

6 DISKUSSION

6.1 Dissoziation von $G\beta\gamma$ -Heterodimeren

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten und verbinden funktionell die in der Plasmamembran integrierten Rezeptoren mit intrazellulären Effektoren. Die Aktivierung eines G-Proteins führt zur Dissoziation der GTP-gebundenen Form der $G\alpha$ -Untereinheit von dem $G\beta\gamma$ -Heterodimer. Beide, die GTP-gebundene Form der $G\alpha$ -Untereinheit und $G\beta\gamma$ -Heterodimer regulieren verschiedene Effektoren. Während die $G\alpha$ -Untereinheit in ihrer monomeren Form aktiv ist, sind $G\beta_{1-4}$ nur im Komplex mit $G\gamma$ funktional aktiv. Sie bilden ein nicht-kovalentes Heterodimer, das unter nativen (nicht denaturierenden) Bedingungen nicht dissoziiert (Clapham and Neer, 1997).

Es wurde allerdings die Isolierung einer $G\beta$ -freien $G\gamma_3$ -Untereinheit aus Rinderhirn unter nativen Bedingungen berichtet (Morishita et al., 1994), die wahrscheinlich aus einem $G\beta\gamma$ -Komplex freigesetzt wurde. Es wurden bisher jedoch keine $G\gamma$ -freien $G\beta$ -Untereinheiten in Geweben identifiziert. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass die klassischen $G\beta_{1-4}$ -Untereinheiten nach der Dissoziation von $G\beta\gamma$ -Komplexen aggregieren. Das im Abschnitt 4.3.6 beschriebene Protokoll führt z.B. zur Dissoziation von rekombinanten $G\beta_{1\gamma_2}$ - bzw. $G\beta_{2\gamma_2}$ -Komplexen, wobei die $G\beta$ -Untereinheiten in Form von Präzipitaten ausfallen und nicht mehr solubilisiert werden können, während $G\gamma_2$ löslich bleibt. Aus diesem Grund war es überraschend, dass bei einer kurzen Reinigungsprozedur, die für die Isolierung rekombinanter klassischer $G\beta\gamma$ -Komplexen etabliert wurde, eine Dissoziation der $G\beta_{5\gamma_2}$ -Dimeren zu beobachten war, wobei $G\gamma$ -freies $G\beta_5$ in löslicher Form gefunden wurde. Dieses Ergebnis war auch deshalb unerwartet, da $G\beta_5$ abgesehen davon die typischen Eigenschaften einer $G\beta$ -Untereinheit zeigte: es bildet nach der Koexpression mit $G\gamma$ - und $G\alpha$ -Untereinheiten einen AMF-sensitiven G-Protein-Komplex und aktiviert in Komplex mit $G\gamma_2$ einen typischen $G\beta\gamma$ -sensitiven Effektor, PLC- β_2 (5.2 und Watson et al., 1994). Unsere Ergebnisse wurden auch durch unabhängige Untersuchungen bestätigt (Johnes und Garrison 1999). Somit wurde die Dissoziierbarkeit als spezifisches Merkmal für $G\beta_{5\gamma}$ -Komplexe angesehen.

6.2 Stabilität des monomeren $G\beta_5$

Die Untersuchungen von Garcia-Higuera et al. haben gezeigt, dass in Retikulozytenlysaten synthetisierte $G\gamma$ -freie $G\beta_1$ -Untereinheiten nicht in der Lage sind, eine für $G\beta\gamma$ -typische globuläre Konformation einzunehmen. Alternativ weisen einige WD-repeat-Proteine,

die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ebenso wie $G\beta_1$ eine 7-Propellerblatt Struktur haben (siehe 1.2.3), bei der Synthese im gleichen System eine korrekte Faltung und globuläre Form auf (Garcia-Higuera et al., 1996). Um die Information über die Faltung des $G\gamma$ -freien $G\beta_5$ zu erhalten, wurde eine Molekularsiebanalyse durchgeführt. Diese deutete auf eine stabile, einheitliche, monomere, kompakte und globuläre Konformation hin (5.3.1). Darüberhinaus fanden Yoshikawa et al., dass $G\beta_5$ sowohl in seiner monomeren Form, als auch in Komplex mit $G\gamma$ ein identisches Fragment-Muster bei der limitierten tryptischen Proteolyse aufweist, wobei ein etwa 37 kDa grosses Fragment entsteht (Yoshikawa et al., 2000). Im Gegensatz dazu unterscheidet sich das Ergebniss des Trypsinverdaus bei der $G\beta_1$ -Untereinheit je nach dem, ob $G\beta_1$ allein oder in Komplex mit $G\gamma_2$ exprimiert wurde. Während $G\beta_1\gamma_2$ nur einmal am Arginin 129 gespalten wird, exponiert das $G\gamma$ -freie $G\beta_1$ mehrere Schnittstellen (Schmidt und Neer, 1991).

