

5 ERGEBNISSE

5.1 Interaktion der $G\beta_5$ -Untereinheit mit $G\alpha$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten

Nach ihrer Entdeckung wurde die $G\beta_5$ -Untereinheit trotz ihres relativ geringen Verwandtschaftsgrades zunächst als eine klassische $G\beta$ -Untereinheit angesehen. Da die grundlegende Eigenschaft einer $G\beta$ -Untereinheit die Assoziation mit $G\gamma$ - und $G\alpha$ -Untereinheiten ist, erschien es notwendig, die Interaktionen dieser neuartigen $G\beta$ -Untereinheit bei der Bildung des heterotrimeren G-Protein-Komplexes zu untersuchen.

Hierzu wurden $G\alpha_{i1}$, $G\beta_5$ und $G\gamma_2$ bzw. $G\alpha_{i1}$, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ in *Sf9*-Zellen koexprimiert. Dabei trugen entweder die $G\gamma_2$ -Untereinheit (Abb. 4A) oder die $G\alpha_{i1}$ -Untereinheit (Abb. 4B) eine Hexahistidin-Affinitätsmarkierung. Da heterotrimere G-Protein-Komplexe unter physiologischen Bedingungen membranständig sind, wurden nur Proteine aus der Membranfraktion über die Ni-NTA-Säule gereinigt. Die entsprechenden Eluate sind in Abb. 4A und 4B (Spur 1 und 3) zu sehen. Man beachte eine Koelution der hexahistidinmarkierten Untereinheiten mit solchen Untereinheiten, die keine Affinitätsmarkierung tragen.

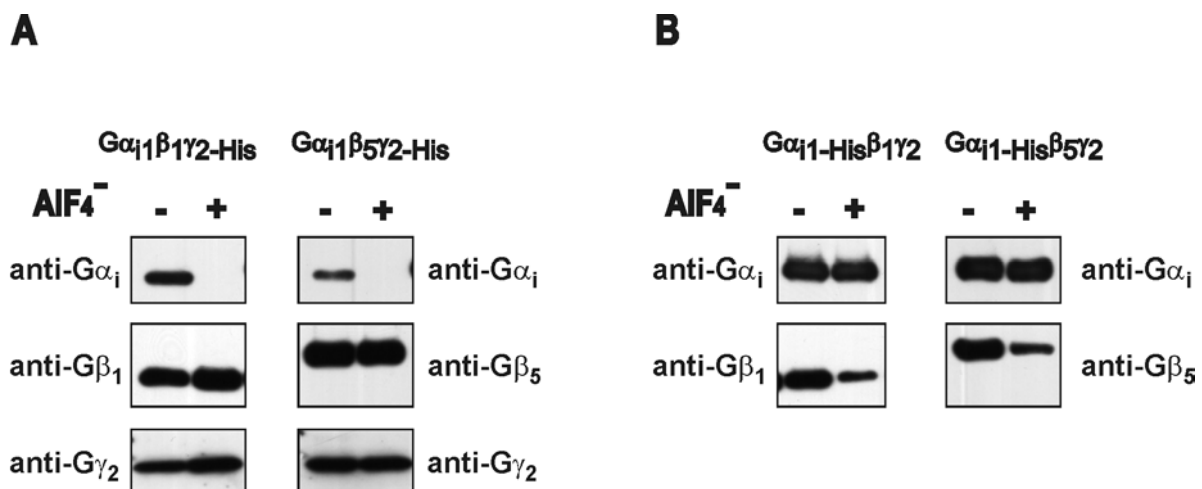


Abb. 4: Bildung von $G\alpha_{i1}\beta_5\gamma_2$ -Komplexen

Die oben bezeichneten heterotrimeren G-Protein-Komplexe wurden in *Sf9*-Zellen exprimiert und nach Extraktion aus den Zellmembranen affinitätschromatographisch gereinigt. Die eluierten Proteine wurden mittels Immunoblot-Verfahren unter Verwendung polyklonaler Antiseren (Tab. 4; für den $G\alpha_i$ -Blot wurde AS 8, für den $G\beta_1$ -Blot AS 398 verwendet) detektiert. Abgebildet sind jeweils die Peak-Fractionen, die etwa 70% des eluierten Proteins enthalten.

Die Funktionalität dieser heterotrimeren Komplexe und die Spezifität der Methode wurde in einem parallelen Ansatz untersucht. Hier wurden durch Zugabe von AMF-Puffer $G\alpha$ -Untereinheiten aktiviert, was zu einer Reduktion ihrer Affinität zu $G\beta\gamma$ -Komplexen führt (siehe 1.2.2). Dies resultierte in einer fehlenden $G\alpha_{i1}$ -Immunoreaktivitätsbande (Abb. 4A, Spur 2 und 4) bzw. in einer Reduktion von $G\beta_1$ - bzw. $G\beta_5$ -immunoreaktiven Banden (Abb. 4B, Spur 2 und 4).

Dieses Ergebnis zeigt, dass $G\beta_5$ genauso wie $G\beta_1$ funktionelle Komplexe mit $G\alpha$ und $G\gamma$ bilden kann und somit typische Eigenschaften einer $G\beta$ -Untereinheit besitzt.

5.2 Dissoziation von $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexen

5.2.1 Dissoziation von $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexen an der Mono Q-Säule

Für die weitere Charakterisierung der $G\beta_5\gamma$ -Komplexe waren größere Mengen und eine höhere Reinheit des Proteins erforderlich. Zu diesem Zweck wurden die in *Sf9*-Zellen exprimierte $G\beta_5\gamma_2$ -His-Komplexe nach einem Protokoll gereinigt, das schon für eine zweistufige Reinigung von $G\beta_{1-4}\gamma_2$ -His-Heterodimeren etabliert wurde (4.3.2.1). Unerwartet kam es während des zweiten Reinigungsschrittes an der Mono Q-Säule zu einer getrennten Elution von $G\beta_5$ - und $G\gamma_2$ -Untereinheiten (Abb. 5). Während die $G\gamma_2$ -Untereinheit schon in frühen Fraktionen von der Säule eluierte, zeigte das Immunoblotsignal für $G\beta_5$ eine stärkere Retention an der Mono Q-Matrix (Peakfraktion 22). Dieses Ergebnis wurde als eine Dissoziation des $G\beta_5\gamma_2$ -Heterodimers interpretiert. Für dieses ungewöhnliche Verhalten kamen prinzipiell zwei Ursachen in Betracht: 1) Die beobachtete Dissoziation konnte Folge der Reinigungsbedingungen sein. 2) $G\gamma_2$ ist kein physiologischer Komplexpартner für $G\beta_5$.

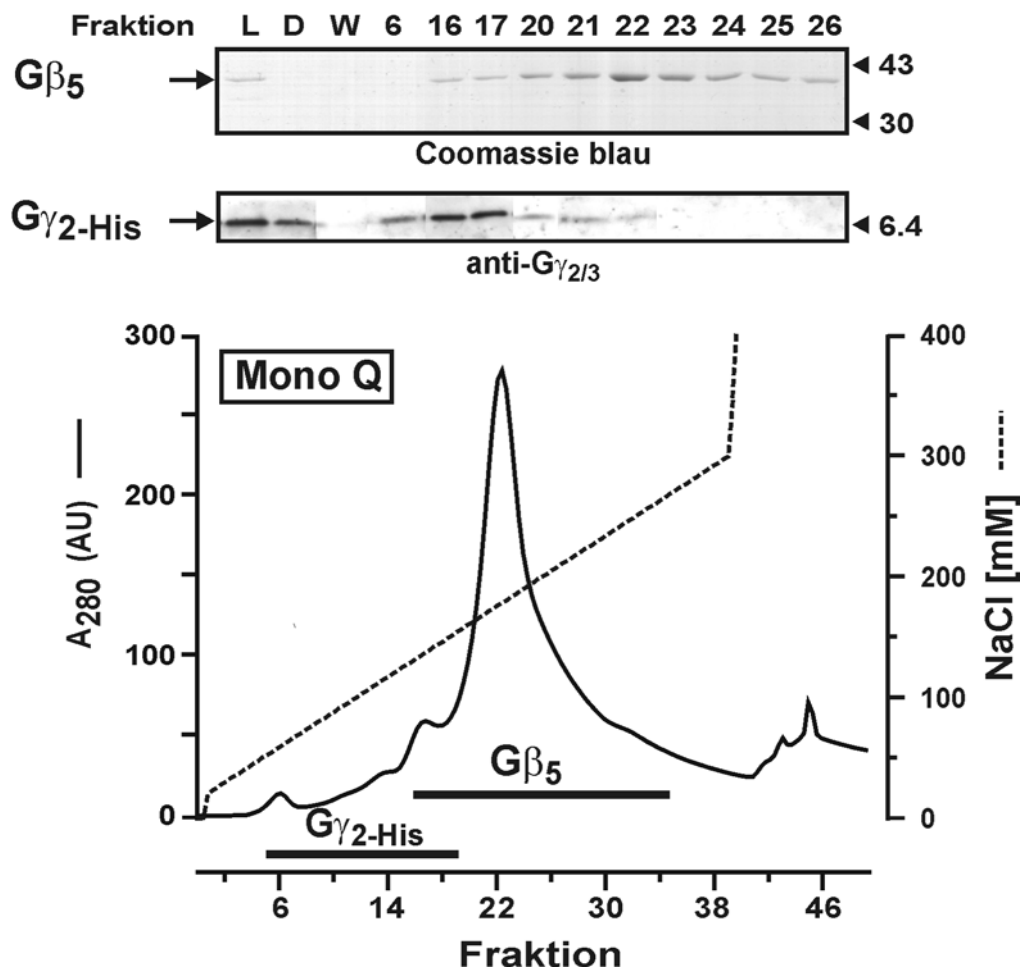


Abb. 5: Trennung $G\beta_5$ von $G\gamma_2$ -His an der Mono Q-Säule.

Die von der Ni-NTA-Agarose eluierten $G\beta_5\gamma_2$ -His-Komplexe wurden auf eine Mono Q-Säule geladen und mit einem linearen NaCl-Gradienten in Puffer P (Tris 20mM, Na-Cholat 0,5%, β -ME 10mM, pH 8) eluiert. Ladedepool (L), Ladedurchlauf (D), Waschfraktion (W) und die angegebenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung bzw. Immunoblot-Verfahren unter Verwendung polyklonaler Antiseren (AS 292) visualisiert (oben). Am rechten Rand sind die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen markiert. Die UV-Absorptionskurve (unten) zeigt den relativen Proteingehalt in den Fraktionen an. Horizontale Balken unter der UV-Absorptionskurve fassen Fraktionen zusammen, die die bezeichneten Proteine enthalten.

5.2.2 Detergenzabhängigkeit der Dissoziation von $G\beta_5\gamma_2$

Als erstes sollten die Pufferbestandteile auf ihre dissoziationsfördernde Wirkung hin untersucht werden. Da aus der Literatur bekannt war, dass Detergenzien die Wechselwirkungen von Proteinen beeinträchtigen können, lag der Verdacht nahe, dass unter den Pufferbestandteilen das Natrium-Cholat, ein anionisches Detergenz, für Dissoziation der Komplexen ursächlich sein könnte. Aus diesem Grund wurde zunächst die Detergenzsensitivität von $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexen untersucht.

Dazu wurden $G\beta_5\gamma_2$ -His-Komplexe an einer Ni-NTA-Agarose-Matrix immobilisiert und mit Puffern gewaschen, die unterschiedliche Detergenzien enthielten. Falls $G\beta_5\gamma_2$ -His-Komplexe bei diesem Waschschrift dissoziieren, kann freigesetztes $G\beta_5$ im Eluat detektiert werden. Somit korreliert die Menge von $G\beta_5$ im Puffer nach dem Waschschrift mit dem Grad der dissoziationsfördernden Wirkung des Puffers. In der Tat zeigten die Ergebnisse, dass die Art des Detergenz maßgeblich zur Instabilität der $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexe beiträgt (Abb. 6). Am schonendsten schienen die nichtionischen Detergentien Lubrol PX, Oktylthioglukosid und Sacharosemonolaurat für die Reinigung von intakten $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexen zu sein.

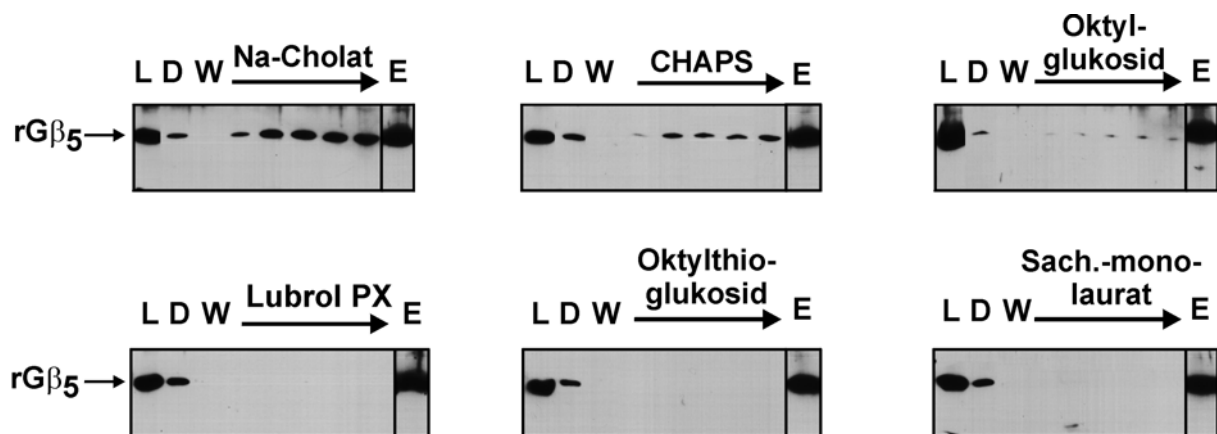


Abb. 6: $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexe sind detergenzsensitiv.

