GGA AGG CAC CAC CAC CAT CAC CAT GGT GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAA 3'
- Linker
Xa
His₆
Linker
Strep-tag II

B

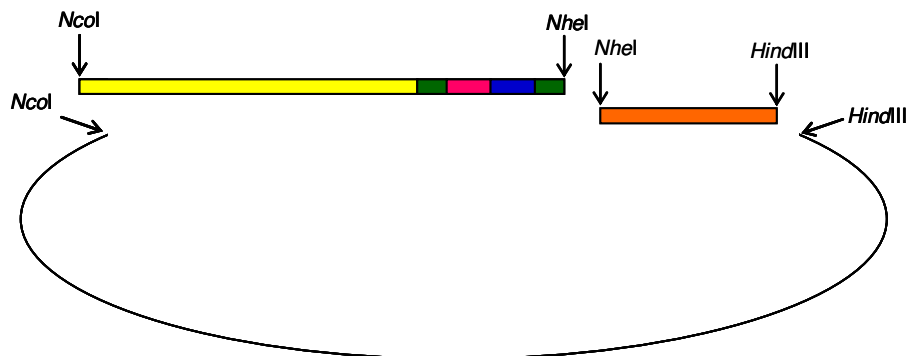


Abb. 9 Schematische Darstellung der Herstellung von $G\alpha_s$ -s4-XHS/pQE60. A: Zusammensetzung der XHS-Modifikation. B: Schematische Darstellung der Drei-Komponenten-Ligationsreaktion. Erläuterungen siehe Text. Nr. 1 = 3' DNA-Sequenz von wt $G\alpha_s$ -s4; Nr. 2 = rev.kompl. Sequenz von KK007-1; Nr. 3 = rev.kompl. Sequenz von KK007-2; Nr. 4 = hybridisierte Oligonukleotide KK008-1 und KK008-2; Nr. 5 = finale 3'-Sequenz von $G\alpha_s$ -s4-XHS. Gelb: wildtypische $G\alpha_s$ -s4-cDNA-Sequenz, grün: *linker*-Sequenzen, magenta: für Protease-Spaltstelle kodierende Sequenz, blau: für His₆-tag kodierende Sequenz, ocker: für Strep-tagII kodierende Sequenz. Der dargestellte Vektor ist pQE60.

Tabelle 9 PCR-Reaktionsbedingungen für die Mutagenese zur Herstellung von $G\alpha_s$ -s4-XHS/pQE60.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1x	94 °C	45 s
2	3x	94 °C	45 s
		60 °C	45 s
		72 °C	2 min 24 s
3	25x	94 °C	45 s
		70 °C	45 s
		72 °C	2 min 24 s
4	1x	72 °C	10 min
		2 °C	Pause

Das in dieser Reaktion gebildete Produkt wurde über ein 1% Agarosegel gereinigt. Es wies eine korrekte Länge von ca. 1200 bp auf. In einem Kontrollansatz, der statt der *template*-DNA Wasser enthielt, wurde kein Produkt gebildet. Das aus dem Agarosegel eluierte Produkt der 1. PCR-Reaktion wurde wiederum als Ausgangssequenz in eine zweite PCR-Reaktion eingesetzt, die unter gleichen Bedingungen und Zusammensetzungen wie die erste Reaktion ablief (jedoch mit KK007-2 statt KK007-1). Die für die Klonierung in den T-Easy-Vektor nötigen A-Überhänge an den 3'-Enden der neu synthetisierten DNA-Stränge wurden durch 10minütige Inkubation mit 1 U Taq-Polymerase bei 70°C erzeugt. Das zweite PCR-Produkt ($G\alpha_s$ -s4-XH) wurde ebenfalls über ein 1%iges Agarosegel gereinigt und nach Angaben des Herstellers in den T-Easy-Vektor ligiert und nach Transformation in *E.coli* XL1-Blue amplifiziert.

Drei-Komponenten-Ligation in den Expressionsvektor

Das in T-Easy klonierte $G\alpha_s$ -XH-Produkt wurde durch Restriktion mit *NcoI* und *NheI* freigesetzt und über ein Agarosegel gereinigt. Der Zielvektor pQE60 wurde durch Restriktion mit *NcoI* und *HindIII* linearisiert und ebenfalls über ein Agarosegel gereinigt. Die beiden Oligonukleotide KK008-1 und KK008-2 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, für 1 min bei 94°C denaturiert und für 5 min bei RT und anschließend auf Eis abgekühlt, um eine Hybridisierung zu erreichen. In die Ligationsreaktion (4.1.4) wurden das Fragment $G\alpha_s$ -XH und die hybridisierten Oligonukleotide in mindestens 6fachem molarem Überschuß bezogen auf den linearisierten Vektor eingesetzt.

Die korrekte Nukleotidabfolge wurde durch Sequenzierung des Plasmids bestätigt (siehe 4.1.5).

4.1.6.4 Herstellung der TAP-modifizierten $G\alpha_s$ -Konstrukte

Zur Herstellung TAP-modifizierter Proteine in Säugerzellen wurden die Vektoren pZOME-1-C (C-terminale TAP-Modifikation) und pZOME-1-N (N-terminale TAP-Modifikation) entwickelt (Rigaut *et al.* 1999), die von der Firma Cellzome über Euroscarf (http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/cz_plas.html) bezogen und in *E.coli* XL1 Blue-Zellen propagiert werden können. Die Insertion der gewünschten DNA in das korrekte Leseraster kann nur über eine einzige Schnittstelle (*Bam*HI in pZOME-1-C bzw. *Eco*RI in pZOME-1-N) erfolgen.

In diesen Vektoren hergestellte $G\alpha_s$ -TAP-Konstrukte ließen sich jedoch nicht reproduzierbar exprimieren und schienen verschiedenen Rekombinationsereignissen ausgesetzt zu sein. Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, wurde daher die für das TAP-Peptid kodierende Sequenz aus den pZOME-Vektoren ausgeschnitten und zusammen mit der für $G\alpha_s$ -s4 kodierenden DNA in einen pCDNA3-Vektor ligiert.

Einführen der *Bam*HI- (C-TAP) bzw. der *Eco*RI-Schnittstelle (N-TAP)

Die für eine korrekte Insertion der $G\alpha_s$ -kodierenden Sequenz in das Leseraster der TAP-kodierenden Sequenz nötigen Schnittstellen wurden mittels einer PCR-Reaktion in die $G\alpha_s$ -s4-DNA eingeführt. Im Falle des C-TAP-Konstruktes musste auf eine asymmetrische Schnittstelle (*Bbs*I) zurückgegriffen werden, da *Bam*HI auch innerhalb der $G\alpha_s$ -Sequenz schneidet. Die Oligonukleotide für die PCR-Reaktion wurden so gewählt, dass bei einem *Bbs*I-Verdau des PCR-Produktes ein *Bam*HI-kompatibler Überhang entstand, der anschließend für die Ligation des DNA-Fragmentes in das C-TAP-Leseraster benutzt wurde. Die PCR-Reaktion wurde zunächst in Halbreaktionen durchgeführt, in denen nur jeweils ein Oligonukleotid anwesend war. Nach 5 Zyklen wurden beide Halbreaktionen vereinigt und die Reaktion für 20 Zyklen fortgesetzt.

Ein Reaktionsansatz für eine Halbreaktion setzte sich folgendermaßen zusammen:

2,5 μ L	10fach konzentrierter Cloned <i>Pfu</i> -Puffer
2,5 μ L	dNTP (je 2,5 mM)
50 ng	<i>template</i> -DNA ($G\alpha_s$ -s4/NpT7-5)
je 1 μ M	Oligonukleotid CK287 bzw. CK288 (C-TAP) Oligonukleotid CK289 bzw. CK290-2 (N-TAP)
0,3 μ L	Cloned <i>Pfu</i> Polymerase (= 0,8U)
ad 25 μ L	Aqua bidest.

Die Reaktionsbedingungen für die PCR sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Für die Halbreaktionen wurden die für die jeweiligen Primer optimalen *Annealing*-Temperaturen. Die 3'-A-Überhänge für die Zwischenklonierung in T-Easy wurden im letzten Schritt durch 10minütige Extension der Produkte durch die *Taq*-Polymerase erzeugt. Die Reaktionsprodukte wurden über Agarosegele gereinigt und anschließend in T-Easy entsprechend den Herstellerangaben ligiert. Die korrekte Nukleotidabfolge der mutierten DNA wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Tabelle 10 PCR-Reaktionsbedingungen für die Herstellung TAP-modifizierter $G\alpha_s$ -Konstrukte.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1x	95 °C	45 s
2	5x	95 °C	45 s
		50/ 55 °C ²	45 s
		72 °C	2 min 30 s
Vereinigung der Halbreaktionen			
3	20x	95 °C	45 s
		50 °C	45 s
		72 °C	2 min 30 s
4	1x	72 °C	10 min
		4 °C	Pause
Zugabe von 5 U <i>Taq</i> -Polymerase			
5	1x	72 °C	10 min
		4 °C	Pause

Herstellung von C-TAP/pCDNA und N-TAP/pCDNA

Die auf den pZOME-Vektoren kodierten Sequenzen für ein C- bzw. N-terminales TAP-Peptid werden von den Schnittstellen *Bam*HI (5') und *Eco*RI (3') flankiert. Über eine Restriktion mit diesen beiden Endonukleasen wurden die DNA-Bereiche freigesetzt und in einen ebenso behandelten pCDNA3-Vektor ligiert. Die Orientierung der TAP-Sequenzen zum Promotor blieb dabei erhalten.

Die entstandenen Plasmide C-TAP/pCDNA3 und N-TAP/pCDNA3 wurden für die Herstellung der $G\alpha_s$ -TAP-Konstrukte verwendet.

Während das C-TAP/pCDNA3-Konstrukt aufgrund eines fehlenden Startcodons nicht exprimiert wird, so existiert für das N-TAP/pCDNA3-Konstrukt jedoch ein offenes Leseraster, dessen Stop-Codon in der Vektorsequenz liegt. Das bei einer Expression entstehende Protein ist 22 kDa groß und wurde im weiteren Verlauf der Arbeit als Negativkontrolle bei der TAP-Prozedur eingesetzt.

Herstellung der $G\alpha_s$ -TAP-Konstrukte

Die C-TAP- bzw. N-TAP/pCDNA3-Plasmide (s. S. 52) wurden mit *Bam*HI bzw. *Eco*RI linearisiert. Um eine Religation des geöffneten Vektors zu verhindern, wurde er nach der

² Die *Annealing*-Temperatur betrug 50 °C für die Oligonukleotide CK287, CK288 und CK290-2 bzw. 55 °C für das Oligonukleotid CK289. Nach der Vereinigung der Halbreaktionen wurde die niedrigere *Annealing*-Temperatur (50 °C) gewählt.

Restriktion über eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und anschließend mit *Shrimps Alkaline Phosphatase* (SAP) dephosphoryliert. Der linearisierte Vektor wurde dafür in 20 μL einfach konzentriertem SAP-Puffer mit 0,1 U SAP (beides Fa. USB) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Phosphatase wurde durch Einstellen des Ansatzes auf 10 mM EGTA und Inkubation für 5 min bei RT sowie durch anschließende 15minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

Die in T-Easy zwischenklonierten, mit *BbsI*- bzw. *EcoRI*-Schnittstellen versehenen $G\alpha_s$ -s4-DNAs (siehe S. 50) wurden durch Restriktion mit den gleichen Enzymen freigesetzt. Sowohl der linearisierte, dephosphorylierte Vektor als auch das $G\alpha_s$ -insert wurden anschließend über ein Agarosegel gereinigt. Die Ligation des inserts in den linearisierten Vektor erfolgte wie in 4.1.4 beschrieben. Die korrekte Insertion wurde per Sequenzierung verifiziert.

4.1.7 Herstellung von RGS-PX1-Expressionsplasmiden

4.1.7.1 Herstellung von His₆-FLAG-moRGS-PX1/NpT7-5

Für die Klonierung der RGS-Domäne des murinen RGS-PX1 wurde aus S49-Maus-Lymphozyten hergestellte cDNA verwendet. Mit den Oligonukleotiden CK246 und CK247 wurden an das 5'-Ende der Sequenz eine für ein His₆- und ein FLAG-tag kodierende Sequenz angefügt: Die Oligonukleotide CK246 und CK248 kodierten eine *NcoI*- bzw. *HindIII*-Schnittstelle, über die das gesamte Konstrukt in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert wurde. Analog zur Herstellung des $G\alpha_s$ -s4XHS-Konstruktes erfolgte auch hier die PCR in zwei Schritten.

Die PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

1 μL	cDNA- <i>template</i>
je 1 μL	2 μM Oligonukleotide (1. Reaktion: CK246 und CK248; 2. Reaktion: CK247 und CK248)
5 μL	dNTP (je 2 mM)
5 μL	10fach konz. <i>Taq</i> -Puffer
5 μL	25 mM MgCl ₂
1 μL	<i>Taq</i> -Polymerase (2,5 U)
ad 50 μL	Aqua bidest.

Die Zyklen der ersten Stufe der zweistufigen PCR liefen unter den in Tabelle 11 aufgeführten Bedingungen ab. Das Produkt der 1. Stufe wurde über ein 1%iges Agarosegel gereinigt, eluiert und in die zweite Stufe eingesetzt. Diese lief unter denselben Bedingungen ab wie die erste Stufe, mit Ausnahme der *Annealing*-Temperatur, die 58 °C statt 48 °C

betrug, und des Schritt 2, in dem 25 Zyklen durchgeführt wurden. Durch Verwendung der *Taq*-Polymerase enthielt das Produkt bereits 3'-A-Überhänge.

Tabelle 11 PCR-Reaktionsbedingungen für die Herstellung von His₆-FLAG-moRGS-PX1/NpT7-5.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1x	92 °C	2 min
2	10x	92 °C	30 s
		48 °C	10 s
		74 °C	50 s
3	1x	60 °C	10 min
4		2 °C	Pause

Das finale Reaktionsprodukt wurde ebenfalls elektrophoretisch gereinigt und über die von der *Taq*-Polymerase generierten 3'-A-Überhänge in einen T-Vektor ligiert. Die für moHis₆-FLAG-RGS-PX1 kodierende Sequenz wurde aus dem T-Vektor durch *Nco*I-/*Hind*III-Restriktion freigesetzt und in den mit denselben Enzymen linearisierten Vektor NpT7-5 ligiert. Die korrekte Nukleotidabfolge des gesamten *inserts* wurde durch Sequenzierung bestätigt.

4.1.7.2 Herstellung von His₆-FLAG-huRGS-PX1/pQE60

Die RGS-Domäne von humanem RGS-PX1 (huRGS-PX1, GeneBank-Eintrag AC420470) wurde aus der vollständigen, in pCMV-Script klonierten DNA dieses Proteins amplifiziert. Die Reaktion erfolgte dabei zu den in 4.1.7.1 beschriebenen Bedingungen unter Verwendung der gleichen Oligonukleotide, da die mit den Oligonukleotiden hybridisierenden Sequenzen der RGS-Domänen von murinem und humanem RGS-PX1 identisch sind. Das PCR-Produkt wurde nach Herstellerangaben in den T-Vektor ligiert und das resultierende Plasmid in *E. coli* XL1-Blue transformiert und amplifiziert. Die für His₆-FLAG-huRGS-PX1 kodierende DNA wurde durch Restriktion mit *Nco*I und *Hind*III aus dem T-Vektor freigesetzt, in einen mit den gleichen Enzymen linearisierten pQE60-Vektor ligiert und in *E.coli* XL1-Blue amplifiziert. Die korrekte Nukleotidabfolge wurde durch Sequenzierung bestätigt (4.1.5).

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Aus einer lagerfähigen Stammkultur (BL21(DE3)/pREP4) wurden Zellen entnommen und auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen, der zur Selektion pREP4-tragender Zellen Kanamycin beigefügt war. Mit einer isoliert auf dieser Platte gewachsenen Bakterienkolonie wurden 2 mL-LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Mit

100-200 μL dieser Vorkultur wurden 100 mL LB-Medium inokuliert und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Bei einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ wurde die Kultur zügig auf Eis abgekühlt und anschließend für 5 min bei 3500 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in 40 mL TfbI resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min bei 3500 x g und 4 °C). Die Zellen wurden anschließend in 4 mL eiskalter TfbII-Lösung resuspendiert und als 100- und 200 μL -Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2.2 Herstellung chemisch superkompetenter Bakterienzellen

Aus einer lagerfähigen Stammkultur (XL1-Blue) wurden Zellen entnommen und auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Mit einer isoliert auf dieser Platte gewachsenen Kolonie wurden 2 mL-LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Mit 100-200 μL dieser Vorkultur wurden 250 mL SOB-Medium inokuliert, schüttelnd weiter inkubiert und bei einer $\text{OD}_{600} = 0,6$ auf Eis schwenkend abgekühlt. Die Zellen wurden anschließend für 10 min bei 3500 x g bei 4 °C sedimentiert und dann vorsichtig in 50 mL TB-Medium resuspendiert, nochmals sedimentiert und wiederum in 10 mL TB-Medium resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 1,5 mL DMSO zugesetzt. Nach nochmaliger Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Zellen zu 100 μL und 200 μL aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

4.2.3 Hitzeschocktransformation von Bakterienzellen

Ein 100 μL -Aliquot chemisch kompetenter bzw. superkompetenter Zellen wurde aufgetaut und mit 1-10 ng des zu transformierenden Plasmids versetzt, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte durch Überführen des Reaktionsgefäßes in ein auf 42 °C temperiertes Wasserbad für 45 bzw. 90 s (superkompetente bzw. kompetente Zellen) und anschließende Inkubation auf Eis für 2 min. Die transformierten Zellen wurden anschließend mit 200-400 μL SOB- oder SOC-Medium gemischt und 30 min bis 1 h bei 37 °C (Wasserbad) inkubiert. Zur Selektion der Transformanten wurden 50 bis 150 μL dieser Zellsuspension auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen, 5-10 min antrocknen lassen und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

4.2.4 Kultivierung und Propagation eukaryotischer Zellen

Zelllinie	Kulturtemperatur	CO ₂ -Gehalt
S49	37 °C	7 %
2B2	33 °C	5 %
SHSY-5Y	37 °C	7 %
COS-7	37 °C	7 %
HEK293	37 °C	5 %
Sf9	27 °C	0,03 %

Die Maus-Lymphomzelllinie S49(cyc⁻) sowie die Sf9-Insektenzellen wurden in Suspensionskultur gehalten, alle anderen Zelllinien wuchsen adhärent.

Die Suspensionskulturen wurden bei einer Zelldichte von ca. 2×10^6 Zellen/mL etwa 1:4 mit frischem Medium verdünnt, so dass die neue Zelldichte nicht unter $0,5 \times 10^6$ Zellen/mL lag.

Adhärenzte Kulturen wurden bei Konfluenz mit sterilem PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen, mit HEG 2-5 min bei 37 °C inkubiert und von der Wachstumsfläche gelöst. Anschließend wurden die Zellen durch Tritulieren vereinzelt, mit frischem Medium verdünnt und in eine frische Zellkulturflasche überführt oder entsprechend den Versuchsanforderungen in kleinere Kulturgefäße ausgesät.

Die Zelldichtebestimmung erfolgte durch Zählung in einer Neubauer-Zählkammer.

4.2.5 Amplifikation von Baculoviren

Der AcNPV-Virus (*Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus*) infiziert ausschließlich Insektenzellen und fungiert als Vehikel für den Transport von cDNA in Sf9-Zellen. Die Fremd-DNA wird mithilfe des Bac-to-Bac-Systems (Invitrogen) anstelle der kodierenden Sequenz des viralen Polyhedringenes in das Genom des AcNPV integriert.

Zur Amplifikation der das Transgen tragenden Baculoviren wurden Sf9-Zellen bei einer Dichte von 0,8 bis $1,0 \times 10^6$ Zellen/mL mit einer MOI von 0,01 infiziert und 5-10 d weiter kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 800 x g für 10 min in der Kälte sedimentiert und der virushaltige Überstand abgenommen und steril bei 4°C gelagert.

4.3 Heterologe Proteinexpression

4.3.1 Proteinexpression in Bakterienzellen

Für die heterologe Expression von Proteinen in Prokaryoten wurde der *E. coli*-Stamm BL21/pREP4 verwendet.

Mit einer nach Hitzeschock-Transformation (siehe 4.2.3) erhaltenen Einzelkolonie wurden 2 mL LB-Medium mit 50 µg/mL Ampicillin und 50 µg/mL Kanamycin angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Die benötigte Menge *Terrific Broth*-Medium oder *T7 enriched*-

Medium wurde mit 1/100 Vol. dieser Übernachtskultur inokuliert und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 wurde die Expression in den Zellen mit 100 μ M IPTG induziert und die Zellen für weitere 12-18 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 5000 x *g* für 15 min sedimentiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für wtG α s-s4 wurden gleiche Ausbeuten an aktivem Protein erzielt, wenn die Expressionskultur bei einer Dichte von $OD_{600} = 1,2$ mit 100 μ M IPTG induziert und für weitere 4-6 h bei 30 °C inkubiert wurde.

4.3.2 Aufschluß von Bakterienzellen

Die bakterielle Zellwand besteht aus einem heteropolymeren Peptidoglykan („Murein“), das mit Lysozym enzymatisch gespalten werden kann. Die eigentliche Lyse der Zellen, d.h. die Zerstörung der Zellmembran, erfolgte nach der Destabilisierung der Zellwand durch osmotischen Schock in hypoosmotischen Lysispuffer. Durch Aufziehen und Ausstoßen der Suspension durch eine 20 x G-Kanüle wurden größere Zellvolumina (z.B. 10-400 mL) zusätzlich mechanisch geschert.

Zellsedimente wurden in 20 mM Na-HEPES, pH 8,0 (1/100 – 1/10 Kulturvolumen) aufgenommen und resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (0,2 mg/mL) wurde die Zellsuspension für 15-30 min auf Eis inkubiert und das Fortschreiten der Lyse anhand der Viskositätszunahme der Lösung verfolgt. Anschließend wurde die Lösung auf 5 mM MgCl₂ eingestellt und die DNA durch Inkubation mit 2 μ g/mL DNase abgebaut. Zur Trennung der löslichen von den partikulären Bestandteilen wurden die so lysierten Zellen nach Zugabe von 100 μ M PMSF bei 40000 x *g* in der Kälte für 30 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und sofort weiter verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.3.3 Proteinexpression in Säugerezelllinien

Eine transiente Überexpression heterologer Proteine wurde durch Transfektion der Zellen mit Plasmiden, auf denen die gewünschten Proteine kodiert waren, erreicht. Es wurde FuGene6 verwendet, ein Lipidreagenz, das Liposomen bildet und über positive Ladungen verfügt, über die es an das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA bindet. Die DNA-beladenen Lipidvesikel werden über die Zellmembran in die Zellen aufgenommen und gelangen in den Kern, wo die DNA schließlich transkribiert wird. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz bestand die transfizierte Plasmidmenge (Stoffmenge) immer zu 1/10 aus einem für GFP kodierenden Plasmid.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion ausgesät und bei ca. 60-80 % Konfluenz mit frischem Medium überschichtet. Das DNA-Lipid-Gemisch wurde entsprechend den Herstellerangaben hergestellt und auf die mit frischem Medium vorbereiteten Zellen getropft.

Nach 36-48 h wurde die Transfektionsrate der Zellen einer Kulturschale unter einem Fluoreszenzmikroskop als Verhältnis der Anzahl fluoreszierender zur Gesamtzahl der Zellen im Gesichtsfeld bestimmt (Hellfeld-Modus, Exzitation 480nm, Emission 610 nm). Nur Zellen aus Schalen mit mindestens 60 % Transfektionsrate wurden 48 h nach der Transfektion mit kaltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen, mit HEG-Lösung von der Wachstumsfläche gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 3 min bei $800 \times g$ in der Kälte sedimentiert, mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und abermals für 3 min bei $800 \times g$ in der Kälte sedimentiert. Die Zellsedimente wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

4.3.4 Proteinexpression in Insektenzelllinien

Für die Überexpression der β - und γ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine sowie von Adenylylcyclasen wurden Insektenzellen der Spezies *Spodoptera frugiperda* (Sf9) verwendet, da in diesem Expressionssystem die korrekte posttranslationale Modifizierung und intrazelluläre Lokalisation eukaryotischer Proteine gewährleistet ist (King 1992). Zudem weisen Sf9-Zellen im Vergleich zu anderen eukaryotischen Systemen eine hohe Expressionsrate auf und können leicht in größeren Mengen kultiviert werden.

Die transgene DNA wurde durch das Baculovirussystem in Sf9-Zellen eingeführt (King 1992).

Die Sf9-Zellen wurden für die heterologe Expression von Proteinen bei einer Dichte von $1,0 - 1,2 \times 10^6$ Zellen/mL mit einer MOI von 2-3 infiziert und weitere 48-72 h kultiviert. Bei multiplen Expressionen wurde darauf geachtet, dass der Volumenanteil des zugegebenen Virus 20 % des Gesamtvolumens nicht überschritt. Die Zellen wurden nach Ablauf der Expressionszeit in der Kälte sedimentiert und der Kulturüberstand verworfen. Aus den Zellsedimenten wurden anschließend sofort Membranen präpariert (Stickstoff-Dekompressions-Methode, siehe 4.3.6), die dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert wurden. Sedimente kleinerer Kulturvolumina (bis 50 mL) wurden direkt schockgefroren; die Membranpräparation erfolgte hier mit der Einfrieren-Auftauen-Methode (siehe 4.3.5)

4.3.5 Aufschluß von eukaryotischen Zellen

Aus einer Suspensionskultur wurden 4×10^6 Zellen bei $800 \times g$ für 10 min und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sedimentiert, der Kulturüberstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in eiskaltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} resuspendiert und abermals wie oben zentrifugiert. Der Überstand des Waschschrilles wurde ebenfalls verworfen und das Zellsediment in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Adhärenent wachsende Zellen wurden von ihrer Wachstumsfläche gelöst, bevor sie mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und eingefroren wurden.

Eingefrorene Sedimente eukaryotischer Zellen wurden in Lysispuffer mit PI-Mix resuspendiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad kontrolliert aufgetaut. Das Einfrieren und Auftauen wurde 3-5mal wiederholt. Es wurden 0,5 mL Lysispuffer pro 1×10^6 Zellen eingesetzt.

4.3.6 Membranpräparation und -extraktion

Zur Anreicherung membranständiger Proteine (Adenylylcyclasen, G β γ) wurden sowohl aus Sf9- als auch aus Säugerzellen (S49 cyc⁻) Zellmembranen präpariert. Für Kulturvolumina ab 100 mL wurde dafür die Stickstoff-Dekompressions-Methode verwendet (Hunter und Commerford 1961; Weitmann *et al.* 1999). Da diese Methode jedoch ein minimales Probenvolumen von ca. 10 mL erfordert, wurden kleinere Sedimente mit der Einfrieren-Auftauen-Methode präpariert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 200 x g) und in eiskaltem PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen. Anschließend wurde das Sediment in Lysispuffer aufgenommen und die Zellen in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren (s. 3.3.5) lysiert.

Einfrieren-Auftauen-Methode

Die sedimentierten, gewaschenen Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit 0,5 – 1 mL Lysispuffer resuspendiert. Die gerade aufgetauten Zellen wurden sofort wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad kontrolliert aufgetaut. Diese Prozedur wurde 3-5x wiederholt. Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (800 x g 1 min) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die darin enthaltenen Zellmembranen bei 40000 x g für 20 min sedimentiert. Die Membranen wurden mit 1 mL Waschpuffer gewaschen, anschließend in Waschpuffer resuspendiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration der Membranpräparationen lag zwischen 0,5 und 10 µg/µL.

Stickstoff-Dekompressions-Methode

Kulturen ab 100 mL wurden wie oben beschrieben sedimentiert und gewaschen, jedoch nicht eingefroren. Das Zellsediment wurde sofort in 20 mL eiskaltem Lysispuffer resuspendiert und in eine eiskalte Parr-Druck-Kammer überführt. Die Kammer wurde verschlossen und mit Stickstoff ein Druck von 50 bar angelegt. Nach 20minütiger Inkubationszeit wurde die Zellsuspension über das Auslaßventil entnommen. Der dabei auftretende Druckabfall verursacht innerhalb der Zellen das Ausperlen von Gasbläschen. Dadurch werden die Zellen aufgebrochen, die Kerne und andere Zellorganellen bleiben jedoch weitgehend intakt und können anschließend zusammen mit nicht lysierten Zellen leicht entfernt werden. Das Gemisch aus Kernen, nicht lysierten Zellen, Trümmern, Membranen und Cytosol wurde dafür

in einer Zentrifuge auf 1000 x *g* beschleunigt. Die Zentrifugation wurde anschließend mit ausgeschalteter Bremse beendet. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment nochmals gewaschen und beide Waschüberstände vereinigt. Aus den vereinigten Überständen wurden die Zellmembranen bei 40000 x *g* für 20 min sedimentiert. Das Sediment wurde anschließend in Waschpuffer aufgenommen, homogenisiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration der Membranpräparationen lag zwischen 0,5 und 10 µg/µL.

Tabelle 12 Zur Membranpräparation aus eukaryotischen Zellen verwendete Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Lysispuffer	20 mM Na-HEPES pH 8,0; 5 mM EDTA ; 0,5 mM EGTA; 150 mM NaCl
Waschpuffer	16 mM Na-HEPES pH 8,0; 1 mM EDTA ; 57 g/L Saccharose

Membranextraktion

Die Extraktion membranassoziierter Proteine erfolgte durch Inkubation von Membranen mit dem nichtionischen Detergens C₁₂E₁₀. Unterhalb seiner Kritischen Micellaren Konzentration (*critical micellar concentration*, CMC) vermittelt das Detergens dabei die lipophile Umgebung, oberhalb der CMC bildet es Micellen. Membranpräparationen wurden mit 0,5 % (w/v) C₁₂E₁₀ durch schüttelnde Inkubation für 1 h bei 4 °C extrahiert, die C₁₂E₁₀-Konzentration wurde anschließend auf 0,05 % (w/v) reduziert.

4.4 Biochemische und analytische Methoden

4.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration verdünnter Proteinlösungen wurde mit dem Bradford NanoQuant-Reagenz der Firma Roth, basierend auf der Methode von Bradford (Bradford 1976), nach den Herstellerangaben ermittelt. Die Konzentration der Probelösung wurde anhand einer bei jeder Messung aufgestellten Standardkonzentrationsreihe mit BSA berechnet.

4.4.2 Konzentrierung von Proteinen durch Fällung

Trichloressigsäure-Fällung

Proteine in verdünnten Lösungen können durch starkes Ansäuern präzipitiert und somit konzentriert werden. Da die Proteine bei dieser Prozedur oft irreversibel denaturiert werden und somit ihre Aktivität verlieren, ist die TCA-Fällung hauptsächlich geeignet, um Proteine für die SDS-Page zu konzentrieren. Jedoch müssen Säurereste vollständig aus der Probe entfernt werden, da ein zu niedriger pH die anschließende elektrophoretische Trennung stört. Detergentien werden mit dieser Methode ebenfalls präzipitiert und somit aufkonzentriert. Für detergentenhaltige Proteinlösungen wurde daher die Acetonfällung (s.u.) durchgeführt.

Probenlösungen wurden in 1,5 mL- oder 2 mL-Reaktionsgefäßen mit 1/10 Vol. 100 % Trichloressigsäure gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch 30 minütige Zentrifugation bei 14000 x g und 4 °C sedimentiert und 2-3x mit 1,5 mL Aceton (temperiert auf -20 °C) gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Proteinsedimente wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet, in 30 – 50 µL einfach konzentriertem SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Proben, die Reste von TCA enthielten (erkennbar an der pH-abhängigen Gelbfärbung des Bromphenolblau), wurden mit gesättigter LiOH-Lösung bis zum Farbumschlag nach blau titriert.

Acetonfällung

Zugabe von polaren organische Lösungsmitteln zu verdünnten Proteinlösungen führt dazu, dass den Proteinmolekülen durch Konkurrenz mit den Lösungsmittelmolekülen ihre Hydrathülle entzogen wird und sie präzipitieren. Detergentien werden nicht präzipitiert und können somit von den Proteinen getrennt werden.

Verdünnte, detergentshaltige Proteinlösungen wurden in 2 mL-Reaktionsgefäßen mit dem 5-7fachen Volumen Aceton (temperiert auf -20 °C) gemischt und 1-12 h bei -20°C inkubiert. Die Proteine wurden durch Zentrifugation für 1 h bei 4 °C und 14000 x g sedimentiert. Die Sedimente wurden anschließend wiederum in 2 mL Aceton (-20 °C) aufgenommen, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Sedimente wurden an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30 – 50 µL einfach konzentriertem SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 95 °C denaturiert.

4.4.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld wurde das diskontinuierliche denaturierende Gelsystem von Laemmli benutzt (Laemmli *et al.* 1976). Je nach Anwendung kamen Gele mit einem Acrylamid-Anteil von 11 %, 15 % oder Gradientengele (9-15 %) zum Einsatz (AA:BAA = 37,5:1). Probenlösungen wurden mit 1/3Vol. 4fach konzentriertem Probenpuffer versetzt, Sedimente gefällter Proteine wurden in einfach konzentriertem Probenpuffer gelöst (s.o.). Nach dem Erhitzen für 5 min bei 95 °C wurden die Proben in die Geltaschen gefüllt (max. 20 µL). Zunächst wurde eine Spannung von 100 V angelegt, nach dem Eindringen der Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 180-200 V erhöht. Vor dem Austreten der Lauffront aus dem unteren Gelende wurde die Elektrophorese beendet. Die Größe der aufgetrennten Proteine wurde anhand eines mitlaufenden vorgefärbten Molekulargewichtsmarkers bestimmt (Prestained Molecular Weight Marker, MBI Fermentas).

4.4.4 Färbemethoden für SDS-Polyacrylamid-Gele

4.4.4.1 Coomassie-Blau-Färbung

Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden die Gele 1-2 h in Färbelösung unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Das Entfärben des Hintergrundes erfolgte für 2-6 h in Entfärberlösung ebenfalls unter Schwenken (Zusammensetzung der Lösungen siehe Abschnitt 3.3.3). Die Empfindlichkeit dieser Färbung liegt bei ca. 200-400 ng / 0,5 cm² Bande (Geldicke 0,7 mm).

4.4.4.2 Silberfärbung

Nach Auftrennen der Proteine per SDS-PAGE erfolgte zunächst eine Fixierung der Proteine im Gel durch Schwenken des Gels in einer Fixierlösung. Nach einem Wasch-Schritt (3x20 s Aqua bidest.) wurde genau 1 min imprägniert und erneut gewaschen (3x20 s Aqua Bidest.). Anschließend erfolgte die Inkubation in der Silberfärbelösung für 20 min. Silbernitratreste wurden anschließend durch Waschen mit Aqua bidest. entfernt (3x20 s). Das Gel wurde anschließend in Entwicklerlösung geschwenkt, um die Proteinbanden anzufärben. Beim Erreichen des gewünschten Färbungsgrades wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 mM EDTA gestoppt (Lösungen siehe Abschnitt 3.3.4). Mit dieser Methode können Proteine noch im Bereich von 5-30 ng / 0,5 cm² Bande (Geldicke 0,7 mm) nachgewiesen werden.

4.4.5 Immunchemische Detektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine

Für eine immunchemische Detektion wurden über PAGE aufgetrennte Proteine in einem Tankverfahren in einem elektrischen Feld auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen übertragen (Towbin *et al.* 1979). Der Transfer erfolgte nach empirisch ermittelten Werten bei konstant 100 V für 50 min (11 %ige Gele und Gradientengele) bzw. 60 min (15 %ige Gele). Die gesamte Prozedur wurde bei 4 °C durchgeführt. Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Transfer für je eine Minute in Ponceau-Lösung geschwenkt, um die Proteine anzufärben, und anschließend in PBST geschwenkt, um den Hintergrund zu entfärben.

Die Blockierung unbesetzter Proteinbindungsstellen auf der Membran erfolgte durch einstündige Inkubation mit RotiBlock-Lösung. Die Inkubation mit primärem Antikörper wurde entweder für 1 h unter Schwenken bei RT oder ohne Bewegung über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die Membranen wurden anschließend 3x5 min mit PBST gewaschen, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit verdünntem sekundären Antikörper. Nach nochmaligem Waschen in PBST (3x5 min) erfolgte die Detektion immunreaktiver Proteine im ECL-System. Die Signale wurden mittels Röntgenfilmen oder einer CCD-Kamera dargestellt.

4.4.6 Funktionsanalyse von Proteinen

4.4.6.1 Adenylylcyclase-Assay

Die Adenylylcyclase katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP. Aktiviertes, d.h. mit GTP, GTP γ S oder AlF $_4^-$ -aktiviertes G α_s ist in der Lage, die Adenylylcyclase zu stimulieren. Bei der Verwendung von GTP oder GTP γ S wurde endogen in den Membranen vorliegender β -adrenerger Rezeptor mit 10 μ M Isoproterenol stimuliert und somit der Nukleotidaustausch am G α_s beschleunigt. Die AC-Aktivität wurde nach der Methode von Salomon *et al.* 1974) bestimmt, die auf der Umsetzung von [α - 32 P]-ATP zu 32 P-cAMP beruht. Das Reaktionsprodukt wird nach Abstoppen der Reaktion sequenziell durch Dowex-Kationenaustausch- und Aluminiumoxid-Chromatographie gereinigt.

Es wurden Plasmamembranpräparationen aus S49 cyc $^-$ -Zellen verwendet, die zwar β -adrenerge Rezeptoren und Adenylylcyclasen besitzen, jedoch kein endogenes G α_s . Die Rekonstitution dieser Membranen mit G α_s (wt oder Mutanten) ermöglicht dessen funktionelle Charakterisierung vor einem Nullhintergrund über die Messung des gebildeten [32 P]-cAMP. In 40 μ L Reaktionspuffer wurden 20 μ g Plasmamembranen mit den zu untersuchenden bakteriellen Lysaten oder gereinigten Proteinen in Sarstedt Polystyren-Röhrchen (#55.476) auf Eis gemischt. Der Leerwert enthielt anstelle von Lysat oder Protein nur AC-Reaktionspuffer. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ L Prä-Mix für 3 min bei 30 °C äquilibriert und anschließend durch Zugabe von 40 μ L Start-Mix initiiert. Nach 20-minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 850 μ L Stop-Lösung beendet.

Um die unterschiedlichen Verluste während der anschließenden chromatographischen Reinigung rechnerisch auszugleichen, wurde die Rückgewinnungsrate des cAMP durch Zugabe von [3 H]cAMP (ca. 5000 cpm) ermittelt. Die Proben wurden auf gewässerte Dowex AG50 WX4-Säulen mit 1 mL Bettvolumen geladen, nicht umgesetztes ATP mit 2 mL Wasser eluiert und gebundene Adenosinphosphate anschließend mit 2x2 mL Wasser eluiert und auf gewässerte 1 mL-Aluminiumoxid-Säulen geladen. Das gebundene cAMP wurde mit 3 mL cAMP-Elutionspuffer eluiert und die Radioaktivität in 8 mL Szintillationsflüssigkeit gemessen. Die spezifische AC-Aktivität wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$A \text{ (nmol / (mg*min))} = \frac{[\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Leerwert}}] * K_{\text{ATP}} * V}{\text{cpm}_{[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}} * t * P * a}$$

A = spezifische Aktivität
 K = Konzentration (nmol / μ L)
 V = Reaktionsvolumen (μ L)
 T = Reaktionszeit (min)
 P = Proteinkonzentration der cyc-Membranpräparation (mg)
 a = [3 H]cAMP-Rückgewinnungsrate

Tabelle 13 Für Adenylylcyclase-Assays verwendete Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
AC-Reaktionspuffer	20 mM Na-HEPES (pH 8,0), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 2 mM MgCl ₂
AC-Prämix	20 mM Na-HEPES (pH 8,0), 0,75 mM ATP, 2 mM MgCl ₂ , 0,02 % (w/v) BSA, 0,03 µg/ µL Pyruvatkinase, 5 mM K-Phosphoenolpyruvat, 0,15 mM GTP _γ S
AC-Startpuffer	15 mM HEPES (pH8,0), 0,03 mM RO20-1724, 0,075 mM ATP, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 3 mM Phosphoenolpyruvat, 0,025 µg/ µL Pyruvatkinase
AC-Stopplösung	2,5 % (w/v) SDS, 50 mM ATP, 1,75 mM cAMP
cAMP-Elutionspuffer	20 mM Imidazol (pH 7,5), 200 mM NaCl

4.4.6.2 cAMP-Akkumulations-Assay

Für diesen Assay wurden stabile 2B2-Zelllinien verwendet, die aufgrund einer Mutation des Gnas-Gens kein funktionales G α_s exprimierten und somit keine endogene G α_s -vermittelte Signaltransduktion aufwiesen (Bastepe *et al.* 2002).

Es wurden 2×10^5 Zellen in 35 mm-Schalen ausgesät und wie in 4.3.2 beschrieben mit den Plasmiden N-TAP-G α_s -s4/pCDNA3 bzw. G α_s -s4-C-TAP/pCDNA3 transfiziert. Das den β_2 -adrenergen Rezeptor kodierende Plasmid β_2 AR/pCDNA1 wurde kotransfiziert.

Das Zellkulturmedium wurde 24 Stunden nach der Transfektion für 8 h mit 2 µCi / mL ³H-Adenin markiert, das von den Zellen aufgenommen und u.a. in ATP, das Substrat der zellulären Adenylylcyclase, inkorporiert wurde. Vor Beginn des Assays (48 h nach der Transfektion) wurde das markierte Medium abgenommen und die Zellen mit Wasch-Lösung gewaschen. Die Adenylylcyclase-katalysierte cAMP-Synthese wurde durch Zugabe eines β_2 -adrenergen Agonisten (100 µM Isoprenalin, gelöst in Wasch-Lösung) in 500 µL frischem Zellkulturmedium 30 min lang stimuliert. Die Reaktion wurde nach Entfernen der Stimulationslösung durch Zugabe von 1 mL eiskalter Stop-Lösung zu den Zellen beendet. Dabei kommt es zur Zerstörung der Zellstrukturen und zur Freisetzung des radioaktiv markierten Reaktionsproduktes sowie der Nebenprodukte in den sauren Überstand. Tritiiertes cAMP wurde anschließend wie in 4.4.6.2 beschrieben chromatographisch aufgereinigt und durch Scintillationsmessung quantifiziert.

Tabelle 14 Für cAMP-Akkumulationsassays verwendete Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
Wasch-Lösung	1 mM IBMX in PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
Stop-Lösung	1 mM ATP, 1 mM cAMP in 5 % (w/v) TCA

4.4.6.3 GTP γ S-Bindungsassay

Die Bindung des nicht hydrolysierbaren GTP-Analogs GTP γ S durch die α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine dient zur Bestimmung der Konzentration an funktionellem, d.h. aktivierbarem G α . Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Assay in Verbindung mit Western Blots vor allem zur Detektion von aktivem G α_s während der Proteinreinigungen und zur Konzentrationsbestimmung des gereinigten Proteins eingesetzt.

Die Proben wurden in 50 mM HEPES (pH8,0), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,05 % (v/v) C₁₂E₁₀, 10 mM MgSO₄ und 2 μ M GTP γ S (2500 cpm / pmol [³⁵S]-GTP γ S) in Polypropylenröhrchen (Sarstedt #55.526) für 30 min in einem auf 30 °C temperiertes Wasserbad schwenkend inkubiert (30 rpm). Durch Zugabe von 2 mL eiskaltem Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) wurde die Reaktion gestoppt, die Proben wurden über Nitrocellulosemembranen filtriert und diese mit jeweils 18 mL Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen getrocknet und die gebundene Radioaktivität in 5 mL Scintillationsflüssigkeit gemessen.

4.4.6.4 „Single-turnover-GTPase“-Assay

Der *Single-turnover*-GTPase-Assay diente der Geschwindigkeitsbestimmung der G α_s -katalysierten GTP-Hydrolyse bzw. der Beeinflussung des Hydrolyseschrittes durch GTPase-akzelerierende Proteine (GAPs). Bei diesem Assay wird die Mg²⁺-Abhängigkeit der GTP-Hydrolyse durch G α_s ausgenutzt: Zunächst erfolgt die Bindung von [³²P]-GTP³ an G α_s bei 30 °C in Abwesenheit von Mg²⁺, die Reaktion wird zum Zeitpunkt t=0 durch Mg²⁺-Zugabe gestartet. Da die Hydrolyse sehr schnell erfolgt, wurden die Reaktionsansätze für die Hydrolyse auf 4°C abgekühlt. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden 50 μ L-Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen und zum Stoppen der Reaktion mit saurer Aktivkohlesuspension gemischt. Während nicht umgesetztes Substrat ebenso wie Proteine an die Kohle bindet, verbleibt das als Reaktionsprodukt entstandene anorganische Phosphat im Überstand und kann durch Zentrifugation abgetrennt werden. Wenn mehrere Meßreihen durchgeführt wurden, so wurde für alle Reihen jeweils ein Mastermix für die G α_s -Verdünnung und den Beladungspuffer hergestellt, um identische Bedingungen in allen Reihen zu ermöglichen.

Gereinigtes G α_s wurde in den bei den jeweiligen Versuchen angegebenen Mengen in HEDBL (10mM Na-HEPES pH8, 1mM EDTA, 1mM DTT, 10 μ g/mL BSA, 0,05% v/v C₁₂E₁₀) vorgelegt. Zweifach konzentrierter Beladungspuffer und das vorgelegte G α_s wurden getrennt auf 30 °C in einem Wasserbad für 3 min temperiert und anschließend zu gleichen

³ Das für diesen Assay und auch für den *Steady-State*-Assay (4.4.6.5) verwendete [³²P]-GTP wurde vor dem Einsatz in GTPase-Versuchen immer chromatographisch gereinigt, um das Signal-Rausch-Verhältnis durch Entfernung von Hydrolyseprodukten zu verbessern (siehe auch 4.5.1).

Volumenanteilen gemischt. Nach 15 min wurde der Ansatz („Beladungsansatz“) auf Eis überführt und 5 min gekühlt. In einem weiteren Gefäß wurde der Mg^{2+} -enthaltende Meßpuffer auf Eis vorgelegt. 1 Volumen des abgekühlten „Beladungsansatzes“ wurde mit 1 Volumen Meßpuffer schnell gemischt und in eine Multipette aufgezogen. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden jeweils 50 μ L als Doppelwert in eine saure Kohlesuspension pipettiert und so gestoppt. Die Kohlesuspension wurde ausgiebig gemischt und 7 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 400 μ L entnommen, in 4 mL Scintillationsflüssigkeit überführt und die enthaltene Radioaktivität bestimmt.

Bestimmung der $G\alpha_s$ -unabhängigen GTP-Hydrolyse bei 30 °C

Nach der 15minütigen Inkubation zum Nukleotidaustausch („ $G\alpha_s$ -Beladung“) wurden 2x 25 μ L HEDBL mit je 2x25 μ L des zweifach konzentrierten Beladungspuffers gemischt, zur Kohlesuspension gegeben und gemessen. Dieser Wert wurde als Blank von allen anderen Werten subtrahiert.

Bestimmung der Mg^{2+} -freien GTP-Hydrolyse durch $G\alpha_s$ bei 4 °C

Der Versuch wurde wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch enthielt der Meßpuffer kein Mg^{2+} . Die so erhaltenen Kontrollwerte wurden von den jeweiligen Meßreihen subtrahiert.

Tabelle 15 Für *Single-Turnover*-GTPase-Assays verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Zweifach Beladungspuffer	konz. 2 μ M GTP (5000-10000 cpm ^{32}P /pmol GTP), 50 mM Na-HEPES pH8 (NaOH), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,04 mg/mL BSA, 10 % (v/v) Glycerol, 0,05 % $C_{12}E_{10}$
Zweifach konz. Meßpuffer	40 mM Na-HEPES pH8 (NaOH), 160 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP, 0,01 mg/mL BSA, 0,05 % $C_{12}E_{10}$
Kohlesuspension	5 % (w/v) in 50 mM NaH_2PO_4 (pH 2 mit H_3PO_4)

4.4.6.5 „Steady-State-GTPase“-Assay

Der Reaktionsansatz aus 20 mM HEPES pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,01% (v/v) $C_{12}E_{10}$, 1 mM $MgSO_4$, 2 μ M GTP, 2500 cpm ^{32}P /pmol GTP (siehe 4.5.1) wurde für 2 min bei 30 °C erwärmt und die Reaktion durch Zugabe des $G\alpha_s$ gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 2x50 μ L (Doppelbestimmungen) Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 750 μ L eiskalter saurer Aktivkohlesuspension gestoppt (siehe 4.4.6.4). Die Kohlesuspension wurde ausgiebig gemischt und 7 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 400 μ L entnommen, in 4 mL Scintillationsflüssigkeit überführt und die enthaltene Radioaktivität bestimmt.

4.5 Chromatographische Methoden

4.5.1 Chromatographische Reinigung von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-GTP}$

In γ -Position radioaktiv markiertes GTP unterliegt auch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ der Radiolyse sowie einer langsamen Hydrolyse. Diese Radiolyse- und Zerfallsprodukte (hauptsächlich $^{32}\text{P}_i$) führen zu einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses in *Single-Turnover*- und *Steady-State*-Assays und müssen daher vom $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ getrennt werden. Die Trennung erfolgte auf einer HPLC-Anlage. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ (18,5 MBq in 50 μL , 6000 Ci/mmol) wurde in 450 μL Puffer A aufgenommen und auf eine in Puffer A äquilibrierte Anionenaustauschersäule (0,4 cm x 25 cm) geladen. Bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 mL/min wurden folgende Elutionsbedingungen verwendet:

Zeit	Eluentkonzentration
0 – 10 min	2,8 % B
10 – 40 min	2,8 – 100 % B
40 – 42 min	100 % B – 2,8 % B
42 – 50 min	2,8 % B

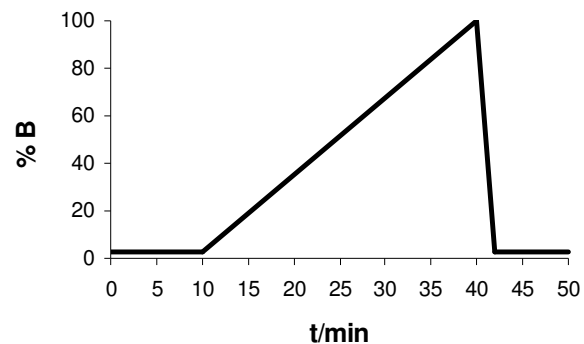


Abb. 10 Chromatographieprogramm für die Trennung von $^{32}\text{P}_i$ von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-GTP}$. Der angesteuerte Programmverlauf ist rechts grafisch dargestellt.

Es wurden 40 Fraktionen (0,5 mL) gesammelt, 2 μL jeder Fraktion wurden in 1 mL Scintillationsflüssigkeit gezählt. Das gereinigte $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ eluierte in Fraktionen 26/27 bzw. 27/28, radioaktive Verunreinigungen eluierten früher (Peak ca. bei Fraktion 20). Die $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ -enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und als 50- und 100 μL -Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Puffer A: 100 mM Triethylamin in A. bidest.

Puffer B: 100 mM Triethylamin in 50 % Ethanol

Beide Puffer wurden mit CO_2 begast, der pH-Wert stellte sich auf 7 ein.

4.5.2 Reinigung von $\text{G}\alpha_s\text{-s4}$

wt $\text{G}\alpha_s\text{-s4}$ wurde heterolog in *E. coli* BL21/pREP4 exprimiert (siehe 4.3.1, Kulturvolumen 10 L) und nach der Methode von Lee *et al.* 1994 mit Modifikationen von Linder (Linder 1999) gereinigt. Die Proteine des Bakterienlysates wurden dabei aufgrund ihrer unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften über 4 verschiedene Chromatographieschritte getrennt (siehe Tabelle 16). Der erste Schritt über DEAE-Sephacel diente dabei vorwiegend dem Abtrennen viskoser Lösungsbestandteile und der Reduktion des Probenvolumens. Die Schritte 2 - 4 wurden an einer ÄKTA-FPLC-Anlage durchgeführt.

Tabelle 16 Ablauf der Reinigung von wildtypischem $G\alpha_s$ über verschiedene Chromatographieschritte.

Schritt	Säulenmaterial	Wechselwirkung
1	DEAE-Sephacel	Anionenaustausch / elektrostatische Wechselwirkung
2	Phenylsepharose	Hydrophobe Interaktion
3	Q-Sepharose	Anionenaustausch / elektrostatische Wechselwirkung
4	BioGel-HTP	Basische Proteine: elektrostatische Wechselwirkungen Saure Proteine: Komplexbindungen mit dem Ca^{2+} der mineralischen Matrix

Die Anwesenheit des wt $G\alpha_s$ -s4 in den einzelnen Fraktionen wurde parallel in [^{35}S]-GTP γ S-Bindungsassays und Western Blots nachgewiesen. Fraktionen mit $G\alpha_s$ -Immunsignal und [^{35}S]-GTP γ S-Bindungsaktivität wurden vereinigt und weiterverwendet.

Lyse

Das gefrorene Zellsediment wurde in 1 L TEDP resuspendiert, entsprechend den Angaben in 4.3.2 lysiert und zentrifugiert. Zur Stabilisierung des $G\alpha_s$ wurde das Lysat auf 30 μ M $AlCl_3$ und 10 mM NaF eingestellt. Alle Schritte der Reinigung erfolgten bei 4 °C.

DEAE-Sephacel-Chromatographie

Das bakterielle Lysat wurde für 30 min unter gelegentlichem Rühren mit 300 mL TEDP-äquibrierter DEAE inkubiert und anschließend durch einen Büchner-Trichter, ausgelegt mit Whatman-Filterpapier Nr. 4, filtriert. Das Austauschharz wurde mit 1 L TEDP gewaschen und mit 3 x 250 ml 300 mM NaCl in TEDP eluiert.

Phenylsepharose-Chromatographie

Eine Phenylsepharosesäule mit 200 mL Bettvolumen wurde mit 25 μ M GDP und 1,2 M Ammoniumsulfat in TEDP-Puffer äquilibriert.