Die aufgeführten Daten stehen im Einklang mit den eigenen Proteinexpressionsuntersuchungen. Hier wurde gezeigt, dass $G\beta_5$ im Gegensatz zu $G\beta_1$ bzw. $G\beta_2$ unabhängig von seinen Komplexpartnern in *Sf-9* Zellen exprimiert werden kann. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Resistenz des kompakt gefalteten monomeren $G\beta_5$ gegenüber den ubiquitären, intrazellulären Utilisationssystemen wie z.B. der Ubiquitin-proteosomale Proteasenkomples sein, der falsch gefaltete, falsch lokalisierte, kurzlebige oder defekte Proteine selektiert und degradiert (McNaught et al., 2001).

Die Interpretation der Molekularsiebanalysen der $G\beta$ -freien $G\gamma$ -Untereinheit, wonach das apparente Molekulargewicht des Proteins bei etwa 20 kDa lag, wurde dadurch erschwert, dass $G\gamma$ vermutlich keine globuläre Struktur besitzt (5.4.1). Es wurde allerdings aufgrund der publizierten Daten (Morishita et al., 1994) und Erfahrungen in der Arbeitsgruppe sichergestellt, dass $G\beta$ -freie $G\gamma$ -Präparationen über längere Zeit stabil bleiben. Die gereinigten $G\beta$ -freien $G\gamma$ -Untereinheiten waren ein wichtiges Werkzeug bei den Untersuchungen der Dissoziation der $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexen und der Isolation der $G\gamma$ - und RGS-freien $G\beta_5$ -Untereinheiten aus Geweben (6.3, 6.4).

Die Tatsache, dass nach der Dissoziation der $G\beta_5\gamma$ -Heterodimeren beide komplexbildende Proteine stabil und löslich bleiben, führte zu der Annahme, dass dieser Prozess reversibel sein kann. Daher wurde geprüft, ob die dissoziierten bzw. getrennt voneinander gereinigten $G\beta_5$ - und $G\gamma_2$ -Untereinheiten wieder miteinander interagieren und ein funktionell aktives Heterodimer bilden können.

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

Durch unterschiedliche chromatographische Ansätze konnte gezeigt werden, dass getrennt gereinigte $G\beta_5$ und $G\gamma_2$ zu einem etwa 45 kDa grossen Komplex rekonstituiert werden können. Es war allerdings wichtig, die Funktionalität der reassozierten Komplexe zu überprüfen. Daher wurden die regulatorischen Eigenschaften dieser Komplexe an der enzymatischen Aktivität der PLC- β_2 getestet. Es konnte gezeigt werden, dass neugebildete $G\beta_5\gamma_2$ -Dimere nach der Assoziation aus monomeren Untereinheiten ihre funktionelle Aktivität wiedergewinnen. Interessanterweise war das Ausmaß der Stimulation durch reassozierte Komplexe und durch intakte gereinigte $G\beta_5\gamma_2$ -bzw. $G\beta_1\gamma_2$ -Heterodimere vergleichbar (5.4.2.1 und Maier et al., 2000). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die $G\beta_5$ -Untereinheit nach der Dissoziation unter den gewählten Bedingungen intakt bleibt.