Gleiche Mengen von gereinigten $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexen wurden an Ni-NTA-Agarose-Säulen (CV = 0,5 ml) immobilisiert. Anschließend wurden die Säulen mit Puffer M gewaschen, der alternativ entweder Cholat (0,9 %), CHAPS (11 mM), Octylglucosid (1 %), Lubrol PX (0,5 %), Octylthioglukosid (0,37 %) oder Sucrosemonolaurat (0,2 %) enthielt. Je ein Aliquot des Ladepools (L), Durchlaufs (D), der Waschfraktionen ohne Detergenz (W), der Waschfraktionen mit Detergenz (→) sowie der Imidazoleluate (E) wurden mittels Immunoblot-Verfahren unter Verwendung des polyklonalen Antiserum AS422 visualisiert.

Diese Erkenntnisse wurden nun bei einem erneuten Reinigungsversuch von intakten $G\beta_5\gamma_2$ -His-Dimeren berücksichtigt. Hierbei wurde Na-Cholat durch Polyoxyethylen-10-Laurylester ($C_{12}E_{10}$) - ein dem Lubrol PX sehr ähnliches nichtionisches Detergenz - ersetzt. Unter diesen Pufferbedingungen eluierten beide Untereinheiten gleichzeitig von der Mono Q-Säule (Abb. 7). Die beobachtete Koelution legt nahe, dass $G\beta_5$ und $G\gamma_2$ gemeinsam als Komplex von der Säule eluierten. Allerdings deutete die Anwesenheit von $G\beta_5$ -freien $G\gamma_2$ -His-Untereinheiten im Durchlauf darauf hin, dass während der Reinigungsprozedur ein Teil der $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexe dissoziiert (nicht abgebildet). Aus diesem Grund war es wichtig zu überprüfen, ob andere $G\gamma$ -Isoformen einen stabileren Komplex mit $G\beta_5$ bilden.

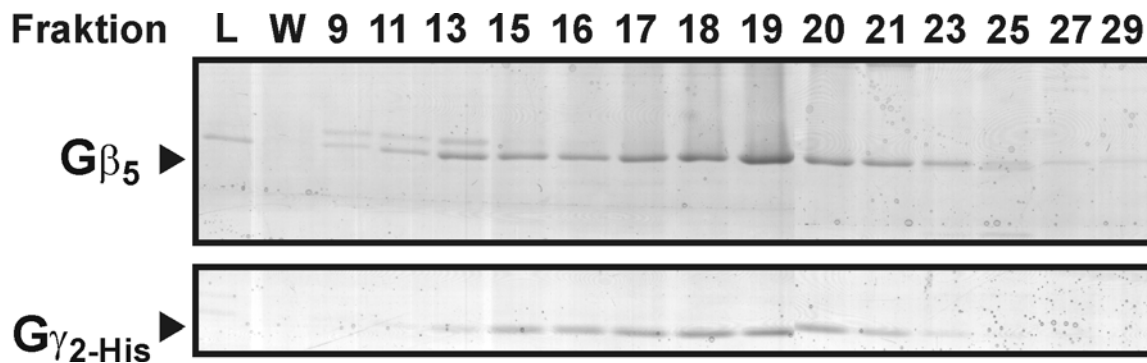


Abb. 7: Reinigung von $G\beta_5\gamma_2$ -His in Anwesenheit von $C_{12}E_{10}$.

Die Reinigung von $G\beta_5\gamma_2$ -His wurde nach dem in 4.3.2. und 4.3.3. beschriebenen Protokoll durchgeführt. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen NaCl-Gradienten im Puffer (Tris 20 mM, $C_{12}E_{10}$ 0,1 %, β -ME 10 mM, pH 8) von der Mono Q-Säule eluiert. Ladepool (**L**), Waschfraktion (**W**) und die angegebenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung visualisiert.

5.2.3 Spezifität von $G\gamma$ -Isoformen bei der Bildung von $G\beta_5\gamma$ -Dimeren

Es ist bekannt, dass verschiedene $G\beta$ - und $G\gamma$ -Isoformen gewisse Präferenzen bei der Bildung von heterodimeren $G\beta\gamma$ -Komplexen aufweisen. Die Spezifität dieser Wechselwirkung äußert sich z.B. darin, dass $G\beta_1$ sowohl mit $G\gamma_1$ als auch mit $G\gamma_2$ einen Komplex bildet, während $G\beta_2$ nur mit $G\gamma_2$ komplexieren kann (siehe 1.2.4). Deshalb sollten nun Versuche unternommen werden, eine $G\gamma$ -Untereinheit zu identifizieren, die ein stabiles Heterodimer mit $G\beta_5$ bildet. Dabei wurde die Stabilität des „klassischen“ $G\beta_2\gamma_2$ -Komplexes zum Vergleich herangezogen. Hierzu wurden verschiedene $G\gamma$ -Isoformen mit $G\beta_5\alpha_{i1}$ -His in *Sf9*-Zellen koexprimiert und gereinigt. Die angewandte kombinierte Affinitäts- und Untereinheitenaustausch-Chromatographie beruht darauf, dass die Freisetzung der $G\beta\gamma$ -Dimeren aus den an die Affinitätsmatrix gebundenen heterotrimeren G-Protein-Komplexen erst durch Aktivierung der hexahistidinmarkierten $G\alpha_{i1}$ -Untereinheiten mit AlF_4^- erfolgt. Dieses Reinigungsverfahren ermöglicht die Isolation von funktionell aktiven $G\beta\gamma$ -Dimeren, die keine Affinitätsmarkierung tragen. Sowohl $G\gamma_2$ als auch $G\gamma_4$, $G\gamma_5$ und $G\gamma_7$ bildeten zwar ursprünglich einen Komplex mit $G\beta_5$, zeigten aber an der Mono Q-Säule eine ähnliche Komplexlabilität mit $G\beta_5$ wie $G\gamma_2$, was darin resultierte, dass die Peakfraktionen von $G\beta_5$ weitgehend $G\gamma$ -frei waren (Abb. 8). Somit bildeten alle untersuchten $G\gamma$ -Untereinheiten instabile Komplexe mit $G\beta_5$.

Während der Untersuchungen wurde eine Methode ausgearbeitet, die die Isolation präparativer Mengen an rekombinanten $G\beta$ -freien $G\gamma$ -Untereinheiten erlaubt (4.3.6). Übereinstimmend mit publizierten Daten (Morishita et al., 1994) waren die isolierten $G\beta$ -freien $G\gamma$ -Präparationen stabil und konnten über längere Zeit aufbewahrt werden.

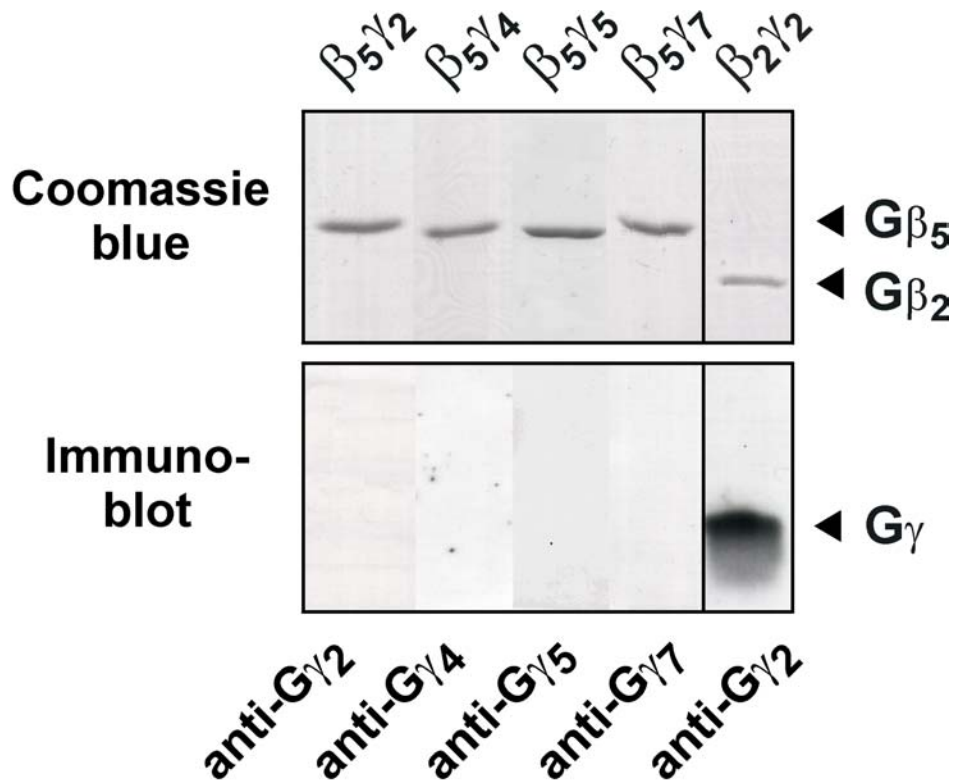


Abb. 8: $G\beta_5$ bildet dissoziierbare Komplexe mit $G\gamma_2$, $G\gamma_4$, $G\gamma_5$ und $G\gamma_7$.

In $7,5 \times 10^8$ Sf9-Zellen wurden $G\gamma_2$, $G\gamma_4$, $G\gamma_5$ oder $G\gamma_7$ mit $G\beta_5 \alpha_{i1}$ -His koexprimiert. Die nach der Aufarbeitung der Zellen gewonnenen Membranextrakte wurden jeweils auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule geladen. $G\beta_5\gamma_2$ -, $G\beta_5\gamma_4$ -, $G\beta_5\gamma_5$ -, $G\beta_5\gamma_7$ -Heterodimere wurden mit Puffer R (Hepes 20 mM, NaCl 50 mM, NaF 10 mM, $AlCl_3$ 50 μ M, $MgCl_2$ 50 mM, GDP 10 μ M, Na-Cholat 1 %, β -ME 10 mM, pH 8) eluiert. Nach der Verdünnung wurden die Eluate auf eine Mono Q-Säule (1 ml) geladen und mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Fraktionen wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung bzw. mittels Immunoblot-Verfahren unter Verwendung polyklonaler Antiseren (Tab. 4) analysiert. Dargestellt sind die Peakfraktionen.

5.3 Biophysikalische Eigenschaften des $G\gamma$ -freien $G\beta_5$

5.3.1 Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von $G\beta_5$

Wie aus der eigenen Arbeitsgruppe (Mitteilung Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg) bekannt war, führt eine Dissoziation der $G\beta_{1-4}\gamma$ -Heterodimere zur Bildung von unlöslichen Proteinpräzipitaten, die von der Ionenaustauschersäule nur unter denaturierenden

Bedingungen eluierbar sind. Es war daher erstaunlich, dass $G\beta_5$ trotz seiner Dissoziation von $G\gamma$ in Lösung blieb und selbst nach wiederholtem Auftauen und Einfrieren nicht präzipitierte oder abgebaut wurde.

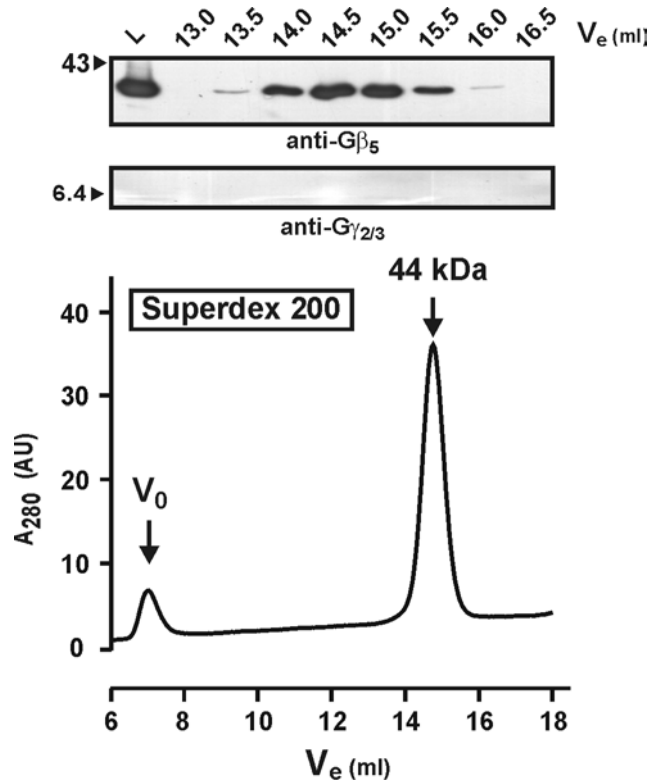


Abb. 9: $G\gamma$ -freies $G\beta_5$ ist ein Monomer.

200 μ l von Fraktion 23 (siehe Abb. 5) wurde auf eine Superdex-200-Säule geladen und anschließend isokratisch eluiert. Das Säulenprofil wurde mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung polyklonaler Antisera (Tab. 4) (oben) ermittelt und mit der UV-Absorptionskurve (unten) verglichen. Für die oben dargestellten Fraktionen sind die Elutionsvolumina angegeben. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Rand markiert. (V_0) steht für Ausschlussvolumen.