Das DEAE-Eluat wurde mit 25 μ M GDP und 1,2 M Ammoniumsulfat versetzt und 10 min auf Eis rührend inkubiert. Ausgesalzene Proteine wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 8500 rpm in einem Beckmann JA-14-Rotor sedimentiert und der Überstand anschließend auf die äquilibrierte Phenylsepharosesäule geladen. Die Proteine wurden mit 1,2 L Volumen in einem linearen Gradienten von 1,2 M bis 0 M Ammoniumsulfat und 0 -35 % (v/v) Glycerol in TEDP in Fraktionen à 13 mL eluiert (Flußrate 2 mL/min). Das Glycerol im Elutionspuffer gleicht die höhere Viskosität der 1,2 M Ammoniumsulfatlösung aus und stabilisiert damit den Gradienten.

Die $G\alpha_s$ -enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt („P-Eluat“), in einer Amicon-Druckzelle (MWCO 30 kDa) aufkonzentriert und anschließend über Nacht gegen 4 L TDG dialysiert (Dialyseschläuche von Serva, MWCO 3500 Da).

Q-Sepharose

Eine Hi-Load Q-Sepharose 26/10 FPLC-Säule wurde mit TDG-Puffer äquilibriert und das dialysierte „P-Eluat“ geladen. Die Säule wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 2 mL / min mit 150 mL TDG gewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0 – 500 mM NaCl in TDG eluiert und 10 mL-Fraktionen aufgefangen. Die $G\alpha_s$ -enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt („Q-Eluat“).

HTP-Chromatographie

18 mL Biogel-HTP-Material wurden in eine FPLC-Säule gepackt und in TPD äquilibriert. Das „Q-Eluat“ wurde mit 10 mM Kaliumphosphat versetzt und auf die HTP-Säule geladen. Die Säule wurde mit 44 mL TPD gewaschen und in 360 mL mit einem linearen Gradienten von 10 – 500 mM Kaliumphosphat in 5 mL-Fraktionen eluiert.

Die $G\alpha_s$ -enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und in einem Centricon-Röhrchen (MWCO 30 kDa) der Puffer durch abwechselndes Konzentrieren und Verdünnen gegen HMED (siehe 3.3.5) ausgetauscht.

Tabelle 17 Für die Reinigung von $G\alpha_s$ -s4 verwendete Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
TEDP-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit NaOH, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF in A.bidest.
TDG-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit NaOH, 1 mM DTT, 0,025 μ M GDP in A.bidest.
TPD-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH8,0 mit NaOH, 10 mM Kaliumphosphat, pH 8,0 in A.bidest.
Kaliumphosphat	1 M K_2HPO_4 in A.bidest., pH 8,0 eingestellt mit 1 M KH_2PO_4 in A.bidest.

4.5.3 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Mit einer Hexahistidin-Sequenz modifizierte Proteine wurden an einer Ni-NTA-Agarose-Matrix (Qiagen) aufgereinigt. Dabei wurden für ein Kulturvolumen von 10 L 10 mL 50%ige Agarosesuspension verwendet, für kleinere Kulturvolumina wurde die Menge proportional reduziert, betrug jedoch mindestens 200 μ L (entspricht 100 μ L Bettvolumen). Die gesamte Reinigungsprozedur erfolgte bei 4 °C.

Die Ni-NTA-Agarosesuspension wurde in BioRad-Säulen gefüllt (\varnothing 2 cm), mit 20 SV A.bidest. gewaschen und in 2 SV Puffer P2 äquilibriert. Bakterieller Lysat (siehe 4.3.2) wurde auf 0,01 mM GDP und 200 mM NaCl eingestellt und auf die Säule geladen. Mit drei anschließenden Wasch-Schritten (Hochsalzbedingungen: 20 SV P3; Niedersalzbedingungen: 20 SV P2; und Konkurrenz mit Imidazol: 10 SV P4) wurden

unspezifisch und schwach bindende Proteine ohne His₆-Sequenz abgetrennt. Die Elution erfolgte mit 10-20 SV P5.

Von allen Fraktionen wurden Aliquots entnommen, mit 1/3 Vol. 4fach konzentriertem Probenpuffer versetzt. Die enthaltenen Proteine wurden denaturiert und 15-20 µL der denaturierten Probe elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau und/oder Immunfärbung visualisiert. Für einige Reinigungen wurde ein weiterer Chromatographieschritt über eine HTP-Säule durchgeführt (siehe 4.5.2)

Das finale Eluat wurde in Centricon-Röhrchen mit Größenausschluß von 30 kDa gegen HMED (siehe 3.3.5) umgepuffert und konzentriert. Die enthaltene Proteinmenge wurde wie in 4.4.1 beschrieben bestimmt und gegebenenfalls in einem [³⁵S]-GTPγS-Bindungsassay (0) die enthaltene Menge aktives Gα_s ermittelt.

Tabelle 18 Zusammensetzung der für die IMAC verwendeten Puffer. Da dem Lysat bereits NaCl und MgCl₂ zugefügt wurden, sind diese Bestandteile für P1 hier nicht gesondert aufgeführt. Die Imidazolkonzentration des Puffers P4 betrug zwischen 5 und 20 mM. Fusionsproteine mit C-terminalem His₆-tag binden fester an die Ni-NTA-Matrix und können daher stringenter gewaschen werden, wohingegen interne His₆-tags in der Regel eine weniger feste Bindung vermitteln. In solchen Fällen wurde die Imidazolkonzentration auf 10 – 5 mM Imidazol reduziert.

	P1	P2	P3	P4	P5
Tris-HCl pH 8,0	20 mM	50 mM	50 mM	50 mM	20 mM
NaCl	---	500 mM	200 mM	200 mM	---
Imidazol	---	---	---	5 mM	150 mM
MgCl ₂	---	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
GDP	0,01 mM	0,01 mM	0,01 mM	0,01 mM	0,01 mM
PMSF	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM
β-Mercaptoethanol	7 mM	7 mM	7 mM	7 mM	7 mM

Tabelle 19 Zusammensetzung der für die Reinigung von G-Protein-Heterotrimeren über Ni-NTA-Agarose verwendeten Puffer. Für die in Abschnitt 5.5.6.2 beschriebenen Versuche wurden leicht veränderte Pufferzusammensetzungen gewählt. Die Lösungen unterscheiden sich von den in Tabelle 18 angegebenen hauptsächlich in der Puffersubstanz (Na-HEPES statt Tris) und geringeren NaCl-Konzentrationen.

Puffer	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	50 mM Na-HEPES (pH7,8), 0,5 % (v/v) C ₁₂ E ₁₀ , 100 mM NaCl, 10 µM GDP, 1 mM MgCl ₂ , 5 mM β-Mercaptoethanol
Hochsalzpuffer	20 mM Na-HEPES (pH7,8), 0,01 % (v/v) C ₁₂ E ₁₀ , 350 mM NaCl, 100 µM GDP, 1 mM MgCl ₂ , 5 mM β-Mercaptoethanol
Niedrigsalzpuffer	20 mM Na-HEPES (pH7,8), 0,01 % (v/v) C ₁₂ E ₁₀ , 200 mM NaCl, 1 µM GDP, 1 mM MgCl ₂ , 5 mM β-Mercaptoethanol
Imidazol-Waschpuffer	20 mM Na-HEPES (pH7,8), 0,01 % (v/v) C ₁₂ E ₁₀ , 100 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 1 µM GDP, 1 mM MgCl ₂ , 5 mM β-Mercaptoethanol
Elutionspuffer	20 mM Na-HEPES (pH7,8), 0,01 % (v/v) C ₁₂ E ₁₀ , 100 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 1 µM GDP, 1 mM MgCl ₂ , 7 mM β-Mercaptoethanol

4.5.4 StrepTactin-Affinitätschromatographie

Eine StrepTactin-Sepharose-Säule (1 mL Bettvolumen, Bestandteil eines StrepTactin-Kits) und MagnetoBeads wurden von der Firma IBA gekauft. Die im StrepTactin-Kit enthaltenen Puffer wurden für alle Experimente verwendet. Die Säule bzw. die MagnetoBeads wurden entsprechend den Herstellerangaben mit 3-5 SV Waschpuffer äquilibriert und die Zellysate appliziert. Die Materialien wurden anschließend mit 10-20 SV Waschpuffer gewaschen und mit 10 SV Elutionspuffer eluiert. Aliquots der einzelnen Waschschritte und des Eluats wurden mit 1/3 Vol. vierfach konzentriertem Probenpuffer gemischt, denaturiert, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und durch Färbung des Gels oder immunchemische Detektion visualisiert.

4.5.5 Glutathion-Affinitätschromatographie

Lysate von Bakterien- oder Säugerzellen wurden wie in 4.3.2 und 4.3.5 beschrieben hergestellt. GST-Sepharose wurde in Inkubationspuffer äquilibriert und anschließend mit den Lysaten für bis zu 4 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend mit 5-10 SV Inkubationspuffer gewaschen und gebundene Proteine mit 5-10 SV Elutionspuffer eluiert. Anschließend wurde das Glutathion durch Dialyse in Dialysekassetten gegen ein 200faches Volumen aus dem Eluat entfernt. Bei Versuchen in kleinem Maßstab wurde die Elution teilweise durch Erhitzen in einfach konzentriertem SDS-Probenpuffer erzielt.

Tabelle 20 Für Glutathion-Affinitätschromatographie verwendete Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Inkubationspuffer	50 mM Na-HEPES (pH7,8), 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 10 µM GDP
Elutionspuffer	2 mM EGTA und 10 mM Glutathion (reduziert) in Inkubationspuffer
Dialysepuffer	50 mM Na-HEPES (pH7,8), 2 mM EGTA, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT

4.5.6 Tandem Affinitäts-Reinigung (Tandem Affinity Purification, TAP)

Das Protokoll zur Aufreinigung TAP-markierter Proteine wurde basierend auf den Angaben von Rigaut *et al.* und den auf der Webseite <http://www-db.embl-heidelberg.de/jss/servlet/de.embl.bk.wwwToolsGroupLeftEMBL/ExternalInfo/seraphin/TAP.html> genannten Bedingungen und Pufferzusammensetzungen für Säugerzellen adaptiert. Zunächst wurden ca. 5×10^5 Zellen transient transfizierte Zellen verwendet, im Hinblick auf die nachfolgenden massenspektrometrischen Analysen wurden später ca. $1,5-2 \times 10^6$ Zellen eingesetzt.

Lyse und Extraktion

Ein Zellsediment (ca. 5×10^5 Zellen) wurde wie unter 4.3.5 beschrieben in 0,2 mL HMED-Puffer mit Proteaseinhibitoren (siehe 3.3.5) resuspendiert und die Zellen lysiert, auf final 0,5 % (v/v) $C_{12}E_{10}$ eingestellt und für 1 h unter Schütteln bei 4 °C extrahiert. Nicht extrahierbare Zellbestandteile wurden durch Ultrazentrifugation (10 min, 4 °C, 40000 x g) sedimentiert, der Überstand mit 1,8 mL IgG-Bindungspuffer versetzt und anschließend mit 50 µL IgG-Sepharose inkubiert. Alternativ wurden 3 Zellsedimente vereinigt, wodurch sich die verwendete Menge IgG-Sepharose proportional erhöhte.

Bindung an IgG-Sepharose

Die Bindung der TAP-modifizierten Proteine an die IgG-Sepharose erfolgte durch Inkubation im Überkopf-Schüttler bei 4 °C für 4h. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation (800 x g, 2 min, 4°C) sedimentiert und der Überstand abgenommen. Die IgG-Sepharose wurde entsprechend den bei Seraphin *et al.* beschriebenen Bedingungen mit IPP150-Puffer gewaschen und anschließend in TEV-Puffer aufgenommen. Dabei wurde sie in 1,5 mL-Eppendorfgefäße überführt. Ab einer Menge von 100 µL Beads wurde die Reinigung in Chromatographie-Säulen von BioRad (Ø 0,5 cm) durchgeführt.

Elution der IgG-Sepharose

Die Elution der IgG-Sepharose erfolgte durch Proteolyse mit AcTEV-Protease. Es werden nur Proteine gespalten, die die Spaltstelle dieser Protease enthalten. Dies sind hauptsächlich die TAP-markierten Köderproteine.

Die Spaltung wurde in 200 µL TEV-Puffer mit 75 U AcTEV-Protease pro 50 µL IgG-Beads durchgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einem Thermoschüttler (Schütteln in Intervallen: 180 rpm für 10s, 20s Pause). Anschließend wurde die IgG-Sepharose sedimentiert (2 min, 800 x g, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Die IgG-Sepharose wurde noch 3x mit 50 µL TEV-Puffer gespült und alle Überstände vereinigt.

CaM-Sepharose

Das Eluat der IgG-Sepharose wurde mit dreifachem Volumen Calmodulin-Bindungspuffer gemischt und auf final 3 mM $CaCl_2$ eingestellt. Die Bindung der TAP-markierten Köderproteine an Calmodulinsepharose (100 µl Bettvolumen pro 5×10^5 Zellen) erfolgte für 4 h im Überkopfschüttler bei 4 °C. Die Calmodulinsepharose wurde mit 3x5 SV gewaschen und in 5-10x 1 SV eluiert. Die Eluate wurden durch Acetonfällung präzipitiert, in 30 µL einfachem Probenpuffer aufgenommen, denaturiert und per SDS-PAGE analysiert.

Tabelle 21 Für TAP-Experimente verwendete Puffer. Der AlF_4^- -Zusatz war in allen Puffern zugegen, die für die TAP von aktiviertem $\text{G}\alpha_s$ eingesetzt wurden.

Puffer	Zusammensetzung
Lysispuffer	10 mM Na-HEPES (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , PI, 10 μM GDP
IPP150-Puffer	10 mM Na-HEPES (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0,1 % (v/v) NP-40
TEV-Protease-Puffer	10 mM Na-HEPES (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 μM GDP
Calmodulin-Bindungspuffer	10 mM Na-HEPES (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 1 mM Imidazol, 2 mM CaCl_2 , 0,1 % (v/v) NP-40, 10 mM β -Mercaptoethanol, 10 μM GDP
Calmodulin-Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl (pH8,0), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 1 mM Imidazol, 2 mM EGTA, 0,1 % (v/v) NP-40, 10 mM β -Mercaptoethanol
AlF_4^- -Zusatz	30 μM AlCl_3 , 10 mM NaF

4.6 Proteinidentifizierung mittels Tandem-Massenspektrometrie

4.6.1 Ablauf eines Experimentes

Von der Calmodulin-Sepahrose eluierte Proteine wurden elektrophoretisch getrennt und die Gele anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt. Eine Gelspur von ca. 0,5 cm Breite wurde in ca. 2 mm hohe Streifen geschnitten. Die in jedem Gelstreifen enthaltenen Proteine wurden mit Trypsin gespalten, die resultierenden Peptide aus dem Gel extrahiert und anschließend mittels Kapillarflüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) analysiert.

Proteine können anhand der Massen ihrer tryptischen (d.h. der nach der Spaltung durch Trypsin erhaltenen) Peptide identifiziert werden. Dabei wird eine Liste der gemessenen Masse (m/z) der Peptide mit einer Liste der zu erwartenden m/z der Peptide aller Proteine der Datenbank (*in silico* Spaltung) verglichen. Zusätzlich werden aus MS/MS-Spektren erhaltene Sequenzinformationen zu den tryptischen Peptiden verwendet. Diese Methode erlaubt die eindeutige Identifizierung von Proteinen mit Hilfe von nur ein bis zwei Peptiden und den dazugehörigen Fragmentationenspektren. Die hohe Empfindlichkeit massenspektrometrischer Methoden in Kombination mit nano-LC ermöglicht die Analyse komplexer Proteingemische mit einer Empfindlichkeit im fmol-Bereich.

Die aus einem Gelstück extrahierten Peptide wurden über eine nanoLC-Anlage chromatographisch getrennt und anschließend direkt in die Ionenquelle des Massenspektrometers geleitet. In dem angelegten elektrischen Feld zwischen Kapillarspitze und Massenspektrometer wurden die gelösten Peptide ionisiert und desolvatisiert. Im MS-Modus wurden zunächst die Massen der Peptidionen direkt mit dem TOF (*time-of-flight*-) Analysator des Massenspektrometers bestimmt (MS-scan zur Ermittlung der m/z -Daten der

Peptidionen). Um im zweiten Schritt Fragmentationenanalysen zu ermöglichen, sind dem Flugzeitmassenspektrometer ein Quadrupol und eine Kollisionskammer vorgeschaltet. Im MS/MS-Modus fungiert dieser Quadrupol als Massenfilter. Unter dem Einfluß eines kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeldes erreichen ausschließlich ausgewählte Ionen eines definierten m/z -Verhältnisses (Vorläufer-Ionen) die nachgeschaltete Kollisionskammer. Durch Zusammenstöße mit einem Stoßgas (Argon) werden die Vorläuferionen in der Kollisionskammer struktursignifikant fragmentiert und die Fragmentionen anschließend mit dem TOF-Analysator gemessen (Fragmentationenspektrum). Über die gesamte LC-MS-Analyse eines mit Trypsin gespaltenen Proteingemisches werden kontinuierlich sowohl MS-Spektren als auch Fragmentationenspektren (MS/MS-Spektren) der Peptidionen mit der höchsten Signalintensität gemessen.

Ein Vorläufer-Ion wurde entweder automatisch oder mit Hilfe von Präferenzlisten zur Fragmentierung ausgewählt. Präferenzlisten wurden eingesetzt, um bestimmte Vorläufer-Ionen auch in Gegenwart abundanter Vorläufer-Ionen zur Fragmentierung auszuwählen. Sie wurden vom Experimentator erstellt und enthielten die m/z -Daten aller Peptide ausgewählter Proteine (z.B. aller humanen γ -Isoformen), die bei einer Spaltung mit Trypsin theoretisch entstehen. Bei der Verwendung von Präferenzlisten wurden nur solche Vorläufer-Ionen zur Fragmentierung ausgewählt, deren m/z -Daten in der Liste enthalten waren. Die gemessenen Daten (MS und dazugehörige MS/MS-Spektren) wurden mit Hilfe der Datenbanksuchmaschine MASCOT (<http://matrixscience.com>) mit Einträgen der Proteindatenbanken verglichen.

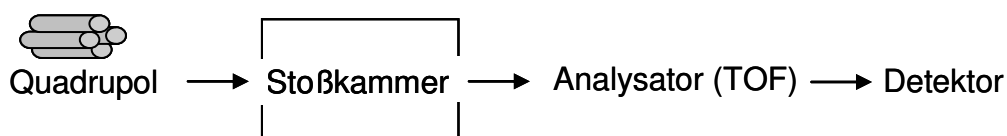


Abb. 11 Schematische Darstellung eines Tandem-MS-Experimentes. Die Peptide wurden über Kapillarflüssigchromatographie getrennt und in der ESI-Quelle ionisiert. Nach der Ionisierung erreichten die Ionen über ein Quadrupol und eine Kollisionskammer den TOF (*time-of-flight*)-Analysator, in dem sie getrennt werden. Im MS-Modus wurden die Massen der Peptidionen unfragmentiert direkt mit dem TOF-Analysator des Massenspektrometers bestimmt. Im MS/MS-Modus fungiert der Quadrupol als Massenfilter zur Selektion der zu fragmentierenden Peptidionen. Durch Zusammenstöße mit dem Stoßgas (Argon) wurden die ausgewählten Peptidionen (Vorläuferionen) in der Kollisionskammer fragmentiert und mit dem TOF-Analysator gemessen.

4.6.2 Durchführung

Die Proteinidentifizierungen wurden am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie durchgeführt.

Die enzymatische In-Gel-Spaltung der Proteine mit Trypsin und die Probenpräparation für die massenspektrometrische Analyse wurden nach beschriebenen Standardprotokollen durchgeführt (z.B. Klemm *et al.* 2006).

Gelelektrophoretisch getrennte Proteine wurden mit Coomassie Blau visualisiert. Die Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ca. 1-2 mm³-Stücke zerteilt und in ein 0,6 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden mit 100 µL 50 % (v/v) Acetonitril in 25 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen, durch Zugabe von 50 µL Acetonitril dehydratisiert und in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Die Spaltung der Proteine erfolgte mit der Serinprotease Trypsin (katalysiert die Spaltung von Peptiden C-terminal von Arginin und Lysin). Dazu wurden die getrockneten Gelstücke in 10 µL 5 mM Ammoniumbicarbonatlösung, welche 60 ng Trypsin (*sequencing grade*; Promega) enthielt, rehydratisiert. Nach 16-18 h Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µL 0,5% (v/v) Trifluoressigsäure in Acetonitril gestoppt. Nach 5 min Ultraschallbehandlung wurde der Überstand in zwei gleiche Teile aufgeteilt und unter Vakuum getrocknet.

Für die massenspektrometrische Analyse wurde ein solcher Teil in 6 µL 0,1 % (v/v) TFA in (6:94, v/v) Acetonitril-Wasser aufgenommen.

LC-ESI-MS/MS-Experimente wurden an einem Q-TOF Ultima Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK) durchgeführt, das mit einer Z-Spray Nanoelektrospray Ionenquelle und einem Kapillarflüssigkeitschromatographie-System (Waters) ausgestattet ist. Die Peptide wurden über eine analytische Säule (PepMap C18, 3 µm, 100 Å, 150 mm x 75 µm Innendurchmesser, Fa. LC Packings) bei einer Flußrate von 200 nL/min getrennt (mobile Phase A: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril-Wasser (5:95 v/v); mobile Phase B: 0,1 % Ameisensäure (v/v) in Acetonitril-Wasser (8:2 v/v), 3-64 % B in 60min) und der Nanoelektrospray-Ionenquelle zugeführt. Die Analyse der Proteolyseprodukte erfolgte in einem datenabhängigen MS/MS-Experiment unter Verwendung des automatischen *MS-to-MS/MS-Switching*. Zur Fragmentierung wurde entweder der intensivste Massenpeak oder ein in einer Präferenzliste enthaltener Peak ausgewählt. Aus der Liste der Peptidionen und den dazugehörigen MS/MS-Daten wurden mit den Programmen MassLynx (Version 4.0 Micromass-Waters) und ProteinLynxTM Global Server (Version 2.2 Micromass Waters) Peaklisten-Dateien (pkl) erstellt und mit der Datenbanksuchmaschine MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) mit Einträgen der aktuellen Proteindatenbank SwissProt und NCBI verglichen (Eng *et al.* 1994). Als Suchparameter wurden ein Maximum von drei Fehlsplattstellen und eine Massenabweichung von 100 ppm für die peptidionmassen im MS-Modus bzw. 0,1 Da für die Fragmentionmassen im MS/MS-Modus zugelassen. Weiterhin wurden als mögliche Proteinmodifizierungen die Addition von nicht polymerisiertem Acrylamid an Cysteinreste sowie die Oxidation von Methioninresten zugelassen. Ein Protein wurde als eindeutig identifiziert eingestuft, wenn mindestens zwei Peptide signifikant (*MASCOT scoring*, Perkins *et al.* 1999) nachgewiesen wurden, welche nicht zu einem anderen, bereits mit einem höheren *MASCOT score* identifizierten Protein gehörten (*first ranking peptide*).

5 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung neuer Interaktionspartner für $G\alpha_s$ und die Etablierung dafür geeigneter Methoden. Als besonders vielversprechend und interessant galt die Interaktion von $G\alpha_s$ mit RGS-PX1, die daher zuerst charakterisiert werden sollte. Im Anschluss an diese Untersuchungen wurden Methoden etabliert, die zur Charakterisierung neuer Interaktionspartner des $G\alpha_s$ führten.

Sowohl für den Nachweis dieser Interaktionen als auch für deren funktionelle Charakterisierung wurde gereinigtes $G\alpha_s$ in ausreichenden Mengen benötigt. Der erste Schwerpunkt der Arbeit lag somit auf der Reinigung von heterolog exprimiertem $G\alpha_s$.

5.1 Reinigung von $G\alpha_s$ für Interaktionsstudien

Für die funktionelle Charakterisierung der Interaktionen von $G\alpha_s$ mit anderen Proteinen wurde zunächst gereinigtes $G\alpha_s$ hergestellt, wobei sowohl wildtypisches als auch mit Affinitätsepitopen markiertes $G\alpha_s$ eingesetzt werden sollte.

Während die Reinigung von heterolog exprimiertem, wildtypischem $G\alpha_s$ sehr aufwändig ist, kann mit einem Affinitäts- Epitop („tag“) modifiziertes $G\alpha_s$ im Allgemeinen sehr leicht und schnell hergestellt werden. Das Affinitätsepitop sollte jedoch möglichst klein sein, da die zusätzlichen Aminosäuren unter Umständen die katalytische Funktion oder intermolekulare Wechselwirkungen des $G\alpha_s$ -s4 beeinträchtigen können. Das in dieser Arbeit eingesetzte $G\alpha_s$ -s4 wurde mit einem His₆-tag modifiziert. Um Einflüsse des tags in Interaktionsstudien zu erkennen, wurden verschiedenartig modifizierte bzw. unmodifizierte $G\alpha_s$ -s4-Varianten hergestellt, die in den entsprechenden Funktionsassays miteinander verglichen werden sollten.

Im Folgenden werden Reinigungen der (1) C-terminal hexahistidinmodifizierten, (2) intern hexahistidinmodifizierten und (3) unmodifizierten (wildtypischen) Variante des $G\alpha_s$ -s4 beschrieben.

5.1.1 Reinigung von C-terminal epitopmarkiertem $G\alpha_s$

Das Expressionsplasmid für die C-terminal hexahistidinmodifizierte Variante von Maus- $G\alpha_s$ -s4 („mo $G\alpha_s$ -s4-CH/pQE60“) wurde wie in 4.1.6.2 beschrieben hergestellt und das kodierte Protein in *E.coli* BL21(DE3)/pREP4 exprimiert. mo $G\alpha_s$ -s4-CH wurde mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose gereinigt (vgl. Abb. 12 A, Spur DI - E). Dieser Reinigungsschritt reichte weder für eine signifikante Anreicherung des mo $G\alpha_s$ -s4-CH aus, noch stellte mo $G\alpha_s$ -s4-CH die Hauptbande der Elutionsfraktion dar (ibd., Spur E). Daher wurde das Eluat der Ni-NTA-Agarose in einem weiteren Schritt über eine Hydroxyapatit-

Säule (im Folgenden als HTP bezeichnet) getrennt. Bei der HTP-Chromatographie werden Proteine sowohl durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen der Matrix als auch durch Chelatierung der Ca^{2+} -Ionen des Apatits durch negativ geladene Aminosäurereste der Proteine getrennt. Auch Kationenaustauscheffekte sind möglich.

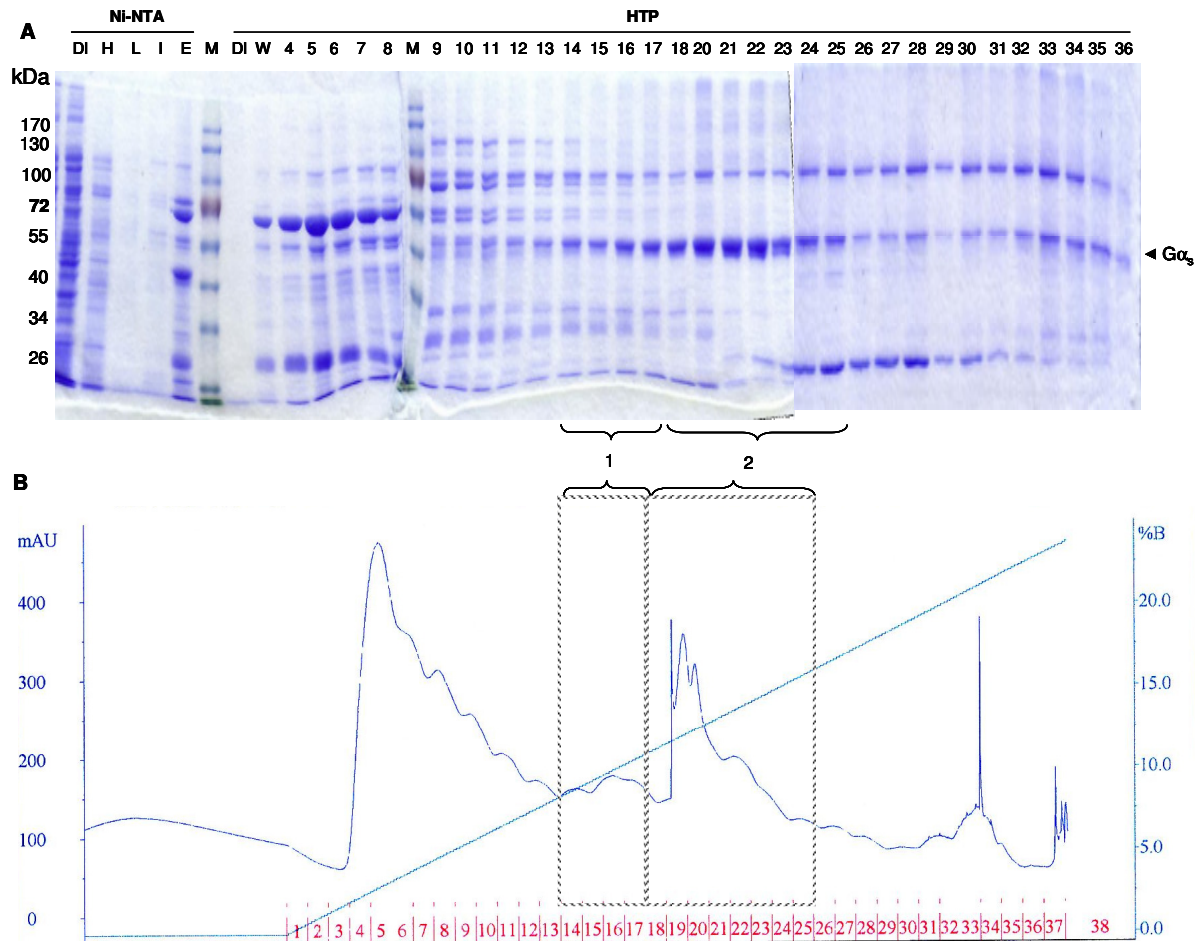


Abb. 12 Reinigung von $\text{moG}\alpha_s\text{-s4-CH}$ aus *E. coli*-BL21(DE3)/pREP4 (10 L). **A** Proteine der Ni-NTA- und der HTP-Elutionsfraktionen (jeweils 12 μL) wurden denaturiert, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau-Färbung visualisiert. Reinigung über Ni-NTA-Agarose (5 mL Bettvolumen): 50 mL Hochsalzpuffer, 50 mL Niedrigsalzpuffer, 10 mL Imidazolwaschpuffer (5 mM Imidazol), 20 mL Elutionspuffer (Zusammensetzungen siehe 3.5.3). DI = Lade-Durchlauf, H = Hochsalzwasch-Schritt, L = Niedrigsalzwasch-Schritt, I = Imidazolwasch-Schritt, E = Eluat (Ni-NTA). HTP-Chromatographie: Bettvolumen 2 mL, Gradient über 38 mL von 10-300 mM Kaliumphosphat (Puffer siehe 3.5.2). Detektion bei $\lambda=280$ nm, Fraktionssammlung (1 mL). Die vereinigten Fraktionen sind markiert (Eluat 1 und 2). W = Wasch-Schritt. Die Ziffern in **A** und **B** geben die Fraktionsnummer des Kaliumphosphat-Gradienten wieder. **B** Chromatogramm der HTP-Säule für die Reinigung von $\text{moG}\alpha_s\text{-s4-CH}$.

$\text{moG}\alpha_s\text{-s4-CH}$ eluierte von der HTP-Säule bei ca. 80-170 mM Kaliumphosphat als Hauptprotein, es konnte jedoch nicht isoliert dargestellt werden (ibd., Spur DI - 36). Der $\text{moG}\alpha_s\text{-s4-CH}$ -enthaltende Elutionspeak (Fraktionen 14-25) wurde daher geteilt. Das „Eluat 1“ (Fraktionen 14-17) enthielt weniger $\text{G}\alpha_s$ und einen höheren Anteil Verunreinigungen als

„Eluat 2“ (Fraktionen 18-25), welches deutlich mehr $G\alpha_s$ und einen geringeren Anteil Verunreinigungen enthielt.

Für eine weitere Anreicherung des $moG\alpha_s$ -s4-CH wurden beide Eluate separat in einer zweiten Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose (0,5 mL Bettvolumen) unter stärker kompetitiven Waschbedingungen (mit 15 mM Imidazol, Pufferzusammensetzungen siehe 4.5.3) gereinigt und konzentriert (Abb. 13, Eluate: $moG\alpha_s$ -s4-CH(1) und $moG\alpha_s$ -s4-CH(2)). Die meisten der mit $moG\alpha_s$ -s4-CH bei der HTP-Chromatographie ko-eluierenden Proteine konnten auf diese Weise abgetrennt werden. Für die anschließende funktionelle Charakterisierung wurde $moG\alpha_s$ -s4-CH(2) verwendet.

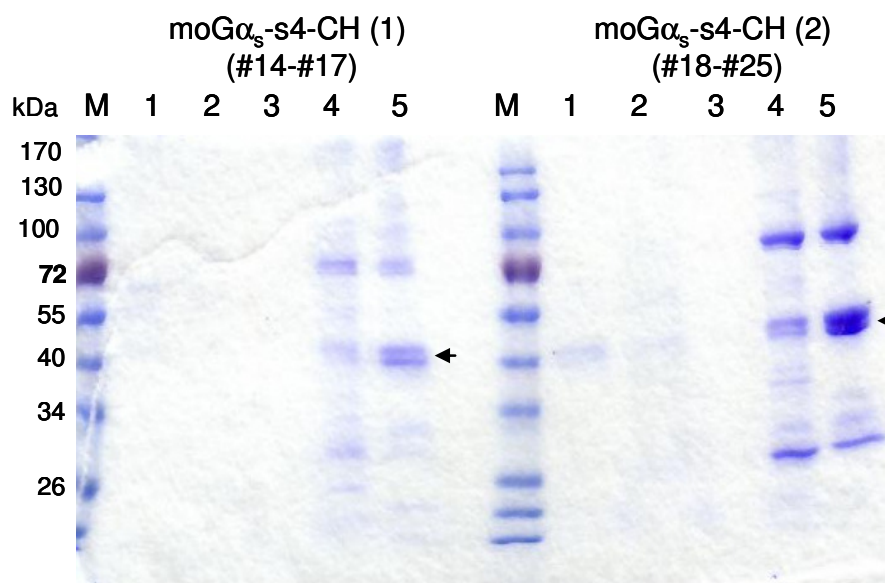


Abb. 13 Reinigung und Konzentration des $moG\alpha_s$ -s4-CH aus den HTP-Eluaten 1 und 2 über Ni-NTA-Agarose. Vereinigte Fraktionen 14-17 (Eluat 1) sowie Fraktionen 18-25 (Eluat 2) der HTP-Chromatographie wurden an je 0,5 mL Ni-NTA-Agarose gebunden, mit je 5 mL Hochsalzpuffer, 5 mL Niedrigsalzpuffer und 2 mL Waschlösung (enthält 15 mM Imidazol) gewaschen und in 5 mL Elutionspuffer eluiert. Jeweils 12 μ L der Fraktionen wurden denaturiert, die enthaltenen Proteine elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau visualisiert. $G\alpha_s$ ist mit einem Pfeil markiert. 1 = Lade-Durchlauf, 2 = Hochsalzwasch-Schritt, 3 = Niedrigsalzwasch-Schritt, 4 = Imidazolwasch-Schritt (15 mM), 5 = Eluat.

Aus der beispielhaft gezeigten Reinigung wurden insgesamt 0,94 nmol aktivierbares $G\alpha_s$ -s4 gewonnen. Das entspricht 6,7% Aktivität bezogen auf die Gesamtproteinmenge des Eluats. Im Vergleich zu der hier dargestellten Reinigung von $moG\alpha_s$ -s4-CH betrug die Proteinausbeute mit einem Rind-Ortholog von $G\alpha_s$ -s4-CH („CK34CH“) 41 mg mit Aktivitäten von 13-20 % (je nach Pool), die aus einer 10 L-Expressionskultur von CK34CH isolierte Menge aktivierbaren $G\alpha_s$ war um den Faktor 172 größer (162 nmol).

5.1.2 Reinigung von intern modifiziertem $G\alpha_s$ -s4

Festlegen der Insertionsstelle

Sowohl C- als auch N-Terminus des $G\alpha_s$ sind an Wechselwirkungen mit anderen Proteinen (Rezeptor, $G\beta\gamma$) beteiligt (Sunahara *et al.* 1997) bzw. werden lipidmodifiziert und boten sich daher nur begrenzt zur Fusion mit Affinitäts-*tags* an. Insertionen innerhalb der $G\alpha_s$ -Sequenz waren daher in diesem Fall prinzipiell zu bevorzugen, sie können jedoch zur Inaktivierung des Proteins führen. Die Wahl der Insertionsstelle mußte daher mit Vorsicht erfolgen.

Das Hefeprotein GPA1 ist homolog zur α -Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins ($G\alpha_i$) in Säugern. GPA1 besitzt jedoch im Vergleich zu $G\alpha_{i1}$ eine Insertion von 110 Aminosäuren im N-terminalen Drittel des Moleküls (Nakafuku *et al.* 1987). Da diese Insertion offensichtlich keine Auswirkungen auf die Funktion des Hefeproteins hat, wurde diese Stelle von Kozasa und Mitarbeitern benutzt, um in das $G\alpha_i$ ein internes His₆-Epitop einzufügen (Kozasa und Gilman 1995). Das Protein war aktiv und konnte erfolgreich gereinigt werden. Aufgrund der ähnlichen Struktur von $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ war davon auszugehen, dass diese Stelle auch im Fall des $G\alpha_s$ für die Insertion von Aminosäuren geeignet ist.

Es wurde eine $G\alpha_s$ -Mutante generiert, die zwischen Aminosäuren 130 und 131 das Epitop GGHHHHHGGPP trug (siehe Abb. 14 und Abb. 15) und nachfolgend $G\alpha_s$ -s4yHis genannt wird. Die Herstellung eines entsprechenden Expressionsplasmids ($G\alpha_s$ -s4yHis/pQE60) ist in Abschnitt 4.1.6.1 beschrieben.

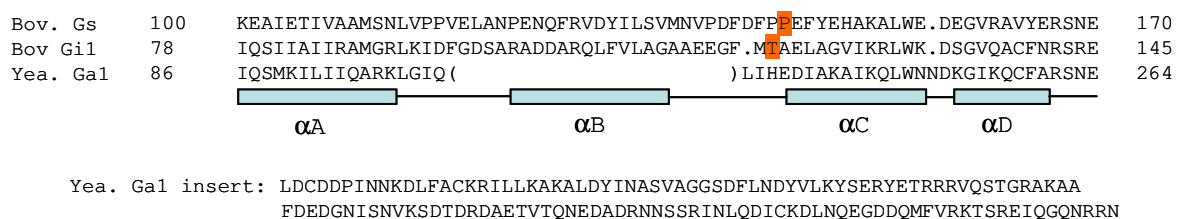


Abb. 14 Aminosäure-Alignment von $G\alpha_s$, $G\alpha_{i1}$ und GPA1 (nach Lambright *et al.* 1996). Das Hexahistidin-*tag* wurde C-terminal der rot markierten Aminosäuren unmittelbar vor der Helix αC eingefügt. Die im Hefe-Ortholog an dieser Stelle vorkommende Insertion von 133 Aminosäuren ist durch Klammern angedeutet und darunter angegeben. Die Anzahl der durch die Insertion zusätzlich vorhandenen Aminosäuren im GPA1 weicht hier von der bei Nakafuku *et al.* angegebenen ab.

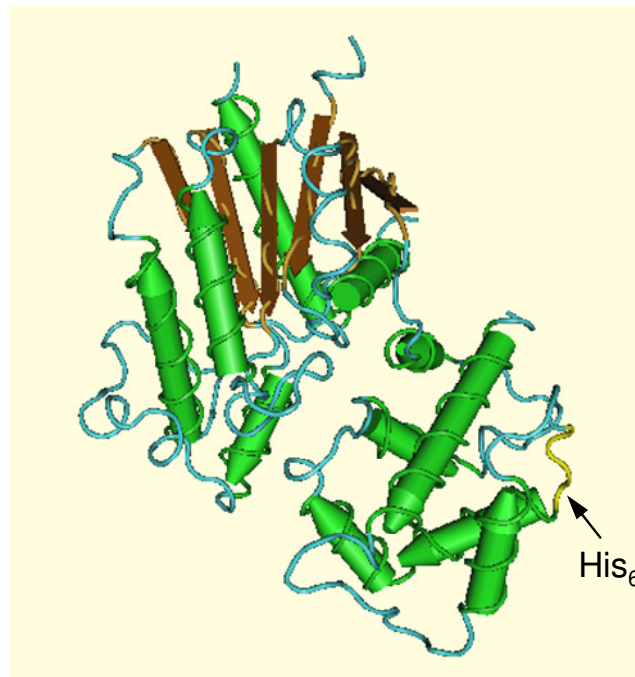


Abb. 15 Kristallstruktur des G α_s -s4 komplexiert mit GTP γ S (PDB accession number 1AZT). Die Insertionsstelle befindet sich auf der helikalen Domäne (rechts) und ist gelb markiert (Pfeil). Interaktionsstellen mit der Adenylylcyclase befinden sich auf der GTPase-Domäne auf der gegenüberliegenden Seite des Moleküls.

Das Hexahistidinepitop des G α_s -s4yHis befindet sich an exponierter Stelle, daher wurde eine gute Interaktion mit der Affinitätsmatrix erwartet. Bekannte Effektor- und Rezeptor-Bindungsstellen des G α_s befinden sich auf der gegenüberliegenden Molekülseite (vgl. Abb. 6) und sollten von der eingeführten Mutation nicht beeinträchtigt werden.

Expression und Aktivität

Das Plasmid G α_s -s4yHis/pQE60 wurde in *E. coli* BL21(DE3)/pREP4 transformiert und das synthetisierte Protein immunchemisch im bakteriellen Lysat nachgewiesen. Im Vergleich zu wtG α_s -s4 ist seine Expressionsrate in *E. coli* deutlich geringer (vgl. Abb. 16 B).

Die Aktivität von G α_s -s4yHis wurde anhand der Stimulierbarkeit der Adenylylcyclase in cyc⁻-Membranpräparationen nach Rekonstitution mit Lysaten von G α_s -s4yHis- bzw. wtG α_s -s4-exprimierenden BL21(DE3)/pREP4-Zellen nachgewiesen (Adenylylcyclase-Assay, 4.4.6.1). *E. coli* BL21(DE3)/pREP4 wurden mit pQE60, G α_s -s4yHis/pQE60 bzw. CK34/pQE30 transformiert und in 20 mL T7 *enriched*-Medium kultiviert. Vor der Induktion wurden die Kulturen geteilt, 8 mL wurden mit 100 μ M IPTG induziert, 8 mL wurden ohne Induktion weiter inkubiert. Nach 12 h wurden die Zellen sedimentiert und in jeweils 80 μ L Lysispuffer lysiert (siehe 4.3.2). Jeweils 2x20 μ L dieser Lysate wurden mit cyc⁻-Membranen inkubiert (Doppelbestimmungen) und die Stimulation der Adenylylcyclase über den β -adrenergen Rezeptor in Anwesenheit von GTP γ S bestimmt (4.4.6.1). Parallel wurde die Expression der

Konstrukte durch immunchemische Detektion mit $G\alpha_s$ -spezifischem Antikörper in 10 μ L der Lysate nachgewiesen.

Wildtypisches $G\alpha_s$ -s4 („CK34“) stimulierte die Aktivität der Adenylylcyclase 37,5fach über den Basalwert, eine C-terminal Hexahistidin-modifizierte Variante des CK34 zeigte vergleichbare Werte (Daten nicht gezeigt). Die $G\alpha_s$ -s4yHis-Mutante war jedoch nicht in der Lage, die AC nennenswert zu stimulieren. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung der Doppelwerte ist die Stimulation kaum von Hintergrundschwankungen zu unterscheiden (vgl. Abb. 16 A).

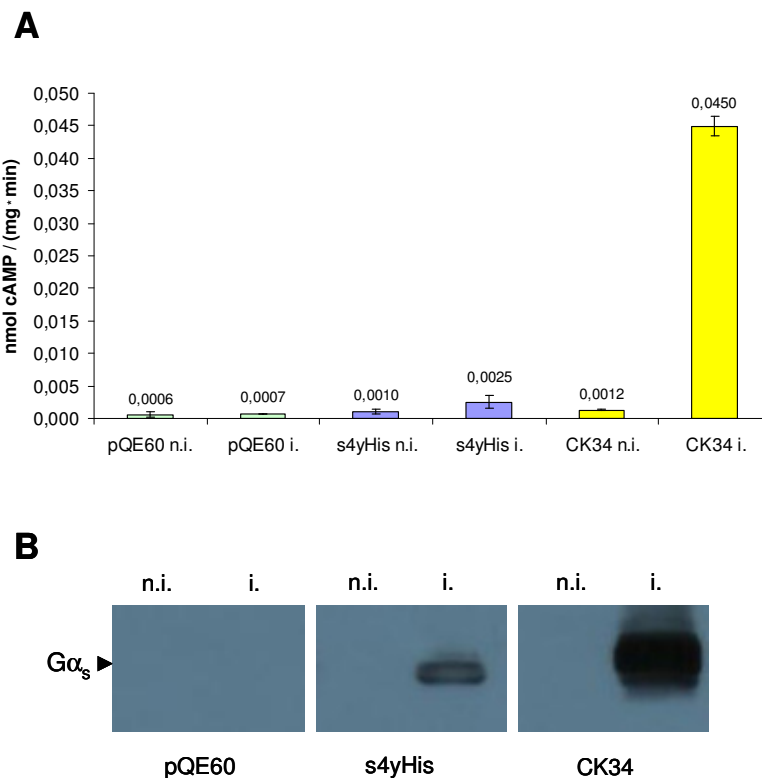


Abb. 16 Expression und Aktivität von $G\alpha_s$ -s4yHis in *E. coli*. *E. coli* BL21(DE3)/pREP4 wurden mit Kontrollplasmid (pQE60), $G\alpha_s$ -s4yHis/pQE60 bzw. CK34/pQE60 transformiert und kultiviert. Vor der Induktion wurden die Kulturen geteilt und nur eine Hälfte induziert. Die Bakterien wurden nach 12 h sedimentiert und lysiert wie im Text beschrieben. In jedem Lysat wurde sowohl die Stimulation der Adenylylcyclase bestimmt (A) als auch $G\alpha_s$ immunchemisch detektiert (B). **A** Stimulation der Adenylylcyclase in cyc^- -Membranen nach Rekonstitution mit Kontroll-Lysat (ohne $G\alpha_s$, „pQE60“), Lysat $G\alpha_s$ -s4yHis-exprimierender Zellen und Lysat Rind- $G\alpha_s$ -s4-exprimierender Zellen („CK34“, enthält kein His₆-tag). **B** Immundetektion des $G\alpha_s$ in den jeweiligen bakteriellen Lysaten (primärer Antikörper: anti- $G\alpha_{s/off}$, C-18, Santa Cruz). Eingesetzte Proteinmengen in **A** / **B**: pQE60 n.i.: 17 μ g / 8,5 μ g, pQE60 i.: 20,6 μ g / 10,3 μ g; s4yHis n.i.: 94 μ g / 47 μ g, s4yHis i.: 26 μ g / 13 μ g; CK34 n.i.: 54 μ g / 27 μ g, CK34 i.: 31 μ g / 15,5 μ g. n.i. = nicht induziert, i. = induziert.

Die Expressionsraten beider Proteine in *E. coli* unterschieden sich ebenfalls, das unmodifizierte Protein CK34 (und ebenso dessen C-terminal Hexahistidin-modifizierte Variante, Daten nicht gezeigt) wurde deutlich stärker exprimiert (vgl. Abb. 16 B).

In diesem Assay lässt sich nicht klar unterscheiden, ob die fehlende Aktivierung der AC durch $G\alpha_s$ -s4yHis auf dessen Inaktivität zurückzuführen ist oder ob die gebildeten Mengen

cAMP unterhalb der Nachweisgrenze des Assays liegen. Daher wurde versucht, $G\alpha_s$ -s4yHis über Affinitätschromatographie anzureichern und näher zu charakterisieren.

Reinigung von $G\alpha_s$ -s4yHis

$G\alpha_s$ -s4yHis/pQE60 wurde in *E.coli*-BL21/pREP4 transformiert und exprimiert. Das Sediment einer 1 L-Kultur wurde lysiert (siehe 4.3.2) und das Lysat über Ni-NTA-Agarose (0,5 mL Bettvolumen) gereinigt. $G\alpha_s$ -s4yHis konnte im Eluat der Ni-NTA-Agarose-Säule mit einem $G\alpha_s$ -spezifischem Antikörper (C-18, Santa Cruz) immunchemisch detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine Anreicherung des Proteins durch Bindung an die Affinitätsmatrix war jedoch in einer Ponceaufärbung der Nitrocellulosemembran nicht erkennbar (Abb. 17 A, Spur E1). Im Vergleich dazu wurde C-terminal hexahistidinmodifiziertes $G\alpha_s$ -s4 (CK34CH, ein Rind-Ortholog) deutlich angereichert (ibd. Spur E2). Auch durch Erhöhung des Kulturvolumens auf 5 L konnten keine durch Coomassie-Blau (Daten nicht gezeigt) oder Ponceau S anfärbbaren Mengen $G\alpha_s$ -s4yHis über Ni-NTA-Agarose angereichert bzw. gereinigt werden (Abb. 17 B Spur E), obwohl auch hier ein Immunsignal im Eluat detektiert wurde (Abb. 17 C Spur E).

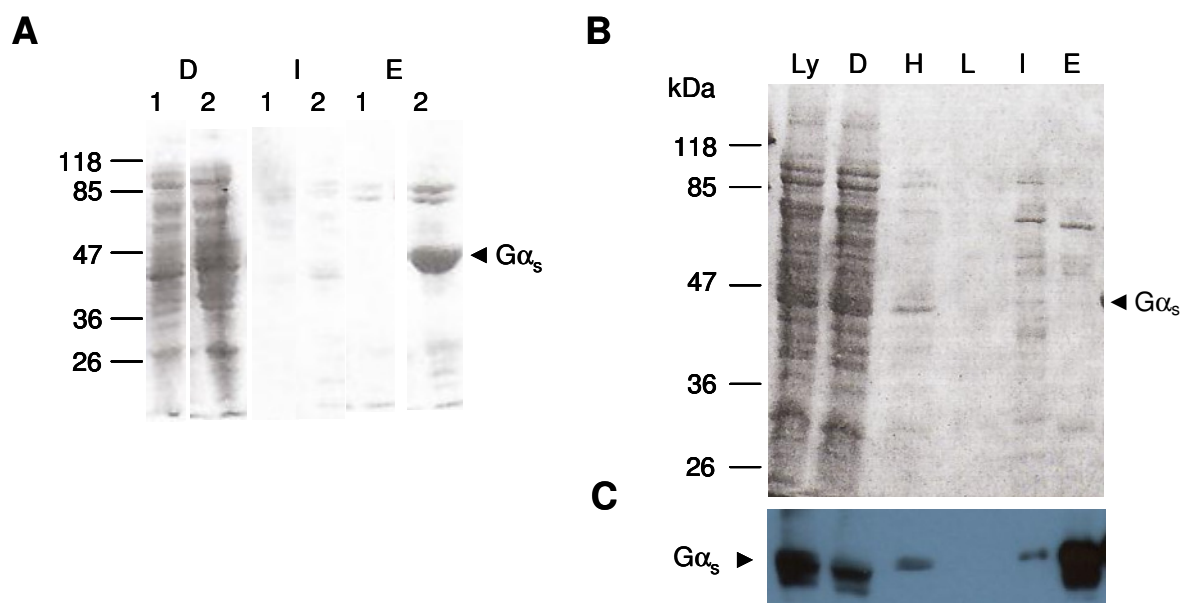


Abb. 17 Reinigung von $G\alpha_s$ -s4yHis. *E.coli*-BL21(DE3)/pREP4-Zellen wurden mit $G\alpha_s$ -s4yHis/pQE60 (1) bzw. CK34CH/pQE60 (2) transformiert, in jeweils 1 L (A) bzw. 5 L (B, C) T7 *enriched*-Medium kultiviert und die Expression durch Zugabe von 100 μ M IPTG induziert. Die Zellen wurden nach 12stündigem Wachstum sedimentiert, die Sedimente in 5 mL (A) bzw. 40 mL (B) Lysispuffer lysiert und die Lysate über eine Ni-NTA-Agarose-Säule wie in 4.5.3 beschrieben gereinigt (0,5 mL bzw. 2,5 mL Bettvolumen). Proteine der Reinigungsfractionen (12 μ L, Ly = Lysat, D = Lade-Durchlauf, H = Hochsalz-Waschschrift (20 SV), L = Niedersalz-Waschschrift (20 SV), I = Waschschrift mit 10 mM Imidazol (10 SV), E = Eluat mit 150 mM Imidazol (5 SV)) wurden in Probenpuffer denaturiert, elektrophoretisch getrennt, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mit Ponceau-S visualisiert (A und B). $G\alpha_s$ wurde auf der in B gezeigten Membran mit $G\alpha_{s/olf}$ -spezifischem Antikörper (C-18, Santa Cruz) immunchemisch detektiert (dargestellt in C).

Obwohl $G\alpha_s$ -s4yHis im Eluat der Ni-NTA-Säule immunchemisch detektiert werden konnte, war die erhaltene Menge an gereinigtem Protein praktisch unterhalb der Nachweisgrenze von Ponceau S. Verluste während der Reinigung traten hauptsächlich im Beladungsschritt auf (vgl. das Immunsignal Abb. 17 C Spur D), jedoch hatte mehr als die Hälfte des $G\alpha_s$ -s4yHis an die Ni-NTA-Matrix gebunden. Die Ausbeute ließ sich durch Verlängerung der Beladungszeit nicht erhöhen (Daten nicht gezeigt).

Selbst die aus einer 10 L-Kultur erzielbaren Mengen und Aktivitäten an $G\alpha_s$ -s4yHis waren zu gering, um weitere Experimente mit diesem Protein durchführen zu können (vgl. auch Abb. 16 A).