Desweiteren wurde die Interaktion der rekonstituierten Komplexen mit $G\alpha$ -Untereinheit untersucht. Ein etablierter Ansatz dafür ist die Blockade der $G\beta\gamma$ -vermittelten Modulation eines Effektors durch Zugabe gereinigter $G\alpha$ -Untereinheit im GDP-gebundenem Zustand. Dabei werden $G\beta\gamma$ -Komplexe offensichtlich an $G\alpha$ gebunden und stehen für die Interaktion mit dem Effektor nicht mehr zur Verfügung (Leopoldt et al., 1998; Yoshikawa et al., 2000; Wing et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass $G\alpha_{i1}$ -GDP tatsächlich die stimulierende Wirkung der rekonstituierten $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexe blockiert. Außerdem wurde die Bindung der reassozierten $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexen an $G\alpha_{i1}$ durch eine Koisolationsbestätigung (5.4.2.1 und 5.4.2.2).

Die vorgestellten Untersuchungen demonstrieren also, dass $G\beta_5\gamma_2$ -Heterodimere reversibel dissoziieren können. Da diese Eigenschaft zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht beschrieben war, wurden auch die klassischen $G\beta\gamma$ -Heterodimere diesbezüglich näher untersucht. Dabei sollte vor allem die Frage beantwortet werden, ob die oben gezeigte Dissoziation und Reassoziations der beiden Untereinheiten auch für $G\beta_1\gamma_2$ -Komplexe nachweisbar ist. Durch Koexpressions- und Koisolationsansätze konnte gezeigt werden, dass während $G\beta_5\gamma_2$ -Heterodimere eine reversible Dissoziation aufweisen, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ einen statischen, nicht dissoziierenden Komplex bilden (5.4.1). Die reversible Dissoziation scheint also unter $G\beta$ -Untereinheiten ausschließlich für $G\beta_5$ charakteristisch zu sein.

Da die bislang diskutierten Ergebnisse *in vitro* an rekombinanten Proteinen erzielt wurden, war eine Aussage über die physiologische Relevanz der Dissoziierbarkeit des $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexes auf dieser Basis kaum möglich. Es war daher notwendig, die Untersuchungen auf native Proteine in Geweben zu erweitern und die Korrelate für dissoziierbare $G\beta_5\gamma_2$ -Komplexe *in vivo* zu finden.

6.4 Isolation des $G\gamma$ -freien $G\beta_5$ aus Rinderhirn

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen wurde von mehreren Arbeitsgruppen berichtet, dass $G\beta_5$ in Komplexen mit den Mitgliedern der R7 Subfamilie der RGS-Proteine (RGS6, RGS7, RGS9 und RGS11, die in diesem Kapitel vereinfacht auch als RGS-Proteine bezeichnet werden) vorkommt. So konnten sowohl aus Retina- und Hirncytosol, als auch aus Hirnmembran-Extrakten $G\beta_5$ /RGS7-Komplexe gereinigt und anschließend identifiziert werden (5.5, Cabrera et al., 1998; Zhang et al., 2000; Witherow et al., 2000), während aus Retinamembranextrakten $G\beta_{5L}$ /RGS9-1-Komplexe isoliert wurden (Makino et al., 1999). Allerdings richtete man die Reinigungsstrategie bei den erwähnten Ansätzen ausschließlich auf die Isolation solchen $G\beta_5$ -haltigen Komplexen aus, die in grösseren Mengen vorkommen. Dadurch wurden weitere, bis dahin noch unbekannte Komplexzustände des $G\beta_5$ nicht erfasst und konnten somit weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund war es wichtig, die Untersuchungen am neuronalen Gewebe mit alternativen chromatographischen Ansätzen zu ergänzen. Da $G\beta_5$ /RGS-Heterodimere als nicht dissoziierende etwa 100 kDa grosse Proteinkomplexe beschrieben wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit einerseits nach Beweisen für die dissoziierbaren $G\beta_5$ -haltigen Komplexen gesucht, andererseits nach Komplexzuständen, die ein von den bekannten $G\beta_5$ /RGS-Heterodimeren abweichendes Elutionsverhalten von der Gelfiltrationssäule aufwiesen.