Dieses ungewöhnliche Elutionsverhalten von $G\gamma$ -freiem $G\beta_5$ an der Mono Q-Säule warf die Frage auf, in welchem Konformationszustand sich dieses Protein befindet. So sind grundsätzlich ein monomerer, homodimerer oder oligomerer Zustand vorstellbar. Um diese Frage zu beantworten, sollte zunächst das apparente Molekulargewicht bestimmt werden, das jeweils die einfache (im Falle des monomeren Zustandes), zweifache (wenn das Protein als Homodimer vorliegt) bzw. mehrfache Zunahme des kalkulierten Molekulargewichts zeigen müßte, falls sich Oligomere bilden. Als Standardmethode für solche Fragestellungen wurde die Molekularsiebanalyse eingesetzt (4.3.4). Das $G\gamma$ -freie $G\beta_5$ eluierte in einem scharfen Peak bei 14,9 ml, entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 44 kDa (Abb. 9). Da das kalkulierte Molekulargewicht 38,7 kDa beträgt (siehe 1.3), kann geschlossen werden, dass das

G γ -freie G β_5 in einem monomeren Zustand vorliegt und eine kompakte, globuläre Konformation aufweist. Die für die Säule typische Peakbreite und ein nur geringfügiges Signal in dem Ausschlußvolumen deuten auf eine Homogenität der Präparation. Somit ergab sich ein erster Hinweis auf eine neue Eigenschaft des G β_5 -Proteins, der für die klassischen G β -Untereinheiten nicht bekannt war: es kann in monomeren Zustand eine lösliche, stabile und globuläre Konformation einnehmen.

5.3.2 *Hydrophilie des monomeren G β_5*

Nachdem Hinweise gefunden wurden, dass die G γ -freie G β_5 -Untereinheit eine monomere, globuläre Konformation aufweist, wurde geprüft, ob G β_5 in einer monomeren Form *in vivo* existieren und seine Funktionen ausüben kann. Da G β_5 - sowohl in einer löslichen als auch in membrangebundenen Form in Geweben vorkommt (1.3) sollte mit Hilfe rekombinanter Proteine überprüft werden, in welcher subzellulären Fraktion das monomere G β_5 lokalisiert ist. Zunächst sollte geprüft werden, ob G β_5 mit Zellmembranen interagieren kann.

Für diese Experimente wurden künstliche Phospholipidvesikel verwendet, um den Einfluss anderer, in den nativen Zellmembranen enthaltenen, Proteinen auszuschließen. Schon frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass klassische G $\beta\gamma$ -Heterodimere mit Phospholipidvesikel assoziieren (Sternweis, 1986). Diese Lipophilie konnte unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen sowohl für G $\beta_1\gamma_2$ - als auch für G $\beta_5\gamma_2$ -Dimere demonstriert werden (siehe 4.4.1 und Abb. 10A). Man beachte, dass ein beträchtlicher Anteil der G $\beta\gamma$ -Komplexe während der Zentrifugation mit den Phospholipidvesikeln sedimentiert wird (Spur: Sediment). Im Gegensatz dazu bindet das monomere G β_5 kaum an Phospholipidvesikel (Abb. 10B). Eine solche geringfügige Phospholipidbindung wird auch bei G $\beta\gamma$ -Komplexen beobachtet, in denen die G γ -Untereinheit keine posttranslationale Lipidmodifikation besitzt. Diese Komplexe wurden hier als negative Kontrolle eingesetzt (G $\beta_1\gamma_2$ (C68s)-His, Abb. 10C) (siehe 1.2.4 und Dietrich et al., 1992). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass monomeres G β_5 aufgrund seiner Hydrophilie vorwiegend im Cytosol lokalisiert sein sollte. Diese Annahme sollte durch ein nachfolgendes Experiment unterstützt werden.

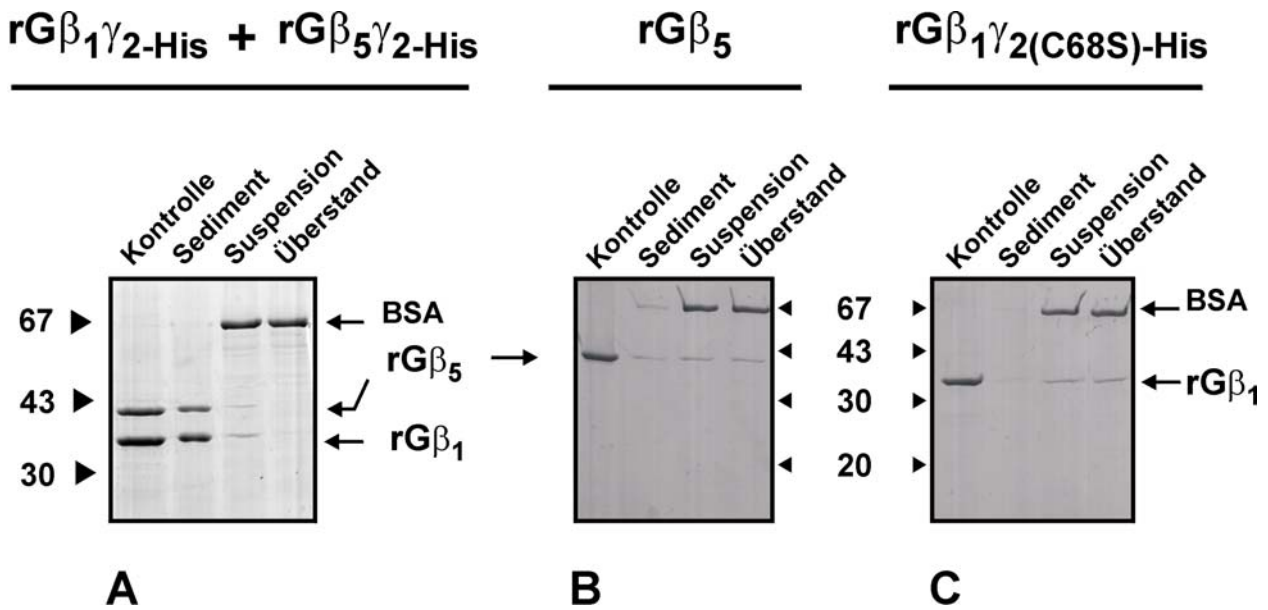


Abb. 10: Das monomere Gβ₅ bindet nicht an Phospholipidvesikel.

Zu 100 µl Lipidvesikelsuspension (4.4.1) wurden 1-2 µg der oben angezeigten G-Protein-Präparation zugegeben (**Suspension**). Dieselbe Menge des jeweiligen G-Proteins wurde zum Vergleich auf das Gel aufgetragen (**Kontrolle**). Nach der Inkubation erfolgte ein Zentrifugationsschritt. Dadurch wurden die Lipidvesikel mit ihren assoziierten Proteinen sedimentiert (**Sediment**). Nicht assoziierte Proteine blieben im Überstand (**Überstand**). Die angezeigten Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung visualisiert. Man beachte, dass von Suspensionen und Überständen nur 1/10 des Gesamtvolumens analysiert wurde. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Rand bzw. in der Mitte markiert.

In *Sf9*-Zellen exprimierte Gβ₅γ₂-His-Heterodimere bzw. monomeres Gβ₅-His wurden getrennt aus dem Cytosol bzw. aus einem Membranextrakt (siehe 4.3.2.1) affinitätschromatografisch gereinigt (Abb 11). Die Analyse der subzellulären Lokalisation von Gβ₅ zeigt eine deutliche Umkehrung in der Verteilung zwischen Cytosol- und Membran-Fractionen nach der Koexpression mit Gγ₂. Dieser Befund verdeutlicht, dass monomeres Gβ₅ in einer intakten Zelle im Cytosol zu erwarten ist und liefert eine mögliche Erklärung für die beschriebene cytosolische Lokalisation von Gβ₅ im neuralen Gewebe (Watson et al., 1994). Es lässt auch vermuten, dass die Assoziation von Gβ₅ mit der Plasmamembran nur durch die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt wird.

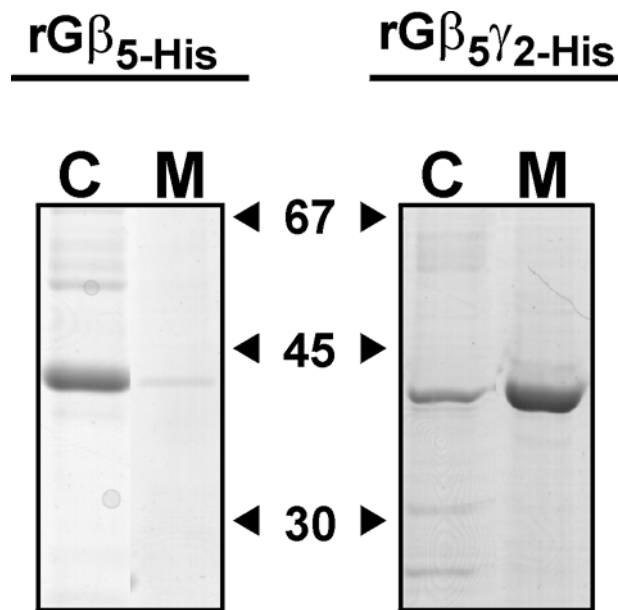


Abb. 11: Unterschiedliche subzelluläre Verteilung von $G\beta_5$ und $G\beta_5\gamma_2$.

Cytosol (**C**) und Membranextrakt (**M**) von $7,5 \times 10^7$ Sf9-Zellen, die $G\beta_5\gamma_2$ -His oder $G\beta_5$ -His exprimierten, wurden getrennt über Ni-NTA-Agarose-Säulen gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung visualisiert. Gezeigt sind jeweils die Peakfraktionen, die etwa 70 % der eluierten Proteine enthalten. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind in der Mitte markiert.

5.4 Reversibilität der Dissoziation von $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexen

5.4.1 Rekonstitution von $G\beta_5$ und $G\gamma_2$ zu einem $G\beta_5\gamma_2$ -Dimer

Die Tatsache, dass eine Dissoziation der $G\beta_5\gamma$ -Komplexe in der Entstehung stabiler $G\beta_5$ - und $G\gamma_2$ -Untereinheiten resultierte, warf die Frage auf, ob die dissoziierte bzw. isolierte $G\beta_5$ - und $G\gamma_2$ -Untereinheiten miteinander interagieren und ein funktionell aktives Heterodimer bilden können.

Durch Koreinigungsansätze (4.4.3) wurde zunächst untersucht, ob die gereinigten $G\beta_5$ - und $G\gamma_2$ -Untereinheiten einen Komplex bilden.

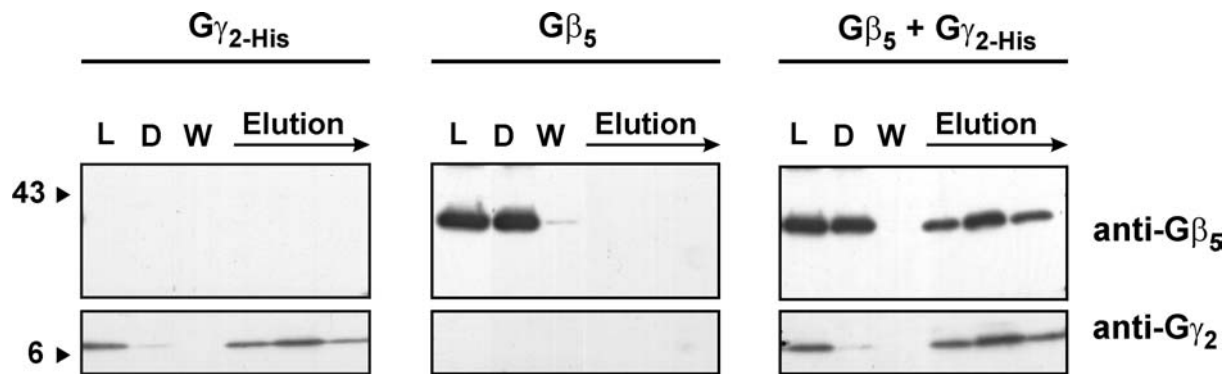


Abb. 12: Gereinigte $G\beta_5$ - und $G\gamma_2$ -Monomere reassoziieren zu einem heterodimeren Komplex.

Gereinigtes, rekombinantes $G\gamma_2$ -His (links), $G\beta_5$ (Mitte) oder ein Mix beider Untereinheiten (rechts) wurden auf die Ni-NTA-Agarose-Säulen (200 μ l) geladen. Nach dem Waschschrift erfolgte die Elution mit Imidazol-haltigem Puffer. Ladepool (L), Ladedurchlauf (D), die letzte Waschfraktion (W) und die Imidazoleluate (Elution) wurden mittels Immunoblot-Verfahren unter Verwendung polyklonaler Antiseren (Tab. 4) visualisiert. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Rand markiert.

Die Affinitätschromatographie eignet sich Dank der hohen Bindungsspezifität besonders gut für solche Untersuchungen. Aus beiden Untereinheiten, die in diesem Ansatz verwendet wurden, verfügte nur das $G\gamma_2$ -His über einen Affinitätsmarker und somit die Fähigkeit, spezifisch an die Ni-NTA-Agarose zu binden (Abb. 12, links). Im Gegensatz dazu weist das monomere $G\beta_5$ unter den gewählten Pufferbedingungen keine Affinität zur Matrix auf (Abb. 12, Mitte). Wenn allerdings beide Untereinheiten nach kurzer Koinkubation auf die Affinitätsmatrix geladen wurden, konnte eine Retention des $G\beta_5$ an der Säule mit nachfolgender Koelution mit der $G\gamma_2$ -Untereinheit beobachtet werden (Abb. 12, rechts). Dieses Experiment zeigte eine Koreinigung der untersuchten Proteine und lieferte somit den ersten Hinweis auf eine Reassoziierung der isolierten $G\beta_5$ - und $G\gamma_2$ -Untereinheiten.