5.1.3 Reinigung von $G\alpha_s$ -s4

Neben dem mit His₆ markierten sollte auch nicht modifiziertes, wildtypisches $G\alpha_s$ -s4 in späteren Untersuchungen zu Wechselwirkungen des $G\alpha_s$ mit Interaktionspartnern eingesetzt werden. Wildtypisches $G\alpha_s$ -s4 wurde in 10 L-Kulturen von *E. coli* BL21(DE3)/pREP4-Zellen exprimiert und nach der Methode von Lee (Lee *et al.* 1994) gereinigt. Die Prozedur umfasste mehrere Schritte. Aus dem Lysat wurden durch Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Sephacel) viskose Lösungsbestandteile entfernt. Die eigentliche Trennung des $G\alpha_s$ von anderen bakteriellen Proteinen erfolgte durch nacheinander durch **H**ydrophobe **I**nteraktions-**C**hromatographie (HIC; Phenylsepharose-Matrix), Anionenaustausch-Chromatographie (Q-Sepharose-Matrix) sowie einer Separation über HTP (siehe 4.5.2).

Die Anwesenheit von $G\alpha_s$ -s4 in den Fraktionen der verschiedenen Säuleneluat wurde parallel immunchemisch und in GTP γ S-Bindungsassays nachgewiesen. $G\alpha_s$ -enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und als „Eluat“ der jeweiligen Säule bezeichnet.

In Abb. 18 sind die verschiedenen Stufen eines Reinigungsexperiments beispielhaft dargestellt. Eine signifikante Anreicherung von $G\alpha_s$ -s4 im Eluat der HTP-Säule (bei ca. 45 kDa, Pfeil) ist nicht erkennbar (Abb. 18 A). Obwohl in den verschiedenen Reinigungsschritten immer $G\alpha_s$ -spezifische Immunsignale detektiert wurden (Daten nicht gezeigt), nahm die GTP γ S-Bindungsaktivität der Fraktionen im Verlauf der Reinigung ab und war schließlich im Eluat der HTP-Säule kaum mehr meßbar (Abb. 18 B), so dass die Fraktionen hauptsächlich auf der Basis immunchemischer Detektion vereinigt wurden. Der Aktivitätsverlust wurde bei jeder durchgeführten Reinigung beobachtet. Auch die anderen drei $G\alpha_s$ -Spleißvarianten der Maus konnten mit dieser Methode nicht gereinigt werden.

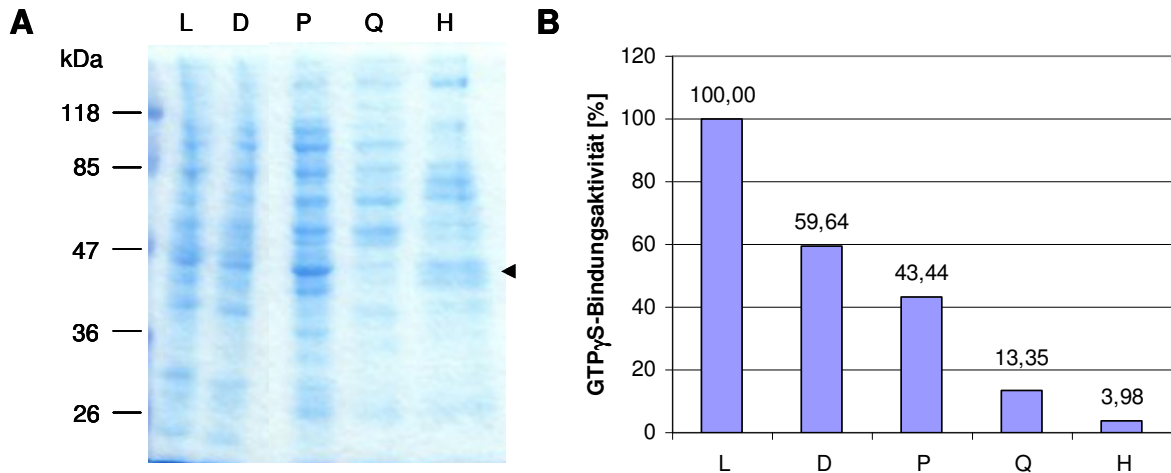


Abb. 18 Reinigung von $G\alpha_s$ -s4. (A) Coomassie-Blau-Färbung. Jeweils 16 μ L der Eluate wurden denaturiert, die enthaltenen Proteine elektrophoretisch getrennt und durch Coomassie-Blau-Färbung visualisiert. Der Pfeil in (A) markiert die Gelregion, in der angereichertes $G\alpha_s$ -s4 erwartet wurde. **(B) $GTP\gamma S$ -Bindungsaktivität.** Jeweils 2 x 25 μ L des Lysates und jedes Eluats (Doppelwerte) wurden in $GTP\gamma S$ -Bindungsassays untersucht und über ihr Volumen (s.u.) die Gesamtbindungsaktivität der Eluate errechnet. Die in den Eluaten bestimmte $GTP\gamma S$ -Bindungsaktivität wurde in Relation zu der im Lysat bestimmten Aktivität gesetzt. L=Lysat (970 mL), $G\alpha_s$ -enthaltende, vereinigte Elutionsfraktionen der (D) DEAE-Sephacel-, (P) Phenylsepharose-, (Q) Q-Sepharose-, (H) Hydroxyapatit-Säule (Volumina: , D = 800 mL, P = 400 mL, Q = 190 mL, H = 17 mL). $GTP\gamma S$ -Bindungsaktivität L = 9177 pmol, D = 5473 pmol, P = 3987 pmol, Q = 1225 pmol, H = 365 pmol.

5.1.4 Zusammenfassung

Um den Einfluß neuer Interaktionspartner auf die $G\alpha_s$ -s4-Signaltransduktion untersuchen zu können, musste $G\alpha_s$ -s4 zunächst in ausreichenden Mengen gereinigt werden. Dafür wurden wildtypisches sowie intern und C-terminal epitopmarkiertes Maus- $G\alpha_s$ -s4 hergestellt.

Die gereinigten Mengen des Maus- $G\alpha_s$ -s4 waren jedoch weder in wildtypischer noch in intern oder C-terminal His₆-markierter Form für die umfassenden nachfolgenden Experimente ausreichend (vgl. Tabelle 22). C-terminal His₆-markiertes Rind- $G\alpha_s$ -s4 (CK34CH) hingegen konnte in ausreichenden Mengen gereinigt und im weiteren Verlauf der Arbeit entsprechend eingesetzt werden.

Tabelle 22 Ausbeuten von heterolog in *E.coli* exprimierten $G\alpha_s$ -Varianten. Die angegebenen Proteine wurden in einem Kulturvolumen von 10 L exprimiert und wie in den Abschnitten 5.1.1 bis 5.1.3 beschrieben gereinigt. Die Menge des erhaltenen Gesamt-Proteins bzw. des mit $GTP\gamma S$ aktivierbaren $G\alpha_s$ sind für jeweils eine Reinigung beispielhaft angegeben (mg bzw. pmol).

Protein	Spezies	Ausbeute
$G\alpha_s$ -s4	Maus	0,37 pmol / 0,32 mg
$G\alpha_s$ -s4yHis	Maus	---
mo $G\alpha_s$ -s4-CH	Maus	0,94 nmol / 0,6 mg
$G\alpha_s$ -s4-CH („CK34CH“)	Rind	162 nmol / 41 mg

Im Hinblick auf die nachfolgende Charakterisierung von Maus-RGS-PX1 (Abschnitt 5.2) war zunächst das Maus-Ortholog des $G\alpha_s$ -s4 präferiert worden, darüber hinaus war die Spezies

jedoch nicht von Bedeutung. Die weiteren Versuche (Mutagenesen, Proteinreinigungen) wurden daher mit dem Plasmid CK34CH/pQE60 bzw. gereinigtem bovinem $G\alpha_s$ -s4-CH (CK34CH) durchgeführt.

5.2 RGS-PX1 als Interaktionspartner von $G\alpha_s$

Im Jahr 2001 wurde in *Science* von Zheng und Mitarbeitern das erste $G\alpha_s$ -spezifische RGS-Protein beschrieben (RGS-PX1, Zheng *et al.* 2001). Diese Arbeit war von besonderem Interesse, da hier erstmals eine Regulation der $G\alpha_s$ -katalysierten GTP-Hydrolyse durch ein RGS-Protein gezeigt wurde. Neben der GAP-Funktion weist RGS-PX1 eine *sorting nexin*-Funktion auf und könnte nach Aussage der Autoren ein Bindeglied zwischen der membranären $G\alpha_s$ -Signaltransduktion und endocytotischen Prozessen darstellen, bei denen $G\alpha_s$ ebenfalls eine Rolle spielt.

Eine genaue kinetische Auswertung der $G\alpha_s$ -spezifischen, GTPase-akzelerierenden Funktion der RGS-Domäne von humanem RGS-PX1 ist von Zheng und Mitarbeitern nicht publiziert worden. Lediglich die „Halbwertszeit der Hydrolyse“ und der Beschleunigungsfaktor wurde von den Autoren mit $<15s$ bzw. >20 angegeben, (Zheng *et al.* 2001). Die Kontaktstellen beider Proteine wurden nicht charakterisiert.

RGS-PX1 wurde als neuer $G\alpha_s$ -spezifischer Regulator einer genauen Charakterisierung unterzogen. Diese Charakterisierung sollte im Maus-System erfolgen, daher wurde in der vorliegenden Arbeit auf der Grundlage der von Zheng und Mitarbeitern veröffentlichten Sequenz die RGS-Domäne des Maus-Orthologen von RGS-PX1 kloniert, exprimiert und gereinigt. Die GTPase-akzelerierende Aktivität des murinen RGS-PX1 sollte quantifiziert und die Kontaktstellen auf $G\alpha_s$ -s4 identifiziert werden.

5.2.1 BLAST-Suche, Klonierung und Expression von Maus-RGS-PX1

Die kodierende DNA-Sequenz des humanen RGS-PX1 wurde mit den in einer humanen cDNA-Datenbank abgelegten Sequenzen verglichen (4.11.2003; Homo_sapiens.NCBI33.cdna.fa). Es wurde das Sorting Nexin 13-Protein (basierend auf SwissProt-Eintrag SNXD_HUMAN, Q9Y5W8) auf Chromosom Nr. 7 (Gen ENSG00000071189) gefunden. Im Abschnitt „*Homology matches*“ dieses Datenbankeintrages war für Maus ein Eintrag mit einer neuartigen Ensembl Vorhersage (*Novel Ensembl Prediction*, basierend auf reziproker BLAST-Analyse) abgelegt. Das angegebene Gen wurde als „putativ homolog durch reziproke BLAST-Analyse“ bezeichnet. Es handelte sich um das Gen ENSMUSG00000020590, aus dem zwei putative Transkripte hervorgehen können (Transkript 1: ENSUST00000020912, Transkript 2:

ENSMUST00000048519). Das erste Transkript zeigte eine hohe Sequenzähnlichkeit zu RGS-PX1, das zweite Transkript unterschied sich deutlicher. ENSMUST000000020912 wurde allerdings zu einem späteren Zeitpunkt (nach Abschluß der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente am RGS-PX1) aus der Datenbank entfernt bzw. als ENSMUST00000048519 weitergeführt.

Dieser Datenbankeintrag bestätigte das Vorhandensein eines Maus-Orthologen. Die Sequenz der RGS-Domäne des Maus-RGS-PX1 wurde aus einer S49-cDNA-Bank amplifiziert und kloniert. Identische Sequenzen von murinem und humanem Ortholog im *primer-annealing*-Bereich erlaubten die Verwendung der gleichen Oligonukleotide und Bedingungen, die Zheng und Mitarbeiter für die Herstellung des humanen RGS-PX1 verwendet hatten. Das von der resultierenden DNA kodierte Protein wurde dabei N-terminal mit His₆- und FLAG-*tag* fusioniert (siehe Abschnitt 4.1.7.1). Der im Folgenden verwendete Begriff RGS-PX1 bezieht sich nur auf die RGS-Domäne der jeweiligen RGS-PX1-Proteine.

Das Maus-Ortholog wies gegenüber humanem RGS-PX1 Nukleotidaustausche auf, die zu einigen stillen sowie zu 5 *missense*-Mutationen (F91S, L111S, S112G, H119Q, S145P) führten. Diese Austausche verändern die Polarität und Hydropathie einiger Molekülbereiche und sind möglicherweise problematisch, d.h. es könnten sich Funktionsunterschiede zwischen murinem und humanem RGS-PX1 ergeben.

		*	20	*	40	*	60			
His-FLAG-RGSPX1	:	MAHHHHHHDYKDDDDKINTIKNQINSLLFVKKVCDSDRIQLQSGKEINTVKLAANFGKLC						TVP	: 63	
HisFLAG-RGSPX1-Maus	:	MAHHHHHHDYKDDDDKINTIKNQINSLLFVKKVCDSDRIQLQSGKEINTVKLAANFGKLC						TVP	: 63	
		MAHHHHHHDYKDDDDKINTIKNQINSLLFVKKVCDSDRIQLQSGKEINTVKLAANFGKLC								
		*	80	*	100	*	120			
His-FLAG-RGSPX1	:	LDSILVDNVALQFFMDYMQQTGGQAHLFWMTVEGYRVTAQQQLEVL						LSRQRD	GKHQTNQTKG	: 126
HisFLAG-RGSPX1-Maus	:	LDSILVDNVALQFFMDYMQQTGGQAHLFWMTVEGYRVTAQQQLEVL						SGRQRD	GKQTNQTKG	: 126
		LDSILVDNVALQFFMDYMQQTGGQAHLFWMTVEGYRVTAQQQLEVL						RQRD	GKQTNQTKG	
		*	140	*	160	*	180			
His-FLAG-RGSPX1	:	LLRAAAVGIYEQYLSEKASPRVTVDYLVAKLADTLNHEDPTPEIFDDIQRKVYELMLRDERE							: 189	
HisFLAG-RGSPX1-Maus	:	LLRAAAVGIYEQYLSEKAPPRVTVDYLVAKLADTLNHEDPTPEIFDDIQRKVYELMLRDERE							: 189	
		LLRAAAVGIYEQYLSEKASPRVTVDYLVAKLADTLNHEDPTPEIFDDIQRKVYELMLRDERE								
		*	200	*						
His-FLAG-RGSPX1	:	YPSFRQNALYVRMLAELDMLKDP		SFRG*				: 216		
HisFLAG-RGSPX1-Maus	:	YPSFRQNALYVRMLAELDMLKDP		SFRG*				: 216		
		YPSFRQNALYVRMLAELDMLKDP		SFRG						

Abb. 19 Aminosäuresequenzen der RGS-Domäne des humanen RGS-PX1 (AF420470-1) und des murinen RGS-PX1. Das *alignment* wurde mit Genedoc erstellt. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt und unterhalb der Sequenzen angegeben, Unterschiede weiß unterlegt.

5.2.2 Reinigung von Maus-RGS-PX1

Das His₆FLAG-Fusionsprotein des murinen RGS-PX1 (His₆-FLAG-moRGS-PX1) wurde in einer 10 L-Kultur *E. coli* BL21(DE3)/pREP4 exprimiert. Das Zellsediment wurde wie in 4.3.2 beschrieben lysiert und das Lysat auf eine Ni-NTA-Agarosematrix (2 mL Bettvolumen) geladen. Der Durchlauf (D1) wurde aufgefangen und erneut über die Matrix gegeben (D2).

Die Säule wurde sukzessiv mit 25 Säulenvolumina (SV) Nidrigsalzwaschpuffer (250 mM NaCl), 25 SV Hochsalzwaschpuffer (500 mM NaCl) und 5 SV Imidazolwaschpuffer (5 mM Imidazol) gewaschen und anschließend mit 10 SV 150 mM Imidazol eluiert. Die in den einzelnen Fraktionen dieser Reinigung enthaltenen Proteine wurden denaturiert, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Blau angefärbt (dargestellt in Abb. 20, Puffer siehe Tabelle 18).

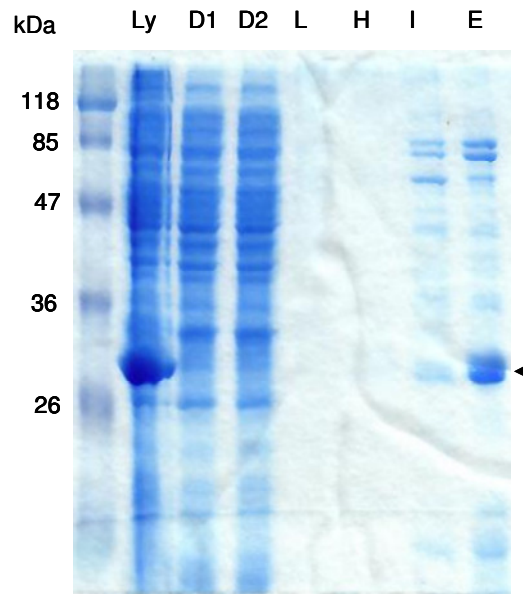


Abb. 20 Reinigung von His₆-FLAG-moRGS-PX1, Coomassie-Blau-Färbung. Ly = bakterielles Lysat D1 = 1. Durchlauf, D2 = 2. Durchlauf, L = Nidrigsalzwaschpuffer (200 mM NaCl), H = Hochsalzwaschpuffer (500 mM NaCl), I = Imidazolwaschpuffer (10 mM Imidazol), E = Elutionspuffer (150 mM Imidazol). Der 1. Durchlauf nach dem Laden des Lysates wurde nochmals auf die Affinitätsmatrix geladen (= 2. Durchlauf). Von jeder Fraktion wurde jeweils eine 1:10-Verdünnung hergestellt, von der je 12 µL mit Probenpuffer bei 95 °C erhitzt, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt wurden. Das Gel wurde anschließend mit 10 % (v/v) Glycerol inkubiert und getrocknet. Die Hauptbande im Eluat (Pfeil) bei ca. 30 kDa stellt His₆-FLAG-moRGS-PX1 dar. Durch einen Riß im Gel erscheint sie als Doppelbande.

Schon im Lysat war eine dominante Bande bei ca. 30 kDa erkennbar, die sich auch als Hauptbande des Imidazol-Eluates (E) darstellte. Das Protein His₆-FLAG-moRGS-PX1 besitzt ein etwas geringeres Molekulargewicht (ca. 26 kDa), der immunchemische Nachweis mit anti-FLAG-Antikörper bestätigte jedoch, dass das in der 30 kDa-Bande enthaltene Protein ein FLAG-*tag* trägt und es sich somit um His₆-FLAG-moRGS-PX1 handelte (Daten nicht gezeigt).

Gereinigtes His₆-FLAG-moRGS-PX1 stellte ca. 75% der Proteine des Imidazol-Eluates dar und wurde für die weitere Charakterisierung der Interaktion mit Gα_s-s4 verwendet.

5.2.3 Funktionelle Interaktion von RGS-PX1 und $G\alpha_s$ -s4

5.2.3.1 Maus-RGS-PX1

GTPase-akzelerierende Proteine („GAPs“) erhöhen die Initialgeschwindigkeit der GTP-Hydrolyse (vgl. Abschn. 1.1.5, Abb. 3). Sie binden bevorzugt an während der Hydrolyse gebildete Intermediärkonformationen der $G\alpha$ -Proteine und stabilisieren diese.

Zheng und Mitarbeiter hatten für die RGS-Domäne von humanem RGS-PX1 eine $G\alpha_s$ -spezifische GAP-Aktivität beschrieben. In den im Folgenden dargestellten Untersuchungen sollte die in dieser Arbeit klonierte und exprimierte RGS-Domäne des Maus-RGS-PX1 bezüglich dieser Aktivität charakterisiert werden.

Der Einfluß des RGS-PX1 auf die GTP-Hydrolyserate des $G\alpha_s$ -s4CH wurde in sogenannten *Single-turnover*-Assays untersucht (vgl. Abschnitt 4.4.6.4). Ein solches Experiment ist in Abb. 21 dargestellt. Jeweils 62,6 nM $G\alpha_s$ -s4CH wurden in Abwesenheit von Mg^{2+} mit $[\gamma^{32}P]$ -GTP inkubiert (0 min bis 15 min). Dabei kommt es zu einem Nukleotidaustausch, durch das Fehlen des katalytischen Mg^{2+} findet jedoch keine Hydrolyse statt. Zum Zeitpunkt $t=15$ min wurde die Reaktion durch Zugabe von Mg^{2+} und eines großen Überschuß an unmarkiertem GTP gestartet, so dass lediglich die Hydrolyserate des zum Zeitpunkt $t=15$ min im katalytischen Zentrum des $G\alpha_s$ -s4CH gebundenen $[\gamma^{32}P]$ -GTP gemessen wurde. His₆-FLAG-moRGS-PX1 (100 nM) war entweder erst im Hydrolyseschritt („getrennt“, magenta) oder bereits während der Beladung mit GTP anwesend („Co-Inkubation“, gelb). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50 μ L aus dem Reaktionsansatz entnommen, die Reaktion mit 750 μ L saurer Aktivkohlesuspension gestoppt und nach Zentrifugation die Menge des Reaktionsprodukts $^{32}P_i$ im klaren Überstand bestimmt. Die Menge des gebildeten Reaktionsproduktes wurde in Abhängigkeit von der Zeit graphisch aufgetragen.

In Anwesenheit eines GTPase-akzelerierenden Proteins muß die Initialgeschwindigkeit der Reaktion steigen (dargestellt im Initialanstieg des Graphen) und die vollständige Hydrolyse des gebundenen $[\gamma^{32}P]$ -GTP, d.h. der Maximalwert, früher erreicht sein. Da für $G\alpha_s$ noch kein GTPase-akzelerierendes Protein beschrieben war, wurde die Funktionalität des Assays mit $G\alpha_o$ und RGS5⁴ überprüft. In dieser Reaktion wurden 50 nM $G\alpha_o$ in An- oder Abwesenheit von 100 nM RGS5 im Hydrolyseschritt eingesetzt. Wie in Abb. 21 B gezeigt wird, änderte sich der Verlauf des Graphen in Anwesenheit von RGS5 erwartungsgemäß.

In einer Reihe von Versuchen konnte keine GTPase-beschleunigende Aktivität des murinen RGS-PX1 auf $G\alpha_s$ -s4CH festgestellt werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob $G\alpha_s$ -s4CH

⁴ $G\alpha_o$ und RGS5 wurden mir freundlicherweise von Frau Dr. Kleuss zur Verfügung gestellt. Beide Proteine enthielten eine His₆-Modifikation, über die sie mittels Ni-NTA-Agarose wie beschrieben gereinigt worden waren.

bereits bei der Beladung mit GTP („mit RGS, Co-Inkubation“, gelb) oder erst beim Start der Hydrolyse („mit RGS, getrennt“, magenta) mit RGS-PX1 inkubiert wurde (vgl. Abb. 21 A).

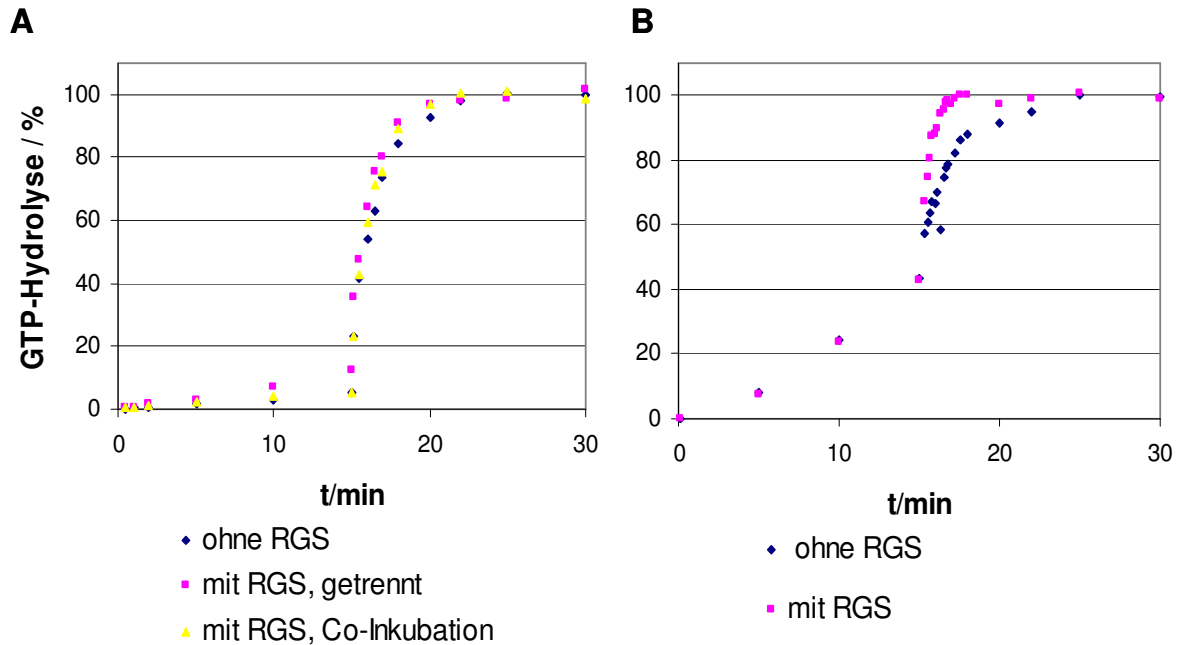


Abb. 21 Beeinflussung der $G\alpha$ -katalysierten GTP-Hydrolyse durch RGS-Proteine in *Single-turnover-Assays*. **A Einfluß von His₆-FLAG-moRGS-PX1 (Maus-RGS-PX1) auf die $G\alpha_s$ -katalysierte GTP-Hydrolyse (bovines $G\alpha_s$ -s4CH). **B** Einfluß von RGS5 auf die $G\alpha_o$ -katalysierte GTP-Hydrolyse. Die vorliegenden Datenpunkte zeigen Mittelwerte aus jeweils zwei Werten. Die Werte bei 25 und 30 min jedes Experimentes (vollständige GTP-Hydrolyse) wurden gemittelt und als Referenzgröße (100%) verwendet (1,86 pmol in (A), 2,00 pmol in (B)). Zwei weitere, unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse. Details siehe Text.**

Die fehlende GAP-Aktivität des murinen RGS-PX1 war zunächst nicht zu erklären, könnte jedoch auf die Aminosäureunterschiede zwischen murinem und humanem Ortholog zurückzuführen sein (vgl. Abb. 19). Um die für RGS-PX1 beschriebene GAP-Aktivität und intermolekulare Interaktionsstellen am $G\alpha_s$ dennoch charakterisieren zu können, wurde auch das humane RGS-PX1 nach den Angaben von Zheng *et al.* kloniert, exprimiert und in *Single-turnover-Assays* untersucht.

5.2.3.2 Humanes RGS-PX1

Für die Klonierung des humanen RGS-PX1 konnten die gleichen Oligonukleotide verwendet werden, die auch für die Amplifikation des murinen Orthologs eingesetzt worden waren, da die Nukleotidsequenzen beider Orthologe im *Primer-Annealing*-Bereich identisch sind. Als *template* diente die vollständige, für humanes RGS-PX1 kodierende DNA in pCMV-Script-Vektor, die uns freundlicherweise von Prof. Wieland (Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg)

zur Verfügung gestellt worden war. Das resultierende Konstrukt His₆-FLAG-huRGS-PX1/pQE60 kodierte für die RGS-Domäne des humanen RGS-PX1. N-terminal enthielt das kodierte Protein in sequenzieller Abfolge ein Hexahistidin- und ein FLAG-tag. Eine genaue Beschreibung der Herstellung von His₆-FLAG-huRGS-PX1/pQE60 befindet sich im Abschnitt 4.1.7.2.

In Sequenzvergleichen mit in Datenbanken hinterlegten Sequenzen wurden keine Aminosäureunterschiede zwischen His₆-FLAG-huRGS-PX1 und der von Zheng und Mitarbeitern veröffentlichten Sequenz festgestellt. Das Protein wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und über sein N-terminales Hexahistidin-tag aus den Zell-Lysaten gereinigt. Dabei wurden bezüglich Ausbeute und Reinheit vergleichbare Ergebnisse wie mit Maus-His₆-FLAG-RGS-PX1 erzielt (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluß von His₆-FLAG-huRGS-PX1 auf die G α_s -katalysierte GTP-Hydrolyse wurde in *Single-turnover*-Assays bestimmt. Jeweils 52,8 nM G α_s -s4CH wurden in An- oder Abwesenheit von 100 nM huRGS-PX1 mit [γ -³²P]-GTP beladen. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem auf S. 88 und unter 4.4.6.4 beschriebenen.

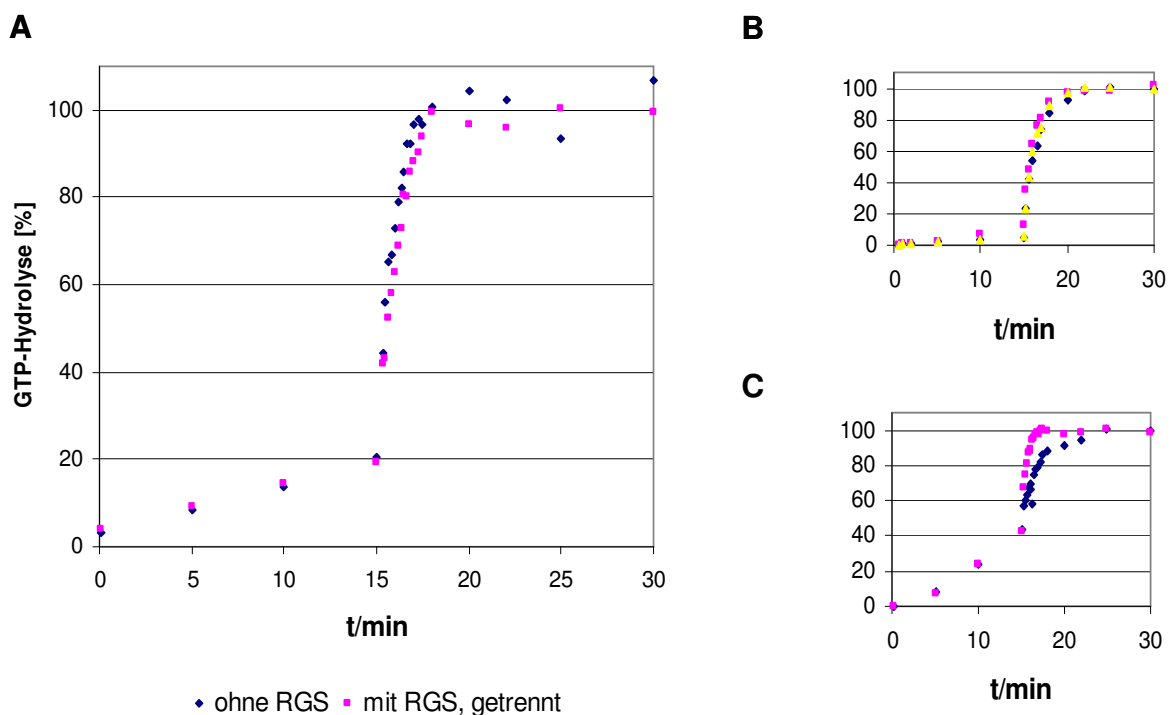


Abb. 22 Einfluß von RGS-Proteinen auf GTPase-Aktivitäten. A G α_s -s4CH und huRGS-PX1. 52,8 nM bovines G α_s -s4CH wurden in An- oder Abwesenheit von 100 nM huRGS-PX1 mit [γ -³²P]-GTP beladen und die *Single-Turnover*-GTPase wie im Text beschrieben untersucht. Zum Vergleich sind die in Abb. 21 bereits gezeigten Versuche mit G α_s -s4CH und moRGS-PX1 (B) sowie G α_o und RGS5 (C) nochmals abgebildet.

Auch das humane Ortholog (huRGS-PX1) beeinflusste die G α_s -katalysierte GTP-Hydrolyse nicht (siehe Abb. 22). Die Experimente wurden unter exakt den von Zheng und Mitarbeitern

angegebenen Bedingungen wiederholt (400 nM huRGS-PX1, 80 nM $G\alpha_s$ -s4CH), aber auch dort hatte huRGS-PX1 keinen Einfluß auf die $G\alpha_s$ -katalysierte GTP-Hydrolyse (Daten nicht gezeigt).

Es war demnach davon auszugehen, dass RGS-PX1 keine $G\alpha_s$ -spezifische GAP-Aktivität besitzt. Eine weitere Charakterisierung der Interaktion sowie der Kontaktstellen von $G\alpha_s$ mit RGS-PX1 war daher nicht möglich.

Die Identifizierung eines $G\alpha_s$ -spezifischen RGS-Proteins war jedoch weiterhin von großem Interesse. Unter Verwendung der im Folgenden beschriebenen *pull-down*-Experimente sollte die Suche nach neuen $G\alpha_s$ -Interaktionspartnern daher mit besonderem Augenmerk auf ein neues $G\alpha_s$ -spezifisches RGS-Protein durchgeführt werden.

5.2.4 Zusammenfassung

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation war RGS-PX1 als neuer $G\alpha_s$ -spezifischer Interaktionspartner aus humanen Herzmuskelzellen kloniert und als Regulator der $G\alpha_s$ -Aktivität beschrieben worden. Diese GTPase-akzelerierende Aktivität von RGS-PX1 sollte nun im Maus-System genauer charakterisiert werden, daher wurde das murine Ortholog des beschriebenen humanen RGS-PX1 aus der cDNA von S49-Zellen kloniert, heterolog in *E.coli* exprimiert und gereinigt (vgl. Abb. 20). Die GTPase-akzelerierende Aktivität des murinen RGS-PX1 wurde in *Single-Turnover*-GTPase-Assays untersucht, jedoch konnte in einer Reihe von Versuchen keine Beschleunigung der $G\alpha_s$ -katalysierten GTP-Hydrolyse durch murines RGS-PX1 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 21). Humanes und murines RGS-PX1 unterscheiden sich in drei Aminosäuren, die ursächlich für die fehlende GAP-Aktivität des murinen Orthologs sein könnten. Um die Charakterisierung der GAP-Aktivität dennoch vornehmen zu können, wurde auch humanes RGS-PX1 kloniert, heterolog exprimiert und gereinigt. Die funktionelle Analyse des humanen RGS-PX1 zeigte jedoch ebenfalls keine GAP-Aktivität dieses Proteins gegenüber $G\alpha_s$ (Abb. 22). Es ist daher davon auszugehen, dass RGS-PX1 kein GAP für $G\alpha_s$ ist.

5.3 Charakterisierung von Interaktionspartnern des $G\alpha_s$ in Säugerzellen

Zur Charakterisierung von Proteinkomplexen bzw. Protein-Protein-Wechselwirkungen sind verschiedene Herangehensweisen möglich, die in Abschnitt 1.4.1 und 1.4.2 näher erläutert wurden. Eine systematische Suche nach Interaktionspartnern für $G\alpha_s$ unter Verwendung der *yeast-two-hybrid*-Methode war von zwei Arbeitsgruppen durchgeführt worden (Tall *et al.* 2003, Klattenhoff *et al.* 2003; vgl. Abschnitt 1.4.1 zu Vor- und Nachteilen dieser Methode).

Mit dieser Methode wurde für $G\alpha_s$ als Köderprotein jedoch nur ein einziger Interaktionspartner identifiziert (Ric-8B). Im Gegensatz zu anderen G-Proteinen führte die *yeast-two-hybrid*-Methode bei $G\alpha_s$ also nicht zum erwarteten Erfolg. In der vorliegenden Arbeit sollten daher Interaktionspartner des $G\alpha_s$ über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen, d.h. durch Affinitätsreinigung von $G\alpha_s$ -enthaltenden Proteinkomplexen und deren anschließende massenspektrometrische Analyse dargestellt werden.

Zwei Strategien erschienen dafür besonders aussichtsreich (vgl. Abb. 23):

- eine „*in vitro*-Methode“, bei der das epitopmarkierte $G\alpha_s$ -Köderprotein zunächst in *E.coli* exprimiert und in größeren Mengen gereinigt wird, um anschließend immobilisiert und mit Säugerzell-Lysaten inkubiert zu werden.
- eine „*in vivo*-Methode“⁵, bei der das epitopmarkierte Köderprotein direkt in den Zielzellen exprimiert und mit assoziierten Proteinen gereinigt werden kann.

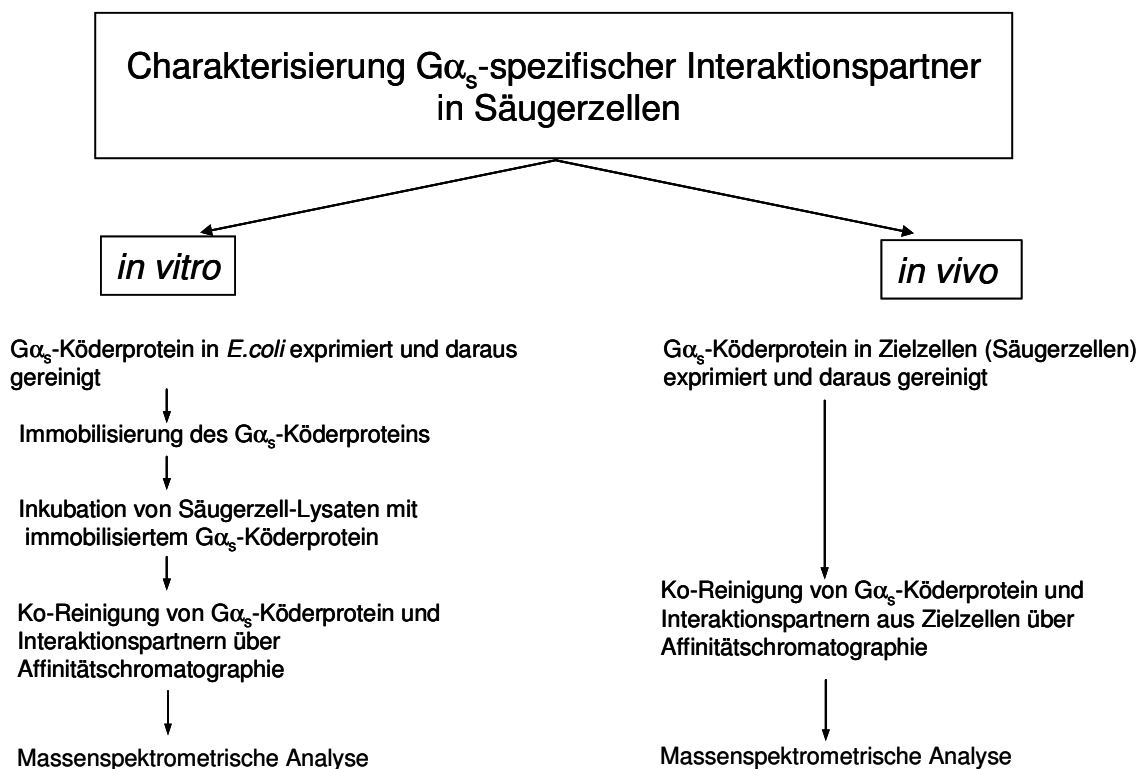


Abb. 23 Strategien zur Charakterisierung neuer $G\alpha_s$ -Interaktionspartner.

Beide Strategien haben unterschiedliche Vorteile. Die *in vitro*-Methode ermöglicht aufgrund des relativ geringen experimentellen Aufwands eine deutlich höhere Durchsatzrate als die *in*

⁵ Die Bezeichnung „*in vivo*“ soll den Unterschied zur *in vitro*-Methode zu verdeutlichen, d.h. die Bildung von Proteinkomplexen innerhalb und nicht außerhalb lebender Zellen.

in vivo-Methode und hat somit eher *Screening*-Charakter. Posttranslationale Modifikationen sind bei der *in vitro*-Methode allerdings nur für die Interaktionspartner aus den Säugerzell-Lysaten und nicht für das $G\alpha_s$ -Köderprotein möglich. Da jedoch nicht alle Protein-Protein-Wechselwirkungen von diesen Modifikationen abhängig sind, bietet die *in vitro*-Methode dennoch gute Voraussetzungen zur Charakterisierung von Interaktionspartnern. Mit der *in vivo*-Methode hingegen können auch Wechselwirkungen erfasst werden, die von posttranslationalen Modifikationen des $G\alpha_s$ abhängig sind.

5.4 Interaktionspartner des $G\alpha_s$ aus Säugerzellen: *in vitro*-Untersuchung

Die Charakterisierung $G\alpha_s$ -spezifischer Interaktionspartner wurde mittels sogenannter „*pull down*“-Experimente durchgeführt, in denen $G\alpha_s$ mit verschiedenen Affinitäts-*tags* modifiziert als Köderprotein eingesetzt wurde. Mit ihm interagierende Proteine wurden durch Inkubation mit Säugerzell-Lysaten und anschließende Affinitätschromatographie isoliert und über denaturierende Gelelektrophorese sowie Massenspektrometrie analysiert.

Das Köderprotein wurde für solche Experimente in großen Mengen rekombinant in *E. coli* hergestellt und konnte somit ohne erhöhten Aufwand für eine Vielzahl von experimentellen Ansätzen verwendet werden.

Für die Wahl des geeigneten *tags* mußten Aspekte wie Löslichkeit, Aktivität und Molekulargewicht des Köderproteins sowie nachfolgende Anwendungsmöglichkeiten (Immobilisation, Detektion, Assays etc.) berücksichtigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde für $G\alpha_s$ ein kleines *tag* wie z.B. das Hexahistidin-*tag* bevorzugt. Es ermöglicht neben der Immobilisierung und Affinitätsreinigung die Detektion des Fusionsproteins durch Hexahistidin-spezifische Antikörper und stört auch die Funktionalität des $G\alpha_s$ in verschiedenen Assays nur sehr selten. Aus vorangegangenen Versuchen war jedoch ersichtlich, dass eine Reihe von Proteinen mit Hexahistidin-modifiziertem $G\alpha_s$ -s4 von der Ni-NTA-Matrix ko-eluieren (vgl. z.B. mo $G\alpha_s$ -s4CH: Abb. 12 Spur E und Abb. 13 Spur 5, bovines $G\alpha_s$ -s4CH: Abb. 17 A Spur E2). Für funktionelle Untersuchungen des gereinigten Proteins sind diese Verunreinigungen meist unproblematisch, bei der Suche nach Interaktionspartnern sind sie jedoch hinderlich, da sie zum einen die Identifikation der interagierenden Proteine stören und zum anderen Bindungsstellen am $G\alpha_s$ besetzen können, die somit den Interaktionspartnern nicht mehr zugänglich sind.

Aus diesem Grund wurde eine duale Epitopmarkierung aus zwei sequenziell angeordneten Affinitäts-*tags*, Hexahistidin-*tag* und StreptagII[®], entwickelt. Über das Hexahistidin-*tag* kann $G\alpha_s$ -s4 aus bakteriellen Lysaten angereichert werden. Das StreptagII[®] dient der

Immobilisierung des gereinigten $G\alpha_s$ -s4 an der Affinitätsmatrix Streptactin. Bakterielle Proteine, die unspezifisch mit der Ni-NTA-Matrix interagieren, werden nur sehr unwahrscheinlich auch an die StrepTactin-Matrix unspezifisch binden und können somit im zweiten Reinigungsschritt vom immobilisierten $G\alpha_s$ -s4 abgetrennt werden.

Um dieses duale *tag* bei Bedarf entfernen zu können und ein natives $G\alpha_s$ zu erhalten, wurde außerdem am N-Terminus des *tag* eine Xa-Protease-Spaltstelle generiert.

Dieses Affinitäts-*tag* wird im Folgenden mit „XHS“ (Xa-His₆-StreptagII) bezeichnet. Die Struktur des C-terminal modifizierten *bait*-Proteins $G\alpha_s$ -s4-XHS ist in Abb. 24 schematisch dargestellt.

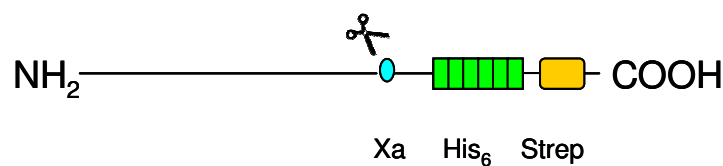


Abb. 24 Schematische Darstellung des Köder-Proteins $G\alpha_s$ -s4-XHS. Xa: Xa-Protease-Spaltstelle, His₆: Hexahistidin-*tag*, Strep: StreptagII[®]. N-terminal von der Xa-Protease-Spaltstelle befindet sich die $G\alpha_s$ -s4-Sequenz.

Die Details der Herstellung des Expressionsplasmids $G\alpha_s$ -s4-XHS/pQE60 sind in Abschnitt 4.1.6.3 beschrieben.

5.4.1 Reinigung des Köderproteins $G\alpha_s$ -s4-XHS

Um $G\alpha_s$ -s4-XHS als Köderprotein einsetzen zu können, musste überprüft werden, ob es ausreichend fest an die Streptactin-Matrix bindet. Zudem sollten die von der Ni-NTA-Agarose ko-eluierenden bakteriellen Proteine abgetrennt werden können, um bei der späteren Charakterisierung von $G\alpha_s$ -Interaktionspartnern nicht zu stören.

Das Lysat von $G\alpha_s$ -s4-XHS-exprimierenden *E. coli* BL21(DE3)/pREP4-Zellen wurde auf eine Ni-NTA-Agarosesäule (0,2 mL Bettvolumen) geladen und sukzessiv mit 20 SV Hochsalzpuffer (0,5 M NaCl), 20 SV Niedrigsalzpuffer (0,2 M NaCl) und 10 SV Imidazolwaschpuffer (20 mM Imidazol) gewaschen und in 10 SV Elutionspuffer (150 mM Imidazol) eluiert. Die Reinheit dieser Präparation war vergleichbar mit der von Präparationen anderer $G\alpha_s$ -Konstrukte mit terminalem His₆-tag (vgl. Abb. 17 A, Spur E2). Die Anreicherung des Proteins über das Hexahistidin-tag wurde durch die Anwesenheit des StreptagII[®] folglich nicht beeinflusst.

Das Eluat der Ni-NTA-Agarose wurde anschließend auf eine vorgepackte StrepTactin-Sepharose-Säule (1 mL Bettvolumen, Fa. IBA) geladen, mit 5 SV Waschpuffer (100 mM Tris pH 8.0 (HCl), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen und mit 1x1 SV und 4x0,5 SV Desthiobiotinpuffer (2,5 mM Desthiobiotin in Waschpuffer) eluiert. Wie in Abb. 25 zu sehen

ist, konnte $G\alpha_s$ -s4-XHS vollständig an die Streptin-Sepharose-Matrix binden. In den Durchlauf- und Waschfraktionen wurde der überwiegende Teil der verunreinigenden Proteine abgetrennt, während $G\alpha_s$ -s4-XHS nur durch Elution mit Desthiobiotin von der Matrix gelöst werden konnte und ausschließlich in den Elutionsfraktionen nachweisbar war.

Die Bindung an Streptactin-Sepharose ermöglichte also eine feste Immobilisierung von $G\alpha_s$ -s4-XHS, so dass es hervorragend in den folgenden *pull-down*-Versuchen eingesetzt werden konnte. Zudem ist deutlich sichtbar, dass fast alle Verunreinigungen im Wasch-Schritt entfernt werden konnten und mit der empfindlichen Silberfärbung neben $G\alpha_s$ -s4-XHS kaum weitere Proteine angefärbt wurden. Die von Ni-NTA-Agarose ko-eluierenden Proteine interagierten also nicht direkt mit $G\alpha_s$ sondern mit der Ni-NTA-Agarosematrix. Sie können im zweiten Reinigungsschritt entfernt werden und stören demzufolge nicht bei der anschließenden Charakterisierung von Interaktionspartnern.

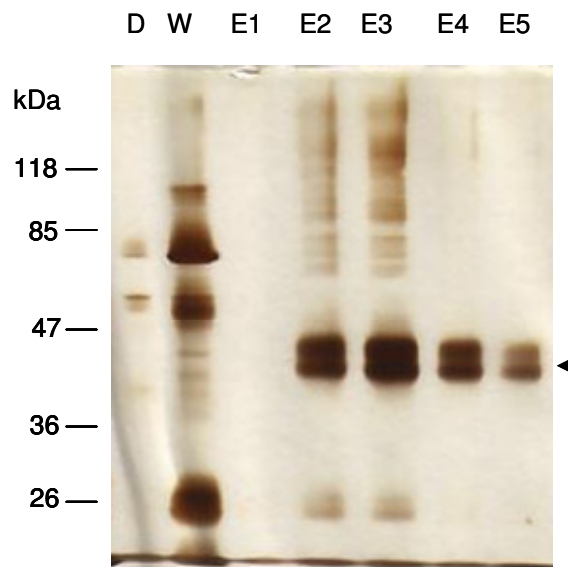


Abb. 25 Reinigung von $G\alpha_s$ -s4-XHS an Streptactin-Sepharose. $G\alpha_s$ -s4-XHS (Pfeil) aus 250 mL Expressionskultur wurde über 0,2 mL Ni-NTA-Agarose angereichert (nicht gezeigt). Das Eluat der Ni-NTA-Säule wurde auf eine vorgepackte Säule mit StrepTactin-Sepharose geladen (Bettvolumen 1 mL), gewaschen und eluiert. Waschvolumen: 5 SV, Elution = 1x1 SV (E1), 4x0,5 SV (E2-E5). 12 μ L jeder Fraktion wurden mit Probenpuffer versetzt, die Proteine denaturiert und auf einem 11% SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und anschließend durch eine Silberfärbung visualisiert. $G\alpha_s$ -s4-XHS erscheint als Doppelbande und ist mit einem Pfeil markiert.

Vergleichbare Ergebnisse wurden in Reinigungen mit präparativem Maßstab (1 L) erzielt (Abb. 26). $G\alpha_s$ -s4-XHS wurde in einer 1 L-Kultur *E. coli* BL21(DE3)/pREP4 exprimiert und das Zellsediment in 30 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) wie in 4.3.2 beschrieben lysiert. Das Lysat wurde auf 200 mM NaCl eingestellt und auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule (0,5 mL Bettvolumen) geladen. Die Säule wurde unter den oben genannten Bedingungen gewaschen und eluiert. Das Eluat wurde anschließend in einem 15 mL-Centricon-Röhrchen

(MWCO 30 kDa) gegen StrepTactin-Waschpuffer umgepuffert und anschließend auf eine StrepTactin-Sepharose-Säule (0,5 mL Bettvolumen) geladen. Die Säule wurde mit 5 SV Waschpuffer (100 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen und mit 1x1 SV und 4x0,5 SV Desthiobiotinpuffer (2,5 mM Desthiobiotin in Waschpuffer) eluiert. Es wurden 12 μ L von jeder Fraktion entnommen, die enthaltenen Proteine denaturiert, elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Wie aus Abb. 26 B deutlich hervorgeht, konnte $G\alpha_s$ -s4-XHS über die zweistufige Reinigung fast bis zur Homogenität gereinigt werden (Spur S).

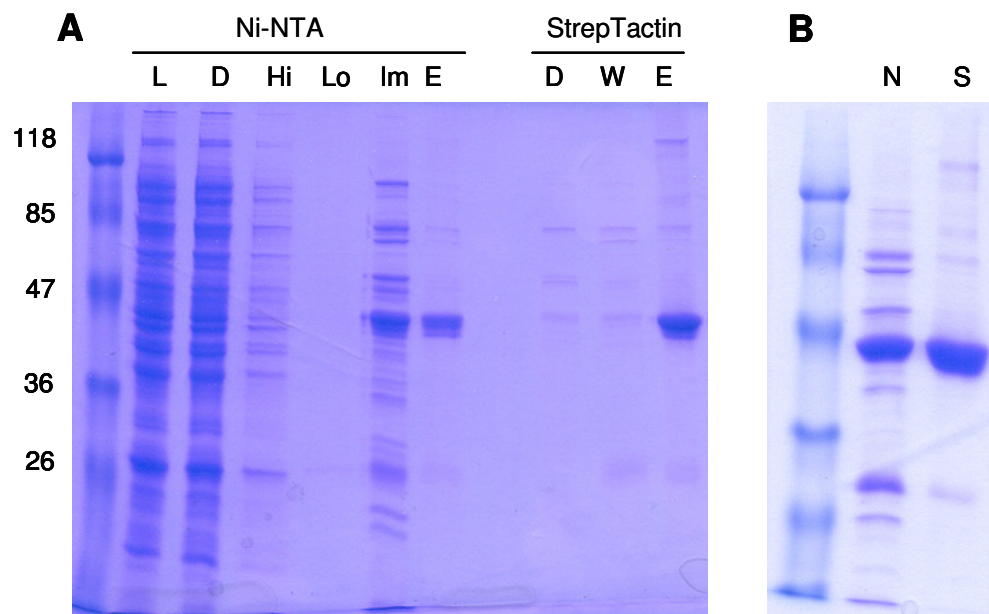


Abb. 26 Reinigung von $G\alpha_s$ -s4-XHS über Ni-NTA und StrepTactin-Sepharose. **A** Das Sediment einer 1L-Expressionskultur wurde lysiert und das Lysat über 0,5 mL Ni-NTA-Agarose und 0,5 mL StrepTactin-Sepharose gereinigt. Jeweils 7,5 μ L der angegebenen Fraktionen sowie 1,6 μ g Protein des konzentrierten StrepTactin-Sepharose-Eluates wurden denaturiert und die Proteine auf einem 11% SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Fraktionsvolumina s. Text. **B** Jeweils 5 μ g Protein des konzentrierten Eluats einer einstufigen (N) und zweistufigen (S) Reinigung wurden denaturiert und auf einem 11% SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Beide Gele wurden mit Coomassie-Blau gefärbt. L=Lysat; D=Durchlauf; Hi=Hochsalz-Waschfraktion; Lo=Niedrigsalzwaschfraktion; Im=Imidazolwaschfraktion; E=Eluat (Fraktionsvolumina s. Text) ; N=über Ni-NTA-Agarose (einstufig) gereinigtes $G\alpha_s$ -s4-XHS; S=über Ni-NTA-Agarose und StrepTactin-Sepharose (zweistufig) gereinigtes $G\alpha_s$ -s4-XHS.

Aus einer Kultur von 10 L wurden 30 – 50 mg $G\alpha_s$ -s4-XHS isoliert. In GTP γ S-Bindungsassays wurde die Aktivität mit 5,4 pmol/ μ L (20% bezogen auf die Gesamtproteinmenge) bestimmt (Daten nicht gezeigt).