Zunächst konnte das $G\gamma$ -freie $G\beta_5$ aus Rinderhirn-Cytosolfractionen bzw. Membranextrakten mittels einer Affinitätssäule, an die $G\gamma_2$ als Bindungspartner für „freie“ $G\beta$ -Untereinheiten immobilisiert wurde, isoliert werden. Das war die erste gelungene und zuvor noch nicht beschriebene Isolation der $G\gamma$ -freien $G\beta$ -Untereinheiten aus Geweben (5.5). Dieses Ergebniss deutete darauf hin, dass es Komplexe gibt, die das monomere $G\beta_5$ freisetzen, bzw. dass $G\beta_5$ in monomerem Zustand existiert. Daher wurden zusätzlich die Molekularsiebanalysen der subzellulären Fraktionen des neuronalen Gewebe durchgeführt. Wenn $G\beta_5$ als Monomer *in vivo* existiert, sollte es aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften im Cytosol lokalisiert sein. Mittels Gelfiltrationschromatographie konnte jedoch gezeigt werden, dass $G\beta_5$ im Cytosol scheinbar nur in Form von „klassischen“ $G\beta_5$ /RGS-Komplexen vorkommt. Diese Komplexe haben ein Molekulargewicht von etwa 100 kDa, sind detergentstabil und dissoziieren nicht in einem AMF-haltigen Puffer. Daraus kann geschlossen werden, dass $G\beta_5$ als Monomer zumindestens im neuronalen Gewebe durch die angewandte Methode nicht nachweisbar ist, und die mit $G\gamma_2$ -Affinitätsmatrix isolierten $G\beta_5$ -Untereinheiten wahrscheinlich aus Komplexen freigesetzt wurden.

Und tatsächlich fand man in den Membranextrakten neben $G\beta_5$ /RGS-Komplexen auch weitere $G\beta_5$ -Spezies, die die Molekularmasse von 45 kDa aufwiesen und daher entweder den

G $\beta_5\gamma$ -Heterodimeren oder den G β_5 -Monomeren, die aus unbekanntem Komplexen freigesetzt wurden, entsprechen könnten. Aufgrund des geringen Unterschiedes der Molekularmassen beider Spezies konnten diese mittels Gelfiltrationschromatographie nicht unterschieden werden. Der Versuch G β -freie G γ -Untereinheiten mittels G β_5 -Affinitätssäule, bzw. G $\beta_5\gamma$ -Komplexen mittels an der Ni-NTA-Matrix immobilisierten G α_i - und G α_q -Untereinheiten zu isolieren, ist nicht geglückt (5.5). Das negative Ergebnis könnte an der unzureichenden Sensitivität der anti G γ -Antiseren liegen und ermöglicht deshalb keine endgültige Aussage über die Existenz von G $\beta_5\gamma$ -Komplexen. In Zukunft wäre eine Wiederholung des Ansatzes mit alternativen Präparationen des gereinigten G β_5 und der Antikörpern sinnvoll. Aufgrund fehlender spezifischer Antiseren konnte die Assoziation zwischen G β_5 und G γ_{13} nicht untersucht werden (6.6).

Zusammenfassend läßt sich aus den diskutierten Ergebnissen ableiten, daß das G β_5 -Protein membranlokalisierte, dissoziierbare Komplexe mit einem unbekanntem Bindungspartner *in vivo* bildet, der noch identifiziert werden soll.

Alternativ könnten die beschriebene Ergebnisse durch die Annahme erklärt werden, dass die G β_5 /RGS-Komplexe auch dissoziieren können, wobei G γ_2 diesen Prozess fördert. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass trotz fehlendem 45 kDa grossem G β_5 -immunoreaktivem Protein bei der Molekularsiebanalyse von cytosolischen Fraktionen, aus diesen Fraktionen G β_5 mittels G γ_2 -Affinitätsmatrix isoliert werden konnte.

6.5 Mögliche funktionelle Bedeutung der Dissoziierbarkeit von G β_5 /RGS-Komplexe

Gegenwertig geht man davon aus, dass G β_5 /RGS-Komplexe stabil sind und analog zu klassischen G $\beta\gamma$ -Dimeren unter nicht denaturierenden Bedingungen keine Dissoziation zeigen (Ross und Wilkie, 2000). Vielmehr wird die Dissoziierbarkeit der G $\beta_5\gamma$ -Komplexe als Zeichen ihrer „Unnatürlichkeit“ betrachtet (Witherow et al., 2000). Allerdings deuten die in unserer Arbeitsgruppe erhobenen Befunde darauf hin, dass es im neuronalen Gewebe neben klassischen G β_5 /RGS-Komplexen auch weitere dissoziierbare G β_5 -haltige Komplexe gibt. Da die Existenz eines G $\beta_5\gamma$ -Dimers, dessen Dissoziierbarkeit bekannt ist, bislang *in vivo* nicht nachgewiesen werden konnte, können die vorliegenden Befunde wie folgt interpretiert werden:

- 1) G β_5 bildet dissoziierbare Komplexe mit einem noch nicht identifiziertem Partner, der weder G γ noch RGS-Protein entspricht, oder

2) G β ₅/RGS-Komplexe sind auch dissoziierbar, bzw. sie können G β ₅ in einem monomeren Zustand freisetzen.