Die Spezifität dieser Interaktion wurde durch ein alternatives Reinigungsprinzip überprüft. So bietet die Gelfiltration neben der Koelution eine weitere Analysemöglichkeit: die Bestimmung der apparenten Molekulargröße des entstandenen Komplexes. Abb. 13 zeigt die erhaltenen Profile von Gelfiltrationsläufen. Wie im oberen Abbildungsteil zu sehen ist, beträgt das Elutionsvolumen der gereinigten $G\gamma_2$ -Untereinheiten etwa $16,2 \pm 0,3$ ml und entspricht einer Molekulargröße von etwa 20 kDa. Werden $G\gamma_2$ -Untereinheiten mit monomerem $G\beta_5$ kurz koinkubiert und auf die Säule geladen, beobachtet man die Verschiebung eines Teils des $G\gamma_2$ -Pools in frühere Fraktionen und eine Koelution mit $G\beta_5$ (Abb. 13, unten).

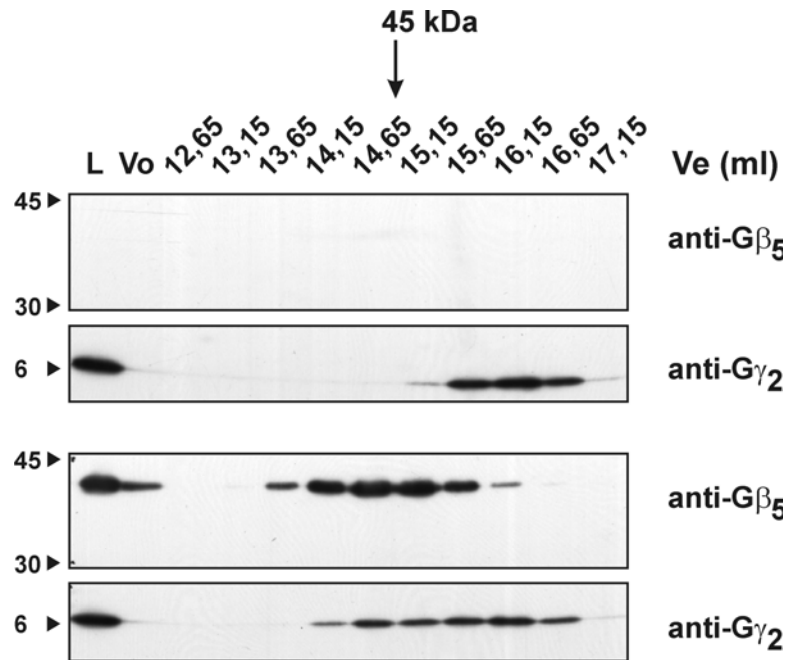
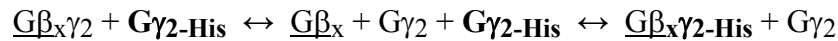


Abb. 13: Die Änderung der apparenten Molmasse von $G\gamma_2$ nach der Inkubation mit monomerem $G\beta_5$.

400 pmol $G\gamma_2$ (C68S)-His wurden in Abwesenheit (A) bzw. mit 250 pmol $G\beta_5$ (B) auf eine Superdex 200-Säule geladen und anschließend mit Puffer M isokratisch eluiert. Das Säulenprofil wurde durch Immunoblot-Analyse unter Verwendung der polyklonalen Antiseren AS 422 und AS 292 (Tab. 4) ermittelt. Für die oben dargestellten Fraktionen sind die berechneten Elutionsvolumina angezeigt. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Rand markiert. (Vo) steht für Ausschlussvolumen.

Das Elutionsvolumen dieses $G\gamma_2$ -Anteils liegt bei 15 ml und entspricht einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa. Die Größe des gebildeten Komplexes deutet darauf hin, dass es sich um einen Heterodimer handelt. Hieraus kann geschlossen werden, dass monomere $G\beta_5$ und $G\gamma_2$ wieder zu einem heterodimeren Komplex reassoziieren können.

Eine reversible Dissoziation der $G\beta\gamma$ -Komplexen wurde zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen noch nicht beschrieben und es existierten daher keine vergleichbaren Studien zu dieser Frage. Aus diesem Grund war es wichtig, auch die klassischen $G\beta\gamma$ -Heterodimere diesbezüglich näher zu untersuchen. Dabei sollte vor allem die Frage beantwortet werden, ob die Assoziation bei $G\beta_5\gamma_2$ bzw. $G\beta_1\gamma_2$ dynamisch oder statisch ist, d.h. ob die oben gezeigte Dissoziation und Reassoziierung der beiden Untereinheiten auch bei klassischen $G\beta\gamma$ -Komplexen vorkommt. Zu diesem Zweck wurde die Interaktion von in *Sf9*-Zellen exprimierten $G\beta_1\gamma_2$ und $G\beta_5\gamma_2$ -Dimeren mit $G\gamma_2$ -His getestet. Setzt man voraus, dass $G\gamma_2$ und $G\gamma_2$ -His die gleiche Effizienz in ihrer Assoziation mit $G\beta$ -Untereinheiten aufweisen, können die monomeren $G\beta_x$ -Untereinheiten nach jedem Dissoziationsereignis statistisch gesehen mit gleicher Wahrscheinlichkeit entweder mit affinitätsmarkiertem oder mit Wildtyp- $G\gamma_2$ einen Dimer bilden.



Wenn man nun die $G\gamma_2\text{-His}$ -Untereinheiten über eine Affinitätsmatrix isoliert (in der Gleichung **fett** markiert), kann man durch den Nachweis von mitgereinigten $G\beta$ -Untereinheiten (unterstrichen) überprüfen, ob eine Dissoziation des ursprünglich eingesetzten $G\beta\gamma$ -Komplexes stattgefunden hat.

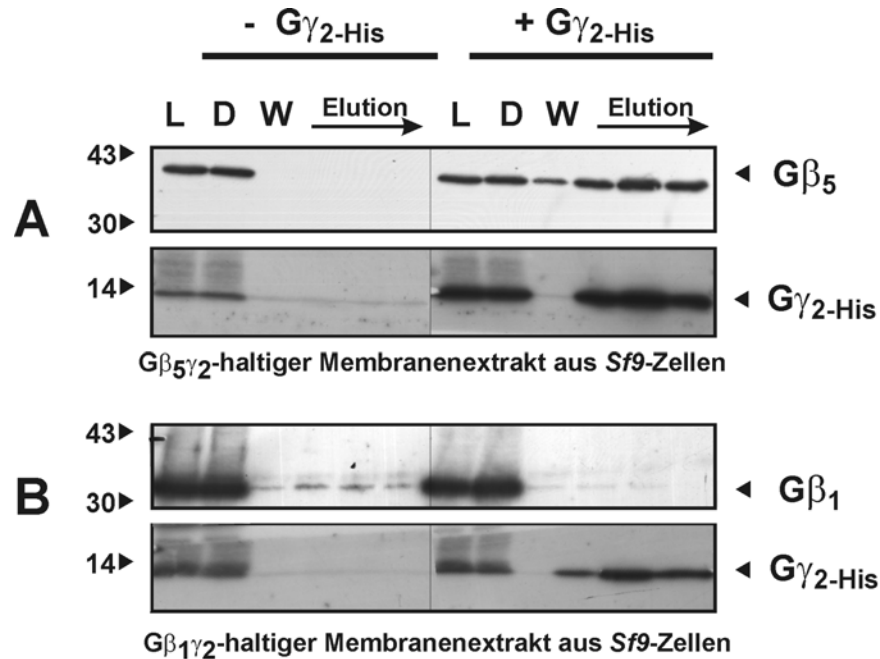


Abb. 14: Gβ₅, nicht aber Gβ₁ interagiert reversibel mit Gγ.

Gereinigtes rGγ₂-His (200 pmol) wurde mit Gβ₅γ₂- (**A**) oder Gβ₁γ₂-haltigen (**B**) Sf9-Zellmembranextrakten (je 5 ml; eingestellt auf eine Proteinkonzentration von 0,7 mg/ml (" + Gγ₂-His ")) inkubiert und anschließend auf Ni-NTA-Agarose-Säulen (200 μl) geladen. Nach dem Waschschritt erfolgte die Elution mit imidazolhaltigem Puffer. Der Ladepool (**L**), Ladedurchlauf (**D**), die letzte Waschfraktion (**W**) und die Imidazoleluate (**Elution**) wurden mittels Immunoblot-Verfahren mit Hilfe AS 422 und AS 398 visualisiert. Die unspezifische Bindung an die Ni-NTA Matrix wurde in parallelen Experimenten ohne rGγ₂-His ermittelt (" - Gγ₂-His "). Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Rand markiert.

Da in den Membranfraktionen überwiegend die korrekt prozessierten $G\beta\gamma$ -Komplexe akkumuliert werden, wurden für diese Untersuchungen Membranextrakte verwendet. Wie in Abb. 14A zu sehen ist, findet man nach einer Inkubation von $G\beta_5\gamma_2$ -haltigen Membranextrakten mit der gereinigten $G\gamma_2\text{-His}$ -Untereinheiten eine beträchtliche Menge von $G\beta_5$ -Untereinheiten, die mit $G\gamma_2\text{-His}$ von der Ni-NTA-Agarose koeluieren. Das zeigt, dass ursprünglich gebildete, nicht affinitätsmarkierte $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexe spontan dissoziieren und freiwerdende $G\beta_5$ -Untereinheiten mit $G\gamma_2\text{-His}$ -Untereinheiten Komplexe bilden. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation von $G\beta_1\gamma_2$ -haltigen Extrakten mit $G\gamma_2\text{-His}$ zu keiner messbaren

G β_1 -Immunoreaktivität in Imidazol-Eluaten (Abb. 14B), was darauf schließen läßt, dass hier kein Untereinheitenaustausch stattgefunden hat.

Um sicherzustellen, dass G γ -freie G β_1 -Untereinheiten mit isolierten G γ -Untereinheiten Komplexe bilden können, wurde die cytosolische Fraktion aus G β_1 -exprimierenden *Sf9*-Zellen mit den gereinigten G γ_2 -His-Untereinheiten inkubiert und anschließend affinitätschromatographisch gereinigt. Wie in der Abb. 15B zu sehen ist, waren sowohl G β_1 - als auch als Kontrollen eingesetzten G β_5 -Monomere (Abb. 15A) in der Lage, mit G γ_2 -His Komplexe zu bilden.

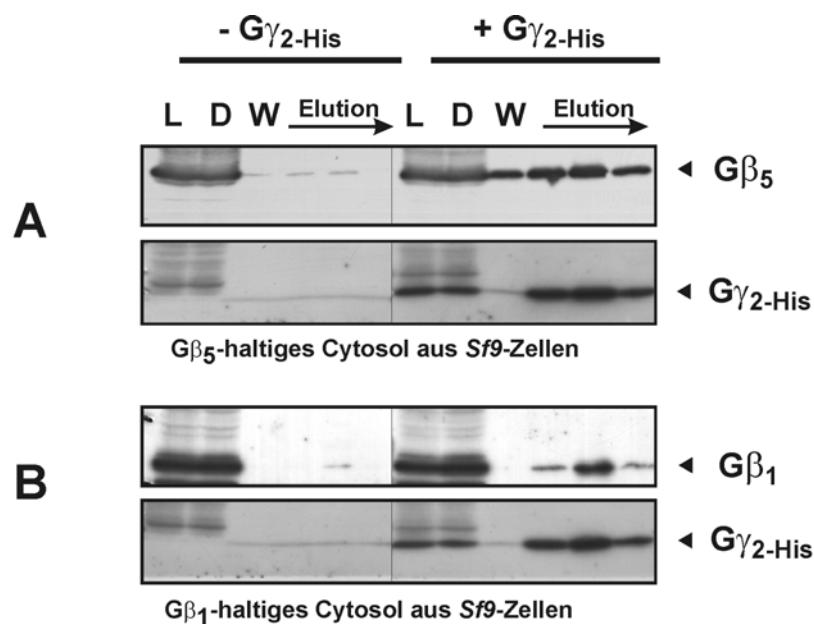


Abb. 15: Monomeres G β_1 kann mit monomerem G γ_2 einen Komplex bilden.

Gereinigtes rG γ_2 -His (200 pmol) wurde mit G β_5 - (**A**) oder G β_1 -haltigem (**B**) *Sf9*-Zellcytosol (6 ml, eingestellt auf eine Proteinkonzentration von 4,3 mg/ml (" + G γ_2 -His ")) inkubiert und anschließend auf eine Ni-NTA-Agarose Säule (200 μ l) geladen. Nach dem Waschschrift erfolgte die Elution mit Imidazol-haltigem Puffer. Ladepool (**L**), Ladedurchlauf (**D**), letzte Waschfraktion (**W**) und Imidazol-Eluat (**Elution**) wurden mittels Immunoblot-Verfahren visualisiert. Man beachte, dass die Expression von monomerem G β_1 verglichen mit monomerem G β_5 wesentlich schwächer ist. Die daraus resultierende geringere Signalintensität bei der Immunoblotanalyse wurde deshalb durch längere Exposition der Filmen kompensiert. Die unspezifische Bindung an die Ni-NTA Matrix wurde in parallelen Experimenten ohne G γ_2 -His ermittelt (" - G γ_2 -His ").

Dieses Ergebnis stand mit früheren Untersuchungen im Einklang (Schmidt und Neer, 1993) und bestätigte, dass getrennt synthetisierten G β -Untereinheiten prinzipiell mit G γ zu einem Dimer assoziieren können. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass G β_5 -Untereinheiten eine dynamische Assoziation mit G γ_2 aufweisen, während G β_1 nur statische, nicht dissoziierende Komplexe mit G γ_2 bilden kann.