5.4.2 Heterotrimerbildung mit G β γ

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob mit der *pull down*-Methode die Interaktion von $G\alpha_s$ -s4-XHS mit bekannten Interaktionspartnern dargestellt werden konnte. Hierfür wurde die Heterotrimerbildung des $G\alpha_s$ mit G β γ herangezogen.

Diese Versuche wurden mit sehr kleinen Mengen an Streptactin-Matrix (25 μL) im *batch*-Verfahren durchgeführt. Um unspezifische Bindungen an die Matrix zu minimieren, wurde die Bindungskapazität der verwendeten Matrix ausgeschöpft und bewusst keine größere Menge Matrix eingesetzt. Die Handhabung der Streptactin-Sepharose erwies sich jedoch als schwierig, weil durch das Abnehmen des Überstandes Partikel verschleppt wurden. Aus diesem Grund wurden für diese Versuche Streptactin-beladene Magnetpartikel („StrepMag“) verwendet, deren Handhabung in diesem kleinen Maßstab wesentlich einfacher war.

Um festzustellen, ob diese Methode zur Darstellung der Heterotrimerbildung in einfachen und komplexen Lösungen geeignet ist, wurde über Ni-NTA-Agarose angereichertes $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ auf der StrepMag-Matrix immobilisiert, gewaschen und anschließend mit gereinigtem $\text{G}\beta\gamma$ bzw. Membranextrakten aus wtS49-Zellen inkubiert.

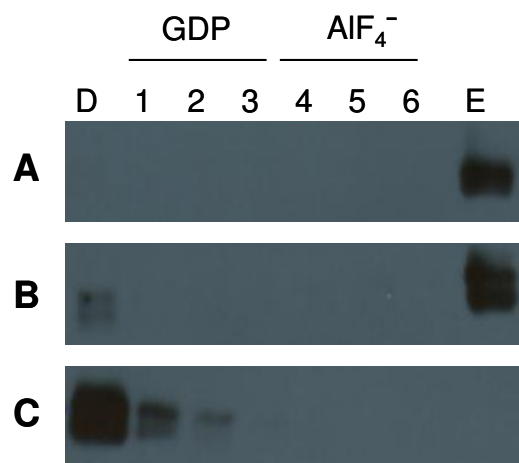
5.4.2.1 Heterotrimerbildung mit isoliertem $\text{G}\beta\gamma$

Immobilisiertes $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ wurde zunächst mit isoliertem $\text{G}\beta_1(\text{His}_6)\gamma_2$ inkubiert ($\text{G}\gamma_2$ trägt N-terminal ein *His₆-tag*) und eine $\text{G}\alpha_s$ -vermittelte Retardierung des $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexes durch immunchemischen Nachweis von $\text{G}\beta$ im Desthiobiotin-Eluat nachgewiesen. Im Hinblick auf die spätere Charakterisierung von Interaktionspartnern sollte des Weiteren geprüft werden, ob diese Interaktion des $\text{G}\beta\gamma$ mit immobilisiertem $\text{G}\alpha_s$ ähnlich wie beim nativen Gs-Heterotrimer konformationsselektiv ist. Eine derartige Elution würde zeigen, dass die beobachteten Wechselwirkungen solchen unter physiologischen Bedingungen entsprechen. Aluminium-, Fluorid- und Magnesiumionen können als Komplex von $\text{G}\alpha_s\text{:GDP}$ gebunden werden und nehmen im aktiven Zentrum des Moleküls die Stelle des γ -Phosphatrests des GTP ein (Sternweis und Gilman 1982, Sondak *et al.* 1994). Dies bewirkt eine Aktivierung des $\text{G}\alpha_s$ und damit eine Dissoziation des Heterotrimers, so dass $\text{G}\beta\gamma$ vom immobilisierten $\text{G}\alpha_s$ durch dessen Aktivierung eluiert werden sollte.

$\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ (21,5 μg , entspricht 500 pmol) wurde auf 50 μL Streptactin-Magnetpartikeln („MagBeads“) in 100 μL Puffer HMEDBNL immobilisiert und mit 5,4 μg (entspricht 120 pmol) gereinigtem $\text{G}\beta_1(\text{His}_6)\gamma_2$ über Nacht bei 4 °C inkubiert (HMEDBNL: 20 mM Na-HEPES (pH 8,0), 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$). Eine gleichmäßige Durchmischung der Partikel wurde durch Inkubation in einem Eppendorfschüttler gewährleistet. Die Partikel wurden anschließend mit 3x100 μL HMEDBNL + 10 μM GDP gewaschen. Durch die Anwesenheit von GDP wurde das Gleichgewicht der Reaktion $\text{G}\alpha_s + \text{GDP} \rightleftharpoons \text{G}\alpha_s\text{:GDP}$ auf die Seite des nukleotidgebundenen $\text{G}\alpha_s$ verschoben, wodurch die Heterotrimerisierung bevorzugt stattfand. Die nächsten Waschschritte (3x100 μL) wurden in Anwesenheit von 30 μM AlCl_3 und 10 mM NaF in HMEDBNL

durchgeführt. Anschließend wurde $G\alpha_s$ -s4-XHS in 100 μ L Elutionspuffer mit 2,5 mM Desthiobiotin von der Matrix eluiert (Puffer siehe Abschnitt 5.4.1).

Abb. 27 Heterotrimerbildung von $G\alpha_s$ -s4-XHS mit isoliertem $G\beta_1(\text{His}_6)\gamma_2$. 21,5 μ g (=500 pmol) $G\alpha_s$ -s4-XHS wurden auf 50 μ L MagBeads (Bettvolumen) in 100 μ L HMEDBNL immobilisiert und mit 5,4 μ g $G\beta_1(\text{His}_6)\gamma_2$ über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Die MagBeads wurden mit je 3x100 μ L HMEDBNL+GDP (Spur 1-3) und HMDGBNL+AIF₄⁻ (Spur 4-6) gewaschen und $G\alpha_s$ -s4-XHS anschließend mit 100 μ L Desthiobiotin-Elutionspuffer eluiert (Spur E). Die in 12 μ L jeder Fraktion enthaltenen Proteine wurden denaturiert, elektrophoretisch getrennt und immunchemisch detektiert. Inkubation der MagBeads mit $G\beta_1(\text{His}_6)\gamma_2$ in Anwesenheit von $G\alpha_s$ -s4-XHS (**A**, **B**) bzw. in Abwesenheit von $G\alpha_s$ -s4-XHS (**C**). Verwendete Antikörper: **A** anti- $G\alpha_{s/olf}$ (C-18, Santa Cruz), **B** und **C** anti- $G\beta$ (T-20, Santa Cruz).



Im Desthiobiotin-Eluat eines $G\alpha_s$ -s4-XHS-haltigen Reaktionsansatzes konnte neben $G\alpha_s$ auch $G\beta$ immunchemisch detektiert werden (Abb. 27 A-E und B-E). In Abwesenheit von $G\alpha_s$ -s4-XHS konnte $G\beta_1(\text{His}_6)\gamma_2$ nicht an die Matrix binden (Abb. 27 C-E).

Daraus folgte, dass

- $G\alpha_s$ -s4-XHS in der Lage war, mit $G\beta_1(\text{His}_6)\gamma_2$ Heterotrimere zu bilden.
- die Heterotrimerbildung durch die vorherige Immobilisierung des $G\alpha_s$ -s4-XHS nicht beeinträchtigt wurde.

Die Anwesenheit von AIF₄⁻ in den Waschfraktionen 4-6 führte jedoch nicht zu einer Elution des $G\beta_1(\text{His}_6)\gamma_2$ von $G\alpha_s$ -s4-XHS. Das Heterotrimer blieb demnach auch in Anwesenheit von AIF₄⁻ intakt (Abb. 27 Spur 4 – 6).

Das sehr schwache Immunsignal in Abb. 27 B-D wurde wahrscheinlich von inaktivem $G\beta\gamma$ hervorgerufen, das bei der Präparation beschädigt bzw. denaturiert wurde und demnach nicht in der Lage war, an $G\alpha_s$ zu binden.

5.4.2.2 Heterotrimerbildung mit $G\beta\gamma$ aus Zellmembranextrakten

Die Komplexität der Proteinlösung eines Lysates bzw. Zellmembranextraktes ist wesentlich größer als die gereinigter Komponenten. Zugleich ist die Konzentration an $G\beta\gamma$ in einem Zellmembranextrakt deutlich geringer. Daher sollte auch überprüft werden, ob $G\alpha_s$ -s4-XHS in der Lage ist, endogenes $G\beta\gamma$ aus Membranextrakten von S49-Maus-Lymphomzellen (wt) zu binden, wobei die Versuchsbedingungen denen entsprachen, die anschließend für die Identifizierung von Interaktionspartnern aus Säugerzell-Lysaten verwendet werden sollten. Die konformationsselektive Elution von Interaktionspartnern wurde in diesen Versuchen

zweistufig durchgeführt, indem nach der Inkubation mit AlF_4^- -haltigem Puffer versucht wurde, $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ mit $\text{GTP}\gamma\text{S}$ zu aktivieren. Die Aktivierung des $\text{G}\alpha_s$ mit AlF_4^- ist reversibel und erfordert keinen Nukleotid austausch am $\text{G}\alpha_s$, wohingegen die $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Aktivierung irreversibel ist, da GTP gegen das nicht hydrolysierbare Nukleotid analogon $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ausgetauscht wird (vgl. 1.1.5).

Membranen und Membranextrakte von wildtypischen S49-Maus-Lymphomzellen wurden wie in 4.3.6 beschrieben aus einem Kulturvolumen von 50 mL hergestellt. In diesen Extrakten enthaltenes $\text{G}\beta\gamma$ ist jedoch auch mit verschiedenen endogenen $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten in Heterotrimeren assoziiert, die für $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ auf der Matrix nicht direkt zugänglich sind. Die Membranextrakte wurden daher mit 1 μM GTP versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Der dadurch in den endogenen $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten bewirkte Nukleotid austausch führt zu ihrer Aktivierung und somit zur Dissoziation der Heterotrimeren, so dass freigesetzte $\text{G}\beta\gamma$ -Dimere temporär (d.h. bis zur Reassoziierung der Heterotrimeren nach Abschluss der GTP -Hydrolyse in den betreffenden $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten) für $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ verfügbar werden. Die „aktivierten“ Membranextrakte wurden mit $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ -beladenen StrepMag-Partikeln inkubiert. Im Vergleich zu den endogenen $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten weist immobilisiertes $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ an der Matrix-Oberfläche eine höhere lokale Konzentration auf. Die GTP -Aktivierung ermöglicht somit eine temporäre Konkurrenz des immobilisierten $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ mit endogenen $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten um die freigesetzten $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexe. Aufgrund der größeren lokalen Konzentration des $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ wird die erneute Heterotrimerbildung nach erfolgter GTP -Hydrolyse zugunsten des $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ ausfallen.

$\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ (100 pmol) wurde an 20 μL Magnetpartikeln immobilisiert und 14 h mit den Membranextrakten inkubiert. In diesen Extrakten vorkommende biotinylierte Proteine können ebenfalls an die Streptactin-Matrix binden⁶, daher wurde den Herstellerangaben entsprechend Biotin-Blocking-Puffer (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Extrakt) aus dem StrepTactin-Kit zugegeben, um diese Wechselwirkungen zu unterbinden. Die Magnetpartikel wurden nacheinander mit GDP -haltigem und AlF_4^- -haltigem Puffer HMEDBNL gewaschen (s.o., Waschfraktionen 1-3 bzw. 4-6). Im letzten Wasch-Schritt wurde das immobilisierte $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ für 10 min mit 100 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ bei RT inkubiert. Die Elution von $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ und über $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ gebundener Proteine erfolgte durch Inkubation mit Desthiobiotin-Elutionspuffer.

Im Desthiobiotin-Eluat wurde in Anwesenheit von $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ ein $\text{G}\beta$ -Immunsignal nachgewiesen (Abb. 28 A-E). $\text{G}\alpha_s\text{-s4-XHS}$ war also in der Lage, endogene $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexe

⁶ Die StrepTactin-Matrix bindet sowohl *StreptagII* als auch Biotin. Biotin-Blocking-Puffer enthält Avidin, das mit hoher Affinität Biotin bindet, nicht jedoch *StreptagII*. Die Verwendung von Biotin-Blocking-Puffer ermöglicht die selektive Maskierung von biotinylierten Proteinen und somit eine Verringerung unerwünschter Bindungen an die StrepTactin-Matrix.

aus wtS49-Zellmembranextrakten zu binden. In Abwesenheit von $G\alpha_s$ -s4-XHS konnte $G\beta$ nicht an die StrepTactin-Matrix binden (Abb. 28 B-E).

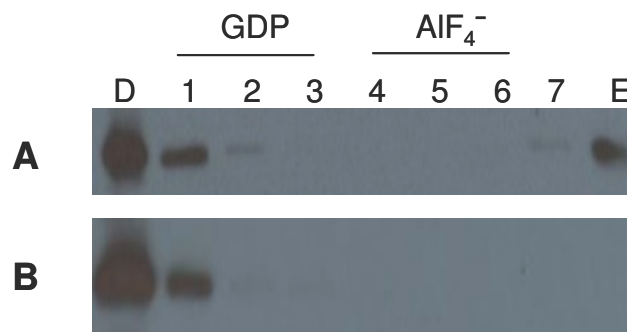


Abb. 28 Bindung endogener $G\beta\gamma$ -Komplexe aus Membranextrakten an immobilisiertem $G\alpha_s$ -s4-XHS. $G\alpha_s$ -s4 wurde an 20 μ L StrepMag-Partikeln immobilisiert und anschließend mit S49wt-Membranextrakt über Nacht inkubiert. Membranextrakt aus S49wt-Zellen wurde mit (A) bzw. ohne (B) 100 pmol $G\alpha_s$ -s4-XHS für 14 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Partikel mit je 3x100 μ L HMEDNL (1-3) und HMEDNL+ AlF_4^- (4-6) sowie 1x mit HMEDNL+100 μ M $GTP\gamma S$ (7) gewaschen (s. Text). D = Durchlauf, E = Eluat. Von jeder Fraktion wurden 12 μ L denaturiert, die enthaltenen Proteine elektrophoretisch getrennt und mit den Antikörpern C-18 (anti- $G\alpha_s$) bzw. T-20 (anti- $G\beta$) immunchemisch detektiert (beide AK Santa Cruz).

Wie schon in den Versuchen mit gereinigten Komponenten beobachtet, war auch hier keine Dissoziation des Heterotrimers in Anwesenheit von AlF_4^- nachzuweisen (Abb. 28 A-4 bis A-6). Auch durch Inkubation des $G\alpha_s$ -s4-XHS mit $GTP\gamma S$ konnte $G\beta\gamma$ nur in geringsten Mengen eluiert werden (Abb. 28 A-7). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass $G\alpha_s$ -s4-XHS unter den gewählten Bedingungen entweder nicht aktivierbar war oder die Aktivierung nicht zu einer Dissoziation des Heterotrimers führte.

5.4.3 Charakterisierung von $G\alpha_s$ -bindenden Proteinen aus wtS49-Zellen

Zur Charakterisierung neuer Interaktionspartner des $G\alpha_s$ wurden wtS49-Zellen gewählt, da von dieser Zelllinie eine Reihe von Mutanten existieren, die für die Untersuchung $G\alpha_s$ -spezifischer Funktionen bzw. ihre Beeinflussung durch andere Proteine in nachfolgenden Experimenten sehr gut geeignet waren. Im Folgenden wurden Interaktionspartner aus Cytosol und Membran getrennt untersucht, weil die für die Präparation membranständiger Proteine nötigen Detergentien schwache Wechselwirkungen mit löslichen Proteinen aufbrechen und diese dem Nachweis entziehen können. Ohne die Verwendung von Detergentien sind wiederum membranassoziierte Interaktionspartner der Analyse von vornherein nicht zugänglich.

5.4.3.1 Membranständige Proteine

Extrakte von wtS49-Membranen wurden wie in 5.4.2.2 beschrieben mit StrepMag-Partikeln in An- oder Abwesenheit von immobilisiertem $G\alpha_s$ -s4-XHS inkubiert. Die StrepMag-Partikel wurden anschließend wie in 5.4.2.1 und 5.4.2.2 beschrieben gewaschen und mit Desthiobiotin eluiert. Die in den verschiedenen Fraktionen enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch getrennt und mit einer Silberfärbung visualisiert.

Aus den ersten Versuchen war ersichtlich, dass die Anzahl $G\alpha_s$ -unabhängig bindender Proteine höher war als erwartet (Daten nicht gezeigt). Weder die Maskierung biotinylierter Proteine mit Avidin (Biotin-Blocking-Puffer, vgl. S.99) noch die Elution durch Proteolyse mit Faktor Xa hatten Auswirkungen auf die Anzahl der Bindungspartner (Daten nicht gezeigt), erst durch stufenweise Erhöhung der NaCl-Konzentration in den Waschschritten konnte ihre Anzahl reduziert werden.

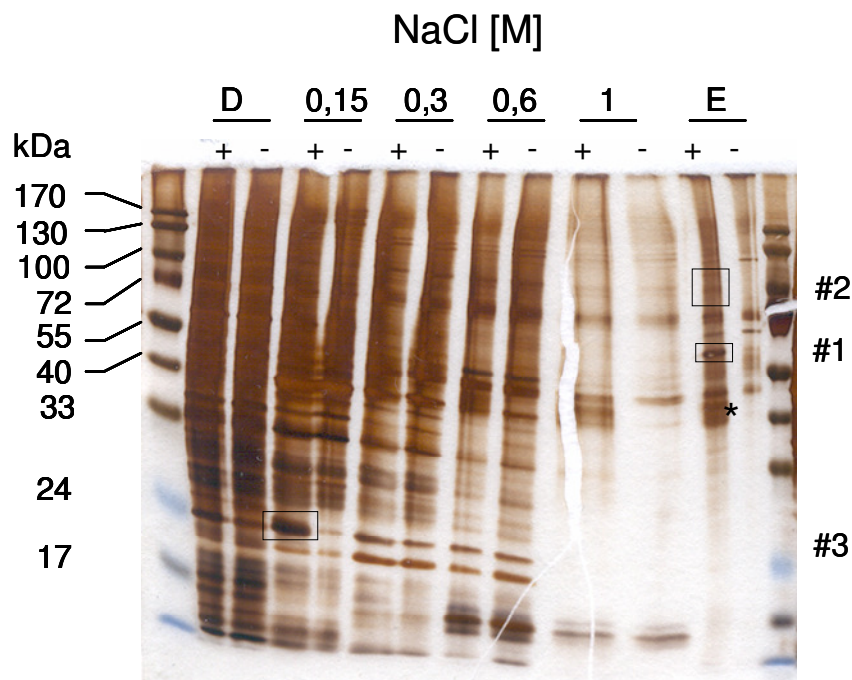


Abb. 29 Bindung membranständiger Proteine aus wtS49-Extrakten an immobilisiertem $G\alpha_s$ -s4-XHS. StrepMag-Partikel, an denen $G\alpha_s$ -s4-XHS immobilisiert (+) bzw. nicht immobilisiert war (-) wurden mit wtS49-Membranextrakten inkubiert und mit ansteigenden Konzentrationen NaCl im Waschpuffer gewaschen. In den verschiedenen Fraktionen enthaltene Proteine wurden denaturiert, elektrophoretisch getrennt und mittels Silberfärbung visualisiert (Volumina siehe Text). Die umrahmten Bereiche weisen Unterschiede im Bandenmuster zwischen Probe (+) und Kontrolle (-) auf. $G\alpha_s$ -s4-XHS tritt als Doppelbande auf und ist mit einem Stern (*) markiert. D = Durchlauf, E = Desthiobiotin-Eluat. Das Gel wurde vor dem Scannen getrocknet, wobei ein Riß entstand.

In Abb. 29 ist der Verlauf einer Isolierung $G\alpha_s$ -spezifischer Interaktionspartner aus wtS49-Membranextrakten dargestellt. $G\alpha_s$ -s4-XHS (100 pmol) wurde an 20 μ L StrepMag-Partikeln immobilisiert, gewaschen und 14 h mit wtS49-Membranextrakt inkubiert (Herstellung von

500 μL Membranextrakt aus 2×10^8 wtS49-Zellen, siehe 4.3.6). Die Partikel wurden anschließend mit ansteigenden Konzentrationen von 0,15 M bis 1 M NaCl im HMEDBNL-Puffer gewaschen (jeweils $3 \times 100 \mu\text{L}$) und mit 100 μL Elutionspuffer (2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Die Kontrolle (-) enthielt kein immobilisiertes $G\alpha_s$ -s4-XHS. Jeweils 3 μL des Durchlauf und der 150 mM NaCl-Fraktion sowie 9 μL der restlichen Fraktionen wurden mit Probenpuffer bei 95 °C erhitzt und die enthaltenen, denaturierten Proteine auf einem 9-20%-Gradienten-Gel elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden durch Silberfärbung visualisiert.

Es waren nur wenige Unterschiede zwischen diesen beiden Proben zu erkennen, d.h. eine optische Auswertung und Bestimmung $G\alpha_s$ -spezifisch gebundener Proteine erwies sich als schwierig. Die umrahmten Banden in Abb. 29 sind reproduzierbar nur in der $G\alpha_s$ -enthaltenden Probe retardiert bzw. eluiert worden. In einem weiteren Versuch wurde ein gleichartiges Gel wie das dargestellte mit Coomassie-Blau gefärbt, die markierten Bereiche ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht (s. 5.4.3.3).

5.4.3.2 Lösliche Proteine

Auch für cytosolische Proteine aus wtS49-Zellen wurde untersucht, ob sie an immobilisiertes $G\alpha_s$ -s4-XHS binden und ob diese Bindung konformationsselektiv ist.

$G\alpha_s$ -s4-XHS wurde sowohl mit AlF_4^- als auch mit $\text{GTP}\gamma\text{S}$ aktiviert. Im Unterschied zu vorangegangenen Versuchen erfolgte die Aktivierung mit $\text{GTP}\gamma\text{S}$ jedoch *vor* der Immobilisierung. In vorigen Versuchen konnte nach AlF_4^- - bzw. $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Aktivierung von immobilisiertem $G\alpha_s$ -s4-XHS keine Dissoziation des Heterotrimer festgestellt werden, daher war nicht sicher, ob die Aktivierung von $G\alpha_s$ -s4-XHS an der Matrix tatsächlich erfolgte. Die Aktivierung von $G\alpha_s$ durch $\text{GTP}\gamma\text{S}$ in Lösung wird im $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsassay (Abschnitt 4.4.6.3) ausgenutzt. Für die hier beschriebenen Versuche erfolgte die Aktivierung unter den Bedingungen des $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsassay, jedoch unter Verwendung einer 5fach höheren $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Konzentration. $G\alpha_s$ -s4-XHS wurde in HMEDBNL-Puffer mit 10 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ für 20 min bei 30 °C in einem Thermoschüttler inkubiert.

$G\alpha_s$ -s4-XHS wurde in Anwesenheit von GDP oder nach Aktivierung mit $\text{GTP}\gamma\text{S}$ auf StrepMag-Partikeln immobilisiert und anschließend mit der löslichen Fraktion von wtS49-Zellen für 14 h bei 4 °C inkubiert. Proben ohne immobilisiertes $G\alpha_s$ dienten als Kontrolle. Die Partikel wurden mit ansteigenden NaCl-Konzentrationen im HMEDBNL-Puffer gewaschen (jeweils $3 \times 100 \mu\text{L}$) und anschließend mit 100 μL Desthiobiotin-Elutionspuffer (2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Von jeder Fraktion wurden 12 μL denaturiert, elektrophoretisch getrennt und die Proteine mit Silberfärbung visualisiert. In Abb. 30 ist der Verlauf eines solchen Experimentes beispielhaft dargestellt.

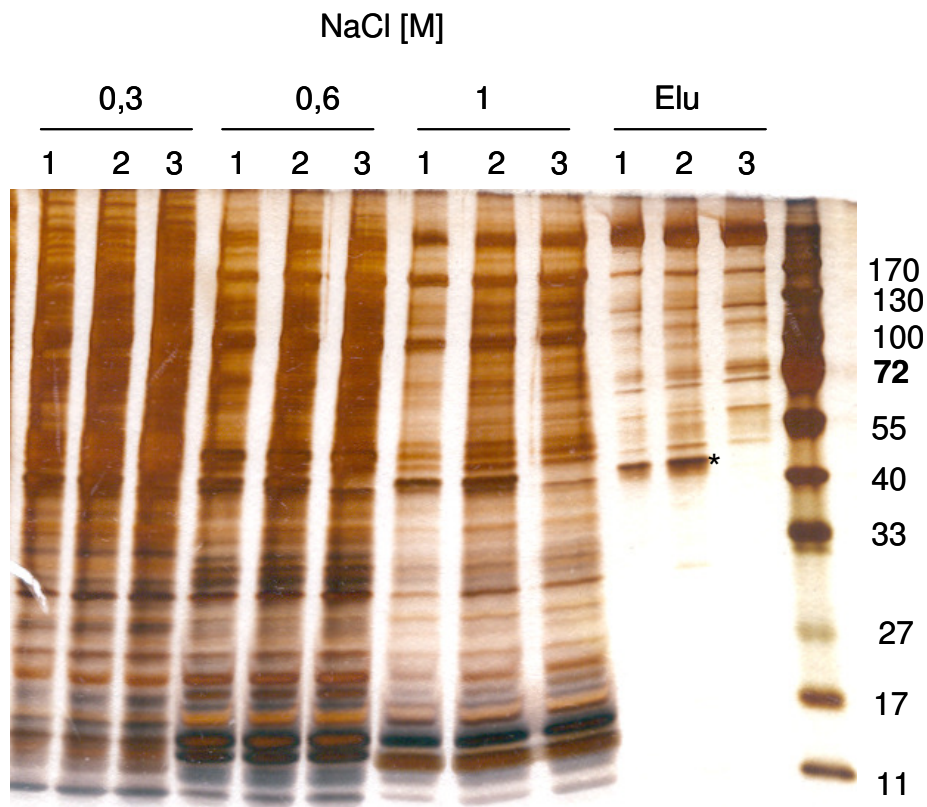


Abb. 30 An $G\alpha_s$ -s4-XHS gebundene cytosolische Proteine aus wtS49. Jeweils 100 pmol $G\alpha_s$ -s4-XHS wurden nach 20minütiger Aktivierung mit 10 μ M GTP γ S bei 30°C (1) oder in Anwesenheit von GDP (2) an 20 μ l StrepMag-Partikel immobilisiert. Probe 3 enthielt StrepMag-Partikel ohne immobilisiertes $G\alpha_s$ -s4-XHS. S49-Zellen ($7,6 \times 10^8$) wurden sedimentiert und in 3 mL HMED lysiert. Durch Zentrifugation wurden die Membranen abgetrennt und der die cytosolischen Proteine enthaltende Überstand zu gleichen Teilen auf die Proben 1-3 verteilt. Nach 14-stündiger Inkubation bei 4°C wurden die StrepMag-Partikel mit ansteigenden NaCl-Konzentrationen im Waschpuffer (0,15 – 1 M, gezeigt sind Wasch-Schritte von 0,3 – 1 M) gewaschen (jeweils 100 μ L) und anschließend mit Desthiobiotinpuffer (2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Von jeder Fraktion wurden 12 μ L denaturiert und die Proteine elektrophoretisch getrennt. Silberfärbung. $G\alpha_s$ -s4-XHS ist auf dem Gel mit einem Stern (*) markiert.

Weder in den Waschschrritten noch in den Eluaten waren $G\alpha_s$ -spezifisch gebundene Proteine sichtbar. Auch zwischen den Proben mit $G\alpha_s$:GDP und $G\alpha_s$:GTP γ S waren keine Unterschiede im Bandenmuster der gebundenen Proteine sichtbar. Eine massenspektrometrische Analyse wurde daher nicht durchgeführt.

5.4.3.3 Massenspektrometrische Analyse

Wie in 5.4.3.1 beschrieben, wurden in S49-Membranextrakten drei Banden identifiziert, die spezifisch mit $G\alpha_s$ -s4-XHS interagierende Proteine enthielten. Diese Banden wurden in zwei unabhängigen Experimenten nachgewiesen und zeigten bei denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein apparentes Molekulargewicht von ca. 60 kDa, 100 kDa bzw. 25 kDa

5 Ergebnisse

(siehe Abb. 29). Die entsprechenden Gelbereiche wurden aus Polyacrylamid-Gelen ausgeschnitten, die Proteine in den Gelstücken wurden mit Trypsin gespalten und per NanoLC-ESI-MS/MS analysiert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 23 aufgelistet.

Nur Proteine, die in beiden Experimenten mit mehr als zwei per MS/MS identifizierten Peptiden und signifikantem *Mascot score* erkannt wurden, wurden als sicher identifizierte Interaktionspartner des $G\alpha_s$ -s4-XHS gewertet (vgl. auch Abschnitt 4.6). Einige Interaktionspartner wurden in nur einem der beiden Experimente gefunden. Obwohl sie im jeweiligen Experiment eindeutig bestimmt wurden (d.h. mit mehr als zwei per MS/MS identifizierten Peptiden und signifikantem *Mascot score*), ist ihre Interaktion mit $G\alpha_s$ -s4-XHS nicht zweifelsfrei reproduziert worden.

Tabelle 23 Auflistung reproduzierbar an $G\alpha_s$ -s4-XHS bindender Proteine aus wtS49-Membranextrakten. Fett dargestellt sind in zwei unabhängigen Experimenten identifizierte Proteine. Proteine, die in einem von zwei unabhängigen Experimenten identifiziert wurden, sind in normaler Schrift aufgeführt. Bei orthologen Proteinen identifizierte Peptide, die mehreren Datenbankeinträgen mit identischen Peptidsequenzen und *Mascot Score* zugeordnet werden konnten, wurde nur das Maus-Protein berücksichtigt. Aufgeführt sind alle Proteine (außer Keratin), die mit mindestens 3 Peptiden einwandfrei identifiziert werden konnten.

gi #	Name	Theoret. MW [kDa]	Mascot Score	per MS/MS identifiz. Peptide
Probe #1 (60kDa)				
gi 72957	chaperonin groEL precursor - mouse	58,8	594	14
gi 13096984	Glucose regulated protein [Mus musculus]	56,6	111	3
Probe #2 (100kDa)				
gi 71887	GTP-binding regulatory protein Gs alpha-S1 chain (adenylate cyclase-stimulating) - mouse	43,6	175	4
gi 6755863	tumor rejection antigen gp96; tumor rejection antigen (gp96) 1 [Mus musculus]	92,4	224	6
gi 194027	heat-shock protein hsp84	83,2	240	6
gi 130257	Junction plakoglobin (Desmoplakin III)	81,6	186	5
Probe #3 (25kDa)				
gi 20070412	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit [Mus musculus]	23,3	303	6
gi 15803871	cyclic AMP receptor protein [Escherichia coli O157:H7 EDL933]	23,6	481	22
gi 28189765	similar to ribosomal protein L30 [Bos taurus]	17,7	134	3

Die meisten der identifizierten Proteine gehören einer **Hitzeschockprotein**-Familie an (z.B. beide Proteine aus Probe 1, Protein 2 und 3 aus Probe 2). Bei der Betrachtung der intrazellulären Lokalisation der identifizierten Proteine fällt auf, dass viele von ihnen in Zellkompartimenten vorkommen, von denen bisher nicht bekannt ist, dass sie $G\alpha_s$ unter physiologischen Bedingungen zugänglich sind. Beide in Probe 1 identifizierten Proteine

befinden sich in der Mitochondrienmatrix, die in Probe 2 gefundenen Hsp-Proteine sind im ER lokalisiert. Das „**tumor rejection antigen**“ besitzt eine Transmembrandomäne, die es im ER zurückhält und vor Sekretion schützt. Auch die **mitochondriale ATP-Synthase** ist in einem für $G\alpha_s$ nicht zugänglichen Kompartiment lokalisiert. Diese Proteine wurden daher nicht berücksichtigt.

Das **cAMP-Rezeptor-Protein** wurde mit einer hohen Anzahl Peptide identifiziert, ist aber bakteriellen Ursprungs und konnte daher ebenfalls nicht berücksichtigt werden.

Ein sehr interessanter Interaktionspartner war das **Plakoglobin**, das sowohl löslich als auch Zellmembran-assoziiert (Desmosomen und Intermediär-Verbindungen) vorkommt und damit auch in $G\alpha_s$ zugänglichen Kompartimenten. Es gehört zur β -Catenin-Familie und bildet ein Gerüstprotein für verschiedene Signaltransduktions-Wege. Es wurde jedoch nur in einem von zwei Experimenten als $G\alpha_s$ -bindendes Protein identifiziert und genügte somit nicht den auf Seite 103 genannten Kriterien.

5.4.4 Zusammenfassung

Neue $G\alpha_s$ -Interaktionspartner sollten identifiziert werden, indem heterolog in *E.coli* exprimiertes, gereinigtes $G\alpha_s$ -Köderprotein immobilisiert, mit Lysaten von wtS49-Zellen inkubiert und anschließend zusammen mit gebundenen Interaktionspartnern gereinigt wurde. Das Köderprotein enthielt ein C-terminales duales Affinitätseptop, das sowohl seine Reinigung und als auch die Immobilisierung ermöglichte.

Das Köderprotein $G\alpha_s$ -s4-XHS war in der Lage, den bekannten Interaktionspartner $G\beta\gamma$ sowohl in gereinigter Form als auch aus S49-Membranextrakten zu binden (vgl. Abb. 27 und Abb. 28). Eine Konformationsänderung des immobilisierten $G\alpha_s$ -s4-XHS durch Aktivierung mit AlF_4^- oder $GTP\gamma S$ war jedoch nicht möglich (vgl. Abb. 27 und Abb. 28).

Die Charakterisierung unbekannter Interaktionspartner erfolgte in der löslichen Fraktion und in Membranextrakten von wtS49-Zellen. Die Anzahl interagierender Proteine war sehr groß, konnte jedoch durch Waschen mit ansteigenden Konzentrationen NaCl (0,3 – 1M) reduziert werden (vgl. Abb. 29 und Abb. 30).

In der löslichen Fraktion von S49-Zellen konnten über SDS-PAGE keine $G\alpha_s$ -spezifischen Interaktionspartner dargestellt werden. In der Fraktion membranständiger Proteine ließen sich nach elektrophoretischer Trennung drei Banden darstellen, die $G\alpha_s$ -spezifisch bindende Proteine enthielten. Die massenspektrometrische Analyse der Banden zeigte, dass es sich hauptsächlich um Hitzeschockproteine oder Proteine bakteriellen Ursprungs handelte.

Tabelle 24 Zusammenfassung der mit $G\alpha_s$ -s4-XHS identifizierten Interaktionspartner. MS = Massenspektrometrie.

untersuchte Fraktion	Anzahl $G\alpha_s$ -spezifischer Banden	Identifizierte Proteine	Methode
Membranextrakte	3	G $\beta\gamma$ Hitzeschockproteine ATP-Synthase cAMP-Rezeptor-Protein Plakoglobin	immunchemisch MS MS MS MS
Cytosol	0	---	---

5.5 Interaktionspartner des $G\alpha_s$ aus Säugerzellen: *in vivo*-Untersuchung

Für die Charakterisierung von $G\alpha_s$ -Interaktionspartnern *in vivo* wurde das $G\alpha_s$ -Köderprotein direkt in den Zielzellen exprimiert und mittels Affinitätsreinigung zusammen mit gebundenen Interaktionspartnern isoliert. Da in diesen Versuchen posttranslationale Modifikationen des Köderproteins (Phosphorylierungen, Lipidmodifikationen) möglich sind, können auch Interaktionspartner erfasst werden, deren Interaktion von diesen Modifikationen abhängig ist. Das Köderprotein kann entweder vor einem Nullhintergrund (z.B. in S49 cyc⁻) oder aber in wildtypischen Zellen exprimiert werden. Bei der Expression vor einem Nullhintergrund muß das Köderprotein nicht mit endogen in den Zielzellen exprimiertem $G\alpha_s$ um Bindungspartner konkurrieren. Das vollständige Fehlen von $G\alpha_s$ in solchen Zellen kann aber andererseits dazu führen, dass auch weitere, mit $G\alpha_s$ interagierende Signalmoleküle nicht mehr exprimiert werden. Die Anzahl und Art der Interaktionspartner entspräche folglich nicht dem Zustand in einer wildtypischen Zelle, so dass wichtige Interaktionen möglicherweise gar nicht erfasst werden können.

Die Expression des epitopmarkierten $G\alpha_s$ in wildtypischen Zellen hingegen führt zwar zu einer Konkurrenz des Köderproteins mit endogenem $G\alpha_s$ um Interaktionspartner, jedoch kann dies durch Überexpression des Köderproteins ausgeglichen werden. Durch die Überexpression wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein $G\alpha_s$ -Interaktionspartner an das Köder- und nicht an das endogene Protein bindet und somit der Analyse zugänglich wird.

In dieser Arbeit wurde das Köderprotein daher in wildtypischen Zellen transient überexprimiert.

5.5.1 Tandem Affinity Purification

Die *Tandem Affinity Purification* (TAP) erlaubt die Isolierung des Köderproteins sowie mit ihm interagierender Proteine aus den Zielzellen. Das Köderprotein („TAP-Fusionsprotein“) trägt dafür eine duale Modifikation aus zwei sequenziellen IgG-Bindedomänen, einer TEV-Protease-Erkennungssequenz und einer Calmodulin-Bindedomäne (Rigaut *et al.* 1999, vgl. Abb. 31).

Die Reinigung erfolgt über zwei Stufen. Zunächst wird das TAP-Fusionsprotein über eine hochaffine Bindung seiner beiden IgG-Bindedomänen an IgG-Sepharose aus dem Zell-Lysat isoliert. Diese Bindung ist nur unter Bedingungen revertierbar, die die immobilisierten Komplexe zerstören würden (starke pH-Senkung, Verwendung von SDS). Daher erfolgt die Elution über eine kontrollierte Proteolyse mittels TEV-Protease, wobei die Bedingungen so gewählt werden können, dass die zu isolierenden Proteinkomplexe intakt bleiben. Zudem werden nur solche Proteinkomplexe eluiert, deren Bestandteile eine TEV-Protease-Spaltstelle aufweisen. Das ist hauptsächlich bei *bait*-Proteinkomplexen der Fall.

Das IgG-Sepharose-Eluat wird anschließend mit Calmodulin-Agarose inkubiert. Das enthaltene Köderprotein bindet über seine Calmodulinbindungs-Domäne an diese Matrix. Die Bindung ist Ca^{2+} -abhängig und daher mit Chelatoren leicht revertierbar.

5.5.2 Herstellung der $\text{G}\alpha_s$ -TAP-Konstrukte

Das TAP-*tag* kann entweder C- oder N-terminal mit der für $\text{G}\alpha_s$ -s4 kodierenden Sequenz fusioniert werden. Es ist mit ca. 15 kDa relativ groß und kann möglicherweise die Interaktion des $\text{G}\alpha_s$ mit terminal bindenden Interaktionspartnern beeinträchtigen. Außerdem könnte die N-terminale Lipidmodifizierung des $\text{G}\alpha_s$ (und somit seine intrazelluläre Lokalisation) durch die Fusion mit dem *tag* an dieser Stelle gestört werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass C- und N-terminale Fusionsproteine unterschiedlich exprimiert werden bzw. Abbauprozessen unterliegen. Es wurden daher beide Konstrukte hergestellt, um durch Vergleich der Fusionsproteine hinsichtlich Expression und Reinigung von Proteinkomplexen das geeignetere von beiden auszuwählen.

Für die Herstellung der $\text{G}\alpha_s$ -TAP-Plasmide wurden zunächst die Vektoren pZOME-1-C und pZOME-1-N der Firma Cellzome (C- bzw. N-terminale Fusionsproteine) generiert. Die $\text{G}\alpha_s$ -s4 kodierende DNA wurde über eine PCR mit den entsprechenden Schnittstellen versehen und in die pZOME-Vektoren eingefügt (Plasmide $\text{G}\alpha_s$ -s4-CTAP/pZOME-1-C und NTAP- $\text{G}\alpha_s$ -s4/pZOME-1-N). Die erhaltenen Konstrukte wiesen zwar die korrekte Basenabfolge auf, waren aber sehr instabil und unterlagen offenbar Rekombinationsereignissen in den für die Plasmidpropagation verwendeten XL1-Blue-Zellen. Plasmide, die aus diesen Zellen isolierten worden waren, wiesen nach einer weiteren Propagation in XL1-Blue-Zellen nicht die erwartete Größe auf. Bei Expressionsversuchen mit diesen Plasmiden in Säugerzellen konnte mit $\text{G}\alpha_s$ -spezifischem Antikörper kein Protein nachgewiesen werden. Um überhaupt exprimierbare Konstrukte zu erhalten, wurden daher die für die $\text{G}\alpha_s$ -TAP-Fusionsproteine kodierenden DNA-Bereiche in pCDNA3-Vektoren umklontiert. Eine genaue Beschreibung der Klonierungsschritte befindet sich im Abschnitt 4.1.6.4.

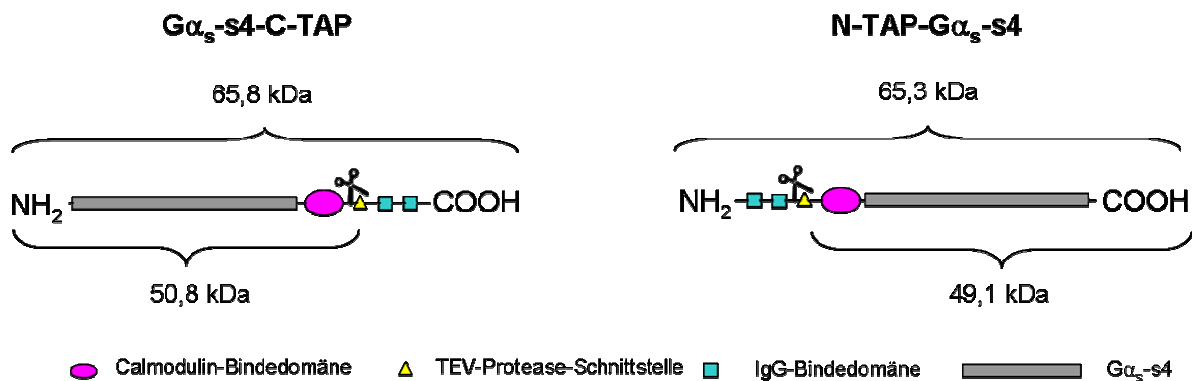


Abb. 31 Schematische Struktur der TAP-Fusionsproteine. G α_s -s4-C-TAP ist links, N-TAP-G α_s -s4 rechts dargestellt. Über die IgG-Bindedomänen binden die Proteine an IgG-Sepharose. Die Spaltung der Proteine mittels TEV-Protease setzt zwei verschiedene Spaltprodukte frei. Die kleineren Spaltprodukte bleiben an der IgG-Sepharose gebunden; die größeren Spaltprodukte (Molekulargewichte unterhalb des Schemas angegeben) enthalten G α_s und die Calmodulin-Bindedomäne, über die die weitere Reinigung erfolgt.

Das N-terminale TAP-tag wurde ohne ein im Leseraster angefügtes Fusionsprotein exprimiert und als Negativkontrolle in den folgenden Experimenten eingesetzt. Sein Leseraster endet nach 600 Nukleotiden in der Vektorsequenz und kodiert ein Protein von 200 Aminosäuren (22,7 kDa). Dieses Kontroll-Protein wurde als „NTAP-tag“ bezeichnet.

5.5.3 Charakterisierung der G α_s -TAP-Fusionsproteine

5.5.3.1 Expression der G α_s -TAP-Fusionsproteine

Die G α_s -TAP-Fusionsproteine wurden in COS-7-Zellen exprimiert und in deren Lysaten mittels immunochemischer Detektion über einen G α_s -spezifischen Antikörper nachgewiesen. Das beobachtete Molekulargewicht lag erwartungsgemäß um 65 kDa (siehe Abb. 32). Nach Berechnungen mit dem Programm ProtParam (www.expasy.org) liegt das Molekulargewicht für G α_s -s4-C-TAP bei 65,8 kDa und das für N-TAP-G α_s -s4 bei 65,3 kDa, d.h. die elektrophoretische Beweglichkeit beider Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel sollte nahezu gleich sein. Die vom Antikörper markierte Bande des G α_s -s4-C-TAP lag jedoch geringfügig unterhalb der N-TAP-G α_s -s4-Bande. Die Ursache für diesen Unterschied könnte auf eine unterschiedliche Beladung mit SDS-Molekülen zurückzuführen sein.

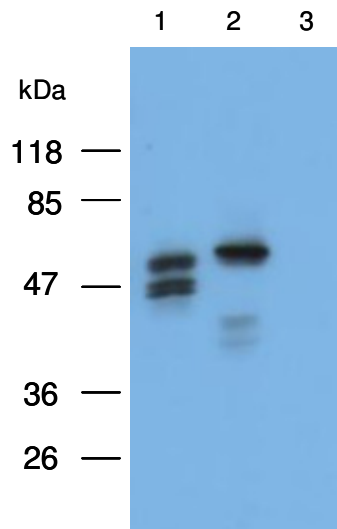


Abb. 32 Expression von $G\alpha_s$ -s4-C-TAP und N-TAP- $G\alpha_s$ -s4 in COS-7. Mit den Plasmiden $G\alpha_s$ -s4-C-TAP/pCDNA3 (1), N-TAP- $G\alpha_s$ -s4/pCDNA3 (2) bzw. N-TAP-tag/pCDNA3 (3) transfizierte Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert und $G\alpha_s$ immunchemisch nachgewiesen (C-18, Santa Cruz). Beide TAP-Fusionsproteine weisen ein Molekulargewicht von ca. 65 kDa auf.

Bei $G\alpha_s$ -s4-C-TAP wurden neben der Hauptbande bei 65 kDa auch weitere Banden des Proteins bei ca. 47 kDa erkannt. Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Dublettbande um endogene lange und kurze Spleißvarianten des $G\alpha_s$ handelte, da sie in den beiden anderen Proben (N-TAP- $G\alpha_s$ -s4 bzw. N-TAP-tag) nicht detektiert wurde. Ob es sich um Abbauprodukte oder alternativ gespleißte Varianten des Fusionsproteins handelt, wurde an dieser Stelle nicht näher untersucht.

5.5.3.2 Signaltransduktion der $G\alpha_s$ -TAP-Fusionsproteine

Um festzustellen, ob das TAP-tag die Funktion des $G\alpha_s$ -s4 beeinträchtigt, wurde die rezeptorvermittelte Signalweiterleitung über $G\alpha_s$ zum Effektor Adenylylcyase in einem cAMP-Akkumulationsassay untersucht.

2B2-Zellen, die durch eine Insertion im Exon 2 des Gens *GNAS* kein endogenes $G\alpha_s$ exprimieren (Bastepe *et al.* 2002), wurden in 35 mm-Kulturschalen ausgesät und mit den Plasmiden $G\alpha_s$ -s4-C-TAP/pCDNA3, N-TAP- $G\alpha_s$ -s4/pCDNA3, $G\alpha_s$ -s4-HA/pCDNA3 oder N-TAP-tag/pCDNA3 transfiziert. Ein für den β_2 -adrenergen Rezeptor kodierendes Plasmid wurde kotransfiziert, so dass in Verbindung mit der endogenen Adenylylcyase der Zellen die Signaltransduktionskette Rezeptor - stimulatorisches G-Protein - Adenylylcyase hergestellt war. Das Zellkulturmedium wurde 24 Stunden nach der Transfektion mit ^3H -Adenin markiert, das von den Zellen aufgenommen und u.a. in ATP, das Substrat der zellulären Adenylylcyase, inkorporiert wird. Die Adenylylcyase-katalysierte cAMP-

Synthese wurde durch Zugabe des β_2 -adrenergen Agonisten Isoprenalin (100 μ M) 30 min lang stimuliert. Das in dieser Zeit gebildete tritierte cAMP wurde anschließend in einem cAMP-Akkumulationsassay wie in 4.4.6.2 beschrieben chromatographisch aufgereinigt und durch Scintillationsmessung quantifiziert.

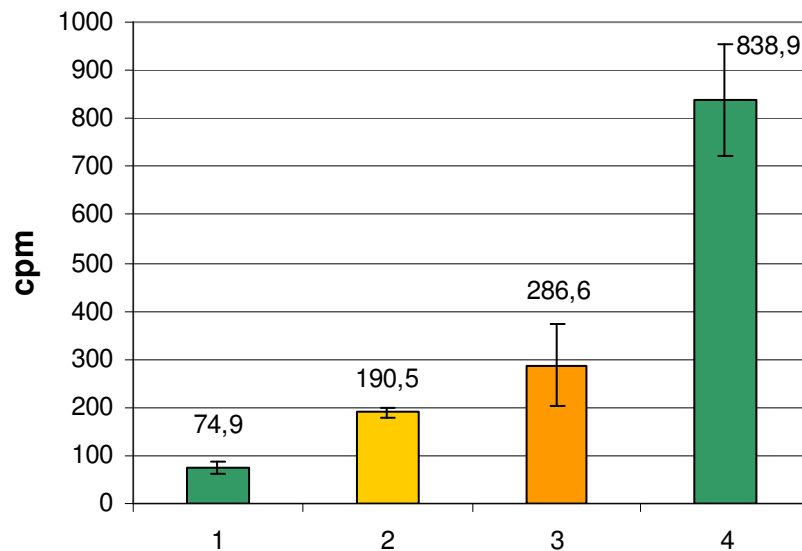


Abb. 33 Isoprenalin-stimulierte cAMP-Akkumulation in 2B2-Zellen. $G\alpha_s$ -s4-C-TAP/pCDNA3 (2) - und N-TAP- $G\alpha_s$ -s4/pCDNA3 (3) -transfizierte Zellen zeigen gegenüber mit N-TAP-Leervektor (1) transfizierten Zellen eine signifikant höhere Isoprenalin-stimulierbare cAMP-Produktion. $G\alpha_s$ -s4-HA/pCDNA3 (4) diente als Positivkontrolle. Die gezeigten Datenpunkte 1-4 wurden aus Doppelwerten bestimmt. In einem weiteren Experiment wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Beide Fusionsproteine waren in der Lage, rezeptorvermittelte Signale an den Effektor Adenylylcyclase weiterzuleiten. Die TAP-Fusionsproteine stimulierten die cAMP-Produktion deutlich über die basale cAMP-Produktion in Abwesenheit von $G\alpha_s$ (vgl. Probe 2 bzw. 3 mit Probe 1 in Abb. 33). Ein mit einem vergleichsweise kleinen Affinitätspeptid fusioniertes $G\alpha_s$ -s4 ($G\alpha_s$ -s4-HA, Probe 4) bewirkte eine um den Faktor 3-4 höhere cAMP-Produktion als die TAP-Fusionsproteine. Dieser Unterschied kann entweder auf verschiedenen hohe Expressionsraten der Proteine oder aber auf verringerte Rezeptorkopplung, verursacht durch das größere *tag* bei den TAP-Fusionsproteinen, zurückzuführen sein. Für die nachfolgenden Experimente war eine genaue Quantifizierung der Expression nicht relevant, da lediglich die Funktionalität der TAP-Fusionsproteine nachgewiesen werden sollte, ohne sie zu anderen $G\alpha_s$ -Varianten in Relation zu setzen.

Beide $G\alpha_s$ -TAP-Fusionproteine waren trotz des relativ großen *tag* in der Lage, mit Rezeptor, $G\beta\gamma$ und Effektor Komplexe zu bilden und Signale weiterzuleiten. Sie wurden daher als funktional angesehen und in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt.

5.5.3.3 Heterotrimerbildung der $G\alpha_s$ -TAP-Fusionsproteine

Die oben beschriebene Signaltransduktion der $G\alpha_s$ -s4-TAP-Proteine belegt ihre Heterotrimerisierung mit $G\beta\gamma$, da nur $G\alpha\beta\gamma$ -Komplexe vom Rezeptor gebunden und aktiviert werden. Im nächsten Schritt sollte der immunchemische Nachweis der Heterotrimerbildung mit $G\beta\gamma$ erbracht und somit die TAP-Methode zur Darstellung von $G\alpha_s$ -Proteinkomplexen untersucht werden. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob $G\alpha_s$ -Proteinkomplexe konformationsselektiv isoliert werden können.

COS-7-Zellen wurden in 94 mm-Kulturschalen ausgesät und transient mit $G\alpha_s$ -s4-C-TAP/pCDNA3, N-TAP- $G\alpha_s$ -s4/pCDNA3 und N-TAP-*tag*/pCDNA3 transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit kaltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen, von der Wachstumsfläche gelöst, in 150 μ L Lysispuffer in Anwesenheit von GDP bzw. GDP und AlF_4^- lysiert und mit 0,5 % (v/v) $C_{12}E_{10}$ inkubiert. Die Lysate wurde mit 860 μ L IPP150-Puffer verdünnt und in Anwesenheit von GDP bzw. AlF_4^- für drei Stunden mit 40 μ L IgG-Sepharose über Kopf schüttelnd inkubiert. Die gebundenen TAP-Fusionsproteine wurden mit 5x150 μ L IPP150-Puffer mit GDP bzw. AlF_4^- gewaschen, durch Inkubation mit 75 U TEV-Protease in 250 μ L von der Matrix abgespalten und anschließend immunchemisch analysiert (Abb. 34). Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in 4.5.6 aufgeführt.

