

2 FRAGESTELLUNG

Guanylnukleotid-bindende Proteine vermitteln die Signalübertragung von membranassoziierten Rezeptoren zu intrazellulär lokalisierten Effektoren. G-Proteine sind Heterotrimerer und bestehen aus α -, β - und γ -Untereinheiten. Aktivierung eines G-Proteins führt zur Dissoziation der GTP-gebundenen Form der $G\alpha$ -Untereinheit von dem $G\beta\gamma$ -Heterodimer. Beide Komponenten, $G\alpha$ -GTP und $G\beta\gamma$ -Heterodimer regulieren unterschiedliche Effektoren. Während verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten unterschiedliche Kinetik der GTP-Hydrolyse aufweisen, familienspezifisch bestimmte Effektorgruppen regulieren und an bestimmte Rezeptoren gekoppelt sind (1.2.2), scheinen $G\beta_{1-4}$ -Untereinheiten untereinander nur geringfügige biochemische und funktionelle Unterschiede aufzuweisen, die mit einer hohen Homologie ihrer Aminosäuresequenzen korrelieren (1.2.5). Das jüngste Mitglied der $G\beta$ -Protein-Familie, $G\beta_5$, zeigt einen geringeren Verwandtschaftsgrad zu den bereits bekannten $G\beta$ -Untereinheiten. Deshalb wurde angenommen, dass die Abweichungen in der Primärstruktur zu einer Änderung der funktionellen Eigenschaften des Proteins führen könnten. Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die $G\beta_5$ -Untereinheit biochemisch und funktionell zu charakterisieren. Im einzelnen sollte die Spezifität der Interaktion von $G\gamma$ - und $G\alpha$ -Untereinheiten mit $G\beta_5$ untersucht werden.

Bei der Bildung von heterotrimeren Komplexen zeigen $G\alpha$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten mitunter ausgeprägte Präferenzen gegenüber $G\beta$ -Untereinheiten wie z.B. beim Transduzin-Heterotrimer. Daher sollte auch die $G\beta_5$ -Untereinheit durch vergleichende Koexpressions- bzw. Koreinigungsansätze und funktionelle Untersuchungen auf die Interaktionsfähigkeit mit verschiedenen $G\alpha$ - bzw. $G\gamma$ -Untereinheiten untersucht werden. Die $G\beta_1$ - bzw. $G\beta_2$ -Untereinheit sollte als Kontrolle dienen. Da die Existenz von $G\beta_5$ bislang im wesentlichen durch molekularbiologische und immunbiochemische Methoden nachgewiesen wurde, sollte $G\beta_5$ aus nativen Geweben gereinigt und charakterisiert werden.

Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, dass $G\beta_5\gamma$ -Komplexe während der Reinigungsprozedur dissoziierten. Da es sich dabei um ein für $G\beta\gamma$ -Komplexe ungewöhnliches Phänomen handelte, sollte die Dissoziation bzw. die Eigenschaften der dissoziierten $G\beta_5$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten charakterisiert werden. Im einzelnen sollte geprüft werden, ob dissoziierte Untereinheiten wieder zu einem funktionell aktiven Heterodimer reassoziieren können. Die Funktionalität der reassozierten Komplexen sollte an der Regulation der enzymatischen Aktivität von PLC- β_2 und an der Interaktion mit $G\alpha$ -Untereinheiten getestet werden. Darüberhinaus sollte geprüft werden, ob auch die „klassische“ $G\beta\gamma$ -Komplexe unter den gleichen Bedingungen eine Dissoziation aufweisen.

Während der Untersuchungen wurde berichtet, dass RGS-Proteine der R7 bzw. C Subfamilie mit G β ₅ Heterodimere Komplexe bilden. Aus diesem Grund sollte auch die Interaktion zwischen G β ₅ und RGS-Proteinen der R7 Subfamilie untersucht werden. Dabei sollten sowohl native als auch rekombinante in *Sf9*-Zellen exprimierte G β ₅/RGS-Komplexe gereinigt, charakterisiert und auf ihre Dissoziierbarkeit geprüft werden.