5.4.2 *Funktionalität der reassozierten G $\beta_5\gamma_2$ -Komplexe*

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die aus den isolierten Untereinheiten reassozierten G $\beta_5\gamma_2$ -Heterodimere funktionell aktiv sind, da die beobachtete Reassoziierung auch durch eine unspezifische Komplexbildung verursacht werden könnte. Es sollten also im folgenden für G $\beta\gamma$ -Komplexe typische funktionelle Eigenschaften bei den reassozierten G $\beta_5\gamma_2$ -Heterodimeren getestet werden. Zu diesen gehört die Bildung eines heterotrimeren Komplexes mit G α -Untereinheiten sowie die Modulation von Effektoren.

5.4.2.1 *Stimulation der PLC- β_2*

Jüngere Untersuchungen mit isolierten Proteinen in Rekonstitutionsexperimenten zeigten, dass G $\beta_5\gamma_2$ -Komplexe hochpotente Aktivatoren der Phospholipase C- β_2 (PLC- β_2) sind (Lindorfer et al., 1998). Es lag deshalb nahe, die funktionelle Aktivität von reassozierten G $\beta_5\gamma_2$ -Dimeren an diesem Enzym zu überprüfen. Ein repräsentativer Versuch ist in Abb. 16 dargestellt. Dabei wurde die PLC- $\beta_{2\Delta}$, eine C-terminale Deletionsmutante des humanen Enzyms, verwendet. Das deletierte Segment ist notwendig für die Assoziation mit der Plasmamembran, ist jedoch nicht erforderlich für die Interaktion mit PI-4,5-P $_2$, Ca $^{2+}$ und für die Stimulation durch G $\beta\gamma$ -Dimere (Schnabel et al., 1993).

In Abbildung 16 ist zu sehen, dass die PLC- β_2 im basalen Zustand nur eine geringe (< 0,5 pmol/min/Ansatz) enzymatische Aktivität aufweist. Auch die getrennte Zugabe von isolierten G β_5 - bzw. G γ_2 -Untereinheiten bewirkt keine signifikante Erhöhung der basalen Bildungsrate von Inositoltrisphosphaten (IP $_3$) aus PI-4,5-P $_2$. Allerdings führt die Koinkubation von G β_5 und G γ_2 mit der PLC- β_2 zu einer konzentrationsabhängigen Aktivitätssteigerung. Interessanterweise war das Ausmaß der Stimulation durch reassozierte Komplexe und durch gereinigte Heterodimere vergleichbar. Hieraus kann geschlossen werden, dass neugebildete G $\beta_5\gamma_2$ -Dimere nach der Assoziation aus monomeren Untereinheiten zumindestens in diesem Testsystem ihre volle funktionelle Aktivität wiedergewinnen.

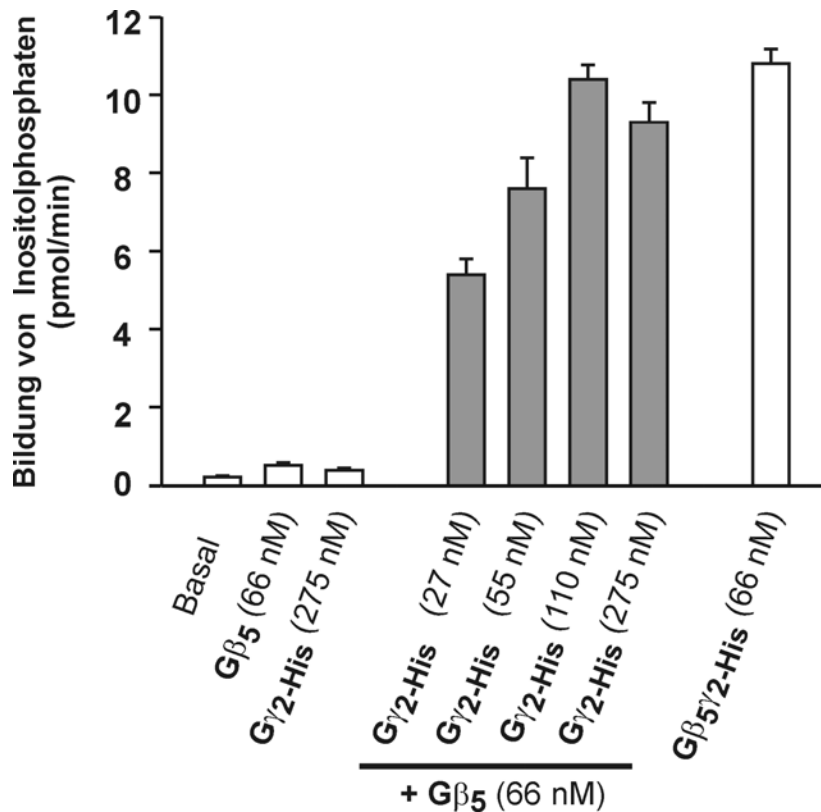


Abb. 16: Stimulation der PLC-β₂ durch monomeres Gβ₅ und Gγ₂-His.

Die Aktivität der rekombinanten PLC-β_{2Δ} wurde in Abwesenheit von Gβγ (Kontrolle) oder nach Inkubation mit gereinigten Gβ₅ bzw. Gγ₂-His gemessen. Gβ- und Gγ-Präparationen wurden einzeln (weiße Säulen) oder zusammen (graue Säulen) bei konstanten Gβ₅-Konzentrationen und steigenden Gγ₂-His-Konzentrationen getestet. Gereinigte intakte Gβ₅γ₂-His-Heterodimere dienten als Kontrolle (weiße Säule). Die Experimente wurden in Kooperation mit Dr. D. Illenberger (Universität-Ulm) durchgeführt.

Um die Funktionalität dieser Interaktion weiter zu unterstützen, wurde untersucht, inwieweit Gα_{i1} bzw. Gα_{Td}-Untereinheiten die Stimulation der PLC-β₂ durch Bindung an Gβ₅γ₂ inhibieren können. Dazu wurde die Änderung der durch Gβ₅ und Gγ₂ vermittelten Aktivierung der PLC-β₂ nach der Zugabe von Gα_{i1} bzw. Gα_{Td} gemessen. Wie man in der Abbildung 17 sieht, wird die stimulierende Wirkung der reassozierten Gβ₅γ₂-Komplexe auf die PLC-β₂ durch die Zugabe von monomeren Gα-Untereinheiten konzentrationsabhängig gehemmt. (Abb. 17B). Dieser Effekt kann am ehesten durch die Bildung von heterotrimeren Gαβ₅γ₂-Komplexen erklärt werden, in denen die Gβγ-Effektorbindungsregion blockiert ist (Leopoldt et al., 1998).

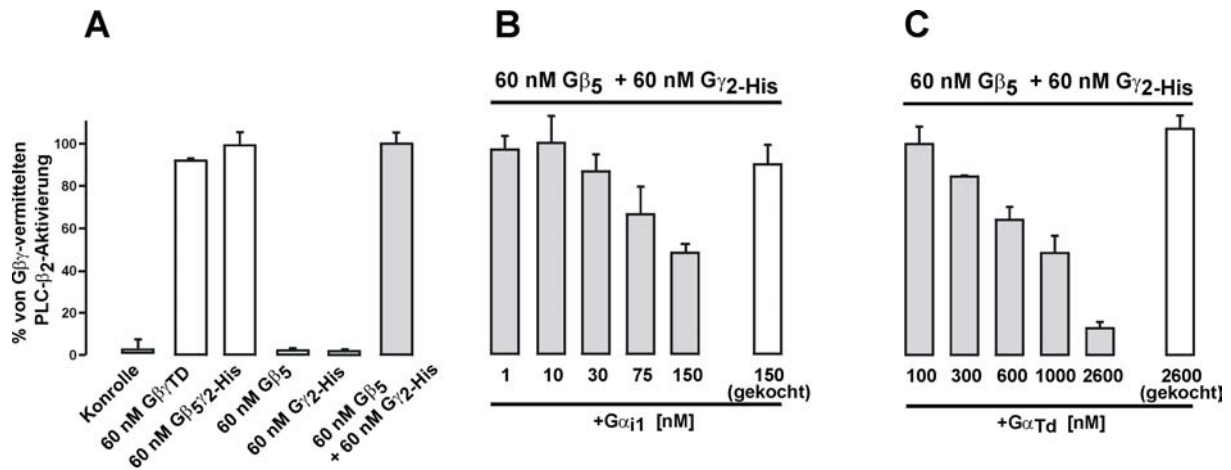


Abb. 17: Hemmung der stimulierenden Wirkung von monomerem Gβ₅ und Gγ₂-His auf PLC-β₂ durch Gα-GDP.

Die Aktivität der rekombinanten PLC-β_{2Δ} wurde in Abwesenheit von Gβγ (Kontrolle) oder nach der Inkubation mit gereinigten Transducin-βγ (Gβγ_{TD}), rGβ₅γ₂-His und monomeren Gβ₅ bzw. Gγ₂-His gemessen (links). In parallelen Experimenten wurde die durch 60 nM rGβ₅ und 60 nM rGγ₂-His vermittelte Stimulation der PLC-β₂-Aktivität durch steigende Konzentrationen von Gα_{i1} (mittig, graue Säulen) oder Gα_t (rechts, graue Säulen) gehemmt. Die Spezifität der Gα-GDP-Hemmung wurde in parallelen Experimenten mit hitzeinaktivierten Gα-Untereinheiten getestet (weisse Säulen). Die Experimente wurden in Kooperation mit Dr. D. Illenberger (Universität-Ulm) durchgeführt.

5.4.2.2 Interaktion mit Gα-Untereinheiten

Alternativ sollte die Interaktion zwischen reassozierten Gβ₅γ₂-Komplexen und Gα-Untereinheiten im Rahmen von Koreinigungsexperimenten an der Ni-NTA-Matrix demonstriert werden. Dabei können monomere Gα_{i1}- und Gβ₅-Untereinheiten nur dann an die Affinitätsmatrix binden, wenn sie mit dem affinitätsmarkierten Gγ₂-His einen Komplex bilden.

Die Koinkubation von Gα_{i1} mit Gβ₅ in Abwesenheit von Gγ₂-His war ähnlich unzureichend für die Bindung von Gα_{i1} an die Säule (Abb. 18, links) wie die Koinkubation von Gα_{i1} mit Gγ₂-His in Abwesenheit von Gβ₅ (Abb. 18, Mitte). Erst als alle drei Untereinheiten zusammen mit der Ni-NTA-Agarose koinkubiert wurden, beobachtete man eine Retention von Gβ₅ und Gα_{i1} an dem Säulenmaterial (Abb. 18, rechts).

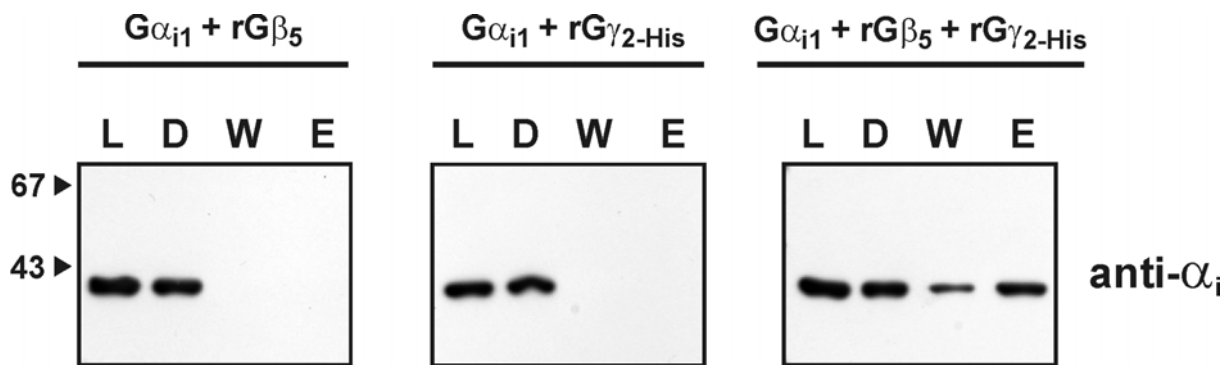


Abb. 18: Monomeres G β_5 , G γ_2 -His und G α_{i1} bilden einen heterotrimeren Komplex.

Aus Rinderhirn gereinigtes G α_{i1} (200 - 300 pmol; Nürnberg et al., 1994) wurde mit monomeren Präparationen von G β_5 (200 - 300 pmol) und G γ_2 -His (100 pmol) koinkubiert und auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule geladen. Nach dem Waschen der Säule wurden spezifisch gebundene Proteine eluiert. Analysiert wurden Ladepool (L), Durchlauf (D), letzte Waschfraktion (W), und Eluat (E) mittels Immunoblot (Antiserum: AS 8). Die Koinkubationen von G α_{i1} mit G β_5 (links) bzw. mit G γ_2 -His (Mitte) dienen als Spezifitätskontrolle. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Rand markiert.

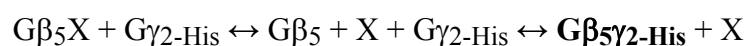
Die Bindung der nicht hexahistidinmarkierten G α_{i1} -Untereinheiten an die Ni-NTA-Agarose und die anschließende spezifische Elution deuten die Bildung eines Komplexes mit monomeren G γ_2 -His und G β_5 an. Somit demonstrieren die beschriebenen Versuche die Bildung von heterotrimeren Komplexen aus gereinigten G-Protein-Untereinheiten und weisen damit die funktionelle Aktivität der untersuchten Proteine nach.

Zusammenfassend läßt sich aus den vorgestellten Experimenten schließen, dass die aus ihren Untereinheiten reassozierten G β_5 G γ_2 -Heterodimere funktionell aktiv sind und über die Eigenschaften klassischer G β G γ -Komplexe verfügen.