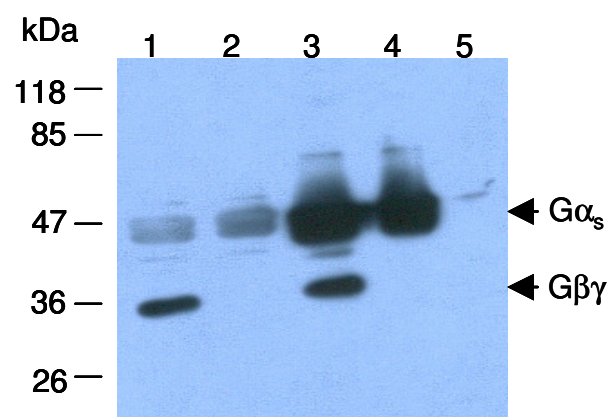


Abb. 34 $G\beta\gamma$ wird konformationsselektiv an $G\alpha_s$ -s4-TAP-Fusionsproteinen gebunden. $G\alpha_s$ -s4-CTAP (1, 2) und N-TAP- $G\alpha_s$ -s4 (3, 4) sowie N-TAP-*tag* (5) wurden in COS-7-Zellen exprimiert und die Zellen anschließend in Anwesenheit von GDP (1, 3, 5) oder GDP und AlF_4^- (2, 4) lysiert. TAP-Fusionsproteine wurden durch Inkubation mit IgG-Sepahrose isoliert, gewaschen und durch Inkubation mit TEV-Protease von der Matrix abgespalten. Die in jeweils 12 μ L (1/20 Vol.) Eluat enthaltenen Proteine wurden denaturiert, elektrophoretisch getrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit $G\alpha_s$ - bzw- $G\beta$ -spezifischem Antikörper (C-18, T-20, beide Santa Cruz) detektiert.

Nach der TEV-Spaltung wiesen die Fusionsproteine den Erwartungen entsprechend ein Molekulargewicht von ca. 47 kDa auf (vgl. auch Abb. 31). Im Falle des $G\alpha_s$ -s4-C-TAP ist die Markierung durch den $G\alpha_s$ -spezifischen C18-Antikörper (bei Beladung mit gleichen

Proteinmengen) etwas schwächer, möglicherweise stört das verbleibende *tag* (die Calmodulin-Bindungsdomäne) die Epitop-Erkennung des Antikörpers, der gegen den C-Terminus von $G\alpha_s$ gerichtet ist.

Beide Fusionsproteine sind ausschließlich in der GDP-gebundenen Form in der Lage, $G\beta\gamma$ zu komplexieren. Mit der *Tandem-Affinity-Purification*-Methode war demzufolge möglich, selektiv mit aktiviertem oder nicht aktiviertem $G\alpha_s$ interagierende Proteine zu charakterisieren.

5.5.4 Isolierung $G\alpha_s$ -enthaltender Proteinkomplexe

Nachdem die Ko-Reinigung bekannter Interaktionspartner gezeigt worden war (5.5.3), sollte überprüft werden, ob mit der TAP-Methode auch unbekannte Interaktionspartner angereichert und identifiziert werden können. Zunächst wurden in Übersichtsversuchen nur geringe Mengen Zellmaterial eingesetzt (ca. $5\text{-}10 \times 10^5$ Zellen aus einer 94 mm-Kulturschale). Für die präparative Reinigung $G\alpha_s$ -enthaltender Proteinkomplexe und die massenspektrometrische Charakterisierung der Interaktionspartner wurde die 3-5fache Menge Zellmaterial aufgearbeitet.

5.5.4.1 Analytischer Maßstab

Zunächst sollte ein Überblick über die Anzahl der an $G\alpha_s$ bindenden Proteine gewonnen werden. Dafür wurde sowohl $G\alpha_s$ -s4-C-TAP als auch N-TAP- $G\alpha_s$ -s4 transient in COS-7-Zellen exprimiert und $G\alpha_s$ -enthaltende Proteinkomplexe wie in 5.5.3 beschrieben über IgG-Sepharose isoliert. Die Eluate der IgG-Sepharose wurden mit 750 μL Calmodulinbindungspuffer versetzt und für 4 h mit 25 μL Calmodulin-Sepharose über Kopf schüttelnd inkubiert. Um das im IPP150-Puffer enthaltene EDTA abzusättigen, wurden außerdem 3 μL 1 M CaCl_2 zugesetzt. Die Calmodulin-Sepharose wurde anschließend mit 5×200 μL Calmodulin-Bindungspuffer (entspricht 5×8 SV) gewaschen. Durch Inkubation für jeweils 10 min mit 2×30 μL Calmodulin-Elutionspuffer wurden die Proteinkomplexe eluiert. Die Eluate wurden vereinigt und die Proteine durch TCA-Fällung konzentriert, in 20 μL einfach konzentriertem SDS-Probenpuffer denaturiert und elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden mit einer Silberfärbung visualisiert.

Die Elution der IgG-Sepharose durch Proteolyse stellte eine methodische Herausforderung dar. Die Anwesenheit von Mg^{2+} inhibiert die dafür verwendete TEV-Protease, ist jedoch für die optimale Stabilität des $G\alpha_s$ essentiell. Der Einsatz von Mg^{2+} im TEV-Puffer verringerte somit die Ausbeute der TEV-Elution und konnte nur teilweise durch den Einsatz erhöhter Mengen der Protease ausgeglichen werden. Der Einsatz von mehr Zellmaterial zur Erhöhung der Ausbeute konnte nicht als Ausgleich dienen, da dadurch proportional mehr Säulenmaterial und demzufolge auch mehr TEV-Protease hätte verwendet werden müssen.

Bis zu 50% des $G\alpha_s$ -s4-TAP verblieben auf der IgG-Sepharose. Auch im Calmodulin-Bindungsschritt wurden schwankende Verluste an $G\alpha_s$ beobachtet (Daten nicht gezeigt), die auf eine unerwartet schwache Bindung des Köder-Proteins an die Calmodulin-Sepharose zurückzuführen waren. Möglicherweise war die Calmodulin-Bindungsdomäne des TAP-tags nicht ausreichend exponiert, um eine feste Bindung des NTAP- $G\alpha_s$ an die Matrix zu gewährleisten. Durch verlängerte Inkubationszeiten konnten die Verluste reduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Die im Calmodulin-Sepharose-Eluat der Versuche enthaltenen Mengen an Proteinkomplexen reichten aus, um die anschließenden massenspektrometrische Analyse durchzuführen.

Um konformationsselektiv mit $G\alpha_s$ interagierende Proteine identifizieren zu können, wurde die Prozedur wie oben bereits beschrieben in Anwesenheit von GDP bzw. GDP und AlF_4^- durchgeführt (siehe Abb. 35).

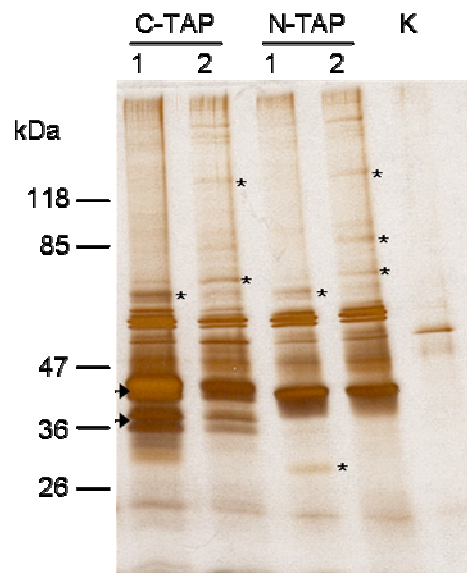


Abb. 35 $G\alpha_s$ -enthaltende Proteinkomplexe aus COS-7-Zellen nach Tandem Affinity Purification. N-TAP- $G\alpha_s$ -s4 („N-TAP“) und $G\alpha_s$ -s4-C-TAP („C-TAP“) wurden transient in COS-7-Zellen exprimiert und die TAP-Proteinkomplexe über die zweistufige Affinitätsreinigung in Anwesenheit von GDP (1) bzw. GDP und AlF_4^- (2) angereichert. 12 μ L (entspricht 1/5 Vol.) des Calmodulinsepharose-Eluats wurden denaturiert, elektrophoretisch auf einem 11%-SDS-Gel getrennt und die enthaltenen Proteine mittels Silberfärbung visualisiert. Proteine, die abhängig vom Aktivierungszustand des $G\alpha_s$ gebunden haben, sind mit einem Stern (*) markiert. Die Pfeile an Spur „C-TAP 1“ markieren die mit einem $G\alpha_s$ -spezifischen Antikörper detektierbaren Banden (vgl Abb. 32, Erläuterungen s. Text). K = N-TAP-tag.

$G\alpha_s$ -enthaltende Proteinkomplexe wurden mit der TAP-Prozedur reproduzierbar aus den Lysaten transient transfizierter COS-7-Zellen angereichert. N- und C-terminal TAP-modifizierte Köder-Proteine zeigten dabei keine grundlegenden Unterschiede in Bezug auf die gebundenen Proteine. Einige Proteine wurden jedoch konformationsselektiv gebunden, diese sind in Abb. 35 mit einem Stern (*) markiert. In der Probe mit gereinigtem N-TAP-tag waren insgesamt nur 3 Banden anfärbbar.

Im Falle der $G\alpha_s$ -s4-C-TAP-Probe war unterhalb der $G\alpha_s$ -Bande (oberer Pfeil) eine Dublette zu sehen (unterer Pfeil), die bei der N-TAP- $G\alpha_s$ -s4-Probe nicht auftritt. In Lysaten von COS-7-Zellen, die transient $G\alpha_s$ -s4-C-TAP exprimierten, wurden in diesem Gelbereich Banden mit einem $G\alpha_s$ -spezifischen Antikörper detektiert (vgl. Abb. 32), daher lag die Vermutung nahe, es könnte sich um Abbauprodukte des TAP-Fusionsproteins handeln. Die Banden wurden aus einem mit Coomassie Blau gefärbten Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Es wurde fast ausschließlich $G\alpha_s$ identifiziert, so dass davon auszugehen war, dass es sich hier um N-terminal trunke Varianten oder Abbauprodukte des TAP-Fusionsproteins handelte, die jedoch über das vollständige TAP-tag verfügten, da sie die gesamte Reinigungsprozedur durchlaufen hatten.

Da diese Banden Interaktionspartner des $G\alpha_s$ -s4-C-TAP in diesem Gelbereich überdecken könnten, wurden die folgenden Experimente ausschließlich mit N-TAP- $G\alpha_s$ -s4 durchgeführt.

5.5.4.2 Präparativer Maßstab

N-TAP- $G\alpha_s$ -s4-enthaltende Proteinkomplexe wurden wie angegeben in Anwesenheit von GDP bzw. GDP und AlF_4^- aus COS-7-Zellen gereinigt. Die verwendete Calmodulin-Sepharose war von massenspektrometrie-geeignetem Reinheitsgrad. Die Calmodulin-Sepharose-Eluate von drei Reinigungen wurden vereinigt, die Proteine mit TCA gefällt, auf einem SDS-Gradientengel (9-20%) elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt.

Wie in Abb. 36 dargestellt ist, waren neben $G\alpha_s$ nur wenige Banden mit Coomassie Blau anfärbbar, obwohl aus den empfindlicheren Silberfärbungen hervorgeht, dass eine größere Anzahl an Proteinen mit $G\alpha_s$ komplexiert war. Auffallend war eine Dublette bei ca. 18 kDa, die nur mit AlF_4^- -aktiviertem $G\alpha_s$ isoliert wurde. Diese Doppelbande war auf dem in Abb. 35 gezeigten Gel nicht detektiert worden, da sie aufgrund des geringeren Acrylamidgehaltes dieses Gels auf Höhe der Lauffront migrierte.

Das Ausschneiden einzelner Banden erschien wenig sinnvoll, da in der Coomassie-Färbung (im Gegensatz zu Silberfärbungen) kaum Unterschiede wahrnehmbar waren. Daher wurden die beiden Gelspuren komplett in jeweils 23 Abschnitte von ca. 2 mm Höhe zerteilt.

In der Kontrollspur konnte nur eine kaum wahrnehmbare Bande detektiert werden. Da selbst mit einer Silberfärbung nur drei Banden schwach anfärbbar waren (vgl. Abb. 35), wurde auf eine umfassende Analyse der gesamten Spur verzichtet. Gelbereiche auf der Höhe der in

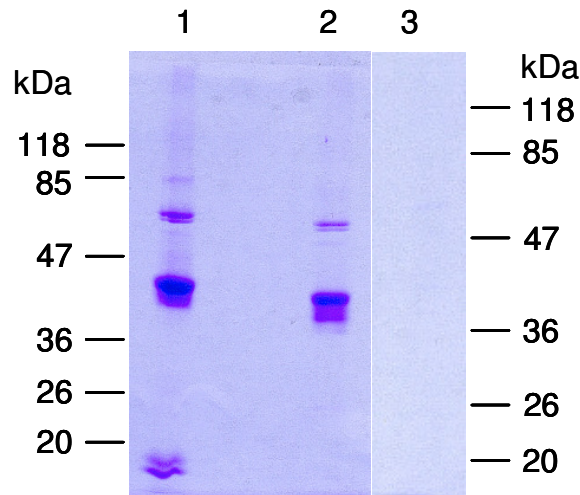


Abb. 36 Über TAP gereinigte Proteinkomplexe des N-TAP-G α_s -s4, Coomassie-Blau-Färbung. COS-7-Zellen wurden mit N-TAP-G α_s -s4/pCDNA3 (sechs 94 mm-Kulturschalen) bzw. mit N-TAP-tag/pCDNA3 (drei 94 mm-Kulturschalen) transfiziert. Aus den Zellsedimenten von jeweils drei Kulturschalen wurden in Anwesenheit von GDP (2, 3) bzw. GDP und AlF $_4^-$ (1) N-TAP-G α_s -s4- bzw. N-TAP-tag enthaltende Proteinkomplexe mittels TAP gereinigt. Die Proteine der gesamten Eluate wurden auf einem 9-20% SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Gelspuren 1 und 2 wurden horizontal in 23 ca. 2 mm hohe Streifen geschnitten. Die darin enthaltenen Proteine wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert. Die Laufrichtung des Gels verlief schräg. Probe 3 wurde auf ein separates Gel aufgetragen und hat dementsprechend andere Verteilung seiner Molekulargewichtsstandards (rechts).

der Silberfärbung markierten Banden wurden ausgeschnitten und analysiert. Durch Gegenüberstellung der Proben G α_s ·GDP und G α_s ·GDP·AlF $_4^-$ sollten Interaktionspartner identifiziert werden, die ausschließlich mit G α_s in der GDP-gebundenen oder der GDP·AlF $_4^-$ -gebundenen Konformation interagieren. Proteine, die unspezifisch an die Matrix binden, werden in beiden Proben gleichermaßen identifiziert und fallen demzufolge als Falsch-Positive Interaktionspartner nicht ins Gewicht.

5.5.4.3 Massenspektrometrische Analyse

Die Proteinidentifizierungen wurden am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in der Arbeitsgruppe Massenspektrometrie (Leiter Dr. E. Krause) mittels Kapillarflüssigchromatographie und Massenspektrometrie durchgeführt. Dazu wurden die Proteine im Gel mit Trypsin gespalten und die generierten Peptide nach chromatographischer Trennung mittels Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (NanoLC-ESI-MS/MS) analysiert. Über eine datenabhängige MS/MS-Analyse konnten dann die Massen der tryptischen Peptide und die dazu gehörenden Fragmentationen bestimmt werden (zu Erläuterung der datenabhängigen Analyse vgl. auch 4.6 und 5.5.6.1). Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch Abgleich der massenspektrometrischen Daten mit den Proteinsequenzdatenbanken SWISSPROT und NCBI über die MASCOT-Software (www.matrixscience.com/).

Um als $G\alpha_s$ -Interaktionspartner gewertet zu werden, musste ein identifiziertes Protein folgende Kriterien erfüllen:

- mindestens zwei Peptide eines Proteins mussten mit entsprechendem *MASCOT Score* (Identität oder extensive Ähnlichkeit, siehe 4.6) zugeordnet sein.
- die Peptide mussten *first ranking* Peptide sein, d.h. sie mussten dem betreffenden Protein zuerst (mit einem höheren *score*) zugeordnet sein (einzige Ausnahme: Isoformen mit einem hohen Anteil identischer Aminosäuren wie z.B. die $G\beta$ -Isoformen 1-4)
- das identifizierte Protein musste eukaryotischen Ursprungs sein
- das zelluläre Kompartiment, in dem sich das identifizierte Protein dem Datenbankeintrag nach aufhält, musste auch für $G\alpha_s$ zugänglich sein (d.h. Cytosol, Plasmamembran, Nukleus).

Zur Analyse der sehr umfangreichen Datenmenge wurden die als $G\alpha_s$ -Interaktionspartner gewerteten Proteine der GDP- und der AIF_4^- -Proben gegenübergestellt und in drei Gruppen eingeteilt:

- ausschließlich mit $G\alpha_s$ ·GDP-interagierende Proteine
- ausschließlich mit $G\alpha_s$ · AIF_4^- interagierende Proteine
- Proteine, die sowohl mit $G\alpha_s$ ·GDP als auch $G\alpha_s$ · AIF_4^- interagieren (unabhängig vom $G\alpha_s$ -Aktivierungszustand interagierende Proteine)

Bei aktivierungsunabhängig, d.h. sowohl mit $G\alpha_s$ ·GDP als auch mit $G\alpha_s$ ·GDP· AIF_4^- interagierenden Proteinen ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es sich entweder um unspezifisch interagierende Proteine (z.B. ribosomale Proteine, T-Komplex-Proteine, Hitzeschockproteine, Actin, Tubulin, Burckstummer *et al.* 2006) oder aber um mit $G\alpha_s$ interagierende Gerüstproteine handelt. Zwar sind diese Interaktionen durchaus $G\alpha_s$ -spezifisch, jedoch lag der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf Proteinen, die in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand des $G\alpha_s$ interagieren, wie z.B. RGS-Proteine. Die oben genannten Proteine wurden bei der Analyse daher nicht näher berücksichtigt. Interaktionen, die nur mit $G\alpha_s$ ·GDP oder $G\alpha_s$ · AIF_4^- stattfanden, wurden dagegen genauer untersucht, da in diesem Fall eine Beeinflussung der $G\alpha_s$ -vermittelten Signaltransduktion durch die Interaktion angenommen wurde.

Von den konformationselektiv interagierenden Proteinen wurden einige ausgewählt und ihre Wechselwirkung mit $G\alpha_s$ im Anschluß *in vitro* verifiziert und charakterisiert.

5.5.5 Unabhängig vom $G\alpha_s$ -Aktivierungszustand interagierende Proteine

Als konformationsunabhängig interagierende Proteine wurden hauptsächlich Hsp70, Hsp7C, GRP75 und GRP78 identifiziert. Des Weiteren wurden T-Komplex-Proteine sowie Tubulin α und β bestimmt. Die letztgenannte Interaktion ist bereits in der Literatur beschrieben (Coulter und Rodbell 1992, Hatta *et al.* 1995, vgl. auch 1.3.1). Ubiquitin wurde über das gesamte Molekulargewichtsspektrum beider Proben detektiert, woraus zu schließen war, dass es hauptsächlich als kovalente Modifikation an den im jeweiligen Gelbereich vorkommenden Proteinen vorlag.

5.5.6 $G\alpha_s$ -s4·GDP-spezifische Interaktionspartner

Selektiv an $G\alpha_s$ -s4·GDP bindende potentielle Interaktionspartner sind, nach Berücksichtigung konformationsunabhängig interagierender Proteine, in Tabelle 25 aufgelistet. Die Auswahl der näher zu charakterisierenden Interaktionspartner erfolgte unter Einbeziehung der Merkmale und Eigenschaften dieser Proteine im Hinblick auf eine mögliche Interaktion mit $G\alpha_s$, die im Folgenden näher betrachtet werden.

Ankyrin repeat domain-containing protein 13A

Das experimentell ermittelte und das theoretische Molekulargewicht stimmen überein, jedoch ist keine Angabe zur intrazellulären Lokalisation bei SWISSPROT eingetragen. Das Protein enthält zwei sog. ANK-repeat-Domänen sowie drei *Ubiquitin-interacting-motif-repeat*-Domänen. Da Ubiquitin auch als kovalente Modifikation über einen breiten MW-Bereich detektiert wurde, kann es durchaus sein, dass dieses Protein nicht direkt mit $G\alpha_s$, sondern mit Ubiquitin-Epitopen anderer mit $G\alpha_s$ komplexierter Proteine interagiert hat. In einem zweiten TAP-Experiment wurde diese Interaktion nicht bestätigt.

Melanoma-associated antigen D2

Dieses Protein ist in mehreren zusammenhängenden Gelbereichen identifiziert worden und konnte mit einer großen Anzahl von Peptiden und einem hohen *Mascot Score* identifiziert werden. Über seine zelluläre Funktion ist noch nichts bekannt. Die Interaktion konnte jedoch in einem zweiten Versuch nicht reproduziert werden.

Tabelle 25 Spezifisch an $G\alpha_s$ -s4·GDP gebundene Proteine. Die für $G\beta$ (Proteine # 3-6) identifizierten Peptide gaben keinen Hinweis auf eine spezifische $G\beta$ -Isoform und sind umrahmt. Grau unterlegt sind Interaktionspartner, die in einem zweiten Experiment reproduziert werden sollten. Erläuterungen zum *Mascot Score* befinden sich unter 4.6. MW Probe = apparentes Molekulargewicht der Probe im Gel. MW theor. = berechnetes Molekulargewicht des jeweiligen Proteins.

#	accession #	Name (Swiss-Prot)	per MS/MS identifizierte Peptide	Mascot Score	MW Probe (MW theor.) [kDa]	Kompartiment
1	Q8IZ07	Ankyrin repeat domain-containing protein 13A	3	170	67,6 (85)	keine Angabe
2	P01040	Cystatin-A	3	102	10 (11)	Cytosol
3	P62871	Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(t) beta subunit 1	7	314	33 (37)	Plasmamembran
4	P11017	Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(t) beta subunit 2				
5	Q9HAV0	Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(t) beta subunit 4				
6	P16520	Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(t) beta subunit 3				
7	Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(o) gamma-12 subunit	2	145	10 (7,87)	Plasmamembran
8	P63217	Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(o) gamma-5 subunit	3	131	10 (7,3)	Plasmamembran
9	Q9UNF1	Melanoma-associated antigen D2	14	579	85 (65)	keine Angabe
10	Q13049	Tripartite motif-containing protein 32 (TRIM32; Zincfinger protein HT2A)	2	126	70 (72)	Nukleus

$G\beta_1$ - $G\beta_4$

Die Interaktion von $G\alpha_s$ -s4·GDP mit $G\beta\gamma$ -Komplexen ist aus der Literatur bekannt und wurde in dieser Arbeit bereits dargestellt (vgl. 5.4.2.1 und 5.4.2.2). Eine Präferenz von $G\alpha_s$ für eine der vier $G\beta$ -Isoformen lässt sich aus der Literatur nicht ableiten. Die vier Isoformen weisen einen hohen Anteil identischer Aminosäuren auf und waren anhand ihrer per MS/MS erfassten Peptide in diesem Versuch nicht zu unterscheiden. Lediglich ein Peptid war ausschließlich $G\beta_4$ zuzuordnen (Abb. 37).

	10 20 30 40 50 60
P62873 GBB1_HUMAN	MSELDQLRQE AEQLKMQIRD ARKACADATL SQITNNIDPV GRIQMRTRRT LRGHLLAKTYA
P62879 GBB2_HUMAN	MSELEQLRQE AEQLRNQIRD ARKACGDSTL TQITAGLDPV GRIQMRTRRT LRGHLLAKTYA
P16520 GBB3_HUMAN	MGEMEQLRQE AEQLKKQIAD ARKACADVTL AELVSGLEVV GRVQMRTRRT LRGHLLAKTYA
Q9HAV0 GBB4_HUMAN	MSELEQLRQE AEQLRNQIQD ARKACNDATL VQITSNMDSV GRIQMRTRRT LRGHLLAKTYA

	70 80 90 100 110 120
P62873 GBB1_HUMAN	MHWGTDSRLL VSASQDGKLI IWDSYTTNKV HAIPLRSSSW MTCAYAPSGN YVACGGLDNI
P62879 GBB2_HUMAN	MHWGTDSRLL VSASQDGKLI IWDSYTTNKV HAIPLRSSSW MTCAYAPSGN YVACGGLDNI
P16520 GBB3_HUMAN	MHWATDSKLL VSASQDGKLI VWDSYTTNKV HAIPLRSSSW MTCAYAPSGN YVACGGLDNI
Q9HAV0 GBB4_HUMAN	MHWGYDSRLL VSASQDGKLI IWDSYTTNKV HAIPLRSSSW MTCAYAPSGN YVACGGLDNI

	130 140 150 160 170 180
P62873 GBB1_HUMAN	CSIYNLKTRE GNVRSVRELA GHTGYLSCCR FLDDNQIVTS SGDTTCALWD IETGQQTTF
P62879 GBB2_HUMAN	CSIYSLKTRE GNVRSVRELP GHTGYLSCCR FLDDNQIITS SGDTTCALWD IETGQQTTF
P16520 GBB3_HUMAN	CSIYNLKSRE GNVKVSRELS AHTGYLSCCR FLDDNNIVTS SGDTTCALWD IETGQQTTF
Q9HAV0 GBB4_HUMAN	CSIYNLKTRE GNVRSVRELP GHTGYLSCCR FLDDSQIVTS SGDTTCALWD IETAQQTTF

	190 200 210 220 230 240
P62873 GBB1_HUMAN	TGHTGDVMSL SLAPDTRLFV SGACDASAKL WDVREGMCRQ TFIGHESDIN AICFFPNGNA
P62879 GBB2_HUMAN	AGHSGDVMSL SLAPDGRFV SGACDASIKL WDVREDSMCRQ TFIGHESDIN AVAFFPNGYA
P16520 GBB3_HUMAN	VGHTGDVMSL AVSPDFNLFV SGACDASAKL WDVREGTCRQ TFIGHESDIN AICFFPNGEA
Q9HAV0 GBB4_HUMAN	TGHTGDVMSL SLSPDMRTFV SGACDASSKL WDIRDGMCRCQ SFTGHVSDIN AVSFFPNGYA

	250 260 270 280 290 300
P62873 GBB1_HUMAN	FATGSDDATC RLFDLRADQE LMTYSHDNII CGITSVSFSK SGRLLLAGYD DFNCNVWDAL
P62879 GBB2_HUMAN	FTTGSDDATC RLFDLRADQE LLMYSHDNII CGITSVAFSR SGRLLLAGYD DFNCNIWDAM
P16520 GBB3_HUMAN	ICTGSDDASC RLFDLRADQE LICFSHESII CGITSVAFSL SGRLLFAGYD DFNCNVWDSM
Q9HAV0 GBB4_HUMAN	FATGSDDATC RLFDLRADQE LLLYSHDNII CGITSVAFSK SGRLLLAGYD DFNCNVWDTL

	310 320 330 340
P62873 GBB1_HUMAN	KADRAGVLAG HDNRVVSCLGV TDDGMAVATG SWDSFLKIWN .
P62879 GBB2_HUMAN	KDRAGVLAG HDNRVVSCLGV TDDGMAVATG SWDSFLKIWN .
P16520 GBB3_HUMAN	KSERVILSG HDNRVVSCLGV TADGMAVATG SWDSFLKIWN .
Q9HAV0 GBB4_HUMAN	KDRAGVLAG HDNRVVSCLGV TDDGMAVATG SWDSFLKIWN .

Abb. 37 Sequenzabdeckung der in den TAP-Experimenten identifizierten G β -Isoformen. Grau unterlegt sind identifizierte Peptide, die Bereichen in G β zuzuordnen sind, in denen G β -Isoformen Aminosäureidentität aufweisen. Das von G β_4 stammende Peptid ist umrahmt und fett dargestellt. Die G β -Isoformen 1-4 der Säuger weisen speziesübergreifend 90-100 % Sequenzidentität auf. Durch das humane Genomprojekt sind bis jetzt vor allem die menschlichen Isoformen sequenziert und in Datenbanken abgelegt, so dass in der MS-Analyse überwiegend Sequenzen für humane G β -Proteine identifiziert wurden, obwohl die Proteine aus der Grünen Meerkatze (aus der die COS-7-Zelllinie generiert wurde) stammten.

G γ_5 , G γ_{10}

In diesem Experiment wurden als potentielle Heterotrimerpartner aus 12 bislang bekannten G γ -Isoformen G γ_5 und G γ_{10} identifiziert. Von G γ_5 ist bekannt, dass es nicht nur in der Plasmemembran, sondern auch in fokalen Adhäsionspunkten lokalisiert ist und mit Actin oder Actin-assoziierten Komponenten assoziieren kann (Hansen *et al.* 1994). Im Komplex mit G α_i führt G γ_5 möglicherweise zu einer intrazellulären Lokalisation von G γ -Heterotrimeren (ibid., Cook *et al.* 1998). G γ_{10} ist bislang wenig charakterisiert.

Das Vorkommen verschiedener G γ -Isoformen in G γ -Heterotrimeren ist aus der Literatur bekannt (Iniguez-Lluhi *et al.* 1992; Ueda *et al.* 1994; Mervine *et al.* 2006). Es existieren

Hinweise auf funktionale Unterschiede der jeweiligen Heterotrimere *in vivo*, deren physiologische Bedeutung im Falle des $G\alpha_s$ jedoch wenig beschrieben ist.

In weiteren Versuchen wurde daher untersucht, welche $G\gamma$ -Isoformen in COS-7-Zellen exprimiert werden und ob selektive bzw. präferentielle Interaktionen von $G\alpha_s$ mit bestimmten $G\gamma$ existieren.

5.5.6.1 Interaktion von $G\alpha_s$ -s4·GDP mit $G\gamma$ -Isoformen

Zunächst wurde untersucht, welche $G\gamma$ -Isoformen in COS-7-Zellen exprimiert werden. Dafür wurden Membranextrakte aus diesen Zellen hergestellt (siehe 4.3.6). Der Nachweis der $G\gamma$ -Isoformen sollte auf der Protein- und nicht auf der mRNA-Ebene durchgeführt werden, um Rückschlüsse auf tatsächlich vorhandene $G\gamma$ -Mengen ziehen zu können. Die Membranextrakte wurden daher massenspektrometrisch analysiert. Anschließend wurde mittels heterolog exprimierter $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Proteine untersucht, ob präferentielle Wechselwirkungen von $G\alpha_s$ mit bestimmten $G\gamma$ existieren.

Bestimmung der in COS-7-Membranen vorkommenden $G\gamma$ -Isoformen

Membranextrakte sind hochkomplexe Lösungen, die zur massenspektrometrischen Detektion von nur in Spuren enthaltenen Proteinen wie $G\gamma$ fraktioniert werden müssen.

Jeweils 20 μg aus COS-7-Zellmembranen extrahierte Proteine wurden dafür auf einem 9-20% SDS-Gel elektrophoretisch getrennt, nur der Gelbereich auf der Höhe von $G\gamma$ (ca. 10 kDa) wurde ausgeschnitten, die Proteine in diesem Gelstück mit Trypsin gespalten und massenspektrometrisch analysiert. Die Identifizierung der per MS identifizierten Peptide wurde in diesem Fall durch Abgleich mit Einträgen der SwissProt-Datenbank unter spezieller Berücksichtigung einer sogenannten Präferenz-Liste durchgeführt, die ausschließlich alle humanen $G\gamma$ -Isoformen⁷ enthielt. Beim *MS-to-MS/MS-Switching* während der Analyse wurden dadurch bevorzugt $G\gamma$ -Peptide zur Fragmentierung ausgewählt. Der so definierte Schwerpunkt erleichterte die Identifizierung der nur in geringen Mengen vorkommenden $G\gamma$ -Proteine.

Mit einer Suche gegen die SWISSPROT-Datenbank wurden ohne Verwendung der Präferenzliste von den über 700 detektierten Peptiden einer Probe nur drei dem $G\gamma_{12}$

⁷ Wie schon für $G\beta$ -Isoformen zur Abb. 37 erläutert, weisen auch die $G\gamma$ -Isoformen der Säuger spezieübergreifend große konservierte Sequenzabschnitte auf. Durch das humane Genomprojekt sind bis jetzt vor allem die menschlichen Isoformen sequenziert und in Datenbanken abgelegt, für die Grüne Meerkatze (aus der die COS7-Zelllinie ursprünglich generiert wurde) existieren noch keine Datenbankeinträge für $G\gamma$ -Proteine. Daher wurden nur die humanen Sequenzen in die Präferenzliste aufgenommen (Sequenzen P50151, P61952, Q9UBI6, Q9P2W3, P63211, P59768, P63215, P50150, Q9Y3K8, P63218, O60626 und Q9UK08; SWISSPROT-*accession numbers*).

zugeordnet. Bei Verwendung der Präferenzliste wurden neben $G\gamma_{12}$ auch $G\gamma_5$ und $G\gamma_{10}$ identifiziert (Tabelle 26).

Tabelle 26 In COS-7-Zellmembranen per MS/MS unter Verwendung einer Präferenz-Liste identifizierte $G\gamma$ -Isoformen.

#	accession #	Name (Swiss-Prot)	per MS/MS identifizierte Peptide	Mascot Score
1	Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding gamma-12 subunit	4	227
2	P63218	Guanine nucleotide-binding gamma-5 subunit [Precursor]	3	139
3	P50151	Guanine nucleotide-binding gamma-10 subunit [Precursor]	3	107

Mit N-TAP- $G\alpha_s$ -s4 interagierende $G\gamma$ -Isoformen aus COS-7-Zellen

In einem TAP-Experiment wurde die Interaktion von $G\alpha_s$ mit den in COS-7-Zellmembranen vorkommenden $G\gamma$ -Isoformen näher untersucht. Alle in den COS-7-Membranen vorhandenen $G\gamma$ -Isoformen ($G\gamma_5$, $G\gamma_{10}$, $G\gamma_{12}$, Tabelle 26) konnten im Komplex mit N-TAP- $G\alpha_s$ -s4 über TAP isoliert werden (siehe Tabelle 27, Abb. 38). $G\gamma_7$ wurde ebenfalls identifiziert, jedoch mit nur einem *first ranking*-Peptid. Obwohl es somit nach den unter 5.5.4.3 genannten (strengen) Kriterien nicht sicher identifiziert ist, wurde das Ergebnis des Experiments als Hinweise gewertet, dass $G\gamma_7$ nur in sehr geringen Mengen in COS-7-Zellen exprimiert wurde. Trotz der Anreicherung über TAP waren diese Mengen so gering, dass ein massenspektrometrischer Nachweis des $G\gamma_7$ neben abundanteren Proteinen nicht immer möglich war.

Tabelle 27 Über *Tandem Affinity Purification* mit $G\alpha_s$ gereinigte $G\gamma$ -Isoformen aus COS-7-Membranen. Im Fall von $G\gamma_7$ war eines der beiden identifizierten Peptide kein *first ranking*-Peptid.

#	accession #	Name (Swiss-Prot)	per MS/MS identifizierte Peptide	Mascot Score
1	Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding gamma-12 subunit	7	285
2	P63218	Guanine nucleotide-binding gamma-5 subunit [Precursor]	9	360
3	P50151	Guanine nucleotide-binding gamma-10 subunit [Precursor]	2	90
4	P30671	Guanine nucleotide-binding gamma-7 subunit [Precursor]	(2)	61

Q9UBI6|GBG12_HUMAN M SSKFASTNNIAQARFTVQQLRLEASIERIKVSKASADLMSYCEEHARSDPLLLIGIPTSENPFKDKKTCIIL
P63218|GBG5_HUMAN M S G S S S V A A M K K V V Q Q L R L E A G L N R V K V S Q A A A D L K Q F C L Q N A Q H D P L L T G V S S S T N P F R P Q K V C S F L
P50151|GBG10_HUMAN M S S G A S A S A L Q R L V E Q L K L E A G V E R L K V S Q A A A E L Q Q Y C M Q N A C K D A L L V G V P A G S N P F R E P R S C A L L

Abb. 38 Über Tandem Affinity Purification mit $G\alpha_s$ gereinigte $G\gamma$ -Isoformen. Per MS/MS identifizierte Peptide sind markiert. Alle Peptide waren ausschließlich der angegebenen Isoform zuzuordnen.

Aus diesen Ergebnissen war keine prinzipielle Präferenz des $G\alpha_s$ für eine oder mehrere $G\gamma$ -Isoformen abzuleiten, da es mit jeder der in COS-7 exprimierten $G\gamma$ -Isoformen Heterotrimer bilden konnte.

5.5.6.2 Charakterisierung der Interaktion von $G\alpha_s$ mit $G\gamma_{10}$ und $G\gamma_{12}$

Zur genauen Charakterisierung der Heterotrimerzusammensetzung des stimulatorischen G-Proteins hinsichtlich der enthaltenen $G\gamma$ -Untereinheiten finden sich in der Literatur nur wenige Daten. *In vitro*-Untersuchungen zeigen, dass die Komplexe $G\beta_1\gamma_2$, $G\beta_1\gamma_5$ und $G\beta_1\gamma_7$ sowie $G\beta_2\gamma_5$ und $G\beta_2\gamma_7$ die $G\alpha_s$ -katalysierte *Steady-State*-GTPase inhibieren und demzufolge funktionelle Gs-Heterotrimeren bilden können (Ueda *et al.* 1994, Takida und Wedegaertner 2003). Die Anwesenheit von $G\gamma_{12}$ (sowie $G\gamma_2$, $G\gamma_3$, $G\gamma_7$) in Gs-Heterotrimeren ist durch Ko-Immunopräzipitations-Versuche aus Rattenhirn-Extrakten belegt (Ueda *et al.* 1998).

Jüngste Arbeiten zeigen *in vivo* eine Heterotrimerbildung von $G\alpha_s$ mit $G\beta_1\gamma_n$ ($n=1, 2, 5, 7, 10, 11, 12$) bei heterologer Expression in HEK293-Zellen, wobei alle Interaktionspartner ein fluoreszierendes *tag* tragen (Mervine *et al.* 2006). Im Falle des $G\gamma$ ist das *tag* fast so groß wie das Protein selbst.

Die direkte, physische Interaktion von $G\alpha_s$ mit $G\beta_1\gamma_{10}$ bzw. $G\gamma_{12}$ z.B. konnte aus der Literatur demnach zwar implizit gefolgert werden, ein Nachweis, z.B. durch Affinitätsreinigung der jeweiligen Komplexe, war jedoch noch nicht veröffentlicht und wurde erst in der vorliegenden Dissertation erbracht.

Zur Bestimmung der Heterotrimerbildung von $G\alpha_s$ mit $G\beta\gamma$ -Dimeren *in vitro* gibt es mehrere Möglichkeiten. Beispielsweise können $G\alpha$ -abhängige Reaktionen betrachtet werden, die durch die Heterotrimerbildung inhibiert werden (z.B. Inhibition der $G\alpha_s$ -katalysierten *Steady-State*-GTP-Hydrolyse durch $G\beta\gamma$, vgl. Ueda *et al.* 1994) oder Reaktionen, die nur am Heterotrimer erfolgen (z.B. Stimulation der Cholera-toxin-katalysierten ADP-Ribosylierung von $G\alpha_s$ durch $G\beta\gamma$). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die physische Assoziation der Heterotrimer *in vitro* durch die Ko-Reinigung von $G\alpha_s$ und verschiedenen $G\beta\gamma$ -Komplexen über eine Affinitätsmatrix nachgewiesen.

$G\alpha_s$ -s4His und $G\beta_1$ wurden mit $G\gamma_{10}$, $G\gamma_{12}$ bzw. β -Galactosidase über ein Baculovirussystem in Sf9-Insektenzellen koexprimiert. Die $G\beta$ - und $G\gamma$ -kodierenden Viren wurden dabei mit

einer höheren MOI eingesetzt als das $G\alpha_s$ -s4His-kodierende Virus. Die Plasmamembranen der Zellen wurden mit der Stickstoff-Druckkammer-Methode (siehe 4.3.6) präpariert. Jeweils 100 μ g Membranproteine wurden mit 0,5 % (v/v) $C_{12}E_{10}$ für eine Stunde bei 4 °C schüttelnd aus der Membran extrahiert und die Extrakte auf Ni-NTA-Agarose (100 μ L Bettvolumen) geladen. Die Säule wurde mit 20 SV Hochsalzpuffer, 20 SV Niedrigsalzpuffer und 10 SV Imidazol-Waschpuffer gewaschen und in 10x0,5 SV Elutionspuffer eluiert (Puffer siehe Kapitel 4.5.3). Die Eluate wurden vereinigt, die darin enthaltenen Proteine mit Aceton gefällt, anschließend elektrophoretisch getrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. $G\alpha_s$ und $G\beta$ wurden immunchemisch nachgewiesen (Abb. 39)⁸.

Anhand der Literatur ließen sich folgende Annahmen formulieren (vgl. auch Abschnitte 1.1.2 und 1.3.1):

1. In Abwesenheit von $G\beta\gamma$ verbleibt $G\alpha_s$ im Cytosol, während $G\beta\gamma$ -Komplexe in Abwesenheit von $G\alpha_s$ an intrazellulären Membranen assoziiert bleiben (Evanko *et al.* 2000; Takida und Wedegaertner 2003).
2. In Abwesenheit von $G\gamma$ wird $G\beta$ im Cytosol von Hitzeschockproteinen stabilisiert (Wells *et al.* 2006) und gelangt nicht zur Plasmamembran. Entsprechend Punkt 1 verbleibt auch $G\alpha_s$ im Cytosol.
3. Bei erfolgreicher Heterotrimerbildung gelangen sowohl $G\alpha_s$ als auch $G\beta$ an die Plasmamembran und sind somit in den Membranextrakten und in den Eluaten der Ni-NTA-Agarose nachweisbar.

Im Fall von $G\alpha_s\beta_1\beta$ Gal kann nur unter Einbeziehung von Sf9-endogenen $G\gamma$ -Proteinen ein Heterotrimer entstehen, das an die Plasmamembran gelangt. Aufgrund der sehr geringen Expressionsrate des Sf9-endogenen $G\gamma$ wurde daher ein sehr schwaches oder gar kein Immunsignal für $G\alpha_s$ und $G\beta$ erwartet. Bei der Expression von $G\alpha_s$, $G\beta_1$ und $G\gamma_1$ ist zwar eine Dimerisierung von $G\beta_1$ und $G\gamma_1$ möglich, es ist jedoch unklar, ob dieses Dimer auch mit $G\alpha_s$ assoziiert. In der Literatur ist beschrieben, dass $G\beta_1\gamma_1$ eine Größenordnung weniger potent ist in Bezug auf z.B. die Hemmung der $G\alpha_s$ -katalysierten Fließgleichgewichts-GTP-Hydrolyse (Ueda *et al.* 1994). Möglicherweise ist dies auf eine geringere Affinität von $G\alpha_s$ und $G\beta_1\gamma_1$ im Vergleich zu anderen $G\beta\gamma$ -Komplexen zurückzuführen. Dementsprechend wurden mit der Negativkontrolle $G\alpha_s\beta_1\beta$ Gal vergleichbare Ergebnisse erwartet. Das bereits gut charakterisierte Heterotrimer $G\alpha_s\beta_1\gamma_2$ diente als Positivkontrolle, bei der intensive

⁸ Die Assoziation des Heterotrimers wurde über den immunchemischen Nachweis der $G\beta$ -Untereinheit erbracht, da nicht für alle $G\gamma$ -Isoformen ausreichend sensitive monoklonale Antikörper zur Verfügung standen bzw. deren Sensitivität stark unterschiedlich war. Vergleiche zwischen den verschiedenen Heterotrimeren wären dadurch deutlich erschwert bzw. nicht möglich.

Immunsignale in Plasmamembranextrakten und Ni-NTA-Eluaten erwartet wurden. Da die Anwesenheit von $G\gamma_{10}$ und $G\gamma_{12}$ in Gs-Heterotrimeren bereits mittels TAP gezeigt worden war (vgl. 5.5.6), wurde für diese Isoformen ein mit $G\beta_1\gamma_2$ vergleichbares Ergebnis erwartet.

Die für die hier dargestellten Experimente erwarteten Ergebnisse sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28 Zusammenfassung der für die Heterotrimerbildung von $G\alpha_s$ mit verschiedenen $G\beta_1\gamma_x$ Komplexen erwarteten Ergebnisse.

exprimierte Proteine	Heterotrimerbildung	intrazelluläre Lokalisation	erwartete Immunsignale im Membranextrakt	erwartete Immunsignale im Ni-NTA-Eluat
$G\alpha_s, G\beta_1, \beta Gal$	nein (nur mit Sf9-endogenem $G\gamma$)	(überwiegend) cytosolisch	- bis +	- bis +
$G\alpha_s, G\beta_1, G\gamma_1$	nein (nur mit Sf9-endogenem $G\gamma$) bzw. schwach	(überwiegend) cytosolisch	- bis +	- bis +
$G\alpha_s, G\beta_1, G\gamma_2$	ja	Plasmamembran	+++	+++
$G\alpha_s, G\beta_1, G\gamma_{10}$	ja	Plasmamembran	+++	+++
$G\alpha_s, G\beta_1, G\gamma_{12}$	ja	Plasmamembran	+++	+++

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 39 dargestellt. Bei der Expression von $G\alpha_s\beta_1\beta Gal$ wurde erwartungsgemäß nur ein sehr schwaches Immunsignal für $G\alpha_s$ und $G\beta_1$ in den Membranextrakten (Kontrolle mit β -Galactosidase, Spur 1). und Ni-NTA-Eluaten (Kontrolle mit β -Galactosidase, Spur 4). detektiert, da in Abwesenheit von prenyliertem $G\gamma$ sowohl $G\beta_1$ als auch $G\alpha_s$ im Cytosol verblieben. Die cytosolische Fraktion wurde jedoch nicht näher untersucht.

Vergleichbare Immunsignale wurden bei der Expression von $G\alpha_s\beta_1\gamma_1$ detektiert. Das Dimer $G\beta_1\gamma_1$ kann assoziieren, im gezeigten Versuch waren $G\beta$ und $G\alpha_s$ jedoch nur sehr schwach in Plasmamembranen und Ni-NTA-Eluaten nachweisbar, d.h. eine aus der Assoziation mit $G\alpha_s$ resultierende Plasmamembranlokalisation des Heterotrimers war nicht nachweisbar. $G\gamma_1$ weist aufgrund seiner Farnesylierung eine geringere Lipophilie auf als prenylierte $G\gamma$ -Untereinheiten. Es ist nicht auszuschließen, dass das Heterotrimer $G\alpha_s\beta_1\gamma_1$ assoziierte, aufgrund der geringeren Lipophilie aber im Cytosol verblieb. Diese Möglichkeit wurde jedoch nicht näher untersucht.

Bei der Expression von $G\alpha_s\beta_1\gamma_2$, $G\alpha_s\beta_1\gamma_{10}$ und $G\alpha_s\beta_1\gamma_{12}$ hingegen wurden intensive Immunsignale sowohl in Plasmamembranextrakten (Abb. 39, jeweils Spur 1) als auch in Ni-NTA-Eluaten (Abb. 39, jeweils Spur 4) detektiert. Die Heterotrimere $G\alpha_s\beta_1\gamma_{10}$ und $G\alpha_s\beta_1\gamma_{12}$ konnten demnach in vergleichbarem Maße assoziieren und gereinigt werden wie $G\alpha_s\beta_1\gamma_2$. In den Ni-NTA-Durchlaufractionen (Spur 2) dieser drei Heterotrimerkombinationen war $G\beta$ detektierbar, was darauf zurückzuführen war, dass $G\beta\gamma$ stärker exprimiert wurde als $G\alpha_s$ -s4His und möglicherweise mit Sf9-endogenen $G\alpha$ -Untereinheiten assoziiert war. Diese $G\beta\gamma$ -

Komplexe waren dadurch zwar plasmamembranassoziiert, konnten jedoch nicht an der Affinitätsmatrix binden und erschienen so in der Durchlaufraction.

Die schwachen Immunsignale in Membranextrakten und Ni-NTA-Eluaten bei $G\alpha_s\beta_1\beta\text{Gal}$ und $G\alpha_s\beta_1\gamma_1$ sind, wie oben bereits erläutert, wahrscheinlich auf die Assoziation mit endogenem $G\gamma$ zurückzuführen.

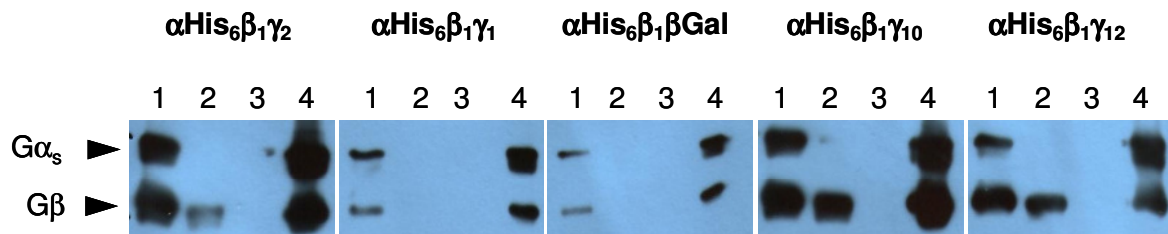


Abb. 39 Heterotrimerbildung von $G\alpha_s$ -s4His mit $G\beta_1$ und verschiedenen $G\gamma$ -Isoformen. $G\alpha_s$ -s4His, $G\beta_1$ und $G\gamma$ bzw. β -Galactosidase wurden in Sf9-Zellen exprimiert und Membranen präpariert. Extrakte aus 100 μg Membranen wurden wie im Text beschrieben über Ni-NTA-Agarose gereinigt. Der Extrakt von 6 μg Membranen, jeweils 12 μL jeder Fraktion bzw. die Hälfte des Eluates wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden nacheinander mit $G\alpha_s$ -spezifischem (C-18) und mit $G\beta_1$ -spezifischem (T-20) primärem Antikörper (Pfeile) immunchemisch detektiert. Der sekundäre Antikörper anti-Kaninchen-IgG-POD erkannte beide primären Antikörper. 1 = Membranextrakt, 2 = Ni-NTA-Durchlauf, 3 = Imidazol-Wasch-Schritt, 4 = Ni-NTA-Eluat.

Die in Abb. 39 dargestellten Ergebnisse konnten auch reproduziert werden, wenn $G\beta_1$ anstelle des $G\alpha_s$ das His₆-tag trug (Daten nicht gezeigt). Eine Interaktion, die auf das tag im $G\alpha_s$ zurückzuführen ist, war somit auszuschließen.

5.5.7 Charakterisierung $G\alpha_s$:AIF₄⁻-enthaltender Proteinkomplexe

Wie in Abb. 35 gezeigt, konnten konformationsabhängig mit $G\alpha_s$ interagierende Proteine mit der TAP-Methode isoliert werden. Parallel zum Ansatz mit $G\alpha_s$:GDP wurde die TAP in Anwesenheit von AIF₄⁻ durchgeführt und eine gesamte Gelspur analysiert (siehe auch Abb. 36). Auffällig war dabei vor allem eine Doppelbande bei ca. 15 kDa. Nach den in 5.5.4.3 genannten Kriterien wurden Interaktionspartner bestimmt und die Interaktion in einem zweiten TAP-Experiment reproduziert. In Tabelle 29 sind die Ergebnisse des ersten AIF₄⁻-TAP-Experimentes aufgeführt. Die grau unterlegten Proteine wurden auf eine mögliche Interaktion mit $G\alpha_s$ hin näher betrachtet. Die Auswahl dieser Proteine erfolgte unter Einbeziehung ihrer molekularen Eigenschaften sowie aufgrund von Hinweisen aus der Literatur, die ihre Beteiligung an G-Protein-gekoppelter Signaltransduktion zeigen.

Tabelle 29 Spezifisch an $G\alpha_s$ -s4 AlF_4^- -gebundene Proteine. Interaktionspartner in grau unterlegten Feldern wurden ausgewählt, um die Wechselwirkung zu reproduzieren.

#	accession #	Name (Swiss-Prot)	per MS/MS identifizierte Peptide	Mascot Score	MW Probe (MW theor.) [kDa]	Kompartiment
1	P63103	14-3-3 zeta / delta	3	139	30 (27,7)	Cytosol
2	P61981	14-3-3 gamma	3	131	30 (28,2)	Cytosol
3	P31946	14-3-3 protein beta / alpha	5	200	26 (27,9)	Cytosol
4	P62763	Actin alpha	3	173	60 (42)	Cytosol
5	P60709	Actin beta	5	202	40 (41,7)	Cytosol
6	P04083	Annexin A1	4	219	30 (38,7)	keine Angabe
7	P62157	Calmodulin	6	279	18 (16,7)	Cytosol
8	P06576	ATP synthase beta chain mitochondrial precursor	2	144	50 (56,5)	Mitochondrium
9	P49951	Clathrin heavy chain	5	319	118 (191,5)	Cytoplasma
10	O75190	DnaJ homolog subfamily B member 6	2	120	26 (36)	keine Angabe
11	Q9UBS4	ER-assoziiertes DnaJ-Protein 3	8	399	40 (40,5)	ER-Lumen
12	Q14315	Filamin C	17	951	180 (290,8)	Cytoskelett
13	P31943	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein H	8	275	50 (49,1)	Nucleus
14	P62805	Histone H4	6	352	30 (11,2)	Nucleus
15	P07195	Lactatdehydrogenase b chain (heart)	2	66	35 (36,2)	Cytosol
16	P46379	Large proline-rich protein BAT3	2	131	118 (119,4)	Cytosol
17	P55209	Nucleosome assembly protein 1-like hNRP	4	126	60 (45,3)	Nucleus
18	P36957	Oxoglutarate Dehydrogenase (Bestandteil)	3	142	50 (48,6)	Mitochondrium
19	P62333	26S protease regulatory subunit S10B	2	88	40 (44,1)	Cytosol
20	P25788	proteasome subunit alpha type 3	2	106	26 (28,3)	Cytosol
21	O00233	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	2	99	26 (24,6)	Cytosol
22	P05307	Protein disulfide-isomerase precursor	2	132	60 (57,2)	ER-Lumen
23	P12004	Proliferating cell nuclear antigen, cyclin	4	157	35 (28,7)	Nucleus
24	P62829	60S ribosomal protein L23	3	102	18 (14,9)	Cytosol
25	P60866	40S ribosomal protein S20	2	86	18 (13,3)	Cytosol
26	P39019	40S ribosomal protein	2	81	18 (15,9)	Cytosol
27	Q15293	Reticulocalbin 1 precursor	2	64	40 (38,9)	ER-Lumen
28	P30153	Ser/Thr protein phosphatase 65kDa regulatory subunit PP2A	7	303	60 (65)	Cytosol
29	P67774	Ser/Thr protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha	4	118	35 (35,6)	Cytosol

Calmodulin

Calmodulin wurde eindeutig als das Hauptprotein der im Coomassie-Blau gefärbten Gel sichtbaren Doppelbande bei 15 kDa identifiziert (siehe Abb. 36). Dieses kleine, sehr flexible Molekül ist an der Regulation einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt. So spielt es unter anderem bei der Interaktion von $G\beta\gamma$ mit Ca^{2+} -Kanälen (Liu *et al.* 1997; Ivanina *et al.* 2000) und bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eine Rolle (Wang, D. *et al.* 1999; Aifa *et al.* 2002). Konservierte Calmodulin-Bindungssequenzen sind zwar bekannt, jedoch kann eine Bindung auch an Motiven stattfinden, die nicht zu den klassischen Bindungsmotiven gehören. Auch $G\beta\gamma$ und RGS-Proteine interagieren mit Calmodulin (Liu *et al.* 1997, Popov *et al.* 2000).