Die erste Hypothese könnte geprüft werden, in dem affinitätsmarkiertes G β ₅-Protein in einer Zelllinie stabil exprimiert wird. Ein derart markiertes Protein würde mit natürlichen Interaktionspartnern wechselwirken, die dann mit Hilfe einer Affinitätsmatrix effizient mitgereinigt und anschließend identifiziert werden könnten (Shevchenko et al., 2002).

Um zu prüfen, ob G β ₅/RGS-Komplexe monomeres G β ₅ freisetzen können, wurden in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen an gereinigten Proteinen durchgeführt. Voraussichtlich interagieren sowohl G γ -Untereinheiten, als auch RGS-Proteine mit derselben oder zumindestens überlappenden Bindungsstellen an G β ₅ (Abb. 28). Daher wurde untersucht, ob, bzw. in wie weit die gereinigten G γ ₂-Untereinheiten mit den gereinigten RGS-Proteinen um das G β ₅ kompetieren können. Ein ähnlicher Ansatz mit rekombinanten G β ₁ γ ₂-Komplexen, die bekannterweise keine Dissoziation aufweisen, führte zu einem negativen Ergebnis, wobei keine Übertragung der G β ₁ aus den ursprünglich formierten G β ₁ γ ₂-Komplexen an die gereinigten G γ ₂-Untereinheiten detektiert werden konnte (5.4.1). Daher würde eine in diesem System gemessene Übertragung von G β ₅ aus G β ₅/RGS-Komplexen auf G γ ₂ auf eine Dissoziation der G β ₅/RGS-Komplexe hindeuten. Tatsächlich waren sowohl native als auch rekombinante G β ₅/RGS-Komplexe in der Lage aktives monomeres G β ₅ freizusetzen, wobei mit Gelfiltrationschromatographie sichergestellt wurde, dass die untersuchten Präparationen kein monomeres G β ₅ enthalten und die rekombinante G β ₅/RGS-Komplexe zumindestens unter gewählten Versuchsbedingungen keine Puffer-bedingte Dissoziation aufweisen (5.6). Zusammenfassend lassen diese Befunde den Schluss zu, dass G β ₅/RGS-Komplexe ähnlich wie G β ₅ γ -Dimere dissoziieren können. Die Dissoziierbarkeit scheint also ein grundsätzliches biochemisches Charakteristikum von G β ₅-haltigen Komplexen zu sein. Die nachgewiesene Dissoziierbarkeit von G β ₅/RGS-Komplexen schließt jedoch die Existenz von G β ₅ γ -Dimeren *in vivo* nicht aus.

Auf Grund der vorgestellten Ergebnissen und publizierten Daten hat G β ₅ je nach Komplexzustand unterschiedliche Funktionen, die untereinander nicht ersetzbar sind. So aktiviert G β ₅ in Komplex mit G γ ₂ selektiv PLC- β ₂, während G β ₅/GGL-Modul eine hemmende Wirkung auf die RGS-Domäne ausübt (Arshavsky et al., 2002) und somit die GAP-Aktivität des jeweiligen RGS-Proteins zu reduzieren scheint, ohne die Effektoren selbst zu modulieren. Eine Dissoziation von G β ₅-haltigen Komplexen und die Übertragung der G β ₅-Untereinheit von einem Komplexpartner auf den anderen könnte ein Umschaltmechanismus darstellen. Dabei würde Dissoziation des G β ₅/RGS-Komplexes zur Erhöhung der GAP-Aktivität und die Übertragung von G β ₅ auf G γ zur Modulation der Effektoraktivität führen. Ein vereinfachtes Modell solcher Interaktionen stellt die