5.5 Nachweis von G β_5 -haltigen dissoziierbaren Komplexen in Geweben

Nachdem gezeigt werden konnte, dass G β_5 *in vitro* reversibel dissoziierende Heterodimere mit G γ_2 bildet, sollte nun geklärt werden, ob diese für eine G β -Untereinheit ungewöhnliche Eigenschaft auch in nativen Geweben beobachtet werden kann.

Um diese Frage zu beantworten, wurde folgende Überlegung den Versuchen zugrundegelegt: wenn G β_5 aus einem dissoziierenden Komplex freigesetzt wird, müsste es mit den monomeren hexahistidinmarkierten G γ_2 -Untereinheiten Heterodimere bilden.



Diese Heterodimere (fett markiert) können dann an die Affinitätsmatrix binden und dadurch spezifisch angereichert werden. Die Ergebnisse entsprechender Versuchsansätze sind in der Abb. 19 gezeigt.

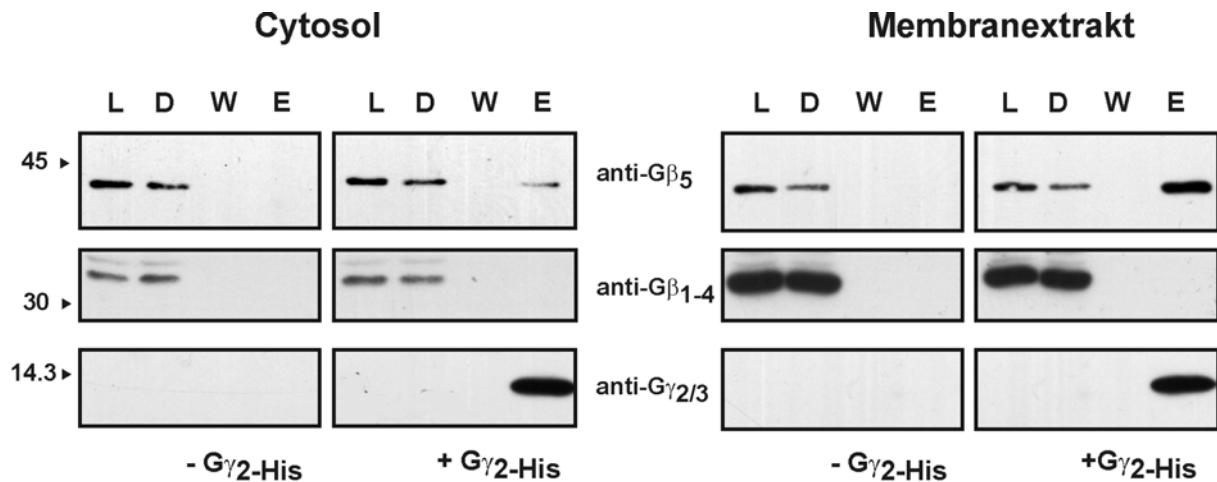


Abb. 19: G β_5 jedoch nicht G β_{1-4} kann aus Gewebeeextrakten auf gereinigtes G γ_2 übertragen werden.

Rinderhirncytosol (20 ml, Proteinkonzentration 1,2 mg/ml) oder Zellmembranextrakte (20 ml, Proteinkonzentration 0,4 mg/ml), wobei die Gesamtmenge von G β_5 in beiden Präparationen etwa gleich war, wurden auf 20 mM Imidazol eingestellt und auf Ni-NTA-Agarose-Säulen geladen, an denen vorher gereinigtes G γ_2 -His (400 pmol) immobilisiert worden war. Nach dem Waschen der Säule wurden die spezifisch gebundenen Proteine eluiert (" + G γ_2 -His "). Anschließend wurden Ladepool (L), Durchlauf (D), letzte Waschfraktion (W), und Eluat (E) mittels Immunoblot unter Verwendung polyklonaler Antisera (Tab. 4; für den anti-G β_{1-4} -Blot wurde AS 398 verwendet) analysiert. Die unspezifische Bindung an die Ni-NTA Matrix wurde in parallelen Experimenten ohne G γ_2 -His ermittelt (" - G γ_2 -His "). Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind links markiert.

Membranextrakte und Cytosol-Präparationen aus Rinderhirn wurden auf eine Ni-NTA-Agarose-Matrix geladen, an der zuvor G γ_2 -Untereinheiten über eine Hexahistidinmarkierung immobilisiert worden waren. Sowohl in den Eluaten der cytosolischen Fraktion als auch des Membranextraktes konnte G β_5 -immunoreaktives Protein detektiert werden (siehe Abb. 19), das die gleiche elektrophoretische Mobilität wie das rekombinante gereinigte G β_5 hatte (nicht abgebildet). Bemerkenswert ist, dass aus dem Membranextrakt, verglichen mit cytosolischen Präparationen, wesentlich mehr G β_5 isoliert werden konnte (siehe Abb. 19). Dass es sich hierbei tatsächlich um eine spezifische Bindung an G γ_2 und nicht an die Matrix handelte, konnte dadurch belegt werden, dass keine Bindung von G β_5 -Immunoreaktivem Protein an die Ni-NTA-Agarose selbst beobachtet werden konnte (siehe Abb. 19). Interessanterweise wurden G β_{1-4} -Untereinheiten in denselben Eluaten nicht detektiert (siehe Abb. 19). Diese Befunde deuteten darauf hin, dass sowohl Cytosol- als auch Membranpräparationen von Hirngewebe einen Pool an G β_5 enthalten, der mit exogenen G γ_2 -Untereinheiten Komplexe

eingehen kann. Die unterschiedliche Interaktionseffizienz bei der Komplexbildung spricht allerdings dafür, dass G β ₅ in den Membranen und im Cytosol in unterschiedlichen Komplexen bzw. Konformationen vorliegt.

Um diese Annahme zu bestätigen, sollte untersucht werden, in welchen Komplexzuständen G β ₅ im Hirngewebe vorkommt. Das war notwendig, da inzwischen von mehreren Arbeitsgruppen berichtet wurde, dass G β ₅ heterodimere Komplexe mit RGS-Proteinen der R7 Subfamilie (in diesem Kapitel werden sie vereinfacht auch als RGS-Proteine bezeichnet), zu der RGS6, RGS7, RGS9 und RGS11 gehören, bildet und in dieser Form im neuralen Gewebe nachweisbar ist (Cabrera et al., 1998; Makino et al., 1998; Zhang et al., 1999). Interessanterweise wurden Heterodimere aus G β ₅ und RGS6, RGS7, RGS9 oder RGS11 als stabile, nicht dissoziierbare Komplexe beschrieben (Snow et al., 1998, 1999; Makino et al., 1999; Posner et al., 1999). Unsere Befunde deuten allerdings auf die Existenz entweder einer monomeren Konformation von G β ₅ oder dissoziierbarer G β ₅-haltiger Komplexe hin. Daher wurde in diesen Untersuchungen nach Hinweisen für das Vorhandensein solcher Konformation bzw. Komplexe von G β ₅ gesucht.

Die Gelfiltrationschromatographie trennt Proteine bzw. Proteinkomplexe nach ihrer Grösse, wobei das Molekulargewicht des Proteins bzw. des Komplexes abgeschätzt werden kann (siehe 4.3.4.). Auf diese Weise könnten G β ₅ γ -Dimere (45 kDa) eindeutig von G β ₅/RGS-Komplexen (85-115 kDa) unterschieden werden. Dagegen wäre eine Differenzierung zwischen G α β ₅ γ -Heterotrimeren (etwa 90 kDa) und G β ₅/RGS-Komplexen aufgrund des geringen Grössenunterschiedes nicht möglich. Allerdings führt die selektive Aktivierung und Dissoziation der heterotrimeren G-Proteine durch GTP γ S oder AlF₄ zur Freisetzung von G β ₅ γ -Dimeren (45 kDa). Auf diese Weise könnte die Existenz von G β ₅-haltigen heterotrimeren G-Proteinkomplexen demonstriert werden.

Aus diesem Grund wurden parallel Gelfiltrationsläufe unter basalen Bedingungen (mit Puffer M) bzw. nach der Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen (mit AMF-Puffer) durchgeführt. In Abb. 20A sind die Profile der Gelfiltrationsläufe nach Immunoblotanalyse abgebildet. Bei der Gelfiltration von Membranextrakten eluiert das G β ₅-immunoreaktive Protein in zwei Peaks (Abb. 20A oben). Der erste Peak weist erwartungsgemäß eine Koelution mit RGS7 (Abb. 20B, links, Blotspur 13,25) auf und kann einem Molekulargewicht von 100 kDa zugeordnet werden. Der zweite Peak (13 \pm 3% des gesamten G β ₅; n=5) erscheint erst in späteren Fraktionen bei 45 kDa und zeigt keine Koelution mit RGS7 (Abb. 20B, links, Blotspur 14,75) bzw. mit RGS9 oder RGS11 Proteinen (nicht abgebildet). Nach der Inkubation mit AMF-Puffer wurden keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung des G β ₅-immunoreaktiven Proteins, verglichen mit den Gelfiltrationsläufen unter basalen Bedingungen, festgestellt (nicht abgebildet).

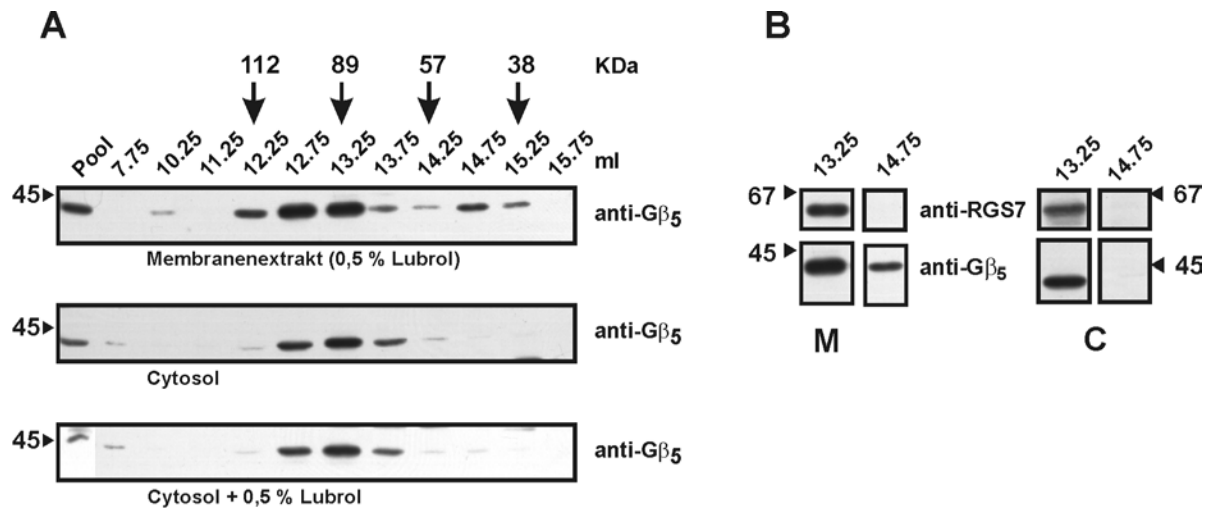


Abb. 20: Zellmembranextrakte aus neuralem Gewebe enthalten RGS-freies Gβ₅.

(A) Rinderhirn-Zellmembranen (M) wurden mit Detergenzhaltigem Puffer extrahiert und mittels einer Superdex-200 Gelfiltrationssäule in Gegenwart des Puffers M aufgetrennt (oben). In Kontrollexperimenten wurde Rinderhirncytosol (C) mit (Mitte) oder ohne Lubrol PX (0.5 %) (unten) mittels Superdex 200 Säule fraktioniert. Ladepool (Pool) und angezeigte Fraktionen (korrespondierende Elutionsvolumina (ml) und die entsprechenden Molekulargewichte (kDa) sind oben gezeigt) wurden mittels Immunoblotanalyse unter Verwendung polyklonaler Antiseren AS 422 bzw. (B) zusätzlich mit anti-RGS7 (sc 8139) visualisiert. Das apparente Molekulargewicht (kDa) von Standardproteinen ist oben markiert.

Im Cytosol wurde nur eine Gβ₅ Entität gefunden, die bei einer apparenten Molmasse von 100 kDa eluierte (Abb. 20A, Mitte). Dies entspricht wiederum der Größe von Gβ₅/RGS-Komplexen (Abb. 20B). Hingegen ist RGS-freies Gβ₅ bei 45 kDa nicht nachweisbar. RGS-freies Gβ₅ wurde jedoch auch dann nicht gefunden, wenn die cytosolische Fraktion mit Detergenz bzw. mit AMF-Puffer vorinkubiert wurde (Abb. 20A, unten, bzw. nicht abgebildet). Diese Befunde deuten darauf hin, dass im Cytosol Gβ₅ nur RGS-gebunden vorzukommen scheint, während es in der Membranfraktion neben den beschriebenen Gβ₅/RGS-Dimeren möglicherweise noch weitere dissoziierbare Gβ₅-haltige Komplexe gibt. Nach den bisherigen Untersuchungen konnte Gβ₅ nur mit Gγ-Untereinheiten dissoziierbare Komplexe bilden (Jones und Garrison 1999; und siehe 5.2). Nimmt man deshalb an, daß Gγ-Proteine die Bindungspartner von membran-lokalisiertem Gβ₅ sind, so sollten neben „freiem“ Gβ₅ auch die entsprechenden „freien“ Gγ-Untereinheiten in den Membranextrakten detektierbar sein. Damit übereinstimmend wurde über die Isolierung der Gβ-freien Gγ₃-Untereinheit aus dem Rinderhirn unter nativen Bedingungen berichtet (Morishita et al., 1994). Aus diesem Grund scheint die Gγ₃-Untereinheit als putativer Komplexpartner für Gβ₅ besonders interessant zu sein. Um dies zu überprüfen, wurden analog zu der schon beschriebenen Gγ₂-Affinitätsmatrix, Säulen mit immobilisierten Gβ₅- bzw. Gα_i- und Gα_q-

Untereinheiten hergestellt, die als Bindungspartner für „freie“ $G\gamma$ -Untereinheiten bzw. im Falle der $G\alpha$ -Säulen für $G\beta_5\gamma$ -Dimere fungieren sollten. Es konnten jedoch weder freie $G\gamma$ -Untereinheiten (geprüft wurde mit Antiseren gegen $G\gamma_2$, $G\gamma_3$, $G\gamma_5$, $G\gamma_7$), noch $G\beta_5\gamma$ -Dimere (geprüft wurde mit Antiserum gegen $G\beta_5$), detektiert werden (nicht gezeigt). Es war also nicht möglich, die entsprechenden $G\beta$ -freien $G\gamma$ -Untereinheiten zu identifizieren. Deshalb stellte sich die Frage, ob auch RGS-Proteine dissoziierbare Komplexe mit $G\beta_5$ formieren können.