Die Ko-Elution von $G\alpha_s$ -s4· AlF_4^- mit Calmodulin konnte in einem weiteren TAP-Experiment reproduziert werden. Die Interaktion von $G\alpha_s$ mit Calmodulin ist noch nicht beschrieben worden, da es jedoch an der Signaltransduktion heterotrimerer G-Proteine beteiligt ist, erschien eine nähere Untersuchung sinnvoll.

14-3-3-Proteine

14-3-3-Proteine sind hochkonservierte, ubiquitär vorkommende Proteine, die an einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen beteiligt sind. In Säugern existieren 7 Isoformen, die unter anderem Enzyme regulieren, als Gerüstprotein dienen, Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflussen und an der intrazellulären Lokalisation von Proteinen beteiligt sein können. Bislang sind über 200 Proteine bekannt, die mit 14-3-3-Proteinen interagieren. Meist, jedoch nicht ausschließlich, erfolgt die Interaktion über Phosphoserinmotive auf den Zielproteinen. 14-3-3-Proteine interagieren unter anderem mit RGS-Proteinen (Niu *et al.* 2002), diese Tatsache ließ eine genauere Charakterisierung der Interaktion sinnvoll erscheinen. In einem zweiten TAP-Experiment wurde diese Interaktion bestätigt.

Annexin A1

Annexin A1 reguliert die Aktivität der Phospholipase A2 und kann 2 bis 4 Ca^{2+} -Ionen mit hoher Affinität binden. Es ist außerdem an der Membranfusion bei Exocytoseprozessen beteiligt. Da auch für $G\alpha_s$ eine Rolle im Vesikeltransport beschrieben ist (Bomsel und Mostov 1993), war diese Interaktion sehr interessant. Obwohl Annexin 1 mit einem relativ hohen *Mascot Score* und 4 Peptiden verlässlich identifiziert wurde, konnte es in einem weiteren TAP-Experiment nicht detektiert werden. Daher wurde diese Interaktion zunächst nicht weiter verfolgt.

ER-assoziiertes DnaJ-Protein 3

Dieses Protein gehört zur Klasse der Hitzeschockproteine. Es enthält eine J-Domäne, über die es mit verschiedenen Proteinen interagieren kann. Auch für $G\alpha_s$ ist eine Interaktion mit der J-Domäne des *Cysteine String Protein* beschrieben worden (Natochin *et al.* 2005). DnaJ3 wurde auch in einem zweiten TAP-Experiment als $G\alpha_s$ -s4·AlF₄⁻-interagierendes Protein identifiziert.

Protein Phosphatase 2A (PP2A)

PP2A ist an der Regulation phosphorylierungsabhängiger Wechselwirkungen beteiligt. Das Enzym ist ein Heterotrimer, dessen strukturelle A- und katalytische C-Untereinheit das Kernenzym bilden, das durch die Untereinheit B reguliert wird. PP2A ist in Komplexen mit Signalmolekülen wie G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Calcium-Kanälen und Raf-1 identifiziert worden und scheint auch bei der Regulation der phosphorylierungsabhängigen 14-3-3-Wechselwirkungen eine Rolle zu spielen (Davare *et al.* 2001, Dougherty und Morrison 2004). PP2A wurde auch in einem zweiten TAP-Experiment als $G\alpha_s$ -s4·AlF₄⁻-interagierendes Protein identifiziert.

5.5.7.1 Charakterisierung der Interaktion von $G\alpha_s$ und Calmodulin

Die Bindung von $G\alpha_s$ und Calmodulin wurde zunächst mit gereinigten Komponenten *in vitro* bestätigt und anschließend ihre Bedeutung für die $G\alpha_s$ -Funktion näher untersucht.

5.5.7.1.1 Nachweis der Interaktion mit isolierten Komponenten

Entsprechend der Vorgehensweise zur Charakterisierung von Interaktionspartnern *in vitro* (Abschnitt 5.4) wurde zunächst versucht, $G\alpha_s$ -s4-XHS auf magnetischen StrepTactin-Partikeln zu immobilisieren und Calmodulin auf der so beladenen Matrix zu retardieren. Wasch- und Elutionsfraktionen wurden immunchemisch untersucht, jedoch ergaben sich Schwierigkeiten bei der Detektion des Calmodulins. Calmodulin kann in sehr hohen Konzentrationen in Säugerzellen vorkommen (bis 1 μ M) und ist daher kaum immunogen, d.h. die gegen Calmodulin gerichteten Antikörper sind schwierig zu handhaben. Daher wurde ein reziproker Ansatz gewählt, bei dem gereinigtes $G\alpha_s$ -s4-XHS an der bereits in den TAP-Experimenten verwendeten Calmodulin-Sepharose retardiert werden sollte. Wie im Abschnitt 5.4.2 bereits beschrieben, eignet sich diese $G\alpha_s$ -Mutante hervorragend zur Charakterisierung $G\alpha_s$ -spezifischer Interaktionen *in vitro*.

In 500 μ L Calmodulin-Bindungspuffer (siehe 4.5.6) wurden 10 μ g $G\alpha_s$ -XHS mit 20 μ L Calmodulin-Sepharose in An- und Abwesenheit von AlF₄⁻ (30 μ M AlCl₃, 10 mM NaF) für 4 h bei 16 °C schüttelnd inkubiert. Die Calmodulin-Sepharose wurde anschließend 6x mit je 10 SV Calmodulinbindungspuffer gewaschen und durch Kochen in 100 μ L Probenpuffer eluiert.

Die Eluate wurden elektrophoretisch getrennt und $G\alpha_s$ immunchemisch nachgewiesen. Dabei wurde festgestellt, dass AlF_4^- -aktiviertes $G\alpha_s$ -XHS an der Calmodulin-Matrix retardiert wurde, $G\alpha_s$:GDP jedoch nicht (Abb. 40 Spur 1, 2 und 4). Auch AlF_4^- -aktiviertes $G\alpha_s$ -s4-XHS, das durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert worden war, konnte nicht an Calmodulin-Sepharose binden (Abb. 40 Spur 5). In Anwesenheit von einem Überschuß EGTA (3 mM EGTA, 2 mM $CaCl_2$) wurde keine Retardierung von $G\alpha_s$ -XHS· AlF_4^- an Calmodulin-Sepharose nachgewiesen (Abb. 40 Spur 3), in Anwesenheit von 0,3 mM EGTA wurde jedoch ein Teil des $G\alpha_s$ retardiert (Daten nicht gezeigt).

In Wettbewerbsversuchen sollte die Spezifität der Interaktion näher charakterisiert werden. Die Bindung von $G\alpha_s$ -s4-XHS an Calmodulin-Sepharose fand nicht statt, wenn es in Anwesenheit von 1 μ M Calmodulin und AlF_4^- 1 h lang bei 16 °C inkubiert wurde, bevor es auf die Calmodulin-Sepharose gegeben wurde (Kompetition 1, Abb. 40 Spur 6). Jedoch konnte eine einmal erfolgte Bindung von AlF_4^- -aktiviertem $G\alpha_s$ -s4-XHS an die Calmodulin-Sepharose nicht nachträglich durch Inkubation mit 1 μ M Calmodulin kompetiert werden (Kompetition 2, Abb. 40 Spur 7).

Da die Interaktion von $G\alpha_s$ mit Calmodulin offenbar vom $G\alpha_s$ -Aktivierungszustand abhängig war, sollte geprüft werden, ob auch $GTP\gamma S$ -aktiviertes $G\alpha_s$ an Calmodulin-Sepharose binden kann. Die Konformationen dieser beiden Aktivierungszustände unterscheiden sich geringfügig, z.B. interagieren viele RGS-Proteine bevorzugt mit AlF_4^- -aktiviertem $G\alpha$, jedoch kaum mit $GTP\gamma S$ -aktiviertem $G\alpha$ (vgl. Kapitel 1.1.5). Im Falle des $G\alpha_s$ ist bekannt, dass es mit den RGS-Domänen von Axin und RGS-PX1 nur im AlF_4^- -aktivierten Zustand interagiert (Castellone 2005).

Es wurden 10 μ g $G\alpha_s$ -s4-XHS mit 5 mM $GTP\gamma S$ und 5 mM $MgCl_2$ in HED-Puffer (20 mM HEPES (pH 8,0), 1 mM EDTA, 1 mM DTT) für 10 min bei 30 °C und anschließend für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das so aktivierte $G\alpha_s$ wie oben beschrieben mit 20 μ L Calmodulin-Sepharose in 500 μ L Calmodulinbindungspuffer inkubiert, gewaschen und eluiert. $GTP\gamma S$ -aktiviertes $G\alpha_s$ -s4-XHS konnte nicht an der Calmodulin-Sepharose retardiert werden (Abb. 40 Spur 8).

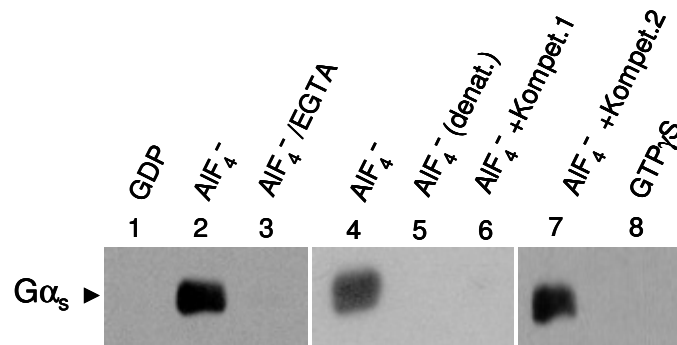


Abb. 40 Retardierung von AIF_4^- -aktiviertem $\text{G}\alpha_s$ -s4-XHS an Calmodulin-Sepharose. $\text{G}\alpha_s$ -s4-XHS wurde unter verschiedenen Bedingungen an Calmodulin-Sepharose gebunden, gewaschen und eluiert, Erläuterungen siehe Text. Die Eluate der Calmodulin-Sepharose wurden denaturiert, die enthaltenen Proteine elektrophoretisch getrennt, auf Nitrocellulose transferiert und $\text{G}\alpha_s$ immunchemisch nachgewiesen (Antikörper C-18, Santa Cruz).

Zusammenfassend ließ sich Folgendes feststellen:

- AIF_4^- -aktiviertes $\text{G}\alpha_s$ band an Calmodulin-Sepharose, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -aktiviertes hingegen nicht.
- Die Bindung war sehr affin, einmal immobilisiertes $\text{G}\alpha_s$ konnte selbst durch hohe Konzentrationen Calmodulin ($1\ \mu\text{M}$) nicht mehr verdrängt werden.
- Der Chelator EGTA verhinderte die Interaktion. Da EGTA sowohl Ca^{2+} als auch Al^{3+} komplexieren kann, war nicht eindeutig festzustellen, ob die Interaktion Ca^{2+} - und/oder Al^{3+} -abhängig war.

Daraus ergaben sich zwei mögliche Schlußfolgerungen:

1. AIF_4^- -aktiviertes $\text{G}\alpha_s$ besitzt eine Konformation, die in der Lage ist, Calmodulin zu binden. Diese Konformation unterscheidet sich von der des $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -aktivierten $\text{G}\alpha_s$, welches Calmodulin nicht binden kann. In diesem Fall kann Calmodulin $\text{G}\alpha_s$ in einem Stadium seines GTPase-Zyklus erkennen und hat möglicherweise Einfluß auf die GTP-Hydrolyse.
2. Calmodulin kann ebenfalls Al^{3+} binden und nimmt dadurch eine Konformation ein, die in der Lage ist, AIF_4^- -aktiviertes $\text{G}\alpha_s$ zu binden. Calmodulin ist ein sehr flexibles Molekül, Auswirkungen der Al^{3+} -Bindung auf seine Funktion bzw. Konformation wurden in der Literatur widersprüchlich (und auch nur im Hinblick auf seine Interaktion mit Phosphodiesterase) beschrieben (Siegel und Haug 1983; Kurita *et al.* 2005).

Um die Bedeutung der Interaktion von Calmodulin mit AIF_4^- -aktiviertem $\text{G}\alpha_s$ einschätzen zu können, wurde in Funktionsassays untersucht, ob sich die beiden Proteine auch funktionell beeinflussen.

5.5.7.1.2 Funktionelle Charakterisierung der Interaktion von $G\alpha_s$ und Calmodulin

Wenn Calmodulin bestimmte Übergangszustände im $G\alpha_s$ erkennt und sie stabilisiert, dann sollte dieser Einfluß in *Single-Turnover*-GTPase-Assays (siehe auch 4.4.6.4) messbar sein.

Hier für wurde das bereits in den Untersuchungen zur physischen Interaktion von $G\alpha_s$ und Calmodulin verwendete $G\alpha_s$ -s4-XHS eingesetzt. $G\alpha_s$ -s4-XHS wurde in Abwesenheit von Mg^{2+} mit $[\gamma^{32}P]$ -GTP beladen und die GTP-Hydrolyse durch Zugabe von Mg^{2+} gestartet. Die Hydrolyse wurde in An- oder Abwesenheit von 1 μ M Calmodulin / 10 mM $CaCl_2$ durchgeführt und zu definierten Zeitpunkten die Menge des bei der Hydrolyse freigesetzten $^{32}P_i$ bestimmt. In einer Reihe von Versuchen konnte kein Einfluß von Calmodulin auf die $G\alpha_s$ -katalysierte GTP-Hydrolyse festgestellt werden (Abb. 41 A).

Um festzustellen, ob Calmodulin an einem anderen Punkt des GTPase-Zyklus angreift (z.B. GDP-Dissoziation oder –Austausch), wurde auch die Fließgleichgewichtshydrolyse (*Steady-State*-GTPase) untersucht (4.4.6.5). $G\alpha_s$ -s4-XHS wurde mit $[\gamma^{32}P]$ -GTP in Mg^{2+} -haltigem Puffer in An- oder Abwesenheit von 1 μ M Calmodulin / 0,5 mM $CaCl_2$ inkubiert und zu definierten Zeitpunkten die Menge des bei der Hydrolyse freigesetzten $^{32}P_i$ bestimmt.

Auch hier wurde in einer Reihe von Versuchen kein Einfluß des Calmodulin auf die GTP-Hydrolyse festgestellt (Abb. 41 B). Es ist also davon auszugehen, dass die zweite der oben genannten Annahmen zutrifft: Calmodulin erkennt möglicherweise nicht die aktivierte Konformation des $G\alpha_s$, sondern nimmt vermutlich durch die Bindung von Al^{3+} eine Konformation ein, die $G\alpha_s$ bindet.

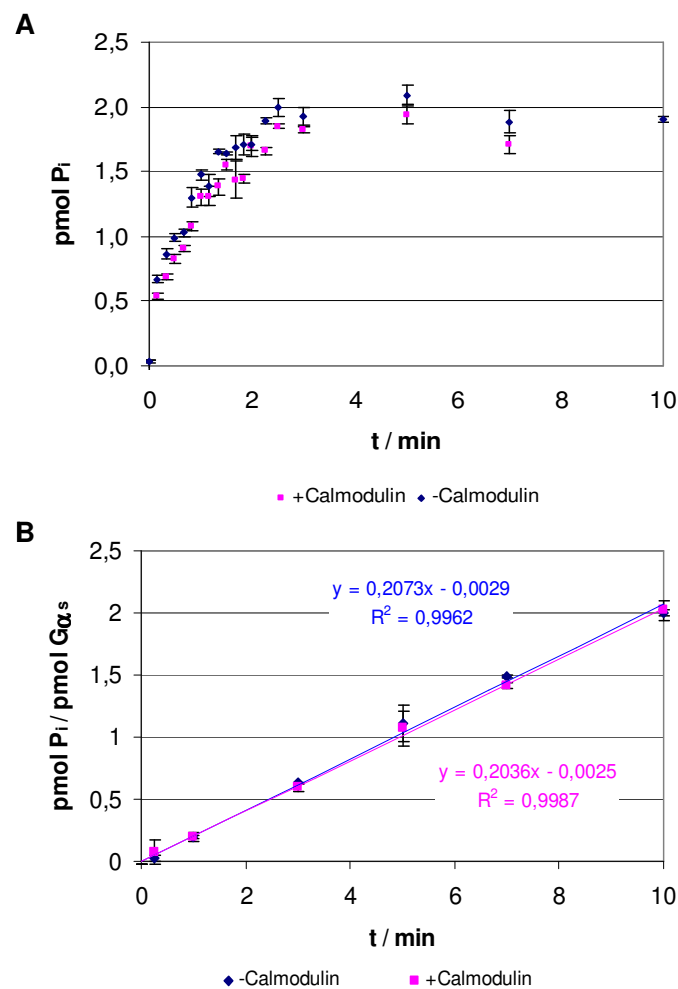


Abb. 41 Einfluß von Calmodulin auf die $G\alpha_s$ -katalysierte GTP-Hydrolyse. A *Single-Turnover-Assay*. $G\alpha_s$ -s4-XHS (50 nM) wurde in magnesiumfreiem Puffer mit $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ beladen. Durch Zugabe von MgCl_2 und einem Überschuß an nicht markiertem GTP wurde die Hydrolyse des an $G\alpha_s$ -s4-XHS gebundenen $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ gestartet. Die Reaktion wurde in An- und in Abwesenheit von 1 μM Calmodulin und 10 mM CaCl_2 im Hydrolyseschritt durchgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden definierte Volumina aus dem Reaktionsansatz entnommen und die Menge an bei der GTP-Hydrolyse freigesetztem $^{32}\text{P}_i$ bestimmt. **B *Steady-State-Assay*.** Es wurden 30 nM $G\alpha_s$ -s4-XHS in An- bzw. Abwesenheit von 1 μM Calmodulin und 0,5 mM CaCl_2 mit $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ in MgCl_2 -haltigem Puffer inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden definierte Volumina aus dem Reaktionsansatz entnommen und die Menge des bei der Hydrolyse freigesetzten $^{32}\text{P}_i$ bestimmt. Die Werte repräsentieren jeweils Doppelwerte einer Reaktion und sind repräsentativ für drei gleichartige Versuche.

5.5.7.2 Charakterisierung der Interaktion von $G\alpha_s$ und 14-3-3-Proteinen

Über die Tandem Affinity Purification wurden die drei 14-3-3-Isoformen β , γ und ζ als $G\alpha_s$ -Interaktionspartner identifiziert. In einem zweiten TAP-Experiment wurde diese Interaktion bestätigt, jedoch stammten die in diesem zweiten Experiment identifizierten Peptide aus Molekülbereichen, in denen alle drei Isoformen identische Sequenzen aufweisen, so dass aus diesem Experiment nicht hervorging, welche der drei Isoformen vorlag(en). Alle drei Isoformen wurden daher hinsichtlich der Interaktion mit $G\alpha_s$ charakterisiert.

14-3-3 β , 14-3-3 γ und 14-3-3 ζ wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* XL1 Blue-Zellen exprimiert und über Glutathion-Sepharose gereinigt (siehe 4.5.5). Das theoretische Molekulargewicht aller drei Proteine betrug 55 kDa. In den Eluaten der Glutathion-Sepharose konnten Proteine in diesem Molekulargewichtsbereich als Hauptbande dargestellt werden (siehe Abb. 42, Spuren E), ihre Identität als 14-3-3-Isoformen wurde immunchemisch bestätigt (Daten nicht gezeigt). Mit Leervektor transformierte *E. coli* XL1 Blue-Zellen wurden für Kontrollversuche auf gleiche Weise aufgearbeitet. Diese Glutathion-Sepharose-Eluate enthielten jedoch nur geringe Mengen Protein bei ca. 50 kDa (vgl. Abb. 42 Spur K-E), die mit einem gegen 14-3-3-Proteine gerichteten primären Antikörper immunchemisch nicht detektierbar waren (Daten nicht gezeigt).

Die Proteine wurden zunächst nicht eluiert, sondern auf der Sepharosematrix belassen („14-3-3-Glut-Sepharose“). Diese wurde in einem gleichen Volumen Waschpuffer resuspendiert und portionsweise eingefroren.

Um die Funktion der gereinigten 14-3-3-Proteine zu überprüfen, wurde ihre Dimerisierung mit einem ubiquitären Protein aus Säugerzellen, Raf1, nachgewiesen (Fu *et al.* 1994; Zhang *et al.* 1997). HEK293-Zellen (ca. 5×10^5) wurden in TAP-Lysispuffer lysiert (siehe 4.5.6) und jeweils 340 μg Protein (in 200 μL) mit 20 μL 14-3-3-Glut-Sepharosesuspension für 10 h bei 4 °C über Kopf schüttelnd inkubiert. Die 14-3-3-Glut-Sepharose wurde in 4 x 200 μL TAP-Lysispuffer gewaschen und anschließend in 50 μL SDS-Probenpuffer auf 95 °C erhitzt. Die in den Waschfraktionen enthaltenen Proteine wurden mit TCA präzipitiert und die Sedimente in 30 μL SDS-Probenpuffer bei 95 °C solubilisiert. Die enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch getrennt, auf Nitrozellulose transferiert und Raf-1 immunchemisch detektiert (Abb. 43).

Alle drei 14-3-3-Isoformen waren in der Lage, Raf-1 aus HEK293-Lysaten zu binden.

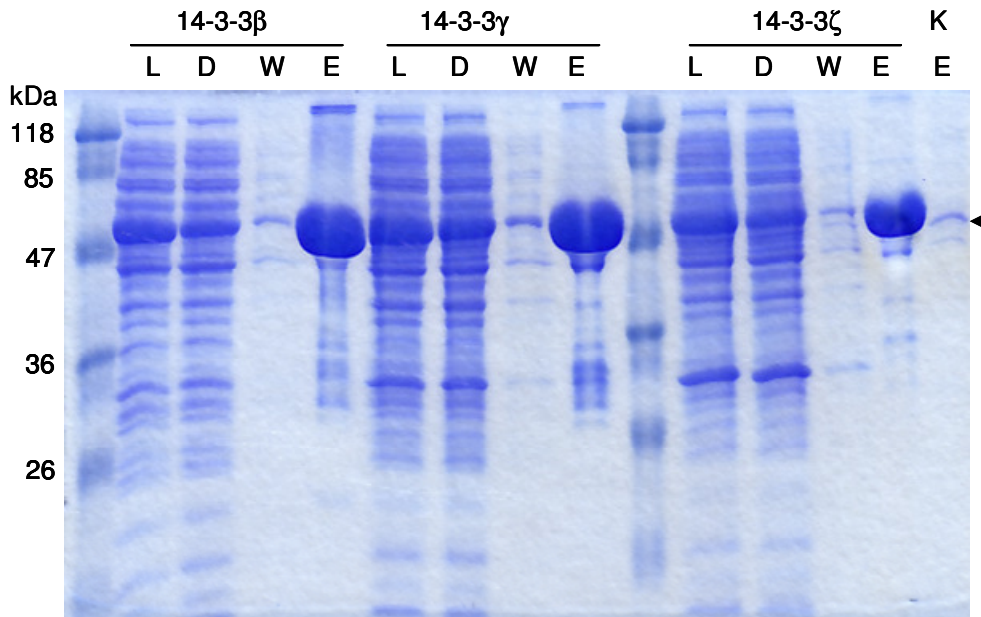


Abb. 42 Reinigung von 14-3-3 β , γ und ζ über Glutathion-Sepharose. Die drei 14-3-3-Isoformen wurden in jeweils 1 L *E. coli* XL1 Blue exprimiert und über 1 mL Glutathion-Sepharose gereinigt. Zellsedimente einer 1 L-Kultur wurden in 10 mL Lysispuffer (50 mM HEPES (pH 7,8), 50 mM NaCl, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) lysiert und die Lysate mit jeweils 1 mL in Lysispuffer äquilibrierter Glutathion-Sepharose für 2 h über Kopf schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose mit jeweils 10 mL Waschpuffer (50 mM Na-HEPES (pH 7,8), 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 20 % (v/v) Glycerol) gewaschen. Jeweils 15 μ L der Fraktionen sowie 10 μ L der Säulenmatrix nach den Waschungen wurden denaturiert, die Proteine elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie Blue visualisiert. Der Pfeil deutet die erwartete Position der 14-3-3-Fusionsproteine im Gel an. L = Lysat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, E = Eluat. K = Kontroll-Reinigung aus *E. coli* XL1 Blue, die mit Leervektor transformiert worden waren (siehe Fußnote 9).

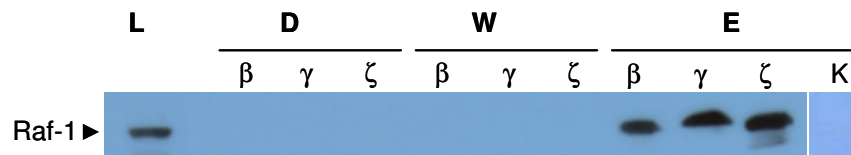


Abb. 43 Funktionsnachweis der 14-3-3-Proteine. 14-3-3 β -, 14-3-3 γ - und 14-3-3 ζ -GST-Sepharose wurden mit HEK293-Lysat (jeweils 340 μ g Protein) inkubiert, gewaschen und durch Inkubation mit 30 μ L SDS-Probenpuffer bei 95 °C eluiert. Die Proteine der Waschfraktionen wurden durch TCA-Fällung präzipitiert und ebenfalls in 30 μ L SDS-Probenpuffer denaturiert. Jeweils 16 μ L jeder Probe wurden elektrophoretisch getrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit Raf-1-spezifischem Antikörper (C-12, Santa Cruz) immunchemisch detektiert. L = HEK293-Lysat (20 μ g), D = Durchlauf, W = Waschfraktion, E = Eluat. K = GST-Sepharose ohne immobilisiertes 14-3-3.

5.5.7.2.1 Nachweis der Interaktion mit isolierten Komponenten

Für diese Versuche wurden die 14-3-3-Isoformen mit 10 mM Glutathion in 50 mM Na-HEPES (pH 7,8), 2 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT von 20 μ L Glutathion-Sepharose eluiert und gegen 2x300 mL desselben Puffers ohne Glutathion dialysiert. Anschließend wurden 160 pmol 14-3-3 mit 16 pmol gereinigtem $G\alpha_s$ -s4-XHS in Anwesenheit von GDP bzw. AlF_4^- in 500 μ L Inkubationspuffer (50 mM Na-HEPES (pH 7,8), 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 μ M GDP) inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden anschließend über das GST-tag der 14-3-3-Proteine an Glutathion-Sepharose gebunden. Die 14-3-3-Glut-Sepharose wurde 5x mit je 200 μ L Inkubationspuffer gewaschen, die immobilisierten Proteine durch Inkubation in SDS-Probenpuffer bei 95 °C denaturiert und immunchemisch analysiert. In Abb. 44 ist der Versuch beispielhaft mit 14-3-3 β dargestellt, die anderen 14-3-3-GST-Fusionsproteine verhielten sich analog.



Abb. 44 Interaktion von 14-3-3 β mit gereinigtem $G\alpha_s$ -s4-XHS (Immunchemische Detektion). 14-3-3-GST und $G\alpha_s$ -s4-XHS wurden in Lösung inkubiert und 14-3-3 β -GST anschließend an Glutathion-Sepharose immobilisiert, gewaschen und durch Inkubation in SDS-Probenpuffer bei 95 °C eluiert. 16 μ L jeder Fraktion wurden denaturiert, die enthaltenen Proteine elektrophoretisch getrennt, auf Nitrozellulose transferiert und anschließend mit Antikörpern gegen $G\alpha_s$ (C-18) und 14-3-3 (K-19) detektiert (Pfeile).

$G\alpha_s$ wurde vor allem im Durchlauf und im ersten Wasch-Schritt detektiert (Spuren D und W1). Im Eluat (Spur E) beider Ansätze wurde ein sehr schwaches $G\alpha_s$ -spezifisches Immunsignal detektiert. Dies widerspricht den in den TAP-Experimenten gezeigten Ergebnissen, denen zufolge die Interaktion nur mit AlF_4^- -aktiviertem $G\alpha_s$ nachzuweisen war. In einem weiteren Versuch, der hier nicht dargestellt ist, konnte jedoch gezeigt werden, dass das schwache $G\alpha_s$ -Immunsignal auf $G\alpha_s$ -Formen zurückzuführen ist, die nicht mit Glutathion sondern nur durch Inkubation mit SDS-Probenpuffer bei 95 °C eluierbar sind. Daher ist davon auszugehen, dass möglicherweise inaktives oder denaturiertes $G\alpha_s$ an 14-3-3 β gebunden hatte.

Die im Durchlauf detektierte Bande von 14-3-3 β ist schwer zu erklären. Auf eine Überschreitung der Glutathion-Sepharose-Bindungskapazität ist sie nicht zurückzuführen, da immobilisiertes 14-3-3 β vor dem Versuch eluiert wurde und die anschließend zur erneuten Immobilisierung eingesetzte Menge der Glutathion-Sepharose ausreichend groß gewählt wurde. Eine mögliche Erklärung wäre eine Dimerisierung des 14-3-3 in Lösung, durch die die

Bindung an die Glutathion-Sepharose gehindert werden kann. Auch eine Interaktion von $G\alpha_s$ mit der GST-Domäne des 14-3-3-Fusionsproteins, die die Bindung des 14-3-3-GST an Glutathion-Sepharose verhindert, ist denkbar. Aus der Literatur ist jedoch keine Interaktion von $G\alpha_s$ mit Glutathion-S-Transferase bekannt.

5.5.7.2.2 Interaktion von 14-3-3 mit $G\alpha_s$ aus Säugerzellen

14-3-3-Proteine erkennen und binden oftmals Phosphoserinmotive auf Zielproteinen. Die Interaktion der 14-3-3-Proteine mit bakteriell exprimiertem $G\alpha_s$ könnte möglicherweise dadurch verhindert worden sein, dass in *E. coli* keine korrekte posttranslationale Modifikation, d.h. Phosphorylierung, von $G\alpha_s$ stattfand. Daher wurde $G\alpha_s$ -HA in HEK293 exprimiert und die Zellen anschließend durch sequentielles Einfrieren und Auftauen lysiert (Puffer: 10 mM HEPES (pH 8,0), 150 mM NaCl, 10 μ M GDP, 5 mM $MgCl_2$, 30 μ M $AlCl_3$, 10 mM NaF, 0,1 % $C_{12}E_{10}$, Protease-Inhibitoren). Die Lysate wurden in Anwesenheit von AlF_4^- mit 14-3-3-Glut-Sepharose für 7 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Als Kontrolle diente Glutathionsepharose, an der kein 14-3-3-Protein immobilisiert war⁹. Die Sepharose wurde wie in Abschnitt 5.5.7.2.1 beschrieben gewaschen und durch Inkubation mit SDS-Probenpuffer bei 95 °C eluiert. Die Fraktionen wurden mit TCA gefällt, elektrophoretisch getrennt und $G\alpha_s$ immunchemisch nachgewiesen.

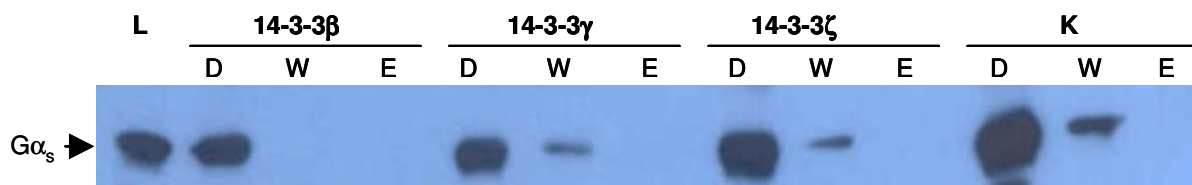


Abb. 45 Interaktion von 14-3-3-Isoformen mit $G\alpha_s$ -HA aus HEK293-Zellen (Immunchemische Detektion). HEK293-Zellen (5×10^5 Zellen) wurden mit dem Plasmid $G\alpha_s$ -HA/pCDNA3 transfiziert und die Lysate dieser Zellen (500 μ g Protein) mit 20 μ L 14-3-3 β -, - γ -, - ζ - bzw. K-Glut-Sepharose inkubiert. Die Sepharose wurde gewaschen und durch Inkubation mit SDS-Probenpuffer bei 95 °C eluiert. Nach elektrophoretischer Trennung der Proteine wurde $G\alpha_s$ immunchemisch nachgewiesen (C-18).

Es konnte jedoch kein $G\alpha_s$ -Immunsignal in den Eluaten dargestellt werden. Eine direkte Interaktion von 14-3-3-Proteinen mit $G\alpha_s$ war somit auszuschließen.

⁹ Nicht transfizierte *E. coli* XL1 Blue-Zellen wurden lysiert und dieses Lysat („Kontroll-Lysat“) wie für eine Reinigung über Glutathion-Sepharose gegeben. Diese Glutathion-Sepharose („14-3-3-K-Glut-Sepharose“) wurde derselben Reinigungsprozedur unterzogen wie jene, auf denen die 14-3-3-Isoformen immobilisiert waren und diente als Negativkontrolle für die *pull-down*-Experimente.

5.5.8 Zusammenfassung

Für die Charakterisierung neuer $G\alpha_s$ -Interaktionspartner mit der *in vivo*-Methode wurde die *Tandem Affinity Purification* (TAP) gewählt. $G\alpha_s$ -TAP-Fusionsproteine wurden heterolog in Säugerzellen exprimiert und waren in der Lage, nach Rezeptorstimulation die Adenylylcyclase zu stimulieren (vgl. Abb. 33). Auch die Heterotrimerbildung mit $G\beta\gamma$ konnte gezeigt werden (vgl. Abb. 34). Die TAP-Fusionsproteine wurden daher als funktional angesehen und zur Charakterisierung von neuen $G\alpha_s$ -Interaktionspartnern in TAP-Experimenten eingesetzt. In zwei Ansätzen wurden 39 Proteine erfasst, die entweder mit $G\alpha_s$ im Grundzustand ($G\alpha_s$ ·GDP) oder im aktivierten Zustand ($G\alpha_s$ ·GDP· AlF_4^-) interagieren (vgl. Tabelle 25 und Tabelle 29). Von den 10 mit $G\alpha_s$ ·GDP und den 29 mit $G\alpha_s$ ·GDP· AlF_4^- interagierenden Proteinen wurden $G\gamma_{10}$, $G\gamma_{12}$, Calmodulin sowie 14-3-3 β , 14-3-3 γ und 14-3-3 ζ ausgewählt und ihre Wechselwirkungen mit $G\alpha_s$ näher untersucht.

Es wurde folgendes gezeigt:

1. Heterotrimere von $G\alpha_s$ ·GDP und $G\beta_1$ mit $G\gamma_{10}$ bzw. $G\gamma_{12}$ wurden in reziproken *pull down*-Versuchen über Affinitätsreinigung dargestellt und waren vergleichbar mit $G\alpha_s\beta_1\gamma_2$ -Heterotrimeren (vgl. Abb. 39).
2. AlF_4^- -aktiviertes $G\alpha_s$ interagiert mit Calmodulin, wie ebenfalls in reziproken *pull down*-Versuchen dargestellt wurde (vgl. Abb. 40). In Anwesenheit von EGTA bzw. bei Konkurrenz mit Calmodulin fand die Interaktion nicht statt. Ein funktioneller Einfluß von Calmodulin auf die $G\alpha_s$ -katalysierte GTP-Hydrolyse (vgl. Abb. 41) bzw. ein Einfluß von $G\alpha_s$ auf die Calmodulin-Funktion (Daten nicht gezeigt) wurde nicht festgestellt.
3. Die 14-3-3-Isoformen β , γ und ζ wurden in unabhängigen TAP-Experimenten als Interaktionspartner von $G\alpha_s$ ·GDP· AlF_4^- identifiziert. Diese Interaktion wurde in verschiedenen reziproken *pull down*-Versuchen nicht bestätigt (vgl. Abb. 44 und Abb. 45).

6 Diskussion

Für $G\alpha_s$ waren lange Zeit nur Interaktionspartner der klassischen Signaltransduktionskaskade ($G\beta\gamma$, Adenylylcyclase), Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ in Skelettmuskeln (Mattera *et al.* 1989; Hamilton *et al.* 1991) und Na^+ -Kanäle im Herzen (Schubert *et al.* 1989) bekannt. Neuartige $G\alpha_s$ -spezifische Effektoren konnten lediglich für einzelne zelluläre Prozesse (Adipogenese, Apoptose) und erst nach langjähriger gezielter Suche beschrieben werden (Tyrosinkinasen der Src-Familie, Wang und Malbon 1999, Gu, C. *et al.* 2000; Ma *et al.* 2000; Ma und Huang 2002). Einige der mit $G\alpha_s$ interagierenden Proteine wurden erst im Zeitraum der hier vorgestellten Arbeit identifiziert (z.B. Ric-8B, Tall *et al.* 2003) und sind teilweise noch nicht in verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt worden (z.B. *G α interacting vesicle associated protein* (GIV), Le-Niculescu *et al.* 2005; *cysteine string protein* (CSP), Natochin *et al.* 2005). Während für andere $G\alpha$ -Proteine im Laufe der Zeit eine Vielzahl neuer Effektoren und Regulatoren beschrieben wurden, blieb die Anzahl der für $G\alpha_s$ beschriebenen Interaktionspartner überschaubar. Regulatoren der GTPase-Aktivität des $G\alpha_s$ (wie z.B. RGS-Proteine) oder spleißvariantenspezifische Interaktionspartner sind bis heute nicht bekannt. Die Charakterisierung neuer Interaktionspartner des $G\alpha_s$ ist vor allem auch vor dem Hintergrund gewebespezifischer bzw. alternativer Signalwege von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit sollten bisher unbekannte $G\alpha_s$ -Interaktionspartner charakterisiert werden. Dafür wurden zwei auf Affinitäts-Reinigung basierende Verfahren angewandt, um $G\alpha_s$ -enthaltende Proteinkomplexe aus Säugerzell-Lysaten zu isolieren und zu analysieren (*XHS-pulldown* und *Tandem-Affinity Purification*). In Funktionsassays mit gereinigten Proteinen sollte anschließend der Einfluß der neuen Interaktionspartner auf die $G\alpha_s$ -Funktion und $G\alpha_s$ -vermittelte Signaltransduktion näher untersucht werden.

Die in dieser Arbeit etablierten Verfahren wurden mit der $G\alpha_s$ -Spleißvariante s4 durchgeführt. Im Hinblick auf weiterführende Versuche wurden jedoch alle Versuche, Mutanten etc. unter dem Gesichtspunkt erarbeitet, auch spleißvariantenspezifisch interagierende Proteine untersuchen zu können.

6.1 Reinigung von $G\alpha_s$

Zur funktionellen Charakterisierung der Wechselwirkungen von $G\alpha_s$ mit neuen Interaktionspartnern wurde $G\alpha_s$ in gereinigter Form benötigt und sowohl in wildtypischer als auch epitopmarkierter Form hergestellt. Epitopmarkiertes $G\alpha_s$ kann im Allgemeinen

wesentlich leichter und schneller gereinigt werden als wildtypisches $G\alpha_s$, dessen Reinigungsprozedur vier Chromatographieschritte umfasst (vgl. 4.5.2). Da ein Einfluß der Affinitätsepitope auf die Wechselwirkungen von $G\alpha_s$ mit neuen Interaktionspartnern jedoch nicht völlig auszuschließen war, sollte zusätzlich auch wildtypisches $G\alpha_s$ eingesetzt werden. Es wurden zunächst Maus-Orthologe von $G\alpha_s$ -s4 verwendet, da ein Teil der Versuche zur Charakterisierung der Interaktionspartner im Maus-System durchgeführt werden sollte.

Für die Reinigung des unmodifizierten Maus- $G\alpha_s$ -s4 wurden die schon für das Rind-Ortholog beschriebenen Methoden angewandt (Graziano *et al.* 1991, Lee *et al.* 1994). Während der Arbeit zeigte sich jedoch, dass heterolog in *E.coli* exprimiertes unmodifiziertes Maus- $G\alpha_s$ -s4 mit diesen Methoden nicht gereinigt werden konnte (vgl. z.B. Tabelle 22). Laut Graziano (Graziano *et al.* 1991) und auch Lee (Lee *et al.* 1994) sind die kritischen Schritte der Reinigung die von der Zell-Lyse bis zur Elution der Phenylsepharosesäule, danach soll das Protein für mehrere Tage bei 4°C stabil sein. Diese Beobachtung konnte nicht bestätigt werden. Die GTP γ S-Bindungsaktivität des $G\alpha_s$ -s4 nahm auch nach diesem Chromatographie-Schritt erheblich ab (vgl. Abb. 18 B). Möglicherweise sind die in dieser Arbeit verwendeten Maus-Orthologe (generiert aus der cDNA der S49-Zelllinie) weniger stabil als die von Lee und auch Graziano verwendeten bovinen Orthologen von $G\alpha_s$, d.h. sie unterliegen möglicherweise einer höheren Abbaurate bzw. sind thermisch wesentlich instabiler als das Rind-Ortholog. Die Ursache dafür ist jedoch unklar, da sich beide Orthologe nur in drei Aminosäuren unterscheiden.

Die Verwendung von Affinitäts-*tags* für die Anreicherung von Maus- $G\alpha_s$ -s4 war demnach unerlässlich. Um Beeinträchtigungen der funktionellen Charakterisierung durch die Affinitäts-*tags* erkennen zu können, wurden verschieden modifizierte $G\alpha_s$ -Mutanten hergestellt, die bei Bedarf alternativ in den Funktionsassays zum Einsatz kommen sollten.

6.1.1 Verwendung von internen Affinitäts-*tags*

Die Insertion von Affinitäts-*tags* in die Aminosäuresequenz eines Proteins ist risikobehaftet, da die zusätzlichen Aminosäuren leicht die katalytische Aktivität oder intermolekulare Wechselwirkungen des betreffenden Proteins beeinträchtigen können. Im Falle des $G\alpha_s$ sind N- und C-Terminus Interaktionsstellen mit Rezeptoren bzw. $G\beta\gamma$ sowie der Plasmamembran, so dass eine geeignete interne Insertionsstelle das geringste Risiko zur Beeinträchtigung intermolekularer Wechselwirkungen birgt. Bei der Auswahl der Insertionsstelle musste desweiteren beachtet werden, dass die katalytische Aktivität des $G\alpha_s$ erhalten bleibt und das *tag* ausreichend exponiert ist, um eine gute Reinigung über die Affinitätsmatrix zu gewährleisten. Die Exon3-Region des $G\alpha_s$ erfüllte alle diese Kriterien, es ist dies die Molekülregion, in der sich die bei alternativen Spleißprozessen entstehenden vier $G\alpha_s$ -

Spleißvarianten unterscheiden (Exon 3 = Aminosäuren 72-86 in $G\alpha_s$ -I1, Aminosäuren 72-87 in $G\alpha_s$ -I2, vgl. Abb. 4). Die Fähigkeit der Exon3-Region zur Aufnahme zusätzlicher Aminosäuren ohne Funktionsverlust des $G\alpha_s$ lässt auf eine besondere strukturelle Flexibilität dieser Region schließen. Selbst große Insertionen wie z.B. GFP beeinträchtigen die Funktionalität nicht (Yu und Rasenick 2002, Hynes *et al.* 2004). Eine Studie von Sheridan und Mitarbeitern war darauf ausgerichtet, in einem Transposon-basierten Ansatz Insertionsstellen für GFP in $G\alpha_s$ zu identifizieren. Nur zwei Insertionen führten zu funktionalen Fusionsproteinen: zwischen Aminosäuren 18 und 20 sowie zwischen Aminosäuren 92 und 94 (d.h. nur 6 Aminosäuren C-terminal der Exon3-Region in $G\alpha_s$ -I1, Sheridan *et al.* 2002). Die erste Insertionsstelle lag innerhalb der N-terminalen $G\beta\gamma$ - und Rezeptorinteraktionsregion und könnte folglich diese Wechselwirkungen sowie die Membranlokalisation des $G\alpha_s$ beeinträchtigen. Die zweite befand sich nur 6 Aminosäuren C-terminal der Exon3-Region. Die in dieser Arbeit etablierten Verfahren wurden allerdings unter dem Gesichtspunkt erarbeitet, auch spleißvariantenspezifische Interaktionspartner charakterisieren zu können. Die Verwendung der Exon3-Region als Insertionsstelle kam daher nicht in Frage, obwohl eine entsprechende Mutante bereits existiert („ $G\alpha_s$ -sHis“, siehe auch Kleuss und Gilman 1997).

Die Insertionsstelle für $G\alpha_s$ wurde in Strukturvergleichen mit $G\alpha_i$ und dessen Hefe-Ortholog GPA1 ermittelt. GPA1 enthält im Vergleich zu $G\alpha_i$ eine 110 Aminosäuren lange Insertion im N-terminalen Drittel des Moleküls (vgl. 5.1.2, Nakafuku *et al.* 1987). Ein von Kozasa und Mitarbeitern entwickeltes, an dieser Stelle intern His₆-modifiziertes $G\alpha_i$ zeigte keine Einflüsse der zusätzlichen Aminosäuren auf Expression, Aktivität oder Wechselwirkungen mit anderen Proteinen (Kozasa und Gilman 1995). Aufgrund der Strukturähnlichkeit von $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ war anzunehmen, dass eine Insertion an der äquivalenten Stelle im $G\alpha_s$ dessen Funktionalität nicht beeinträchtigen würde (Abb. 46).

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit zeigte jedoch, dass $G\alpha_s$ -s4yHis nur sehr schlecht in *E.coli* BL21(DE3)/pREP4 exprimiert wurde. Obwohl in Lysaten und Eluatn der Ni-NTA-Agarose $G\alpha_s$ -spezifische Immunsignale detektiert wurden, lag die Menge des aus 5 L Kultur gereinigten $G\alpha_s$ -s4yHis unterhalb der Nachweisgrenze von Ponceau S. Verluste während der Reinigung traten bei der Beladung der Affinitätsmatrix auf (vgl. Abb. 17 C Spur D) und waren etwas höher als bei vergleichbaren Reinigungen von C-terminal His₆-markiertem $G\alpha_s$ (Daten nicht gezeigt). Sie allein konnten jedoch die schlechte Ausbeute nicht erklären. Vielmehr können die Ursachen beispielsweise auch darin liegen, dass das His₆-tag nicht ausreichend exponiert war, weil a) die Exposition des tag an der gewählten Stelle nicht ausreichte oder b) $G\alpha_s$ -s4yHis zu großen Teilen generell nicht korrekt gefaltet wurde und das tag deshalb nicht an der Moleküloberfläche lag. Im Zusammenhang mit der schlechten

Expressionsrate ist anzunehmen, dass $G\alpha_s$ -s4yHis möglicherweise von *E.coli* nicht richtig gefaltet werden konnte.

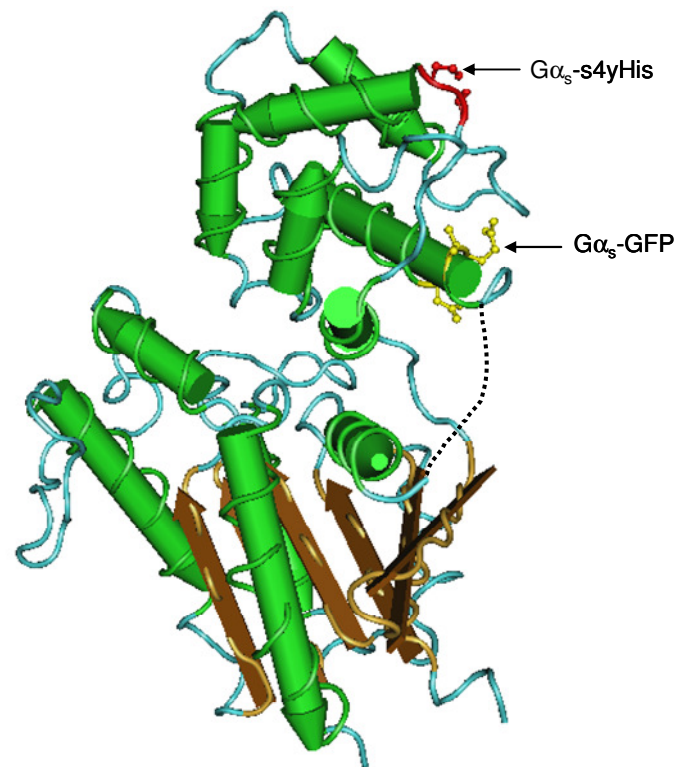


Abb. 46 Kristallstruktur des $G\alpha_s$ (pdb-Datenbankeintrag 1azt). $G\alpha_s$ ist aus zwei Domänen (helicale und GTPase-Domäne) aufgebaut. Die helicale Domäne des $G\alpha_s$ befindet sich oben, die GTPase-Domäne unten im Bild. Die Insertionsstelle für His₆ ($G\alpha_s$ -s4yHis) ist rot, die für GFP ($G\alpha_s$ -GFP, Sheridan *et al.*) ist gelb markiert. Die in dieser Arbeit benutzte Insertionsstelle für das His₆-tag befindet sich an exponierter Stelle in der Nähe der von Sheridan und Mitarbeitern beschriebene Insertionsstelle für GFP. Die Exon3-Region ist in der Kristallstruktur nicht aufgelöst, sie befindet sich N-terminal zur von Sheridan beschriebenen GFP-Insertionsstelle (gestrichelte Linie).

Die Expressionsrate von Proteinen ist unter anderem abhängig von der Menge der gebildeten mRNA, der speziesspezifischen Kodon-Verwendung bei der Translation, der korrekten Faltung der Proteine sowie deren Abbaurate. Die schlechte Expression von $G\alpha_s$ -s4yHis könnte also auf instabile mRNA, die Verwendung von nicht-kodonoptimierter cDNA, höhere Abbauraten von $G\alpha_s$ -s4yHis im Vergleich zu anderen $G\alpha_s$ -Varianten oder aber auf Speziesunterschiede zurückzuführen sein. Promotor- und Terminatorbereiche auf den für die Expression eingesetzten Plasmiden waren in beiden Fällen identisch und kamen somit als Ursache nicht in Frage.

Die kodierende DNA des nicht His₆-modifizierten Kontroll-Proteins CK34 war kodon-optimiert und kodierte das Rind-Ortholog, während die kodierende DNA des $G\alpha_s$ -s4yHis nicht kodon-optimiert war und das Maus-Ortholog kodierte. Da die Aminosäureunterschiede zwischen Maus- und Rind-Ortholog aber nur gering sind, lassen sich die teilweise beachtlichen Unterschiede in den Expressionsraten möglicherweise auf höhere Abbauraten

des Maus-Proteins oder aber auf Unterschiede in den mRNA-Sekundärstrukturen der Rind- und der Maus-Varianten zurückführen, die somit die Translation von $G\alpha_s$ -s4yHis beeinträchtigen. Die mRNA-Level von $G\alpha_s$ -s4yHis und auch die Halbwertszeiten verschiedener $G\alpha_s$ -Varianten wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Sheridan und Mitarbeitern haben beobachtet, dass intern modifizierte $G\alpha_s$ -Mutanten mitunter schlechter exprimiert werden als terminal modifizierte (Sheridan *et al.* 2002). In späteren Experimenten konnte dies auch für Varianten des Rind- $G\alpha_s$ festgestellt werden, die in unserer Arbeitsgruppe hergestellt wurden und am „yHis“-Ort (Wirtz, Diplomarbeit) oder anderer Stelle (Maurischat, S., Praktikumsarbeit) ein internes Affinitätsepitop trugen.

Die genaue Ursache der schlechten Expression konnte im Falle von $G\alpha_s$ -s4yHis nicht genau identifiziert werden, jedoch ist davon auszugehen, dass sowohl das interne His₆-tag als auch die Spezies (Maus) Einfluß hatten.

6.1.2 Verwendung von Terminalen Affinitäts-tags

Zusätzlich zu intern affinitätsmodifizierten $G\alpha_s$ -Mutanten wurde in dieser Arbeit eine C-terminal His₆-modifizierte Mutante von Maus- $G\alpha_s$ -s4 hergestellt und gereinigt, die zur funktionellen Charakterisierung von $G\alpha_s$ -Interaktionspartnern eingesetzt werden sollte. Auch wenn durch das His₆-Epitop möglicherweise Wechselwirkungen von Proteinen mit dem $G\alpha_s$ -C-Terminus gestört werden, so sollten doch sehr aussichtsreiche Kandidaten wie z.B. spleißvariantenspezifische, RGS- oder mit der $G\alpha_s$ -Lipidmodifikation interagierende Proteine davon nicht beeinträchtigt werden.

Das C-terminal His₆-modifizierte Maus- $G\alpha_s$ -s4 wurde gut in *E.coli* BL21(DE3)/pREP4 exprimiert und konnte über Ni-NTA-Agarose angereichert werden (vgl. Abb. 12 A Spur E). Die Anreicherung von Maus- $G\alpha_s$ -s4-CH über Ni-NTA-Agarose reichte jedoch nicht aus, um dieses Protein als Hauptkomponente des Eluates darzustellen, daher wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt über Hydroxylapatit (HTP) durchgeführt (vgl. Abb. 12 A und B). Dieses Material hat laut Graziano *et al.* 1991 die besten Trenneigenschaften für $G\alpha_s$. Allerdings eluierte Maus- $G\alpha_s$ -s4-CH über einen weiten Bereich des Phosphatgradienten von der HTP-Säule und nicht in einem scharfen Peak wie von Graziano beschrieben wurde. Insgesamt konnten nur 0,94 nmol aktivierbares Maus- $G\alpha_s$ -s4-CH aus einem Kulturvolumen von 10 L gereinigt werden (vgl. 5.1.1). Für C-terminal His₆-modifiziertes $G\alpha_s$ wurden ebenfalls, wie schon für $G\alpha_s$ -s4yHis besprochen (Abschnitt 6.1.1), unterschiedliche Expressionsraten für Maus- und Rind-Orthologe beobachtet. Im Vergleich zu Maus- $G\alpha_s$ -s4-CH wurde das C-terminal His₆-modifizierte Rind-Ortholog CK34CH besser exprimiert und die Reinigung über Ni-NTA war ausreichend, um CK34CH als Hauptbande im Ni-NTA-Eluat darzustellen (vgl.

z.B. Abb. 17 A Spur E2). Aus einem Kulturvolumen von 10 L konnten 162 nmol aktivierbares CK34CH gereinigt werden (ibd.).