Rekonstitution des Proteinkomplexes aus PLC- β_2 , G β_5 /RGS7 und G γ_2 an Phospholipid-Vesikeln dar, wobei die Stimulation der enzymatischen Aktivität der PLC- β_2 wahrscheinlich durch eine zumindest partielle Dissoziation von G β_5 /RGS7 und eine Wechselwirkung zwischen G β_5 und G γ_2 erfolgt. (5.6). Selbst wenn die G β -freien G γ -Untereinheiten *in vivo* nicht nachgewiesen sind, zeigt dieses Experiment eine mögliche Auswirkung einer Konkurrenz der RGS-Proteine mit einem anderen, putativen Protein um einen gemeinsamen Bindungspartner. Dieses putative Protein kann G γ -ähnliche Eigenschaften haben (z.B. etwa 10 kDa gross sein und in die Plasmamembran verankert sein) und soll mit G β_5 zumindest transitorisch einen Komplex bilden, der Effektoren modulieren kann. Zu den möglichen

G β_1	MS-----ELDQLRQEAELKQNIHDKAKACAD-----ATLSQITNNID	38
G β_5	MATEGLHENETLASLKSEAESLKGKLEERAKLHD-----VELHQVAERVE	46
G β_1	FVGRIQ-----MRTRRTLGRGH--LAKIYAMHWGTD--SRLLVASASQDGKLIWD	83
G β_5	ALGQFV-----MTRRRTLGRGH--GNKVLCDWCKD--FRRIVSSSQDGKVIWVD	91
G β_1	SYT-----TNKVHAIPLRSS--WVMTCAYAPS--GNYVACGGLDNICSIYN	125
G β_5	SFT-----TNKSHAVTMCPT--WVMTCAYAPS--GCAIACGGLDNKCSVYP	133
G β_1	LKTREGN-----VRVSRELAGH--TGYL-SCCRFLD--DNQIVTSSGDTTCALWD	170
G β_5	L-TFDKNE-----AAKKKSVAMH--TNYL-SACSFENS--DNQILTASGDTCALWD	181
G β_1	IET-----GQOTT F GH--TGDVMSLSLAPD--TRLFVSGACDASAKLWD	212
G β_5	VES-----GQLLQSFHGH--GADVLCLDLAPSETGNTFVSGGCDKKAIVWD	225
G β_1	VRE-----GMCROTFTGH--ESDINAI ^C FFPN--GNAFATGSDDATCRLFD	254
G β_5	MSR-----GQCVAFETH--ESDIN ^V RYYPG--GDAFAGSDDATCRLVD	267
G β_1	LRA-----DQELM ^Y SHDNII ^C GITSVSFS ^K S--GRLLLAGYDDFNCNVWD	298
G β_5	LRA-----D ^E EVAIYSKESII ^F GASVDF ^S S--GRLLFAGYNDY ^T INVWD	311
G β_1	ALK-----ADR ^G GVLAGH--DNRVSCLGVTDD--GMAVATGSWDSFLKIWN	340
G β_5	VLK-----G ^R VSIL ^F GH--ENRVS ^L RVSE ^D --G ^A FC ^S GSWD ^H TLR ^W A	353

Abb. 28: Überlappung von RGS- bzw. G γ -Bindungsstellen und potenziellen DNA-Bindungsdomäne von G β_5 .

Aus den abgeleiteten Proteinsequenzen von G β_1 (Genbank # P54311) und G β_5 (Genbank # P54314) wurde im Programm-Modul Megalign des Programmes DNASTAR der dargestellte Vergleich erzielt. Die Mutationen in grau unterlegten Bereichen der G β_1 -Sequenz beeinträchtigen die Komplexbildung zwischen G β_1 und G γ_2 (Panchenko et al., 1998). Die durch Kristallstrukturanalysen ermittelten Kontaktstellen zwischen G β_1 und G γ_2 (Wall et al., 1995) sind einfach unterstrichen. Die durch Pfeile markierte Aminosäurenreste scheinen genetischen Untersuchungen nach kritisch für die Interaktion zwischen G β_5 und RGS-Proteinen zu sein (Robatzek et al., 2001). V274 und A353, die für die Selektivität der Interaktion zwischen G β_5 und RGS-Proteinen wichtig zu sein scheinen (Snow et al., 1998), sind mit Sternen markiert. Die Identifikation der putativen DNA-bindenden Domäne (doppelt unterstrichen) erfolgte mit Hilfe des *NCBI Conserved Domain* Programms. Die innerhalb der G β_1 -4 konservierte oder konservativ substituierten Aminosäuren sind fett gedruckt. Die laufenden Nummern der letzten Aminosäuren in den Reihen sind jeweils rechts angezeigt. Weitere Erklärungen siehe Text