Dazu wurden die aus dem Rinderhirn-Cytosol angereinigte $G\beta_5$ /RGS-Komplexe (Abb. 21) analog zu den oben beschriebenen Experimenten (siehe Seite 45, Abb. 14 und Seite 53, Abb. 19) auf ihre Interaktion mit $G\gamma_2$ -His untersucht. Unerwartet wurde eine Retention des $G\beta_5$ -immunoreaktiven Proteins an der Ni-NTA-Agarose-Säule nach der Koinkubation mit $G\gamma_2$ -His beobachtet (s. Abb. 22). Da die untersuchte Präparation hauptsächlich aus RGS/ $G\beta_5$ -Komplexen bestand und Proteine bzw. Proteinkomplexe enthielt,

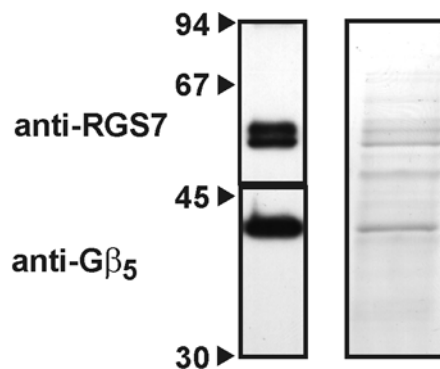


Abb. 21: Aus Rinderhirn angereinigte $G\beta_5$ /RGS7-Komplexe.

Ein Aliquot (150 μ l) der $G\beta_5$ /RGS7-haltigen Fraktion wurde nach dem abschließenden Reinigungsschritt (siehe 4.3.8) mittels Microcon YM-50 Konzentrator 10-fach konzentriert. Anschließend wurde 1/20 der Gesamtmenge mit Hilfe SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblotverfahren unter Verwendung polyklonaler Antiseren (Tab. 4) analysiert (links). Die restliche Probe (19/20 der Gesamtmenge) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Blue visualisiert (rechts).

die ein Molekulargewicht von etwa 100 kDa aufwiesen (siehe 4.3.8.), wurde das Ergebnis als eine Übertragung von $G\beta_5$ aus einem Komplex mit RGS-Proteinen auf $G\gamma_2$ interpretiert.

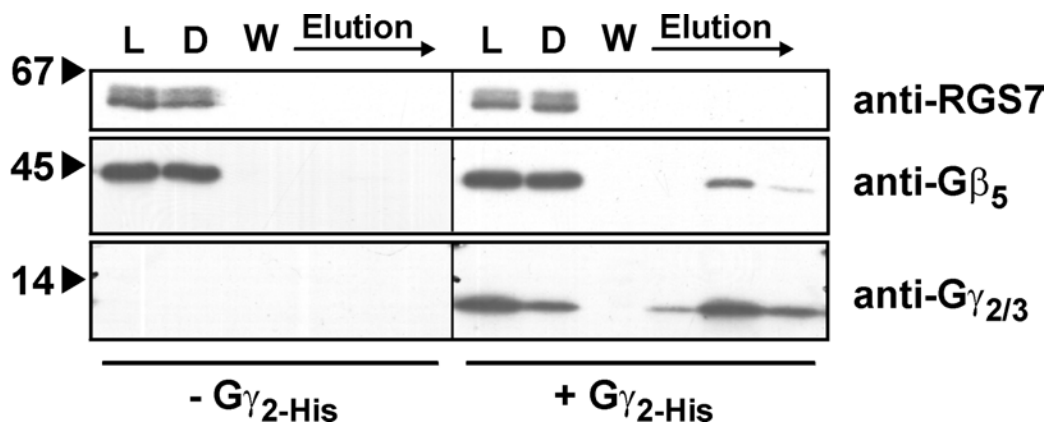


Abb. 22: Natives $G\beta_5$ kann von einem RGS-gebundenen in einen $G\gamma$ -gebundenen Zustand überführt werden.

500 μ l der angereinigten $G\beta_5$ /RGS-haltigen Fraktion nach dem letzten chromatografischen Schritt (siehe 4.3.8) (~ 20 pmol von $G\beta_5$) wurde mit 200 pmol r $G\gamma_2$ -His ("+" $G\gamma_2$ -His") inkubiert (20 min, 4°C) und anschließend auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule (200 μ l) geladen. Nach dem Waschen der Säule wurden spezifisch gebundenen Proteine eluiert. Anschließend wurden Ladepool (L), Durchlauf (D), letzte Waschfraktion (W), und Eluat (Elution) mittels Immunoblot-Verfahren unter Verwendung polyklonaler Antiseren (Tab. 4) analysiert. Unspezifische Bindung an die Ni-NTA-Matrix wurde in parallelen Experimenten ohne r $G\gamma_2$ -His ermittelt ("-" $G\gamma_2$ -His"). Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Rand markiert.

Zusammenfassend zeigen die vorgestellten Ergebnisse sowohl, dass neurale Gewebe $G\beta_5$ -haltige dissoziierbare Komplexe enthält als auch, dass RGS/ $G\beta_5$ -Komplexe das monomere $G\beta_5$ freisetzen können.

5.6 Dissoziierbarkeit von $G\beta_5$ /RGS Komplexen.

Da unsere Ergebnisse zur Dissoziierbarkeit der $G\beta_5$ /RGS-Komplexen in Widerspruch zur veröffentlichten Daten standen (Makino et al., 1998; Witherow et al., 2000), sollte dieses Phänomen an rekombinanten, gereinigten $G\beta_5$ /RGS-Komplexen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden RGS6, RGS7, RGS9 und $G\beta_5$ in *Sf9*-Zellen exprimiert und anschließend biochemisch charakterisiert. Dabei fiel auf, dass die Expression des $G\beta_5$ unabhängig von Komplexpartnern war (Abb. 23A), während RGS-Proteine nicht solitär exprimiert werden konnten (nicht abgebildet). Für ihre Expression benötigten sie die Anwesenheit von $G\beta_5$ (Abb. 23A). In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (Snow et al., 1998) konnte keine Komplexbildung zwischen RGS6, RGS7, RGS9 und $G\beta_2$ festgestellt werden (Abb. 23B).

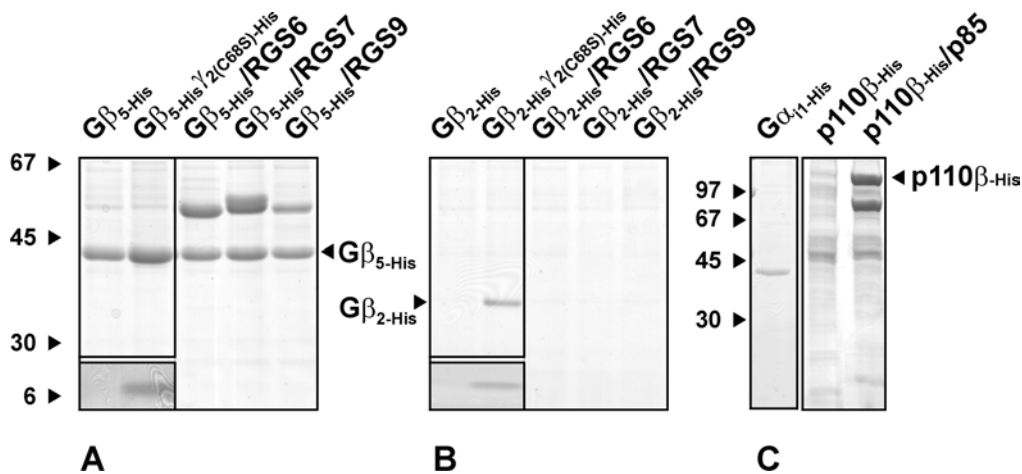


Abb. 23: Expression von G β ₅-haltigen Komplexen in Sf9-Zellen.

Cytosolpräparationen von $7,5 \times 10^7$ Sf9-Zellen, die die oben bezeichneten Proteine bzw. Proteinkomplexe enthielten, wurden über Ni-NTA-Agarose-Säulen gereinigt. Die isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung visualisiert. Gezeigt sind jeweils die Peakfraktionen, die etwa 70% der eluierten Proteine enthielten. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind markiert.

Eine ausgeprägte Abhängigkeit der Expression vom Komplexpartner zeigten auch einige andere Proteine. Es wurde eine verstärkte Expression von G β ₂-Untereinheit und der katalytischen Untereinheit der PI-3-Kinase β bei der Koexpression mit Komplexpartnern wie G γ ₂-Untereinheit bzw. p85 beobachtet (Abb 23B und 23C). Dagegen konnten G α -Untereinheiten unabhängig von ihren Komplexpartnern exprimiert werden (Abb 23C).

Als nächstes wurden gereinigte rekombinante G β ₅/RGS6- und G β ₅/RGS7-Komplexe mittels Molekularsiebanalyse untersucht. Erwartungsgemäß lag das ermittelte Molekulargewicht der Komplexe bei etwa 100 kDa, und die Präparationen enthielten kein RGS-freies G β ₅. Daraus konnte geschlossen werden, dass weder G β ₅/RGS6 noch G β ₅/RGS7 unter gewählten Versuchsbedingungen spontan dissoziieren (Abb. 24).

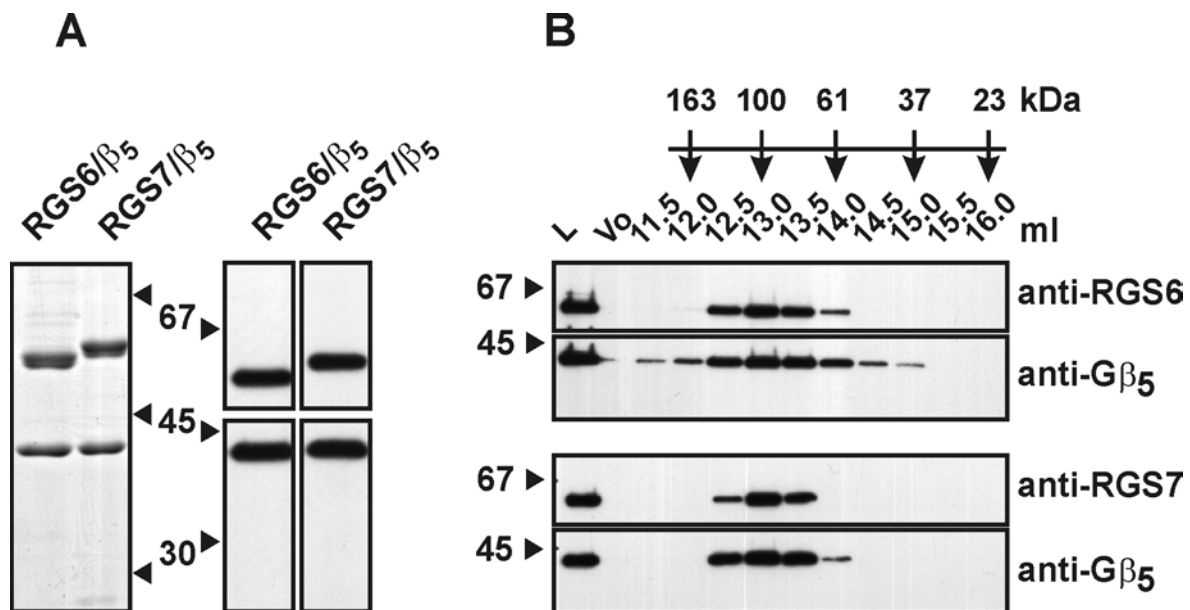


Abb.24: Gβ₅/RGS-Komplexe zeigen keine spontane Dissoziation.

(A) Gereinigte Gβ₅/RGS6 bzw. Gβ₅/RGS7 (siehe 4.3.5) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Blue (links) bzw. durch Immunoblotverfahren (rechts) visualisiert. **(B)** 120 pmol Gβ₅/RGS7 bzw. 250 pmol Gβ₅/RGS6 wurde auf eine Superdex 200-Säule geladen und anschließend isokratisch in Puffer M eluiert. Das Säulenprofil wurde mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung polyklonaler Antiseren (Tab. 4) ermittelt. Für die oben dargestellten Fraktionen sind die Elutionsvolumina und die entsprechenden Molekulargewichte angezeigt. Die relativen Molekulargewichte (kDa) von Standardproteinen sind am linken Rand markiert. **(L)** steht für Ladepool und **(V₀)** steht für Ausschlussvolumen.