Möglicherweise korreliert in diesem Fall die Expressionsrate mit den veränderten Trenneigenschaften: Das deutlich besser exprimierte Rind-Ortholog (CK34CH) konnte wesentlich leichter als Hauptprotein der Ni-NTA-Agarose eluiert werden, zeigte eine geringere Anzahl und Menge koeluierender Proteine und bedurfte keiner weiteren Reinigungsschritte.

Abweichend von dem in der Zielsetzung formulierten Vorgehen konnte die Charakterisierung von $G\alpha_s$ -Interaktionspartnern demnach nicht im reinen Maus-System durchgeführt werden. Diese Tatsache war jedoch nur für die Charakterisierung der Interaktion mit murinem RGS-PX1 relevant (s. dort).

6.1.3 Schlußfolgerungen

Die Expressionsraten von Proteinen lassen sich selbst bei hoher Sequenzähnlichkeit der betrachteten Proteine nur schwer prognostizieren. Im Falle von $G\alpha_s$ -s4 unterscheiden sich Maus- und Rind-Ortholog nur in drei Aminosäuren, dennoch wurde sowohl bei wildtypischen als auch bei C-terminal und intern epitopmarkiertem $G\alpha_s$ -s4 eine deutlich schwächere Expression des Maus-Orthologen festgestellt. Da die verwendeten Expressionsstämme, Vektoren sowie die Klonierungsstelle im Vektor jeweils identisch waren, konnten die Unterschiede nur in der Nukleinsäurestruktur oder in den Proteinen selbst begründet liegen. Folgende Punkte können – wie ausführlich in den Abschnitten 6.1.1 und 6.1.2 besprochen wurde – einzeln oder in Kombination für die unterschiedlichen Mengen an exprimiertem Protein verantwortlich sein:

- unterschiedliche mRNA-Level
- die speziesspezifische Verwendung von Kodons und der damit verbundene Einfluß auf die Translationsgeschwindigkeit
- das Vorhandensein von Sekundärstrukturen in der mRNA und die damit verbundene Verringerung der Translationsgeschwindigkeit
- die (speziesspezifische) Abhängigkeit der Proteinfaltung von der Anwesenheit bestimmter Faltungshelfer
- die Abbaurate bzw. Halbwertszeit von Proteinen.

Die DNA des bovinen $G\alpha_s$ -Orthologs war im Gegensatz zum Maus-Ortholog für die Expression in *E.coli* kodonoptimiert, so dass vermutlich eine schnellere Translation für die höheren Proteinlevel des bovinen Orthologs verantwortlich ist. Die mRNA-Level selbst oder mögliche mRNA-Sekundärstrukturen wurden nicht näher untersucht. Aus der Literatur ist

auch nicht bekannt, dass Maus-G α_s während der Expression bestimmte Faltungshelfer benötigt oder anderweitig stabilisiert werden muß.

Die Platzierung von Affinitätsepitopen hatte ebenfalls Einfluß auf die Expressionsrate von G α_s . Die schlechte Expression des Maus-G α_s -s4 wurde weiter reduziert, wenn ein internes His₆-tag eingefügt wurde (vgl. Tabelle 22). Selbst die sehr gute Expressionsrate von bovinem G α_s -s4 wurde reduziert, wenn an dieser (Wirtz, Diplomarbeit) oder anderer Stelle (Maurischat, S., Praktikumsarbeit, persönliche Mitteilung) ein internes Affinitätsepitop eingefügt wurde.

6.2 Charakterisierung G α_s -spezifischer Interaktionspartner

Eine Reihe von Daten aus der Literatur zeigt, dass G α_s oft als Bestandteil größerer Proteinkomplexe innerhalb der Zelle vorliegt, deren Zusammensetzung jedoch nicht immer näher charakterisiert wurde (Mollner *et al.* 1992; Negishi *et al.* 1992; Ferreira *et al.* 1999; Balijepalli *et al.* 2006). Eine systematische Suche nach G α_s -Interaktionspartnern wurde unter Verwendung der *yeast-two-hybrid*-Methode vorgenommen (Klattenhoff *et al.* 2003; Tall *et al.* 2003), mit der lediglich ein einziges Protein (Ric-8B/Synembryn) identifiziert wurde. Der geringe Erfolg dieser Methode gab Anlaß zu der Annahme, dass der Nachweis direkter Protein-Protein-Wechselwirkungen im Falle des G α_s besser zur Identifizierung neuer Interaktionspartner geeignet ist. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene, auf der Affinitätsreinigung von Proteinkomplexen basierende Verfahren verwendet, mit denen G α_s -interagierende Proteine dargestellt werden konnten (vgl. Abb. 23).

Die Charakterisierung der Interaktionspartner erfolgte mit dem Schwerpunkt auf konformationsselektive, d.h. in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand des G α_s stattfindende Wechselwirkungen. Die Wahrscheinlichkeit, einen an der G α_s -Signaltransduktion beteiligten Interaktionspartner zu identifizieren, ist höher, wenn das betreffende Protein mit G α_s *entweder* im Grundzustand *oder* im aktivierten Zustand interagiert. Proteine, die mit G α_s unabhängig von dessen Aktivierungszustand interagieren, sind in diesem Ansatz von solchen, die unspezifisch mit der Matrix interagieren, nicht zu unterscheiden. Die Fokussierung erleichterte somit auch die Interpretation der Ergebnisse.

6.2.1 *In vitro*-Ansatz mit G α_s -s4-XHS

Für die *in vitro*-Suche nach G α_s -spezifischen Interaktoren wurde das Köder-Protein (G α_s -s4-XHS) mit einer dualen C-terminalen Affinitätsmodifikation ausgestattet, die sowohl die Reinigung des heterolog exprimierten Proteins aus *E.coli*-Lysaten über Ni-NTA-Agarose, als auch die Charakterisierung von Interaktionspartnern nach Immobilisierung an eine StrepTactin-Matrix erlaubte. G α_s -s4-XHS konnte in großen Mengen gereinigt werden (vgl.

Abschnitt 5.4.1). Im ersten Reinigungsschritt über Ni-NTA-Agarose ko-eluierten eine Reihe von bakteriellen Proteinen mit $G\alpha_s$ -s4-XHS, die im zweiten Reinigungsschritt über StrepTactin-Sepharose jedoch fast vollständig entfernt werden konnten. Das über zwei Stufen gereinigte Köder-Protein enthielt fast keine mit Coomassie-Blau oder Silber anfärbbaren Verunreinigungen durch *E.coli*-Proteine (vgl. Abb. 25 Spur E2, Abb. 26 B Spur S).

Über Ni-NTA gereinigtes Köderprotein wurde an der StrepTactin-Matrix immobilisiert und gewaschen, bevor es zur Charakterisierung von Interaktionspartnern eingesetzt wurde. Auf diese Weise wurden bakterielle Proteine weitestgehend entfernt (vgl. Abb. 26 B Spur S). Um zu überprüfen, ob immobilisiertes $G\alpha_s$ -s4-XHS in der Lage war, mit Proteinen zu interagieren, wurde seine Fähigkeit zur Heterotrimerbildung sowohl mit gereinigtem $G\beta\gamma$ als auch mit $G\beta\gamma$ in komplexen Lösungen (Extrakten aus S49-Membranen) untersucht. Immobilisiertes $G\alpha_s$ -s4-XHS konnte $G\beta\gamma$ sowohl in gereinigter Form als auch aus Membranextrakten binden (vgl. Abb. 27 und Abb. 28). Die Bindung von $G\beta\gamma$ aus Membranextrakten an $G\alpha_s$ -s4-XHS war durch die Konkurrenz des $G\alpha_s$ -s4-XHS mit den endogenen $G\alpha$ -Proteinen der verwendeten Säugerzell-Lysate nicht vollständig, so dass neben den Eluatn auch im Durchlauf der entsprechenden Versuche $G\beta$ immunchemisch detektiert wurde (vgl. Abb. 28).

Die Charakterisierung der Interaktionspartner erfolgte, wie oben bereits erwähnt, mit dem Schwerpunkt auf konformationsselektive, d.h. in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand des $G\alpha_s$ stattfindende Wechselwirkungen. Durch Inkubation mit AlF_4^- sollte immobilisiertes $G\alpha_s$ aktiviert und $G\beta\gamma$ somit von der Matrix eluiert werden. Eine solche vom Aktivierungszustand des $G\alpha_s$ abhängige Elution des $G\beta\gamma$ wurde nicht bestätigt (Abb. 27 B Spur 4-6). In der Literatur gibt es Angaben, nach denen zur Elution des $G\beta\gamma$ von einer Affinitätsmatrix mit immobilisiertem $G\alpha$ außergewöhnlich hohe Mengen $MgCl_2$ (50 mM) im Elutionspuffer verwendet wurden. Zudem wurden die Säule und der AlF_4^- -enthaltende Elutionspuffer auf RT bzw. 30°C erwärmt (Kozasa und Gilman 1995). Diese Bedingungen wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche jedoch bewusst vermieden, um die (unbekannte) Stabilität neuer Interaktionspartner sowie deren Komplexe mit $G\alpha_s$ nicht zu gefährden.

Um dennoch eine konformationsselektive Elution $G\alpha_s$ -interagierender Proteine erreichen zu können, wurde immobilisiertes $G\alpha_s$ auf der Matrix mit $GTP\gamma S$ aktiviert. Die Reaktionsbedingungen für den Nukleotidaustausch entsprachen bezüglich Temperatur und Pufferzusammensetzung den im $GTP\gamma S$ -Bindungsassay verwendeten, so dass vergleichbare Austausch- und somit Aktivierungsraten erwartet wurden. Doch auch die Aktivierung des $G\alpha_s$ mit $GTP\gamma S$ auf der Matrix führte nur zu sehr schwachen Dissoziation des Heterotrimers (Abb. 28 A Spur 7). Diese Daten sind im Einklang mit fluoreszenzgestützten Untersuchungen die

zeigten, dass beim stimulatorischen G-Protein nach dessen Aktivierung an der Plasmamembran keine echte Dissoziation der Untereinheiten, sondern eine Reorganisation des Heterotrimeres stattfand (Frank *et al.* 2005, s.a. 1.1.6).

Unspezifisch an die StrepTactin-Matrix bindende Säugerproteine erschwerten die Identifizierung spezifisch mit $G\alpha_s$ interagierender Proteine in diesen Versuchen. Trotz stringenter Waschschriffe mit 1M NaCl und Maskierung von Biotinylierungen (die ebenfalls mit der StrepTactin-Matrix interagieren können) mit Avidin war die Zahl der unspezifisch matrix-gebundenen Proteine relativ hoch (vgl. Abb. 29 Spur E -, Abb. 30 Spur Elu 3).

Um die Komplexität der Proteinlösungen zu reduzieren, wurden Cytosol und Membranextrakte getrennt mit dem Köderprotein inkubiert. Für die Untersuchung des Cytosols wurde $G\alpha_s$ -s4-XHS entweder im GDP-gebundenen Zustand oder nach vorheriger Aktivierung durch $GTP\gamma S$ immobilisiert. Unterschiede im Bandenmuster waren nicht erkennbar (vgl. Abb. 30 Spur Elu 1 bzw. Elu 2).

In Membranextrakten von S49-Zellen ließen sich insgesamt drei Gelbereiche, die $G\alpha_s$ -spezifisch interagierende Proteine enthielten, durch SDS-PAGE der Wasch- und Elutionsfraktionen reproduzierbar darstellen (vgl. Abb. 29). In der massenspektrometrischen Analyse dieser Gelbereiche wurden 9 Proteine identifiziert (vgl. Tabelle 23). Der überwiegende Teil dieser Proteine gehörte der Familie der Hitzeschockproteine an, die oftmals an exponierte hydrophobe Bereiche falsch gefalteter Proteine binden bzw. Proteine vor der Denaturierung schützen. Das für diese Versuche immobilisierte $G\alpha_s$ -s4-XHS war nur zu einem Teil mit $GTP\gamma S$ aktivierbar (siehe 5.4.1), d.h. ein Teil des $G\alpha_s$ -s4-XHS war möglicherweise bei der Präparation aus *E.coli* beschädigt worden und somit Substrat für Hsp-Proteine. Diese Interaktion war daher nicht $G\alpha_s$ -spezifisch im Sinne des hier durchgeführten *screenings*.

Viele der Interaktionspartner waren außerdem in einem $G\alpha_s$ normalerweise nicht zugänglichen Zellkompartiment lokalisiert (z.B. mitochondriale Matrix). Es ist daher davon auszugehen, dass diese Interaktion erst durch den Zellaufschluß für die Membranpräparation möglich gemacht wurde und nicht den tatsächlichen Zustand in der Zelle widerspiegelt.

Die Sensitivität der Massenspektrometrie kann ebenfalls das Versuchsergebnis beeinflussen. Die zu analysierende Probe enthielt eine große Anzahl verschiedener Proteine, die zudem in sehr unterschiedlichen Mengen vorlagen. Trotz der vorhergehenden Anreicherung in den Proteinkomplexen ist es möglich, dass in geringen Mengen vorkommende Proteine massenspektrometrisch nicht detektiert werden. Die Ursache hierfür kann durchaus im MS-Verfahren selbst liegen: für den *MS-to-MS/MS-switch* wird die in einem LC-Elutionspeak vorkommende Masse (m/z) mit der höchsten Intensität im MS-Spektrum für die anschließende Fragmentierung per MS/MS ausgewählt (zu Erläuterungen

der MS-Experimente vgl. Abschnitt 4.6). Folgen zwei Peaks unterschiedlicher Intensität im Elutionsprofil sehr dicht aufeinander oder eluieren zwei Proteine (bzw. Peptide) gleichzeitig, so wird ebenfalls nur die Masse mit der höchsten Intensität zur Sequenzierung durch MS/MS ausgewählt. Die zweitintensivste Masse des LC-Peaks wird nicht analysiert, obwohl sie in der Probe vorhanden ist, und entgeht somit der Analyse.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Falle des $G\alpha_s$ die Identifizierung neuer Interaktionspartner mit der *in vitro*-XHS-Methode aufgrund der relativ großen Anzahl unspezifisch mit der Matrix interagierender Proteine schwierig war. Eine konformationsselektive und somit spezifische Elution von $G\alpha_s$ -Interaktionspartnern war in diesen Versuchen nicht möglich. Dennoch waren diese *in vitro*-Versuche sehr gut für die Charakterisierung von Interaktionen z.B. durch immunochemische Untersuchungen geeignet, so daß $G\alpha_s$ -s4-XHS auch für die noch folgenden Versuche in dieser Arbeit hervorragend verwendet werden konnte (vgl. 5.5.7.1 und 5.5.7.2).

6.2.2 *In vivo*-Ansatz mit NTAP- $G\alpha_s$ -s4

Die Isolierung von $G\alpha_s$ -enthaltenden Proteinkomplexen aus Säugerzellen im *in vivo*-Ansatz erfolgte mit Hilfe der *Tandem Affinity Purification* (TAP). Das dafür verwendete Affinitätsepitop ermöglichte eine zweistufige Reinigung dieser Komplexe über IgG-Sepharose und Calmodulin-Sepharose (vgl. Abschnitte 4.5.6 und 5.5.1). Die TAP war zuerst für das Hefe-Expressions-System beschrieben worden (Rigaut *et al.* 1999) und wurde später in einem transienten (Cox *et al.* 2002) und einem viralen Expressionssystem (Knuesel *et al.* 2003) auch für Säugerzellen adaptiert. Die Protokolle sind meist für die Isolierung löslicher Proteinkomplexe ausgelegt und wurden daher für membranassoziierte Proteine wie $G\alpha_s$ und $G\beta\gamma$ angepasst.

Für eine funktionelle Charakterisierung der Köderproteine wurde sowohl N-terminal als auch C-terminal TAP-markiertes $G\alpha_s$ in phänotypisch $G\alpha_s$ -defizienten 2B2-Zellen zusammen mit β_2 -adrenergem Rezeptor und Adenylylcyclase heterolog exprimiert (vgl. Abschnitt 5.5.3.2) und die Menge an gebildetem cAMP nach Rezeptorstimulation bestimmt. Beide $G\alpha_s$ -TAP-Proteine waren trotz des sehr großen *tags* (ca. 23 kDa) in der Lage, Signale vom β_2 -adrenergen Rezeptor auf den Effektor Adenylylcyclase zu übertragen und die cAMP-Synthese zu stimulieren (vgl. Abb. 33). Heterolog in COS7-Zellen exprimiertes TAP-markiertes $G\alpha_s$ bildete in Anwesenheit von GDP mit $G\beta\gamma$ Heterotrimere (vgl. Abb. 34). TAP-markiertes $G\alpha_s$ wurde somit als funktional angesehen und zur Isolierung von $G\alpha_s$ -Interaktionspartnern eingesetzt.

Die Anwesenheit von GDP bzw. GDP/AlF_4^- während der TAP-Prozedur ermöglichte im Gegensatz zur *in vitro*-XHS-Methode die Erfassung von Proteinen, die mit $G\alpha_s$ abhängig von

seinem Aktivierungszustand interagierten. So wurden Heterotrimeren ausschließlich in Anwesenheit von GDP gebildet, nicht jedoch in Anwesenheit von AlF_4^- . Dies bedeutet, dass bei den TAP-Experimenten im Gegensatz zur XHS-Methode eine vollständige Dissoziation der Heterotrimeren nach der $\text{G}\alpha_s$ -Aktivierung erfolgte. Da die Immobilisierung der Komplexe bei der TAP-Methode erst *nach* der Aktivierung stattfand, könnte der Unterschied darin begründet liegen, dass bei der XHS-Methode nach der Immobilisierung des $\text{G}\alpha_s$ eine Aktivierung nicht mehr oder nur schwer möglich war und es demzufolge auch nicht bzw. nur schwach zu einer Dissoziation des Heterotrimers kam (siehe Abschnitt 6.2.1). Möglicherweise wurde die Aktivierung von immobilisiertem $\text{G}\alpha_s$ -s4-XHS auf der Affinitätsmatrix durch dessen hohe lokale Dichte behindert. Die Aktivierung von bereits immobilisiertem $\text{G}\alpha_s$ konnte jedoch nicht überprüft werden.

Insgesamt wurden 10 mit $\text{G}\alpha_s$ ·GDP interagierende und 29 mit $\text{G}\alpha_s$ ·GDP· AlF_4^- interagierende Proteine in zwei unabhängigen TAP-Experimenten identifiziert (vgl. Tabelle 25, Tabelle 29). Einige dieser Proteine wurden in reziproken *pull down*-Experimenten näher charakterisiert (dargestellt in Abschnitt 6.3).

In der Literatur beschriebene Kriterien zur Identifizierung von Interaktionspartnern aus Hochdurchsatzanalysen werten ein Protein oft als eindeutig identifiziert, wenn es in mehreren unabhängigen Experimenten am Köder-Protein gebunden wurde. Eine direkte und unmittelbare Interaktion kann daraus jedoch nicht geschlussfolgert werden, da auch multimere Komplexe auftreten können, in denen nicht alle Proteine in direkter Wechselwirkung miteinander stehen. Der anschließenden *in vitro*-Verifizierung und Charakterisierung einer beobachteten Interaktion kam daher eine bedeutende Rolle zu.

Es traten eine Reihe von Interaktionspartnern auf, die wahrscheinlich in direktem Zusammenhang mit der transienten Überexpression des Köder-Proteins stehen (vgl. auch Forler *et al.* 2003). Da das Köder-Protein mit endogen exprimiertem $\text{G}\alpha_s$ um Interaktionspartner konkurrieren muß, wurde die transiente Überexpression bewusst gewählt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass ein Interaktionspartner mit $\text{G}\alpha_s$ -TAP und nicht mit endogenem $\text{G}\alpha_s$ interagiert. Die Überexpression kann jedoch auch eine Instabilität oder falsche Faltung des Köder-Proteins nach sich ziehen, was zu einer verstärkten Assoziation dieser Proteine mit Faltungshelfern (Chaperonen, Hitzeschockproteinen) und/ oder Proteasom-Komponenten führt. Dies wiederum erschwert die Identifizierung spezifischer Interaktionspartner, die auf endogenem Niveau und damit nicht stöchiometrisch zum überexprimierten Köderprotein vorhanden sind. Diesem Problem konnte in dieser Arbeit begegnet werden, indem Proteine, die sowohl mit $\text{G}\alpha_s$ ·GDP als auch mit $\text{G}\alpha_s$ ·GDP· AlF_4^- interagierten, ausgeschlossen wurden (Abschnitt 5.5.5). Dennoch spielte die anschließende Bestätigung einer beobachteten Interaktion eine größere Rolle als es

beispielsweise bei den TAP-Experimenten in Hefen der Fall ist, wo die Konkurrenz mit endogenem Protein nicht gegeben ist.

Im Falle des $G\alpha_s$ wurden somit mit der *in vivo* (TAP)-Methode mehr Interaktionspartner identifiziert als mit der *in vitro* (XHS)-Methode, insbesondere solche, die in Abhängigkeit vom $G\alpha_s$ -Aktivierungszustand binden. Im Hinblick auf Gs-Heterotrimeren resultierten aus beiden Methoden unterschiedliche Aussagen: während die XHS-Methode eher mit Daten übereinstimmt, die eine Neuordnung als die Dissoziation des Heterotrimers nach $G\alpha_s$ -Aktivierung vorschlagen (Hughes *et al.* 2001; Frank *et al.* 2005), wurde mit der TAP-Methode eine eindeutige Dissoziation anhand von immunochemischen und massenspektrometrischen Daten festgestellt (in Übereinstimmung mit Yu und Rasenick 2002). Die Ursache für diese Diskrepanz liegt wahrscheinlich in den Methoden selbst. Bei der TAP-Methode wurden bereits assoziierte Komplexe gebunden und gereinigt, so dass die Konzentration der Komplexe an der Affinitätsmatrix nicht an Kapazitätsgrenzen stieß und vermutlich keine räumlichen Einschränkungen existierten. Im Gegensatz dazu waren die Köderproteine bei der XHS-Methode lokal sehr hoch konzentriert, so dass unter den gegebenen räumlichen Bedingungen auf der Matrix wahrscheinlich keine Aktivierung mehr möglich war bzw. die entsprechende Konformationsänderung nur eingeschränkt vollzogen werden konnte. Es ist davon auszugehen, dass die während der TAP-Prozedur auftretenden Bedingungen dem physiologischen Zustand näher waren als die der XHS-Prozedur.

6.3 Interaktionspartner des $G\alpha_s$

6.3.1 RGS-PX1 und $G\alpha_s$

Kurz vor Beginn dieser Arbeit wurde ein neuer Interaktionspartner des $G\alpha_s$ beschrieben, der im Zuge dieser Arbeit näher charakterisiert werden sollte. Dieses Protein, RGS-PX1, war aus der cDNA-Bank humaner Herzmuskelzellen kloniert worden und besaß zwei Funktionen. Zum einen sollte es die intrinsische GTP-Hydrolysegeschwindigkeit des $G\alpha_s$ beschleunigen (GAP-Aktivität, vgl. Abschnitt 1.1.5), zum anderen sollte es eine sogenannte *sorting-nexin*-Funktion besitzen (Zheng *et al.* 2001). Die GAP-Aktivität von RGS-PX1 beschleunigte die $G\alpha_s$ -katalysierte GTP-Hydrolyse in *Single-Turnover*-Assays den Autoren zufolge um mindestens den Faktor 20. Die GAP-Aktivität wurde außerdem durch eine Verringerung der Isoprenalin-stimulierten cAMP-Synthese in HEK293-Membranen durch RGS-PX1 gezeigt, d.h. die GAP-Wirkung von RGS-PX1 führte den Autoren zufolge zu einer schnelleren Inaktivierung des $G\alpha_s$, somit zu einer verringerten Signaldauer und infolge dessen zu einer geringeren Menge gebildeten cAMP.

Diese Veröffentlichung war überraschend, da alle bisher charakterisierten RGS-Proteine nicht mit $G\alpha_s$ interagieren, was strukturell auf einen bestimmten Aminosäureunterschied zwischen $G\alpha_s$ und anderen $G\alpha$ -Untereinheiten zurückgeführt wurde (Natochin und Artemyev 1998; Castro-Fernandez *et al.* 2003). Erst durch den Austausch von Asp²²⁹ gegen Ser im $G\alpha_s$ ist eine Beschleunigung der $G\alpha_s$ -katalysierten GTP-Hydrolyse durch RGS3T und RGS10 (Castro-Fernandez *et al.* 2003) sowie RGS4 und RGS16 möglich (Natochin und Artemyev 1998). In RGS-PX1 sind die in der RGS-Domäne konservierten Kontaktstellen mit $G\alpha$ (Glu¹²⁹ und Asn¹³¹ in RGS16) durch zwei andere Aminosäuren belegt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Zheng beschriebene GAP-Aktivität von RGS-PX1 anhand des murinen Orthologs (moRGS-PX1) näher untersucht. In *Single-Turnover-Assays* konnte kein Einfluß von moRGS-PX1 auf die $G\alpha_s$ -katalysierte GTP-Hydrolyse festgestellt werden (vgl. Abb. 21). Um einen Funktionsverlust durch Aminosäureunterschiede zwischen menschlichem und murinem Protein auszuschließen, wurde auch das von Zheng und Mitarbeitern beschriebene humane Protein (huRGS-PX1) hergestellt und untersucht. Auch in diesem Fall war keine GAP-Aktivität nachweisbar (vgl. Abb. 22). Es ist daher davon auszugehen, dass RGS-PX1 keine $G\alpha_s$ -spezifische GAP-Aktivität besitzt.

Nachdem die Experimente zur Charakterisierung der GAP-Aktivität von RGS-PX1 in dieser Arbeit abgeschlossen waren, erschienen weitere Veröffentlichungen der Gruppe um Zheng, die sich auf die *sorting nexin*-Komponente des RGS-PX1 fokussierten und eine Beteiligung von $G\alpha_s$ an der Regulation des EGF-Rezeptor-Abbaus postulierten. In einer Arbeit wurde über *GST-pulldown*- und Immunpräzipitations-Experimente die Assoziation von $G\alpha_s$ mit RGS-PX1 und mit dem Protein Hrs nachgewiesen (Zheng *et al.* 2004). Es wurde ein heterotrimerer, immunpräzipitierbarer Komplex beschrieben, der in den frühen Endosomen lokalisiert war und den Abbau des EGF-Rezeptors beschleunigen sollte. Eine Beziehung zur GAP-Aktivität des RGS-PX1 wurde dabei nicht hergestellt. $G\alpha_s$ lag in allen angegebenen Versuchen offensichtlich als $G\alpha_s$ ·GDP vor, so dass die $G\alpha_s$ -spezifische GAP-Aktivität von RGS-PX1 indirekt (und in der vorliegenden Dissertation direkt) widerlegt wird.

Seit kurzem werden auch GAP-unabhängige Wirkungen von RGS-Proteinen diskutiert, da die meisten RGS-Proteine neben der RGS-Domäne eine Vielzahl weiterer funktioneller Domänen enthalten, die die Bildung von Signalkomplexen ermöglichen können (z.B. Tinker 2006, Abramow-Newerly *et al.* 2006b). Für RGS2 ist beispielsweise eine Interaktion sowohl mit $G\alpha_s$ als auch mit verschiedenen Adenylylcyclase (AC)-Isoformen beschrieben worden. Die Interaktion von RGS2 sowohl mit der AC als auch mit $G\alpha_s$ führt (wie auch im Falle des RGS-PX1) zu einer Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration, ohne dass RGS2 die GTP-Hydrolyserate des $G\alpha_s$ beeinflusst (Roy *et al.* 2003). Da auch RGS-PX1 keine GAP-Wirkung für $G\alpha_s$ besitzt, könnte die in der Arbeit von Zheng beobachtete verringerte cAMP-

Konzentration in Anwesenheit von RGS-PX1 ebenfalls auf einen solchen Effekt zurückzuführen sein (s.o., Zheng *et al.* 2001). Vergleichbares ist auch für die erst vor kurzem beschriebene Bindung der RGS-Domäne von Axin an AlF_4^- -aktiviertes $\text{G}\alpha_s$ gezeigt worden (Castellone *et al.* 2005). Auch in diesem Falle wurde keine GAP-Aktivität beobachtet, sondern eine Funktion des Axins (ähnlich wie für RGS-Domänen-enthaltende RhoGEF-Proteine) als Gerüstprotein bzw. Effektor für $\text{G}\alpha_s$ im β -Catenin-Signalweg vorgeschlagen. Interessanterweise fanden die Autoren – im Widerspruch zu den von Zheng veröffentlichten Daten - eine Assoziation der RGS-Domäne von RGS-PX1 sowohl mit $\text{G}\alpha_s \cdot \text{AlF}_4^-$ als auch etwas schwächer mit $\text{G}\alpha_s \cdot \text{GDP}$. Die RGS-Domäne von Axin hingegen interagiert ausschließlich mit der AlF_4^- -Form. Eine konformationsunabhängige Interaktion schließt eine GAP-Aktivität des RGS-PX1 aus. Eine mögliche Funktion von RGS-PX1 als Gerüstprotein bleibt davon jedoch unberührt, d.h. cytosolisches oder membranständiges $\text{G}\alpha_s$ kann durchaus von RGS-PX1 an frühe Endosomen rekrutiert und somit alternativen Signaltransduktionswegen zugeführt werden (Zheng *et al.* 2004).

Die Bedeutung alternativer (nicht-plasmamembranständiger) Signaltransduktionswege für Heterotrimeren G-Proteine wurde in den letzten Jahren immer mehr wahrgenommen (Manning 2003). Eine Beteiligung von RGS-PX1 an der intrazellulären $\text{G}\alpha_s$ -vermittelten Signaltransduktion ist, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, nicht auf eine GAP-Aktivität zurückzuführen. Eine Untersuchung der Beeinflussung der $\text{G}\alpha_s$ -Funktion durch RGS-PX1 ist bislang auch in anderen Arbeitsgruppen nicht erfolgt, könnte jedoch Aufschluß über gewebespezifische alternative Signalwege des $\text{G}\alpha_s$ z.B. in Herzzellen¹⁰ geben, wie sie für Thymocyten (Apoptose, Gu, Chenghua *et al.* 2000) und Fibroblasten (Adipogenese, Wang und Malbon 1999) bereits gezeigt wurden.

Muß nun ein $\text{G}\alpha_s$ -spezifisches RGS-Protein mit GAP-Wirkung gefordert werden? Die Notwendigkeit für das Vorhandensein GTPase-beschleunigender Faktoren ergibt sich, wenn sich die *in vitro* beobachteten GTP-Hydrolyseraten deutlich von den *in vivo* bestimmten Werten unterscheiden. Dies wurde beispielsweise bei $\text{G}\alpha_q$ beobachtet und trug zur Entdeckung der RGS-Proteine bei (siehe auch Abschnitt 1.1.5 unter „GTPase-akzelerierende Proteine (GAP)“). Allerdings wurden auch für $\text{G}\alpha_{i/o}$ -Proteine RGS-Proteine beschrieben, obwohl die intrinsische GTP-Hydrolyserate dieser $\text{G}\alpha$ -Proteine wesentlich höher ist als die von $\text{G}\alpha_q$ und die Notwendigkeit für die Existenz von GAP-Faktoren, d.h. RGS-Proteinen, bei weitem nicht so evident war wie im Fall von $\text{G}\alpha_q$.

Die Hydrolyserate des $\text{G}\alpha_s$ ist vergleichbar mit der von $\text{G}\alpha_{i/o}$, d.h. allein aus den Daten der klassischen Signaltransduktion heraus ist die Existenz eines $\text{G}\alpha_s$ -spezifisches RGS nicht

¹⁰ Die für RGS-PX1 kodierende DNA wurde von Zheng und Mitarbeitern aus einer menschlichen Herzzell-cDNA-Bank kloniert.

zwingend erforderlich. Innerhalb alternativer und bislang unbekannter Signalwege jedoch können RGS-Proteine auch für $G\alpha_s$ von Bedeutung sein.

6.3.2 $G\beta\gamma$ -Komplexe

In Säugern sind 5 $G\beta$ - und 12 $G\gamma$ -Isoformen bekannt, die mit Ausnahme von $G\beta_2\gamma_1$ alle funktionale Dimere bilden können (Iniguez-Lluhi *et al.* 1992) und teilweise gewebsspezifisch exprimiert werden ($G\beta_5$ und $G\gamma_3$ im Hirn (Gautam *et al.* 1990; Iniguez-Lluhi *et al.* 1993), $G\gamma_1$ und $G\gamma_8$ in Stäbchen bzw. Zapfen (Hurley *et al.* 1984, Ong *et al.* 1995)). Die Zusammensetzung der $G\beta\gamma$ -Komplexe, insbesondere die $G\gamma$ -Untereinheit, haben *in vivo* Einfluß auf die Rezeptor- und Effektorkopplung von Heterotrimeren (Wang, Q. *et al.* 1999; Robillard *et al.* 2000; Krumins und Gilman 2006, vgl. auch Abschnitt 1.1.3), obwohl sich die Eigenschaften der $G\beta\gamma$ -Komplexe *in vitro* mit Ausnahme von $G\beta_1\gamma_1$ nicht gravierend unterscheiden (z.B. bei der Potenzierung der Stimulation von $G\alpha_s$ -stimulierter Adenylylcyclase (AC) II, Inhibition von Ca^{2+} /Calmodulin-aktivierter AC I und der *Steady-State*-GTP-Hydrolyse, sowie die ADP-Ribosylierung von $G\alpha_i$ bzw. $G\alpha_o$ durch Pertussis-Toxin, Iniguez-Lluhi *et al.* 1992; Ueda *et al.* 1994).

Zur Zusammensetzung des stimulatorischen G-Proteins sind bislang nur wenige Untersuchungen publiziert worden. Ko-Lokalisationsexperimente zeigen eine Assoziation von $G\alpha_s$ mit $G\gamma_2$, $G\gamma_3$, $G\gamma_7$ und $G\gamma_{12}$ in Rattenhirnextrakten (Immunpräzipitation, Ueda *et al.* 1998, $G\beta$ wurde hier nicht untersucht) bzw. von $G\alpha_s$ mit $G\beta_1\gamma_{2,5,7,10,11,12}$ (fluoreszenzgestützte Untersuchungen mit heterolog exprimierten $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$, Mervine *et al.* 2006). In *in vitro*-Assays ist die Inhibition der $G\alpha_s$ -katalysierten GTP-Hydrolyse durch $G\beta_1\gamma_1$ um den Faktor 10 geringer potent als durch $G\beta_1\gamma_2$, wohingegen die $G\alpha_t$ -katalysierte GTP-Hydrolyse deutlich stärker durch $G\beta_1\gamma_1$ inhibiert wird. Auch bei der Modulation der AC-Aktivität (Inhibition der Ca^{2+} /Calmodulin-aktivierten AC I, Potenzierung der $G\alpha_s$ -stimulierten AC II) ist $G\beta_1\gamma_1$ um den Faktor 10-30 weniger potent als andere $G\beta\gamma$ -Komplexe (Ueda *et al.* 1994). Dies kann auf eine verringerte Affinität von $G\alpha_s$ zum $G\beta_1\gamma_1$ -Komplex zurückzuführen sein.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden über Tandem Affinity Purification mit $G\alpha_s$ -GDP assoziierte $G\beta\gamma$ -Komplexe immunchemisch nachgewiesen (vgl. Abb. 34) und anschließend die Isoformen $G\beta_{1-4}$, $G\gamma_5$, $G\gamma_{10}$ und $G\gamma_{12}$ massenspektrometrisch identifiziert (vgl. Tabelle 25 und Tabelle 27. Die für $G\beta$ identifizierten Peptide in Tabelle 25 konnten aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der 4 $G\beta$ -Isoformen nicht ausschließlich einer Isoform zugeordnet werden.). Da die Zusammensetzung der Heterotrimeren, insbesondere jedoch die $G\gamma$ -Untereinheit von Bedeutung für die Signaltransduktion *in vivo* ist, galt es zu klären, welche $G\gamma$ -Isoformen in den verwendeten COS-7-Zellen exprimiert wurden und ob $G\alpha_s$ präferentiell mit einigen dieser $G\gamma$ -Isoformen interagiert. Die Analyse von COS-7-Zellmembranextrakten

wurde mittels SDS-PAGE und Massenspektrometrie durchgeführt, da keine ausreichend spezifischen und sensitiven Antiseren gegen die verschiedenen G γ -Isoformen zur Verfügung standen. Sie zeigte, dass G γ_5 , G γ_{10} und G γ_{12} auch die hauptsächlich in COS-7-Zellen-exprimierten G γ -Isoformen darstellten (vgl. Tabelle 26), eine präferentielle Interaktion von G α_s mit einer der G γ -Isoformen *in vivo* lag demnach nicht vor.

Die Interaktion von G α_s mit G $\beta\gamma_5$ wurde *in vitro* bereits funktionell charakterisiert (Ueda *et al.* 1994), während die Anwesenheit von G γ_{12} in Gs-Heterotrimeren lediglich in Immunpräzipitationsexperimenten gezeigt worden ist (Ueda *et al.* 1998). Für G γ_{10} ist bislang noch keine Assoziation im Gs-Heterotrimer gezeigt worden. Die Heterotrimerbildung von G α_s mit G β_1 und G γ_{12} sowie G γ_{10} wurde daher *in vitro* mit rekombinant hergestellten Proteinen näher untersucht.

Hexahistidinmodifiziertes G α_s und G β_1 wurden dafür mit G γ_{10} bzw. G γ_{12} heterolog in Insektenzellen ko-exprimiert. Zum Vergleich mit einem bekannten Heterotrimer wurden G α_s und G β_1 mit G γ_2 ko-exprimiert, die Ko-Expression mit β -Galactosidase (β Gal) bzw. G γ_1 wurde als Negativkontrolle verwendet (keine Bildung von Heterotrimeren). Aus Membranpräparationen dieser Zellen wurden die gebildeten Proteinkomplexe über eine Affinitätsmatrix angereichert und die mit G α_s assoziierten G $\beta\gamma$ -Komplexe immunchemisch detektiert (vgl. Abschnitt 5.5.6.2)¹¹. Die Assoziation von heterolog in Insektenzellen exprimiertem G α_s mit G $\beta_1\gamma_{10}$ und G $\beta_1\gamma_{12}$ führte zu Heterotrimeren, die sich in den Ko-Reinigungs-Versuchen ähnlich verhielten wie das sehr gut charakterisierte G $\alpha_s\beta_1\gamma_2$ und sich deutlich von der Negativkontrolle mit β Gal unterschieden (Abb. 39). Aussagen zu Affinitäten lassen sich aus diesem Versuch heraus nicht treffen, jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass sich G $\beta_1\gamma_{10}$ und G $\beta_1\gamma_{12}$ *in vitro* nicht wesentlich von den bislang beschriebenen G $\beta\gamma$ -Dimeren unterscheiden (mit Ausnahme von G $\beta_1\gamma_1$, Ueda *et al.* 1994).

Bei Expression von β Gal wurde erwartungsgemäß nur ein schwaches Immunsignal in den Eluaten der Affinitätschromatographie detektiert (vgl. Tabelle 28 und Abb. 39), da keine Heterotrimer gebildet wurden. Die schwachen Immunsignale spiegeln wahrscheinlich eine Assoziation von G α_s und G β_1 mit gering exprimiertem Sf9-endogenem G γ wider. Für G $\beta_1\gamma_1$ konnte keine von der β Gal-Kontrolle verschiedene Interaktion mit G α_s beobachtet werden, daher ist davon auszugehen, dass auch hier keine Heterotrimerbildung stattgefunden hat. Weder G α_s noch G $\beta_1\gamma_1$ sind an die Plasmamembran gelangt (Abb. 39 Spur 1), die

¹¹ Der Nachweis der Komplexe erfolgte mit einem G β -spezifischen Antikörper, da keine ausreichend spezifischen und sensitiven, gegen die verschiedenen G γ -Isoformen gerichteten Antiseren zur Verfügung standen. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen war G $\beta\gamma$ nicht dissoziiert, daher konnte ein G β -Immunsignal einem assoziierten (d.h. intakten) Heterotrimer gleichgestellt werden.

schwachen Immunsignale in den Membranextrakten und Eluaten stammen wie auch bei β Gal wahrscheinlich aus der Assoziation mit endogenem $G\gamma$ oder $G\beta$.

Wie oben bereits angedeutet, ist eine Assoziation von $G\alpha_s$ gerade mit den genannten $G\gamma$ -Untereinheiten besonders interessant, da vor allem im Zusammenhang mit $G\gamma_5$ und $G\gamma_{12}$ eine intrazelluläre Lokalisation der Heterotrimere möglich ist und sie demnach in alternative, d.h. nicht plasmamembranständige Signalwege eingebunden sein können.

$G\gamma_{12}$ ist eine der vorherrschenden $G\gamma$ -Isoformen in nicht-neuronalen Geweben (Asano *et al.* 1995). Seine intrazelluläre Lokalisation ist nicht allein auf die Plasmamembran beschränkt, auch eine Assoziation von $G\gamma_{12}$ mit Actin-Filamenten wurde gezeigt (Ueda *et al.* 1997). Über ihre intrazelluläre Lokalisation könnten für G-Proteine somit alternative Möglichkeiten zur Signaltransduktion entstehen (z.B. Sarndahl *et al.* 1993). Auch für $G\alpha_s$ ist eine von seinem Aktivierungszustand abhängige Assoziation mit Mikrofilamenten aus der Literatur bekannt (Sarndahl *et al.* 1993; Ozawa *et al.* 1996; Cote *et al.* 1997). Nicht immer konnte jedoch auch $G\beta$ immunchemisch in Cytoskelettfractionen nachgewiesen werden (z.B. von Neutrophilen, Sarndahl *et al.* 1993). Das Fehlen von $G\beta$ an Cytoskelettstrukturen könnte darauf hinweisen, dass dabei andere als die klassischen Signaltransduktionskomplexe existieren. In der Tat gibt es Hinweise in der Literatur, die Komplexe aus $G\alpha$ und $G\gamma$ in Abwesenheit von $G\beta$ beschreiben (Rahmatullah und Robishaw 1994; Rahmatullah *et al.* 1995). $G\gamma_{12}$ kann als einzige $G\gamma$ -Isoform N-terminal durch Proteinkinase C phosphoryliert werden (Morishita *et al.* 1995; Asano *et al.* 1998), wodurch seine Interaktion mit G-Proteinen bzw. Effektoren moduliert wird (Morishita *et al.* 1995; Yasuda *et al.* 1998). Ob die Actin-Assoziation oder Phosphorylierung des $G\gamma_{12}$ auch für seine Interaktion mit $G\alpha_s$ von Bedeutung sind, muß in weiteren Experimenten geklärt werden.

$G\gamma_5$ wird in einer Reihe von Geweben exprimiert und ist außer an der Plasmamembran ebenfalls intrazellulär z.B. an Fokalen Adhäsionspunkten in der Nähe von Vinculin gefunden worden (Hansen *et al.* 1994). Für $G\alpha_i$ ist eine Assoziation mit $G\gamma_5$ an Actin gezeigt (Ozawa *et al.* 1996; Cote *et al.* 1997), im Falle des $G\alpha_s$ ist die Kolokalisation aller drei Proteine bislang nicht gezeigt worden. Wie auch für $G\gamma_{12}$ ausgeführt, kann die Assoziation von $G\alpha_s$ mit $G\gamma_5$ eine alternative (d.h. intrazelluläre) Lokalisation und Signaltransduktion zur Folge haben. Die Arbeit von Park und Mitarbeitern beschreibt die direkte Interaktion von $G\gamma_5$ mit dem Transkriptionsrepressor *adipocyte enhancer-binding protein* (AEBP1) (Park *et al.* 1999) und weist dieser Interaktion eine Bedeutung bei der Adipogenese zu. Auch $G\alpha_s$ spielt bei der Adipogenese eine Rolle, und zwar durch Repression der Syk-Tyrosinkinase-Aktivität (Wang und Malbon 1999). Stimulation der Adipogenese in 3T3-L1 Mausfibroblasten reduziert sowohl die $G\gamma_5$ - als auch die $G\alpha_s$ -Level in den Zellen. Sowohl $G\gamma_5$ als auch $G\alpha_s$ sind auch im nukleären Kompartiment lokalisiert worden (Park *et al.* 1999, Willard und Crouch 2000). Ein

Zusammenhang zwischen der intrazellulären Lokalisation von $G\alpha_s$ / $G\gamma_5$ und der Adipogenese wurde auf experimenteller Ebene bisher nicht beschrieben.

Mit einem Ribozym-Ansatz zeigten Wang und Mitarbeiter, dass *in vivo* in HEK293-Zellen die Stimulation der Adenylylcyclase über den β_2 -adrenergen Rezeptor ausschließlich unter Beteiligung von $G\alpha_s\beta_1\gamma_7$ erfolgt, obwohl eine Reihe weiterer $G\beta$ - und $G\gamma$ -Isoformen exprimiert werden (Wang, Q. *et al.* 1999). Die Bedeutung der Heterotrimerzusammensetzung mit $G\gamma_{10}$ und $G\gamma_{12}$ für die Signaltransduktion *in vivo* muß in weiterführenden Versuchen, beispielsweise unter Verwendung von RNAi-Technologien, untersucht werden.

6.3.3 Calmodulin

Calmodulin ist ein sehr vielseitiges Protein, das in einer Vielzahl physiologischer Prozesse unentbehrlich ist. Strukturstudien zeigen eine ausgeprägte Flexibilität des Moleküls, so dass in Abhängigkeit vom Ca^{2+} -Beladungszustand Interaktionen mit sehr unterschiedlichen Molekülen stattfinden können. Dazu gehören auch Proteine der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion: von intrazellulären Domänen einiger GPCR (z.B. mGluR3, Lidwell *et al.* 2004), Adenylylcyclase (z.B. AC I, Vorherr *et al.* 1993), monomeren G-Proteinen (z.B. Kir/Gem, Fischer *et al.* 1996; RIC, Wes *et al.* 1996) sowie RGS-Proteinen (Popov *et al.* 2000) ist eine Regulation durch Calmodulin bekannt. Calmodulin inhibiert die ADP-Ribosylierung von $G\alpha_o$ (Liu *et al.* 1997). Es bindet an die N-terminale Domäne von $G\beta$ (Liu *et al.* 1997), die auch eine Kontaktstelle zur $G\alpha$ -Untereinheit darstellt, so dass von den Autoren eine Beeinträchtigung der Heterotrimerbildung durch die Ca^{2+} -abhängige Bindung von Calmodulin an $G\beta$ diskutiert wird.

Calmodulin wurde in der vorliegenden Arbeit in *Tandem-Affinity-Purification*-Versuchen als Interaktionspartner von AlF_4^- -aktiviertem $G\alpha_s$ identifiziert. Aus der Literatur ist bekannt, dass Calmodulin auch an $G\beta$ bindet und das entsprechende Bindungsmotiv mit der $G\alpha_s$ -Kontaktstelle auf $G\beta$ koinzidiert, daher ergaben sich interessante Fragen sowohl zur Heterotrimerstruktur des aktivierten Gs (Dissoziation oder aber Umstrukturierung des Heterotrimers, vgl. Abschnitt 1.1.6) als auch zur Beeinflussung der $G\alpha_s$ -vermittelten Signaltransduktion durch Calmodulin.

Zur Charakterisierung dieser Interaktion wurden *pull-down*-Experimente mit gereinigten Proteinen durchgeführt, aus denen hervorging, dass Calmodulin nur in Anwesenheit von Ca^{2+} und nur mit AlF_4^- -aktiviertem $G\alpha_s$ -GDP interagiert (vgl. Abb. 40). $GTP\gamma S$ -aktiviertes (ibid.) oder konstitutiv aktives $G\alpha_s$ (Daten nicht gezeigt) wurde nicht gebunden. Dieser Befund konnte zwei mögliche Ursachen haben:

- a) die Interaktion war abhängig von der $G\alpha_s$ -Konformation (auch RGS-Proteine binden präferentiell die AlF_4^- - und nicht die $GTP\gamma S$ -aktivierte Form eines $G\alpha$ -Proteins, vgl. Abschnitt 1.1.5),

b) die Interaktion war Al^{3+} -abhängig, d.h. durch die Bindung von Al^{3+} an Calmodulin wurde dessen Konformation so verändert, dass es mit $G\alpha_s$ interagiert.

Um zwischen den oben genannten Möglichkeiten a und b zu unterscheiden, wurde der Einfluss von Calmodulin auf die GTPase-Aktivität des $G\alpha_s$ untersucht. Wenn Calmodulin Übergangskonformationen des $G\alpha_s$ bindet, die während der GTP-Hydrolyse auftreten, so könnte die GTPase-Aktivität beeinflusst werden. Ein direkter Einfluss von Calmodulin auf die GTPase-Aktivität des $G\alpha_s$ konnte nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 41), so dass eine GAP-, GEF- bzw. GDI-Funktion von Calmodulin im entkoppelten System (d.h. in Abwesenheit von Rezeptor und Effektor) ausgeschlossen werden konnte.

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob $G\alpha_s$ möglicherweise Einfluss auf das Calmodulin-Signalling hat. Beispielhaft wurde dafür die Aktivität der Ca^{2+} /Calmodulinabhängigen Kinase II (CaMK II) untersucht. In Vorversuchen, die in dieser Arbeit nicht dargestellt sind, konnte gezeigt werden, dass unter den bei der TAP eingesetzten Al^{3+} -Konzentrationen (30 μM) eine Beeinträchtigung der stimulatorischen Wirkung von Calmodulin auf die CaMK II auftrat, die bereits bei Al^{3+} -Konzentrationen $\geq 5 \mu M$ evident wurde. Die Untersuchung der AlF_4^- -aktivierten $G\alpha_s$ -Konformation war in diesem System nicht ohne toxische Effekte möglich.

Es war demnach nicht eindeutig zu entscheiden, ob die Interaktion auf die $G\alpha_s$ -Konformation oder auf eine in Anwesenheit von Al^{3+} veränderte Calmodulin-Konformation zurückzuführen war. Eine Untersuchung von Kurita *et al.* 2005 zeigte, dass Calmodulin in Anwesenheit von Ca^{2+} auch Al^{3+} binden kann und dadurch seine Interaktion mit Zielproteinen geschwächt wird, obwohl seine generelle Struktur kaum verändert ist. Dies ging auch aus Vorversuchen in dieser Arbeit hervor (Daten nicht gezeigt). Eine generelle Beeinträchtigung scheint jedoch nicht zwingend daraus hervorzugehen: Popov und Mitarbeiter konnten in *pull-down*-Experimenten einen Komplex aus Calmodulin, RGS4 und $G\alpha_i \cdot GDP \cdot AlF_4^-$ darstellen (Popov *et al.* 2000). In Abwesenheit von RGS4 fand keine Interaktion von $G\alpha_i \cdot GDP \cdot AlF_4^-$ mit Calmodulin statt. Die Anwesenheit von Al^{3+} schien demnach keine gravierenden Auswirkungen auf Calmodulin zu haben.

Im Zusammenhang mit der Heterotrimer-Dissoziations-Theorie war auch eine weitere Erklärung denkbar. Möglicherweise dissoziiert $G\alpha_s$ bei seiner Aktivierung *in vivo* nicht, sondern durchläuft eine Umstrukturierung der Untereinheiten (vgl. Abschnitt 1.1.6). Da Calmodulin mit Rezeptoren, $G\alpha_s$ und $G\beta\gamma$ interagieren kann, ist nicht auszuschließen, dass Calmodulin in Signalkomplexen mit GPCR, heterotrimeren G-Proteinen und Effektoren vorliegt und sein Wirkmechanismus auf einer anderen Ebene als der des GTPase-Zyklus ansetzt (z.B. Einfluss auf die teilweise synergistisch durch $G\alpha_s$ und $G\beta\gamma$ stimulierte AC-Signaltransduktion durch Bindung an aktiviertes $G\alpha_s$ im Heterotrimer). Möglich ist auch eine

Funktion als Koinzidenz-Sensor für $G\alpha_s$ -Stimulation und intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg. Eine Untersuchung dieser Überlegung in der kompletten Signaltransduktionskette (d.h. incl. Rezeptor und Adenylylcyclase) war mit den gegebenen Mitteln jedoch nicht möglich, da wie erwähnt Calmodulin auch mit $G\beta\gamma$, Rezeptoren und Adenylylcyclase-Isoformen interagiert und eine Zuordnung gemessener Effekte zu bestimmten Interaktionen demzufolge unmöglich wurde. Zudem werden Adenylylcyclasen schon durch geringe Konzentrationen Al^{3+} ($< 5 \mu M$) inhibiert (Daten aus Vorversuchen, nicht gezeigt), daher war auch eine separate Untersuchung ausschließlich an Adenylylcyclasen nicht möglich.

Aus den vorliegenden Daten lässt sich also nicht mit letzter Sicherheit sagen, inwieweit die Al^{3+} -induzierte Calmodulin-Konformation physiologisch oder pathologisch von Bedeutung ist, d.h. ob in diesem Falle ein durch Al^{3+} vermittelter Effekt oder ein $G\alpha_s$ -konformations-spezifischer Effekt vorliegen.

6.3.4 14-3-3-Proteine

14-3-3-Proteine regulieren eine Reihe von zellulären Prozessen wie z.B. den Zellzyklus, Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und Zellbewegung. Sie kontrollieren die subzelluläre Verteilung oder intermolekulare Wechselwirkungen anderer Proteine, indem sie überwiegend (aber nicht ausschließlich) Phosphoserin- oder Phosphothreoninmotive auf den Zielproteinen binden (RSXpSXP oder RXXXpSXP, R = Arginin, S = Serin, P = Prolin, X = jede Aminosäure, pS = Phosphoserin), aber auch phosphorylierungs-unabhängige Interaktionen sind möglich (Übersichtsartikel von Mhawech 2005).