Kandidaten könnten entweder schon bekannte oder noch nicht klonierte G γ -Untereinheiten gezählt werden. Außerdem stellt RGS9-1-*anchor*-Protein (R9AP), das als einen neuen Komplexpartner für G β_5 /RGS9-1-Heterodimer identifiziert wurde (Hu und Wensel, 2002), eventuell den bisher fehlenden Faktor dar, der die Effektormodulation durch G β_5 /RGS-

Komplexe ermöglicht (Posner et al., 1999). Ein ähnliches *anchor*-Protein wäre auch für weitere membranassoziierte G β_5 /RGS6- und G β_5 /RGS7-Komplexe vorstellbar.

Zusätzlich sind auch weitere Interaktionen von G β_5 /RGS-Komplexen denkbar, die zur ihren zumindest partiellen Dissoziation führen könnten. Den publizierten Daten zufolge, interagiert G β_5 mit RGS-Proteinen vermutlich ähnlich wie mit G γ über sein C-terminales Segment. Bemerkenswerterweise liegt innerhalb des genannten Segmentes eine putative DNA-bindende Domäne, die bei klassischen G β -Untereinheiten nicht vorhanden ist (Abb. 28). Diese strukturelle Besonderheit könnte mit den Daten von Zhang et al., die eine Kernlokalisierung von G β_5 /RGS7-Komplexen beschreiben (Zhang et al 2001), zusammenhängen und auf eine mögliche Beteiligung von G β_5 an den Transkriptionsvorgängen hinweisen.

Alternativ stellen Polycystin und SCG10 (superior cervical ganglia)-Protein, die ähnlich wie G β_5 an die GGL-Domäne der RGS-Proteine (Kim et al., 1999; Guay-Woodford et al., 2000; Liu et al., 2002) binden, weitere potenzielle Proteine dar, deren Wechselwirkung mit RGS-Proteinen eine zumindestens partielle Dissoziation von G β_5 /RGS-Komplexen voraussetzt. Die Dissoziierbarkeit der G β_5 /RGS-Komplexe könnte zukünftig unter Berücksichtigung neuer Interaktionspartner u. a. mit Hilfe der BRET (Bioluminiszenz-Resonanz-Energie-Transfer)-Methode untersucht werden.

6.6 *Weitere Hinweise auf die Existenz der G β_5 γ -Komplexen*

Nachdem die Interaktion von G β_5 mit G γ und RGS-Proteinen gezeigt wurde, stellte sich die Frage, welcher der Partner physiologisch relevant ist, bzw. ob eine Koexistenz von beiden G γ - und RGS-gebundenen Zuständen möglich ist. Die physiologische Relevanz der G β_5 γ -Komplexen scheint zumindest dadurch gegeben zu werden, dass G β_5 γ -Heterodimere einige Effektoren modulieren und dabei durch G β_5 /RGS-Komplexe nicht ersetzt werden können (5.6 und Posner et al., 1999).

In dem vorigen Abschnitten wurden die Daten zur Identifikation von dissoziierbaren G β_5 -haltigen Komplexen aus den Geweben mittels chromatographischer Methoden als Hinweis für die Existenz von G β_5 γ -Komplexen diskutiert (6.4). Im diesem Abschnitt werden die genetischen Studien und die strukturellen Untersuchungen behandelt, die auf eine RGS-unabhängige Funktion von G β_5 hinweisen bzw. G γ_{13} als eine G β_5 -spezifische G γ -Untereinheit annehmen lassen.

Die genetischen Untersuchungen im Nematoden *C. elegans* weisen darauf hin, dass G β_5 in Komplexen mit den RGS-Proteinen EAT-16 bzw. EGL-10 als negativer Regulator an G q - bzw. G o -abhängigen muskarinergen bzw. serotonergen Signalwegen beteiligt ist (Abb. 29).