Um nun die früher beobachtete Übertragbarkeit von nativem Gβ₅ aus cytosolischen Gβ₅/RGS-Komplexen auf Gγ₂-His (siehe Abb. 22) zu überprüfen und zu quantifizieren wurden steigende Mengen von Gγ₂-His an Ni-NTA-Agarose-Säulen immobilisiert und dann mit einer konstanten Menge von rekombinanter, gereinigter Gβ₅/RGS-Komplexe beladen (Abb. 25). Der Versuch wurde nach dem oben beschriebenen Prinzip aufgebaut, d.h. eine Retention an der Säule und Koelution mit Gγ₂-His bedeutet eine Übertragung von Protein aus seinem ursprünglichen Komplex auf Gγ₂-His (siehe Seite 45 und Abb. 14). Mittels quantitativer Immunoblotanalyse zeigte sich, dass etwa 20-25% des gesamten Gβ₅ aus Gβ₅/RGS-Komplexen auf Gγ₂-His übertragen wurde (Abb. 25, anti-Gβ₅ Blot). Jedoch konnten weder RGS6 noch RGS7 in den Eluatn nachgewiesen werden (Abb. 25, anti-RGS Blot).

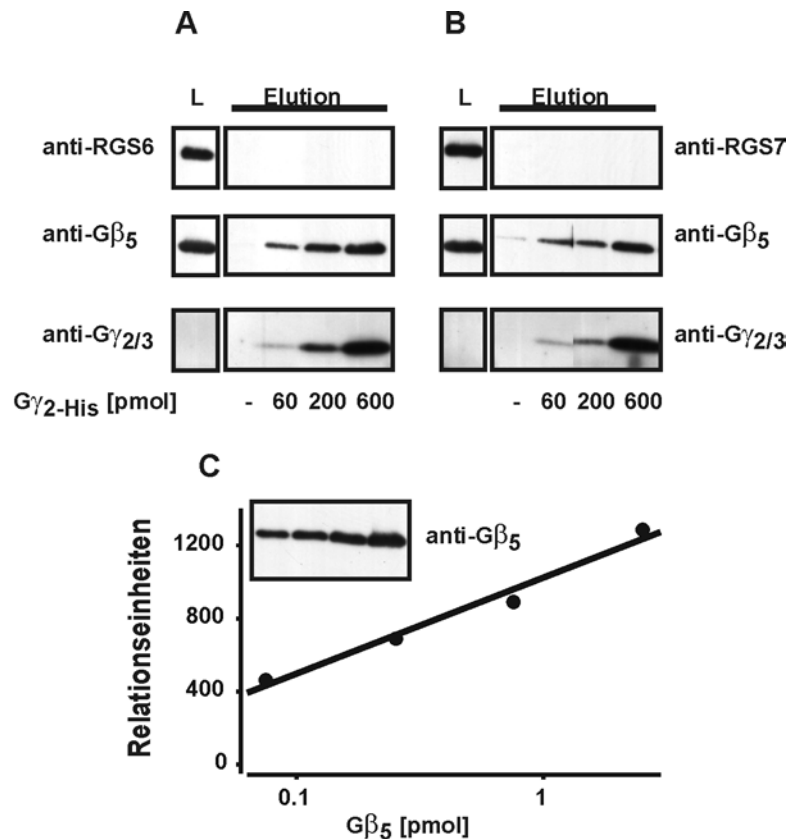


Abb. 25: Gβ₅/RGS-Komplexe können monomeres Gβ₅ freisetzen.

Die indizierten Mengen an Gγ₂-His wurden an Ni-NTA-Agarosematrix (200 μl) immobilisiert. Auf diese Gγ₂-Affinitätsäulen wurden jeweils 700 μl (~140 pmol) Gβ₅/RGS6 (**A**) bzw. (~120 pmol) Gβ₅/RGS7 (**B**) geladen. Nach dem Waschen der Säule wurden die spezifisch gebundenen Proteine eluiert. Anschließend wurden Ladepool (**L**) und Eluate (**Elution**) mittels Immunoblotverfahren unter Verwendung polyklonaler Antiseren (Tab. 4) analysiert. Eine Eichgrade (**C**) wurde nach densitometrischer Auswertung des gleichzeitig durchgeführten Immunoblots mit definierten Mengen des gereinigten Gβ₅ erstellt.

Da bei den RGS6/Gβ₅- und RGS7/Gβ₅-Heterodimeren zumindestens unter den gewählten Versuchsbedingungen keine spontane Dissoziation beobachtet wurde, kann aus den vorgestellten Daten geschlossen werden, dass Gγ₂ und RGS6 bzw. RGS7-Proteinen um die Bindung an Gβ₅ kompetieren. In Übereinstimmung mit publizierten Daten (Levy et al., 1999) deutet das Mengenverhältnis der Assay-Komponenten darauf hin, dass jedoch die Bindung des Gβ₅-Proteins an RGS-Proteine wesentlich stärker als an Gγ₂ ist.

Die Untersuchungen von Posner und Harris (1999) sowie die in unserer Arbeitsgruppe erhobenen Befunde deuten darauf hin, dass Gβ₅γ₂- und Gβ₅/RGS-Komplexe unterschiedliche oder sogar entgegengesetzte Wirkungen auf ein und denselben Effektor ausüben. Während beispielsweise Gβ₅γ₂ ein hochpotenter Stimulator der PLC-β₂ ist (siehe Abb. 28), haben Gβ₅/RGS-Komplexe keinen Einfluß auf die basale enzymatische Aktivität der PLC-β₂

(Abb. 26). Allerdings wird die $G\beta\gamma$ -vermittelte Aktivierung der PLC- β_2 durch $G\beta_5$ /RGS-Heterodimere gehemmt (Abb. 26).

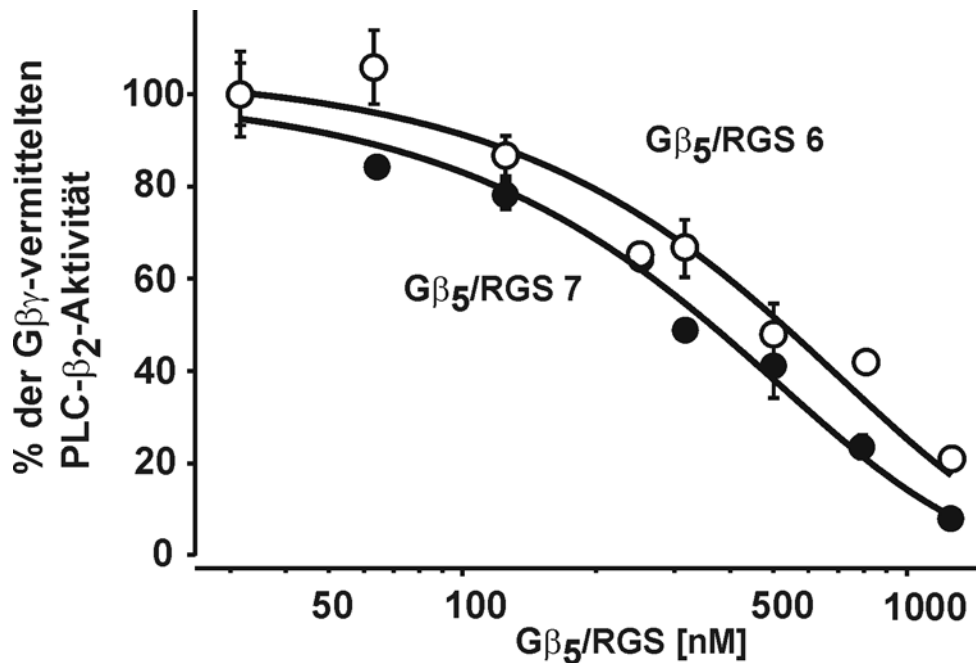


Abb. 26: Hemmung der $G\beta\gamma$ -vermittelten PLC- β_2 Aktivierung durch $G\beta_5$ /RGS-Dimere.

Die enzymatische Aktivität der gereinigten rPLC- $\beta_{2\Delta}$ wurde nach der Stimulation durch 30 nM r $G\beta_5\gamma_2$ -His gemessen (basal: $688,5 \pm 33,2$ pmol Inositolphosphat/min bzw. stimuliert: 2008 ± 189 pmol Inositolphosphat/min). Gleichzeitig wurde die durch $G\beta_5\gamma_2$ -His-stimulierte PLC- β_2 -Aktivität durch steigende Konzentrationen von $G\beta_5$ /RGS6 (●) oder $G\beta_5$ /RGS7 (○) inhibiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Mittelwerte aus Doppelwerten \pm S.E.M.) aus drei. Die Experimente wurden in Kooperation mit Dr. D. Illenberger (Universität-Ulm) durchgeführt. Hier wurde die PLC- $\beta_{2\Delta}$, eine C-terminale Deletionsmutante des humanen Enzyms, verwendet. Das deletierte Segment ist notwendig für die Assoziation mit der Plasmamembran, ist jedoch nicht erforderlich für die Interaktion mit PI-4,5-P₂, Ca²⁺ und für die Stimulation durch $G\beta\gamma$ -Dimeren (Schnabel et al., 1993).

Diese unterschiedlichen regulatorischen Eigenschaften können genutzt werden um die funktionelle Konsequenzen der Wechselwirkung zwischen $G\beta_5$ /RGS-Komplexen und $G\gamma_2$ zu untersuchen. Dazu wurde die Aktivität der PLC- β_2 nach Koinkubation von $G\beta_5$ /RGS mit $G\gamma_2$ getestet. Während $G\gamma_2$ oder $G\beta_5$ /RGS, wie erwartet, keinen Einfluss auf die basale PLC-Aktivität haben, beobachtet man überraschenderweise eine Stimulation des Enzyms bei der Koinkubation von $G\gamma_2$ mit $G\beta_5$ /RGS (Abb. 27).

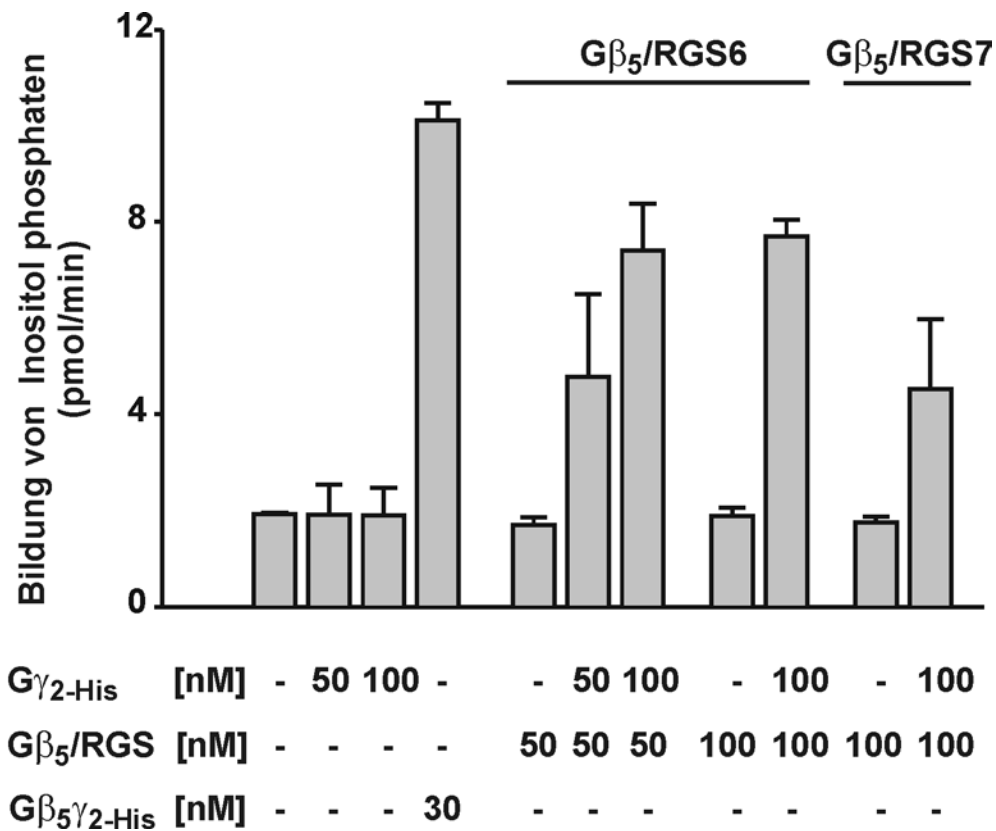


Abb. 27: Koinkubation von $G\beta_5/RGS$ -Komplexen und $G\gamma_2-His$ führt zu einer Aktivierung der PLC- β_2 .

Die enzymatische Aktivität der gereinigten PLC- $\beta_{2\Delta}$ wurde nach der Zugabe von $G\gamma_2-His$ und/oder $G\beta_5/RGS6$ bzw. $G\beta_5/RGS7$ getestet. Gereinigte intakte $G\beta_5\gamma_2-His$ -Dimere dienen als Kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Mittelwerte aus Doppelwerten \pm S.E.M.) von drei durchgeführten Experimenten. Die Experimente wurden in Kooperation mit Dr. D. Illenberger (Universität-Ulm) durchgeführt. Hier wurde die PLC- $\beta_{2\Delta}$, eine C-terminale Deletionsmutante des humanen Enzyms, verwendet. Das deletierte Segment ist notwendig für die Assoziation mit der Plasmamembran, ist jedoch nicht erforderlich für die Interaktion mit PI-4,5- P_2 , Ca^{2+} und für die Stimulation durch $G\beta\gamma$ -Dimere (Schnabel et al., 1993).

Die vorgestellten Ergebnisse liefern mehrere Hinweise, dass das G-Protein β_5 nach der Dissoziation aus Komplexen mit RGS-Proteinen bzw. mit $G\gamma$ -Untereinheiten wieder funktionelle Komplexe bilden kann.