Über Tandem Affinity Purification wurden die 14-3-3-Isoformen β , γ und ζ als Interaktionspartner für AlF_4^- -aktiviertes $G\alpha_s$ identifiziert (vgl. Tabelle 29). Besonders interessant war die Tatsache, dass 14-3-3-Proteine neben Calmodulin als Interaktionspartner des aktivierten $G\alpha_s$ identifiziert wurden, denn sowohl Calmodulin als auch 14-3-3-Proteine regulieren die intrazelluläre Lokalisation eines monomeren G-Proteins, Rem2 (Beguin *et al.* 2005). Zudem interagieren 14-3-3-Proteine mit RGS-Isoformen (Benzing *et al.* 2000; Niu *et al.* 2002; Abramow-Newerly *et al.* 2006a). Eine nähere Charakterisierung dieser Interaktion erschien daher sehr vielversprechend.

Ein klassisches Phosphoserin-Motiv liegt auf $G\alpha_s$ nicht vor (Daten nicht gezeigt). Die in den TAP-Experimenten gezeigte Interaktion konnte also über ein nicht-klassisches Serin-Motiv oder phosphorylierungsunabhängig erfolgt sein. Von besonderem Interesse war dabei die Tatsache, dass es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten $G\alpha_s$ -s4 um eine Spleißvariante handelt, die ein zusätzliches, potentiell phosphorylierbares Serin enthält, so dass hier möglicherweise eine spleißvariantenspezifische Interaktion vorliegen könnte (vgl. Abschnitt 1.2.1).

Zunächst wurden reziproke Präzipitationsversuche mit heterolog in *E.coli* exprimiertem (und somit nicht phosphoryliertem) $G\alpha_s$ und 14-3-3-Isoformen durchgeführt. Die 14-3-3-Isoformen konnten den bekannten Interaktionspartner Raf-1 binden (vgl. Abb. 43). Eine Interaktion mit $G\alpha_s$ konnte hingegen nicht gezeigt werden (vgl. Abb. 44). Ein phosphorylierungs-unabhängiges Bindungsmotiv in einem heterodimeren Komplex mit 14-3-3-Proteinen konnte somit ausgeschlossen werden.

Die in den TAP-Experimenten identifizierte Interaktion von $G\alpha_s$ mit 14-3-3-Proteinen kann auch auf eine Phosphorylierung nicht-klassischer Motive zurückzuführen sein. Die verwendete Spleißvariante $G\alpha_s$ -s4 trägt einen phosphorylierbaren Serinrest, der möglicherweise in die Interaktion involviert ist. Weiterhin bestand die Möglichkeit, dass $G\alpha_s$ mit 14-3-3-Proteinen in multimeren Komplexen vorliegen und somit weitere (Säuger-) Proteine zugegen sein müssen, um eine Interaktion zu ermöglichen. In einem zweiten Schritt wurde daher untersucht, ob in Säugerzellen exprimiertes (und somit posttranslational modifiziertes) $G\alpha_s$ -s4 mit 14-3-3-Proteinen interagiert. $G\alpha_s$ -s4 wurde transient in HEK293-Zellen exprimiert und Lysate dieser Zellen mit immobilisiertem 14-3-3-Protein inkubiert. Jedoch auch in diesen Experimenten konnte keine Bindung von $G\alpha_s$ an 14-3-3-Proteine festgestellt werden (vgl. Abb. 45).

Somit ergab sich eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der TAP-Experimenten und der reziproken *pull down*-Versuche. Aus den Ergebnissen der TAP-Experimente lässt sich nicht schlussfolgern, dass eine *direkte* Protein-Protein-Interaktion von $G\alpha_s$ mit 14-3-3-Proteinen stattgefunden hat. Möglicherweise ist für eine Interaktion von $G\alpha_s$ mit 14-3-3-Proteinen ein weiteres Säugerprotein erforderlich und dieses Protein lag zwar in den für die TAP-Experimente verwendeten COS-7-Zellen vor, nicht jedoch in HEK293-Zellen. Die Interaktion von in COS-7-Zellen exprimiertem $G\alpha_s$ mit immobilisiertem 14-3-3-Protein wurde jedoch nicht untersucht. Es ist zudem nicht auszuschließen, dass es sich bei 14-3-3-Proteinen um Falsch-Positive Interaktionspartner handelt. Dem wurde versucht zu begegnen, indem nur solche Proteine in der TAP-Analyse berücksichtigt wurden, die ausschließlich mit einem der beiden Konformationszustände des $G\alpha_s$ ($G\alpha_s$ ·GDP oder $G\alpha_s$ ·GDP·AlF₄⁻) interagieren. Das Risiko für Falsch-Positive lässt sich jedoch nicht völlig ausschließen.

6.4 Ausblick

In den letzten Jahren wurde aus der Literatur immer wieder deutlich, dass ein Gesamtbild der verschiedenen Interaktionspartner eines Proteins oft erst durch eine Kombination von Methoden wie z.B. *yeast-two-hybrid*-Technologie und Affinitätsreinigung von Proteinkomplexen erfaßt werden kann (z.B. Schoonheim *et al.* 2006). Im Falle des $G\alpha_s$ erwies sich die Affinitätsreinigung von Proteinkomplexen als erfolgreicher Ansatz zur Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner. Besonders geeignet war die in der vorliegenden Arbeit verwendete *Tandem Affinity Purification*, wenngleich das Potential dieser Methode im Rahmen dieser Arbeit nicht völlig ausgeschöpft werden konnte. In weiterführenden Arbeiten können mit Hilfe der TAP bislang ungeklärte Punkte der $G\alpha_s$ -Signaltransduktion näher untersucht werden.

Das Vorkommen von vier $G\alpha_s$ -Spleißvarianten sowie deren gewebs- und entwicklungs-spezifisch regulierte Expression legen nahe, dass auch spleißvariantenspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen existieren. Durch die Untersuchung und den Vergleich der Interaktionspartner aller vier Spleißvarianten mittels TAP lassen sich solche Fragestellungen in geeigneter Weise adressieren.

In Weiterführung zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen zur Charakterisierung von Wechselwirkungen, die in Abhängigkeit von der $G\alpha_s$ -Aktivierung stattfinden, kann auch eine konstitutiv aktive Mutante von $G\alpha_s$ (z.B. $G\alpha_s$ -QL oder $G\alpha_s$ -QR, vgl. Abschnitt 1.2) der TAP-Prozedur unterzogen werden. Auf diese Weise kann die Verwendung von aktivierenden Substanzen wie $GTP\gamma S$ oder AlF_4^- vermieden werden.

Auch die Charakterisierung gewebespezifischer Interaktionspartner ist durch die Wahl der verwendeten Zelllinie (z.B. neuronaler Linien wie SHSY-5Y) möglich. Durch Kombination dieser Möglichkeiten mit einer zusätzlichen Stimulation der Zelllinien über Gs-koppelnde Rezeptoren bestehen weitreichende Möglichkeiten zur weiteren Charakterisierung neuer $G\alpha_s$ -spezifischer Interaktionspartner. Auf methodischer Ebene kann es dabei hilfreich sein, stabil mit $G\alpha_s$ -TAP transfizierte Zelllinien herzustellen, die das Köderprotein auf endogenem Niveau exprimieren bzw. die Expression von endogenem $G\alpha_s$ über RNAi-Technologien zu reprimieren (z.B. nach einem Ansatz von Forler *et al.* 2003), um Konkurrenzeffekte zwischen endogenem $G\alpha_s$ und heterolog exprimiertem Köderprotein zu minimieren.

7 Zusammenfassung

Die α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins, $G\alpha_s$, nimmt eine zentrale Stellung in der zellulären Signaltransduktion ein. $G\alpha_s$ ist ein Transmitter zwischen einer Vielzahl von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und dem Effektor Adenylylcyclase (AC) und stimuliert die Produktion des sekundären Botenstoffs cAMP. Im Gegensatz zu anderen G-Proteinen sind neben der AC nur wenige weitere Effektoren und keine Regulatoren der $G\alpha_s$ -Aktivität bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher neue Interaktionspartner des $G\alpha_s$ über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen charakterisiert. Dafür wurden zwei auf Affinitätsreinigung basierende Methoden verwendet, mit denen das Köderprotein $G\alpha_s$ zusammen mit gebundenen Interaktionspartnern aus Säugerzell-Lysaten isoliert wurde. Die isolierten Proteinkomplexe wurden über SDS-Gelelektrophorese und anschließende Massenspektrometrie analysiert.

Für die funktionelle Charakterisierung der Wechselwirkung von $G\alpha_s$ mit bisher unbekanntem Interaktionspartnern wurde rekombinantes $G\alpha_s$ eingesetzt. Murine Orthologe konnten jedoch im Gegensatz zu bovinem $G\alpha_s$ weder in wildtypischer Form noch unter Verwendung von C-terminalen und internen His₆-Epitopen in ausreichenden Mengen exprimiert und gereinigt werden. Für die funktionelle Charakterisierung der Interaktionspartner wurde daher C-terminal His₆-markiertes bovines $G\alpha_s$ verwendet.

Das Maus-Orthologe eines kurz vor Beginn der Arbeit erstmals beschriebenen humanen Regulators der $G\alpha_s$ -Aktivität, humanem RGS-PX1, wurde näher untersucht. Es wurde gezeigt, dass die $G\alpha_s$ -Aktivität weder durch murines RGS-PX1 noch humanes RGS-PX1 beeinflusst wird, so dass RGS-PX1 nicht als Regulator der $G\alpha_s$ -Aktivität angesehen werden kann.

Bei der Suche nach neuen $G\alpha_s$ -Interaktionspartnern wurden 10 mit inaktivem $G\alpha_s$ und 29 mit aktiviertem $G\alpha_s$ interagierende Proteine identifiziert, unter anderem Calmodulin, 14-3-3 β , 14-3-3 γ und 14-3-3 ζ sowie $G\gamma_{10}$ und $G\gamma_{12}$, deren Wechselwirkung mit $G\alpha_s$ näher charakterisiert wurde. Eine Wechselwirkung von $G\alpha_s$ mit 14-3-3-Proteinen wurde nicht bestätigt. Calmodulin wurde durch reziproke Ko-Reinigungen isolierter Proteine als $G\alpha_s$ -Interaktionspartner bestätigt. Ein Einfluß von Calmodulin auf die $G\alpha_s$ -katalysierte GTP-Hydrolyse konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Interaktion von $G\alpha_s$ mit $G\gamma_{10}$ und $G\gamma_{12}$ wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals *in vitro* durch Ko-Reinigung der heterolog in Insektenzellen exprimierten Proteine gezeigt und bietet einen wertvollen Ansatz für zukünftige Untersuchungen zu alternativer, nicht-plasmamembranständiger Signaltransduktion des $G\alpha_s$.

8 Summary

The α -subunit of the stimulatory G protein, $G\alpha_s$, plays a central role in cellular signal transduction. $G\alpha_s$ acts as a transmitter between a number of G protein-coupled receptors (GPCRs) and the effector enzyme adenylyl cyclase (AC) thereby stimulating the production of the second messenger cAMP. As opposed to other G proteins, few effectors other than AC and no regulators of $G\alpha_s$ activity are known to date.

In the present study, direct protein-protein interactions of $G\alpha_s$ and novel partners were characterized. Therefore, two methods based on affinity purification were used to isolate the bait protein $G\alpha_s$ together with bound partners from mammalian cell lysates. The isolated protein complexes were analyzed using SDS-gel electrophoresis and mass spectrometry.

For the functional characterization of its interaction with novel unknown partners *in vitro*, recombinant $G\alpha_s$ was used. Unlike bovine $G\alpha_s$, neither wild type nor C-terminally or internally affinity tagged murine $G\alpha_s$ orthologs could be recovered in sufficient amounts. Therefore, the functional characterization of novel interactors was performed using C-terminally His₆ tagged bovine $G\alpha_s$.

Recently, human RGS-PX1 was described as a novel regulator of $G\alpha_s$ activity and therefore, the mouse ortholog was characterized in detail. In functional assays it was demonstrated that neither the mouse nor the human ortholog affects $G\alpha_s$ activity, therefore RGS-PX1 can not be regarded a regulator of $G\alpha_s$ activity.

Using the affinity purification methods, 10 specific interactors for inactive $G\alpha_s$ and 29 specific interactors for activated $G\alpha_s$ were identified. Of these proteins, calmodulin, 14-3-3 β , 14-3-3 γ and 14-3-3 ζ as well as $G\gamma_{10}$ and $G\gamma_{12}$ were further characterized with regard to their interaction with $G\alpha_s$. The interaction of $G\alpha_s$ and the 14-3-3-isoforms was not confirmed. Calmodulin was confirmed as a $G\alpha_s$ -interacting protein by means of reciprocal co-purification of the isolated proteins. A functional influence of calmodulin on $G\alpha_s$ -catalysed GTP hydrolysis was not detected. In this study, the interaction of $G\alpha_s$ with $G\gamma_{10}$ and $G\gamma_{12}$ was demonstrated for the first time by co-purification of these proteins from insect cells where they were heterologously expressed. This provides a valuable basis for future characterization of alternate, non-plasmamembrane localized $G\alpha_s$ signal transduction.

9 Literatur

- Abramow-Newerly, M., *et al.* (2006a). "Modulation of subfamily B/R4 RGS protein function by 14-3-3 proteins." Cell Signal.
- Abramow-Newerly, M., *et al.* (2006b). "RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins." Cell Signal **18**(5): 579-91.
- Aifa, S., *et al.* (2002). "Interactions between the juxtamembrane domain of the EGFR and calmodulin measured by surface plasmon resonance." Cell Signal **14**(12): 1005-13.
- Arshavsky, V., *et al.* (1989). "Transducin GTPase provides for rapid quenching of the cGMP cascade in rod outer segments." FEBS Lett **250**(2): 353-6.
- Arshavsky, V. und M. D. Bownds (1992). "Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP." Nature **357**(6377): 416-7.
- Asano, T., *et al.* (1995). "Localization of various forms of the γ subunit of G protein in neural and nonneural tissues." J Neurochem **64**(3): 1267-73.
- Asano, T., *et al.* (1998). "GTP-binding protein γ_{12} subunit phosphorylation by protein kinase C--identification of the phosphorylation site and factors involved in cultured cells and rat tissues in vivo." Eur J Biochem **251**(1-2): 314-9.
- Balijepalli, R. C., *et al.* (2006). "Localization of cardiac L-type Ca^{2+} channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for β 2-adrenergic regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(19): 7500-5.
- Bar-Sinai, A., *et al.* (1992). "The GppNHp-activated adenylyl cyclase complex from turkey erythrocyte membranes can be isolated with its $\beta\gamma$ subunits." Eur J Biochem **207**(2): 703-8.
- Bastepe, M., *et al.* (2002). "Receptor-mediated adenylyl cyclase activation through $\text{XL}\alpha_s$, the extra-large variant of the stimulatory G protein α -subunit." Mol Endocrinol **16**(8): 1912-9.
- Bastepe, M. und H. Juppner (2005). "GNAS locus and pseudohypoparathyroidism." Horm Res **63**(2): 65-74.
- Bastepe, M., *et al.* (2004). "Stimulatory G protein directly regulates hypertrophic differentiation of growth plate cartilage in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(41): 14794-9.
- Beguin, P., *et al.* (2005). "Roles of 14-3-3 and calmodulin binding in subcellular localization and function of the small G-protein Rem2." Biochem J **390**(Pt 1): 67-75.
- Benzing, T., *et al.* (2000). "14-3-3 interacts with regulator of G protein signaling proteins and modulates their activity." J Biol Chem **275**(36): 28167-72.
- Berman, D. M., *et al.* (1996). "The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis." J Biol Chem **271**(44): 27209-12.
- Berstein, G., *et al.* (1992). "Phospholipase $\text{C}\beta$ 1 is a GTPase-activating protein for $\text{Gq}/11$, its physiologic regulator." Cell **70**(3): 411-8.
- Biddlecome, G. H., *et al.* (1996). "Regulation of phospholipase $\text{C}\beta$ 1 by Gq and $\text{m}1$ muscarinic cholinergic receptor. Steady-state balance of receptor-mediated activation and GTPase-activating protein-promoted deactivation." J Biol Chem **271**(14): 7999-8007.
- Blagoev, B., *et al.* (2003). "A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling." Nat Biotechnol **21**(3): 315-8.
- Bomsel, M. und K. E. Mostov (1993). "Possible role of both the α and $\beta\gamma$ subunits of the heterotrimeric G protein, G_s , in transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor." J Biol Chem **268**(34): 25824-35.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.

- Brandt, D. R. und E. M. Ross (1985). "GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, Gs. Accumulation and turnover of enzyme-nucleotide intermediates." J Biol Chem **260**(1): 266-72.
- Bray, P., *et al.* (1986). "Human cDNA clones for four species of $G\alpha_s$ signal transduction protein." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 8893-7.
- Bunemann, M., *et al.* (2003). "From The Cover: Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation." PNAS **100**(26): 16077-16082.
- Burckstummer, T., *et al.* (2006). "An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells." Nat Methods **3**(12): 1013-9.
- Carlson, K. E., *et al.* (1986). "Fractionation of the β subunit common to guanine nucleotide-binding regulatory proteins with the cytoskeleton." Mol Pharmacol **30**(5): 463-8.
- Cassel, D. und Z. Selinger (1977). "Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(8): 3307-11.
- Castellone, M. D., *et al.* (2005). "Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin- β -catenin signaling axis." Science **310**(5753): 1504-10.
- Castro-Fernandez, C., *et al.* (2003). "A $G\alpha_s$ mutation (D229S) differentially effects gonadotropin-releasing hormone receptor regulation by RGS10, RGS3 and RGS3T." Mol Cell Endocrinol **200**(1-2): 119-26.
- Chen, C. K., *et al.* (1996). "RGS-r, a retinal specific RGS protein, binds an intermediate conformation of transducin and enhances recycling." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12885-9.
- Clark, G. J., *et al.* (1997). "14-3-3 ζ negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain." J Biol Chem **272**(34): 20990-3.
- Coleman, D. E., *et al.* (1994). "Structures of active conformations of G_i1 and the mechanism of GTP hydrolysis." Science **265**(5177): 1405-12.
- Colombo, M. I., *et al.* (1994). "Gs regulation of endosome fusion suggests a role for signal transduction pathways in endocytosis." J Biol Chem **269**(21): 14919-23.
- Cook, L. A., *et al.* (1998). "Heterogeneous processing of a G protein γ subunit at a site critical for protein and membrane interactions." Biochemistry **37**(35): 12280-6.
- Cote, M., *et al.* (1997). "Association of α_s -subunit of the Gs protein with microfilaments and microtubules: implication during adrenocorticotropin stimulation in rat adrenal glomerulosa cells." Endocrinology **138**(1): 69-78.
- Couet, J., *et al.* (1997). "Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins." J Biol Chem **272**(10): 6525-33.
- Coulter, S. und M. Rodbell (1992). "Heterotrimeric G proteins in synaptoneurosome membranes are crosslinked by p-phenylenedimaleimide, yielding structures comparable in size to crosslinked tubulin and F-actin." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 5842-6.
- Cox, A. D. (1995). "Mutation and analysis of prenylation signal sequences." Methods Enzymol **250**: 105-21.
- Cox, D. M., *et al.* (2002). "Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells." Biotechniques **33**(2): 267-8, 270.
- Cross, M., *et al.* (2005). "A proteomics strategy for the enrichment of receptor-associated complexes." Proteomics **5**(18): 4754-63.
- Davare, M. A., *et al.* (2001). "A β_2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca^{2+} channel Cav_{1.2}." Science **293**(5527): 98-101.
- De Vries, L., *et al.* (1995). "GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein $G\alpha_3$, is a member of a protein family with a highly conserved core domain." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11916-20.
- Denker, S. P., *et al.* (1996). "Differential distribution of α subunits and $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas." J Cell Biol **133**(5): 1027-40.

- Digby, G. J., *et al.* (2006). "Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 17789-94.
- Dougherty, M. K. und D. K. Morrison (2004). "Unlocking the code of 14-3-3." J Cell Sci **117**(Pt 10): 1875-84.
- Drakas, R., *et al.* (2005). "A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells." Proteomics **5**(1): 132-7.
- Dupre, D. J., *et al.* (2007). "Dopamine receptor-interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for G γ subunits before assembly with G β ." J Biol Chem **282**(18): 13703-15.
- Eng, J., *et al.* (1994). "An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database." J. Am. Soc. Mass Spectrom. **5**(11): 976-989.
- Evanko, D. S., *et al.* (2001). "G $\beta\gamma$ isoforms selectively rescue plasma membrane localization and palmitoylation of mutant G α_s and G α_q ." J Biol Chem **276**(26): 23945-53.
- Evanko, D. S., *et al.* (2000). "Interaction with G $\beta\gamma$ is required for membrane targeting and palmitoylation of G α_s and G α_q ." J Biol Chem **275**(2): 1327-36.
- Ferreira, P., *et al.* (1999). "Selective formation of G $_s\alpha$ -MHC I complexes after desensitization of human platelets with iloprost." Eur J Biochem **259**(1-2): 167-74.
- Fischer, R., *et al.* (1996). "Calmodulin Binds to and Inhibits GTP Binding of the Ras-like GTPase Kir/Gem." J. Biol. Chem. **271**(41): 25067-25070.
- Forler, D., *et al.* (2003). "An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes." Nat Biotechnol **21**(1): 89-92.
- Frank, M., *et al.* (2005). "G Protein Activation without Subunit Dissociation Depends on a G α_i -specific Region." J. Biol. Chem. **280**(26): 24584-24590.
- Fu, H., *et al.* (1994). "Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins." Science **266**(5182): 126-9.
- Ganpat, M. M., *et al.* (2000). "Evidence for stimulation of adenylyl cyclase by an activated G(s) heterotrimer in cell membranes: an experimental method for controlling the G(s) subunit composition of cell membranes." Cell Signal **12**(2): 113-22.
- Gautam, N., *et al.* (1990). "G protein diversity is increased by associations with a variety of γ subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(20): 7973-7.
- Gavin, A. C., *et al.* (2002). "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes." Nature **415**(6868): 141-7.
- Graziano, M. P., *et al.* (1989). "Expression of G $_s\alpha$ in Escherichia coli. Purification and properties of two forms of the protein." J Biol Chem **264**(1): 409-18.
- Graziano, M. P., *et al.* (1991). "Purification of recombinant G $_s\alpha$." Methods Enzymol **195**: 192-202.
- Gu, C., *et al.* (2000). "Apoptotic signaling through the β -adrenergic receptor. A new Gs effector pathway." J Biol Chem **275**(27): 20726-33.
- Hamilton, S. L., *et al.* (1991). "Evidence for direct interaction of G $_s\alpha$ with the Ca $^{2+}$ channel of skeletal muscle." J Biol Chem **266**(29): 19528-35.
- Hansen, C. A., *et al.* (1994). "Localization of a heterotrimeric G protein γ subunit to focal adhesions and associated stress fibers." J Cell Biol **126**(3): 811-9.
- Hatta, S., *et al.* (1995). "Participation of Tubulin in the Stimulatory Regulation of Adenylyl Cyclase in Rat Cerebral Cortex Membranes." Journal of Neurochemistry **64**(3): 1343-1350.
- Hausdorff, W. P., *et al.* (1992). "Tyrosine phosphorylation of G protein α subunits by pp60c-src." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 5720-4.
- He, W., *et al.* (1998). "RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction." Neuron **20**(1): 95-102.
- Helms, J. B. (1995). "Role of heterotrimeric GTP binding proteins in vesicular protein transport: indications for both classical and alternative G protein cycles." FEBS Lett **369**(1): 84-8.
- Higashijima, T., *et al.* (1987). "Effects of Mg $^{2+}$ and the $\beta\gamma$ -subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins." J Biol Chem **262**(2): 762-6.

- Higgins, J. B. und P. J. Casey (1994). "In vitro processing of recombinant G protein γ subunits. Requirements for assembly of an active $\beta\gamma$ complex." J Biol Chem **269**(12): 9067-73.
- Hirshman, C. A., *et al.* (2005). "Isoproterenol induces actin depolymerization in human airway smooth muscle cells via activation of an Src kinase and Gs." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(5): L924-31.
- Huang, C., *et al.* (1999). "Persistent membrane association of activated and depalmitoylated G protein α subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 412-7.
- Huang, C., *et al.* (1997). "Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane." Mol Biol Cell **8**(12): 2365-78.
- Hughes, T. E., *et al.* (2001). "Visualization of a functional $G\alpha_q$ -green fluorescent protein fusion in living cells. Association with the plasma membrane is disrupted by mutational activation and by elimination of palmitoylation sites, but not by activation mediated by receptors or AlF_4 ." J Biol Chem **276**(6): 4227-35.
- Humrich, J., *et al.* (2005). "Phosphatidylinositol-like protein regulates G-protein $\beta\gamma$ folding by interaction with tailless complex polypeptide-1 α : dephosphorylation or splicing of PhLP turns the switch toward regulation of $G\beta\gamma$ folding." J Biol Chem **280**(20): 20042-50.
- Hunter, M. J. und S. L. Commerford (1961). "Pressure homogenization of mammalian tissues." Biochim Biophys Acta **47**: 580-6.
- Hurley, J. B., *et al.* (1984). "Isolation and characterization of a cDNA clone for the γ subunit of bovine retinal transducin." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(22): 6948-52.
- Hynes, T. R., *et al.* (2004). "Live cell imaging of Gs and the β_2 -adrenergic receptor demonstrates that both α_s and $\beta_1\gamma_7$ internalize upon stimulation and exhibit similar trafficking patterns that differ from that of the β_2 -adrenergic receptor." J. Biol. Chem.: M405151200.
- Ihnatovych, I., *et al.* (2001). "Maturation of rat brain is accompanied by differential expression of the long and short splice variants of $G_s\alpha$ protein: identification of cytosolic forms of $G_s\alpha$." J Neurochem **79**(1): 88-97.
- Ihnatovych, I., *et al.* (2002). "Opposing changes of trimeric G protein levels during ontogenetic development of rat brain." Brain Res Dev Brain Res **133**(1): 57-67.
- Iniguez-Lluhi, J., *et al.* (1993). "The importance of G-protein $\beta\gamma$ subunits." Trends Cell Biol **3**(7): 230-6.
- Iniguez-Lluhi, J. A., *et al.* (1992). "G protein $\beta\gamma$ subunits synthesized in Sf9 cells. Functional characterization and the significance of prenylation of γ ." J Biol Chem **267**(32): 23409-17.
- Ivanina, T., *et al.* (2000). "Modulation of L-type Ca^{2+} Channels by $G\beta\gamma$ and Calmodulin via Interactions with N and C Termini of α_1C ." J. Biol. Chem. **275**(51): 39846-39854.
- Kahn, R. A. und A. G. Gilman (1986). "The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein." J Biol Chem **261**(17): 7906-11.
- Katada, T., *et al.* (1986). "Two guanine nucleotide-binding proteins in rat brain serving as the specific substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. Interaction of the α -subunits with $\beta\gamma$ -subunits in development of their biological activities." J Biol Chem **261**(18): 8182-91.
- King, L. A. a. P., R. D. (1992). The baculovirus expression system: A Laboratory Guide., Chapman & Hall, London.
- Klattenhoff, C., *et al.* (2003). "Human brain synembryon interacts with $G_s\alpha$ and $G_q\alpha$ and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol." J Cell Physiol **195**(2): 151-7.
- Klemm, C., *et al.* (2006). "Evaluation of the titanium dioxide approach for MS analysis of phosphopeptides." J Mass Spectrom **41**(12): 1623-32.
- Kleuss, C. und A. G. Gilman (1997). " $G_s\alpha$ contains an unidentified covalent modification that increases its affinity for adenylyl cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6116-20.
- Kleuss, C. und E. Krause (2003). " $G\alpha_s$ is palmitoylated at the N-terminal glycine." Embo J **22**(4): 826-832.

- Knuesel, M., *et al.* (2003). "Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system." Mol Cell Proteomics **2**(11): 1225-33.
- Kozasa, T. und A. G. Gilman (1995). "Purification of recombinant G proteins from Sf9 cells by hexahistidine tagging of associated subunits. Characterization of α_{12} and inhibition of adenylyl cyclase by α_z ." J Biol Chem **270**(4): 1734-41.
- Krumins, A. M. und A. G. Gilman (2006). "Targeted knockdown of G protein subunits selectively prevents receptor-mediated modulation of effectors and reveals complex changes in non-targeted signaling proteins." J Biol Chem **281**(15): 10250-62.
- Kurita, H., *et al.* (2005). " Al^{3+} interaction sites of calmodulin and the Al^{3+} effect on target binding of calmodulin." Biochem Biophys Res Commun **333**(4): 1060-5.
- Laemmli, U. K., *et al.* (1976). "Correlation between structural transformation and cleavage of the major head protein of T4 bacteriophage." Cell **7**(2): 191-203.
- Lambright, D. G., *et al.* (1996). "The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein." Nature **379**(6563): 311-9.
- Landis, C. A., *et al.* (1989). "GTPase inhibiting mutations activate the α chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours." Nature **340**(6236): 692-6.
- Lee, E., *et al.* (1994). "Expression of G-protein α subunits in Escherichia coli." Methods Enzymol **237**: 146-64.
- Le-Niculescu, H., *et al.* (2005). "Identification and Characterization of GIV, a Novel $G\alpha_{i/s}$ - interacting Protein Found on COPI, Endoplasmic Reticulum-Golgi Transport Vesicles." J. Biol. Chem. **280**(23): 22012-22020.
- Levis, M. J. und H. R. Bourne (1992). "Activation of the α subunit of Gs in intact cells alters its abundance, rate of degradation, and membrane avidity." J Cell Biol **119**(5): 1297-307.
- Leyte, A., *et al.* (1992). "Multiple trimeric G-proteins on the trans-Golgi network exert stimulatory and inhibitory effects on secretory vesicle formation." Embo J **11**(13): 4795-804.
- Li, S., *et al.* (1995). "Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin." J Biol Chem **270**(26): 15693-701.
- Lidwell, K., *et al.* (2004). "Determining calmodulin binding to metabotropic glutamate receptors with distinct protein-interaction methods." Biochem Soc Trans **32**(Pt 5): 868-70.
- Liebmann, C., *et al.* (1996). "Tyrosine phosphorylation of $G_s\alpha$ and inhibition of bradykinin-induced activation of the cyclic AMP pathway in A431 cells by epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **271**(49): 31098-105.
- Linder, M. E. (1999). Expression and Purification of G-Protein α Subunits in Escherichia coli. G Proteins. Techniques of Analysis. D. R. Manning, CRC Press LLC: 2-21.
- Liu, M., *et al.* (1997). "The Ca^{2+} -dependent Binding of Calmodulin to an N-terminal Motif of the Heterotrimeric G Protein β Subunit." J. Biol. Chem. **272**(30): 18801-18807.
- Liu, X., *et al.* (1998). "Identification of Amino Acid Residues of $G_s\alpha$ Critical to Repression of Adipogenesis." J. Biol. Chem. **273**(19): 11685-11694.
- Lu, T., *et al.* (1999). "Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein α subunit." J Physiol **518** (Pt 2): 371-84.
- Lukov, G. L., *et al.* (2005). "Phosducin-like protein acts as a molecular chaperone for G protein $\beta\gamma$ dimer assembly." Embo J **24**(11): 1965-75.
- Ma, Y. C., *et al.* (2000). "Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins." Cell **102**(5): 635-46.
- Ma, Y. C. und X. Y. Huang (2002). "Novel signaling pathway through the β -adrenergic receptor." Trends Cardiovasc Med **12**(1): 46-9.
- Manning, D. R. (2003). "Evidence mounts for receptor-independent activation of heterotrimeric G proteins normally *in vivo*: positioning of the mitotic spindle in *C. elegans*." Sci STKE **2003**(196): pe35.
- Markby, D. W., *et al.* (1993). "Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G α subunit." Science **262**(5141): 1895-901.

- Matsuda, J. J., *et al.* (1992). "Enhancement of rabbit cardiac sodium channels by β -adrenergic stimulation." Circ Res **70**(1): 199-207.
- Mattera, R., *et al.* (1989). "Splice variants of the alpha subunit of the G protein Gs activate both adenylyl cyclase and calcium channels." Science **243**(4892): 804-7.
- Mende, U., *et al.* (1995). "The G protein γ subunit. Requirements for dimerization with β subunits." J Biol Chem **270**(26): 15892-8.
- Mervine, S. M., *et al.* (2006). "Analysis of G Protein $\beta\gamma$ Dimer Formation in Live Cells using Multicolor Bimolecular Fluorescence Complementation Demonstrates Preferences of β_1 for Particular γ Subunits." Mol Pharmacol.
- Mhawech, P. (2005). "14-3-3 proteins--an update." Cell Res **15**(4): 228-36.
- Michaelson, D., *et al.* (2002). "Membrane Trafficking of Heterotrimeric G Proteins via the Endoplasmic Reticulum and Golgi." Mol. Biol. Cell **13**(9): 3294-3302.
- Mollner, S., *et al.* (1992). "The α subunit of the stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein forms high-molecular-mass aggregates, concomitant with iloprost-induced desensitization of human platelet adenylyl cyclase." Eur J Biochem **210**(2): 539-44.
- Morishita, R., *et al.* (1995). "Primary structure of a γ subunit of G protein, γ_{12} , and its phosphorylation by protein kinase C." J Biol Chem **270**(49): 29469-75.
- Morris, A. J. und C. C. Malbon (1999). "Physiological regulation of G protein-linked signaling." Physiol Rev **79**(4): 1373-430.
- Moyers, J. S., *et al.* (1995). "Identification of the in vitro phosphorylation sites on G_s α mediated by pp60c-src." Biochem J **305**(Pt 2): 411-7.
- Mumby, S. M. und M. E. Linder (1994). "Myristoylation of G-protein α subunits." Methods Enzymol **237**: 254-68.
- Nakafuku, M., *et al.* (1987). "Occurrence in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene homologous to the cDNA coding for the α subunit of mammalian G proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(8): 2140-4.
- Natochin, M. und N. O. Artemyev (1998). "A single mutation Asp229 --> Ser confers upon G_s α the ability to interact with regulators of G protein signaling." Biochemistry **37**(39): 13776-80.
- Natochin, M., *et al.* (2005). "Characterization of the G α_s regulator cysteine string protein." J Biol Chem **280**(34): 30236-41.
- Negishi, M., *et al.* (1992). "Translocation of α subunits of stimulatory guanine nucleotide-binding proteins through stimulation of the prostacyclin receptor in mouse mastocytoma cells." J Biol Chem **267**(4): 2364-9.
- Niu, J., *et al.* (2002). "RGS3 interacts with 14-3-3 via the N-terminal region distinct from the RGS (regulator of G-protein signalling) domain." Biochem J **365**(Pt 3): 677-84.
- Noel, J. P., *et al.* (1993). "The 2.2 Å crystal structure of transducin α complexed with GTP γ S." Nature **366**(6456): 654-63.
- Nurnberg, B. und G. Ahnert-Hilger (1996). "Potential roles of heterotrimeric G proteins of the endomembrane system." FEBS Lett **389**(1): 61-5.
- Oh, P. und J. E. Schnitzer (2001). "Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G_q binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G_i and G_s target lipid rafts by default." Mol Biol Cell **12**(3): 685-98.
- Okamoto, T., *et al.* (1998). "Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane." J Biol Chem **273**(10): 5419-22.
- Ong, O. C., *et al.* (1995). "Molecular cloning and characterization of the G protein γ subunit of cone photoreceptors." J Biol Chem **270**(15): 8495-500.
- Ozawa, K., *et al.* (1996). "Phase specific association of heterotrimeric GTP-binding proteins with the actin-based cytoskeleton during thrombin receptor-mediated platelet activation." FEBS Lett **382**(1-2): 159-63.
- Palygin, O. A., *et al.* (2008). "Regulation of caveolar cardiac sodium current by a single G_s α histidine residue." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(4): H1693-9.

- Park, J. G., *et al.* (1999). "Transcriptional regulation by the γ_5 subunit of a heterotrimeric G protein during adipogenesis." Embo J **18**(14): 4004-12.
- Perkins, D. N., *et al.* (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." Electrophoresis **20**(18): 3551-67.
- Pimplikar, S. W. und K. Simons (1993). "Regulation of apical transport in epithelial cells by a Gs class of heterotrimeric G protein." Nature **362**(6419): 456-8.
- Popov, S., *et al.* (1997). "The regulators of G protein signaling (RGS) domains of RGS4, RGS10, and GAIP retain GTPase activating protein activity in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7216-20.
- Popov, S. G., *et al.* (2000). "Ca²⁺/Calmodulin reverses phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent inhibition of regulators of G protein-signaling GTPase-activating protein activity." J Biol Chem **275**(25): 18962-8.
- Poppleton, H., *et al.* (1996). "Activation of G_s α by the epidermal growth factor receptor involves phosphorylation." J Biol Chem **271**(12): 6947-51.
- Pozuelo Rubio, M., *et al.* (2004). "14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking." Biochem J **379**(Pt 2): 395-408.
- Puig, O., *et al.* (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification." Methods **24**(3): 218-29.
- Pyne, N. J., *et al.* (1992a). "Phosphorylation of the spliced variant forms of the recombinant stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein (G_s α) by protein kinase C." Biochem J **285**(Pt 1): 333-8.
- Pyne, N. J., *et al.* (1992b). "Phosphorylation of the recombinant spliced variants of the α -subunit of the stimulatory guanine-nucleotide binding regulatory protein (Gs) by the catalytic sub-unit of protein kinase A." Biochem Biophys Res Commun **186**(2): 1081-6.
- Rahmatullah, M., *et al.* (1995). "Specificity of G protein α - γ subunit interactions. N-terminal 15 amino acids of γ subunit specifies interaction with α subunit." J Biol Chem **270**(7): 2946-51.
- Rahmatullah, M. und J. D. Robishaw (1994). "Direct interaction of the α and γ subunits of the G proteins. Purification and analysis by limited proteolysis." J Biol Chem **269**(5): 3574-80.
- Ransnas, L. A. und P. A. Insel (1988). "Subunit dissociation is the mechanism for hormonal activation of the Gs protein in native membranes." J Biol Chem **263**(33): 17239-42.
- Rasenick, M. M. und N. Wang (1988). "Exchange of guanine nucleotides between tubulin and GTP-binding proteins that regulate adenylate cyclase: cytoskeletal modification of neuronal signal transduction." J Neurochem **51**(1): 300-11.
- Rebois, R. V. und T. E. Hebert (2003). "Protein complexes involved in heptahelical receptor-mediated signal transduction." Receptors Channels **9**(3): 169-94.
- Rens-Domiano, S. und H. E. Hamm (1995). "Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins." Faseb J **9**(11): 1059-66.
- Rigaut, G., *et al.* (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." Nat Biotechnol **17**(10): 1030-2.
- Ribalet, B. und G. T. Eddlestone (1995). "Characterization of the G protein coupling of SRIF and β -adrenergic receptors to the maxi K Ca channel in insulin-secreting cells." J Membr Biol **148**(2): 111-25.
- Robillard, L., *et al.* (2000). "G $\beta\gamma$ subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling *in vivo*." Cellular Signalling **12**(9-10): 673-682.
- Roy, A. A., *et al.* (2003). "Recruitment of RGS2 and RGS4 to the plasma membrane by G proteins and receptors reflects functional interactions." Mol Pharmacol **64**(3): 587-93.
- Rubio, V., *et al.* (2005). "An alternative tandem affinity purification strategy applied to Arabidopsis protein complex isolation." Plant J **41**(5): 767-78.
- Rybin, V. O., *et al.* (2000). "Differential targeting of β -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway." J Biol Chem **275**(52): 41447-57.

- Saffitz, J., *et al.* (1994). "Immunoelectron microscopic identification of cytoplasmic and nuclear G_sα in S49 lymphoma cells." FASEB J. **8**(2): 252-258.
- Salomon, Y., *et al.* (1974). "A highly sensitive adenylate cyclase assay." Anal Biochem **58**(2): 541-8.
- Sambrook, J. und D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sarndahl, E., *et al.* (1993). "Stimulus-induced dissociation of α subunits of heterotrimeric GTP-binding proteins from the cytoskeleton of human neutrophils." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6552-6.
- Schakowski, F., *et al.* (2001). "A novel minimal-size vector (MIDGE) improves transgene expression in colon carcinoma cells and avoids transfection of undesired DNA." Mol Ther **3**(5 Pt 1): 793-800.
- Schimanski, B., *et al.* (2005). "Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination." Eukaryot Cell **4**(11): 1942-50.
- Scholich, K., *et al.* (1999). "Facilitation of signal onset and termination by adenylyl cyclase." Science **283**(5406): 1328-31.
- Schoonheim, P. J., *et al.* (2006). "A Comprehensive Analysis of the 14-3-3 Interactome in Barley Leaves Using a Complementary Proteomics and Two-hybrid Approach." Plant Physiol.
- Schubert, B., *et al.* (1989). "β-adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways." Science **245**(4917): 516-9.
- Seifert, R., *et al.* (1998). "Different effects of G_sα splice variants on β2-adrenoreceptor-mediated signaling. The β2-adrenoreceptor coupled to the long splice variant of G_sα has properties of a constitutively active receptor." J Biol Chem **273**(18): 5109-16.
- Sheridan, D. L., *et al.* (2002). "A new way to rapidly create functional, fluorescent fusion proteins: random insertion of GFP with an in vitro transposition reaction." BMC Neurosci **3**(1): 7.
- Shevchenko, A., *et al.* (2002). "Deciphering protein complexes and protein interaction networks by tandem affinity purification and mass spectrometry: analytical perspective." Mol Cell Proteomics **1**(3): 204-12.
- Siegel, N. und A. Haug (1983). "Aluminum interaction with calmodulin. Evidence for altered structure and function from optical and enzymatic studies." Biochim Biophys Acta **744**(1): 36-45.
- Simon, M. I., *et al.* (1991). "Diversity of G proteins in signal transduction." Science **252**(5007): 802-8.
- Snow, B. E., *et al.* (1998). "A G protein γ subunit-like domain shared between RGS11 and other RGS proteins specifies binding to Gβ₅ subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13307-12.
- Sondek, J., *et al.* (1996). "Crystal structure of a G-protein βγ dimer at 2.1 Å resolution." Nature **379**(6563): 369-74.
- Sondek, J., *et al.* (1994). "GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin α-GDP-AIF-4." Nature **372**(6503): 276-9.
- Spiegel, A. M. (2000). "G protein defects in signal transduction." Horm Res **53**(Suppl 3): 17-22.
- Sternweis, P. C. und A. G. Gilman (1982). "Aluminum: a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(16): 4888-91.
- Sun, H., *et al.* (1997). "The juxtamembrane, cytosolic region of the epidermal growth factor receptor is involved in association with α-subunit of Gs." J Biol Chem **272**(9): 5413-20.
- Sunahara, R. K., *et al.* (1997). "Crystal structure of the adenylyl cyclase activator G_sα." Science **278**(5345): 1943-7.

- Takida, S. und P. B. Wedegaertner (2003). "Heterotrimer formation, together with isoprenylation, is required for plasma membrane targeting of G $\beta\gamma$." J Biol Chem **27**: 27.
- Tall, G. G., *et al.* (2003). "Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor." J Biol Chem **278**(10): 8356-62.
- Tang, W., *et al.* (2006). "G $\beta\gamma$ inhibits G α GTPase-activating proteins by inhibition of G α -GTP binding during stimulation by receptor." J Biol Chem **281**(8): 4746-53.
- Tesmer, J. J., *et al.* (1997a). "Structure of RGS4 bound to AlF $_4^-$ -activated G $_i\alpha_1$: stabilization of the transition state for GTP hydrolysis." Cell **89**(2): 251-61.
- Tesmer, J. J., *et al.* (1997b). "Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G $_s\alpha$.GTP γ S." Science **278**(5345): 1907-16.
- Thiyagarajan, M. M., *et al.* (2002). "Activation-induced subcellular redistribution of G α_s is dependent upon its unique N-terminus." Biochemistry **41**(30): 9470-84.
- Tinker, A. (2006). "The selective interactions and functions of regulators of G-protein signalling." Semin Cell Dev Biol **17**(3): 377-82.
- Towbin, H., *et al.* (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Ueda, H., *et al.* (1998). "G protein γ subunits coimmunoprecipitated with antibodies against α subunits: identification of major isoforms in cultured cells by silver stain and immunoblotting with conventional transfer procedure." J Biochem (Tokyo) **124**(5): 1033-1037.
- Ueda, H., *et al.* (1997). "Association of the γ_{12} subunit of G proteins with actin filaments." J Cell Sci **110**(13): 1503-1511.
- Ueda, H., *et al.* (1999). "Phosphorylation of F-actin-Associating G Protein γ_{12} Subunit Enhances Fibroblast Motility." J. Biol. Chem. **274**(17): 12124-12128.
- Ueda, N., *et al.* (1994). "G protein $\beta\gamma$ subunits. Simplified purification and properties of novel isoforms." J Biol Chem **269**(6): 4388-95.
- Van Dyke, R. W. (2004). "Heterotrimeric G protein subunits are located on rat liver endosomes." BMC Physiol **4**(1): 1.
- Vorherr, T., *et al.* (1993). "The calmodulin binding domain of nitric oxide synthase and adenylyl cyclase." Biochemistry **32**(23): 6081-8.
- Wang, D., *et al.* (1999). "Calmodulin binding to G protein-coupling domain of opioid receptors." J Biol Chem **274**(31): 22081-8.
- Wang, H.-y. und C. C. Malbon (1999). "G $_s\alpha$ Repression of Adipogenesis via Syk." J. Biol. Chem. **274**(45): 32159-32166.
- Wang, Q., *et al.* (1999). "Ribozyme approach identifies a functional association between the G protein $\beta_1\gamma_7$ subunits in the β -adrenergic receptor signaling pathway." J Biol Chem **274**(24): 17365-71.
- Watson, N., *et al.* (1996). "RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein α -subunits." Nature **383**(6596): 172-5.
- Wedegaertner, P. B. und H. R. Bourne (1994). "Activation and depalmitoylation of G $_s\alpha$." Cell **77**(7): 1063-70.
- Weinstein, L. S., *et al.* (2004). "Minireview: GNAS: normal and abnormal functions." Endocrinology **145**(12): 5459-64.
- Weitmann, S., *et al.* (1999). "A functional chimera of mammalian guanylyl and adenylyl cyclases." Biochemistry **38**(11): 3409-13.
- Wells, C. A., *et al.* (2006). "The role of the chaperonin CCT/TRiC complex in G protein $\beta\gamma$ dimer assembly." J. Biol. Chem.: M602409200.
- Wes, P. D., *et al.* (1996). "RIC, a calmodulin-binding Ras-like GTPase." Embo J **15**(21): 5839-48.
- Willard, F. S. und M. F. Crouch (2000). "Nuclear and cytoskeletal translocation and localization of heterotrimeric G-proteins." Immunol Cell Biol **78**(4): 387-94.
- Wirtz, S. (2005) "Herstellung und Charakterisierung von G α_s -Spleißvarianten". Diplomarbeit

- Wittinghofer, A. (1997). "Signaling mechanistics: aluminum fluoride for molecule of the year." Curr Biol **7**(11): R682-5.
- Wu, H. C., *et al.* (1998). "G protein β subunit is closely associated with microtubules." J Cell Biochem **70**(4): 553-62.
- Yan, K., *et al.* (2001). "Tubulin stimulates adenylyl cyclase activity in C6 glioma cells by bypassing the β -adrenergic receptor: a potential mechanism of G protein activation." J Neurochem **76**(1): 182-90.
- Yasuda, H., *et al.* (1998). "Phosphorylation of the G protein γ_{12} subunit regulates effector specificity." J Biol Chem **273**(34): 21958-65.
- Yatani, A. und A. M. Brown (1989). "Rapid β -adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G protein pathway." Science **245**(4913): 71-4.
- Yi, F., *et al.* (1991). "Structural and functional studies of cross-linked Go protein subunits." J Biol Chem **266**(6): 3900-6.
- Yu, J. Z. und M. M. Rasenick (2002). "Real-time visualization of a fluorescent $G\alpha_s$: dissociation of the activated G protein from plasma membrane." Mol Pharmacol **61**(2): 352-9.
- Yu, S., *et al.* (1998). "Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein α -subunit ($G_s\alpha$) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the $G_s\alpha$ gene." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8715-20.
- Zhang, L., *et al.* (1997). "Raf-1 kinase and exoenzyme S interact with 14-3-3 ζ through a common site involving lysine 49." J Biol Chem **272**(21): 13717-24.
- Zheng, B., *et al.* (2004). "Regulation of epidermal growth factor receptor degradation by heterotrimeric $G\alpha_s$ protein." Mol Biol Cell **15**(12): 5538-50.
- Zheng, B., *et al.* (2001). "RGS-PX1, a GAP for $G\alpha_s$ and sorting nexin in vesicular trafficking." Science **294**(5548): 1939-42.
- Zhu, H., *et al.* (2003). "Proteomics." Annu Rev Biochem **72**: 783-812.

Anhang

Verwendete Abkürzungen und Fachbegriffe

AA/BAA	Acrylamid-Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
<i>accession number</i>	datenbankspezifische Zugangsnummer für z.B. ein Protein, Gen oder Transkript, das unter dieser Nummer in der entsprechenden Datenbank abgelegt ist.
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>bait</i>	Köder.
<i>batch</i>	<i>engl.</i> Bündel, Menge, Stapel. Bezeichnet die Inkubation einer Proteinlösung mit einer (Affinitäts-)Matrix außerhalb einer Säule. Durch konstante Agitation wird eine gute Durchmischung und eine effizientere Bindung epitopmarkierter Proteine an die entsprechende Affinitätsmatrix erreicht.
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulinabhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosin-3'-5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
C ₁₂ E ₁₀	Polyoxyethylen-10-Laurylether
<i>common</i>	allgemein (z.B. Gβ- <i>common</i> -Antikörper = Antikörper gegen alle Gβ-Isoformen)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphate
DTB	Desthiobiotin
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz, <i>enhanced chemiluminescence</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GST	Glutathion-S-Transferase
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphat-Hydrolase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
<i>gene imprinting</i>	allel-spezifische Expression eines Genes
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie)
<i>missense</i> -Mutation	Mutation der Nukleotidsequenz, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führt

MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Verhältnis Anzahl der Viren : Anzahl der Zellen)
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molekulargewichtsausschlußgröße (<i>molecular weight cut off</i>)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Triessigsäure
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei der Wellenlänge $\lambda = 600\text{nm}$
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
P _i	Phosphation PO ₄ ³⁻ (anorganisches Phosphat – <i>inorganic phosphate</i>)
<i>prey</i> (engl.)	Beute
<i>primer</i> (engl.)	Desoxyoligonukleotid; Komponente von Polymerase-Kettenreaktionen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
<i>screening</i> (engl.)	Rastersuche, Selektion, Aussieben
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyle sulfate)
SV	Säulenvolumen
<i>tag</i> (engl.)	an Biomoleküle angefügte Modifikation, die den Molekülen definierte Eigenschaften verleiht (z.B. Fluoreszenz oder Affinität). In dieser Arbeit wurden Proteine mit Aminosäuresequenzen modifiziert, die eine Affinität zu bestimmten Matrices vermitteln (<i>Affinitäts-tags</i>).
TAP	Tandem-Affinitäts-Reinigung (<i>Tandem Affinity Purification</i>)
<i>Taq</i> -Polymerase	hitzebeständige DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
<i>template</i> (engl.)	Matrize, DNA-Vorlage
TEV	Tobacco-Etch-Virus
U	Einheit (<i>unit</i>)
wt	Wildtyp

Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Diel, S., Klass, K., Wittig, B., Kleuss, C. (2006). „Gβγ activation site in adenylyl cyclase type II. Adenylyl cyclase type III is inhibited by Gβγ“. *J Biol Chem* **281**(1): 288-94

Kongreßbeiträge

Klass, K. und Kleuss, C. (2004) „A Gα_s-specific RGS Protein in Mouse“

45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **369**, Suppl. 1

Klass, K., Krause, E. und Kleuss, C. (2005) „Identification of novel Gα_s-interacting proteins“

9. Jahrestagung der Signaltransduktions-Gesellschaft STS, Weimar
Signal Transduction **5**, Suppl. 1

Vorträge

„Wenn Forscher angeln gehen...Affinitätstags in der Proteomforschung.“

April 2006, Hochschule Anhalt (FH), Fachbereich 7 (Angewandte Biowissenschaften und Prozeßtechnik), Abt. Molekulare Biotechnologie, Köthen, auf Einladung von Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, die Arbeit selbständig und mit keinen anderen als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Kathrin Klass

Berlin, im Juni 2008

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. Christiane Kleuss für die Bereitstellung des sehr interessanten Promotionsthemas, ihre große Hilfsbereitschaft bei den großen und kleinen Dingen während der Arbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen, durch die ich sehr viel gelernt habe.

Herrn Prof. Walter Rosenthal danke ich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am Institut und die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Volker Haucke möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Besonderen Dank schulde ich der Sonnenfeld-Stiftung, die einen großen Teil meiner Arbeit nicht nur finanziell sondern auch durch die sehr persönliche und kontinuierliche Betreuung durch Herrn Prof. Dr.-Ing. Freiherr von Villiez unterstützt hat.

Auch der Promotionsstiftung der Charité möchte ich für die erhaltene finanzielle Unterstützung aufrichtig danken.

Ich danke auch der AG Massenspektrometrie am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, insbesondere dem Leiter Herrn Dr. Eberhard Krause für die Zusammenarbeit, die umfassende Unterstützung bei den massenspektrometrischen Untersuchungen sowie die vielen Gespräche, die mir das weite Feld der Massenspektrometrie verständlich gemacht haben.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert danke ich für die Einladung, meine Arbeit in einem Vortrag an seiner Fakultät vorzustellen.

Mein Dank gilt außerdem den Doktoranden und Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft. Besonders möchte ich Susanne Diel, Hendrik Falk und Melanie Kny danken, die mir jederzeit mit ihrer Hilfsbereitschaft, konstruktiven Diskussionen und fröhlichen Art zur Seite gestanden haben.

Frau Dr. Anja Talke und Anca Marksteder möchte ich für viele hilfreiche Gespräche und Anregungen in der letzten Phase der Arbeit danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mich während der gesamten Zeit in jeglicher Hinsicht unterstützt und mir immer wieder Kraft gegeben haben.