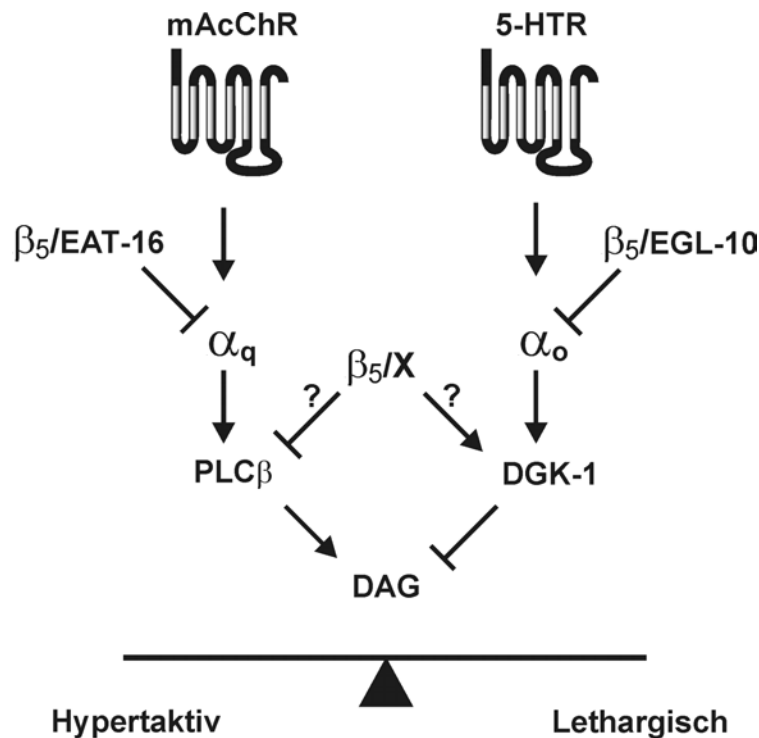


Abb. 29: Regulation der G_q - und G_o -abhängigen Signaltransduktion in *C. elegans* durch $G\beta_5$.

In einem intakten Organismus befinden sich beide Signaltransduktionsketten im Gleichgewicht, wobei sie die Konzentration des „second messengers“ Diacylglycerol (DAG) kontrollieren. Die durch Geninaktivierung und entsprechenden Funktionsverlust einer der Komponenten hervorgerufene Verschiebung des Gleichgewichtes führt je nach Signalkette und je nach Ausfall entweder zu einem lethargischen (z.B. bei der Inaktivierung von $G\alpha_q$ oder PLC β) oder zu einem hyperaktiven (z.B. bei der Inaktivierung von $G\alpha_o$ bzw. DGK) Phentyp von *C. elegans*. Das Modell basiert auf Untersuchungen zur Regulation des Fortbewegens und des Eierlegenverhaltens von *C. elegans* (van Der Linden et al., 2001; Robatzek et al., 2001; Chase et al., 2000, Brundage et al., 1996). DGK: Diacylglycerol-Kinase, mAcChR: muskarinerger Acetylcholin-Rezeptor und 5-HTR: Serotonin-Rezeptor. Die Zeichen \downarrow bzw. \perp bedeuten eine stimulierende bzw. eine inhibierende Wirkung.

Darüber hinaus wurde in einigen Studien eine gegenseitige Abhängigkeit von $G\beta_5$ und RGS-Proteinen beobachtet. Das heißt, dass in Geweben von RGS-defizienten Tieren die Menge von $G\beta_5$ stark reduziert ist bzw. *vice versa* (Chen et al., 1999; Chase et al., 2001). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass $G\beta_5$ ausschließlich in Komplexen mit RGS-Proteinen vorkommt. Dagegen liefern Studien von Plasterk und Mitarbeitern Hinweise, dass $G\beta_5$ auch Funktionen ausübt, die unabhängig von RGS-Proteinen sind. Sie gingen ebenfalls von einer konstitutiven Assoziation des $G\beta_5$ und RGS-Proteinen der R7 Subfamilie aus. Funktionell sollte dies bedeuten, dass die $G\beta_5$ /RGS-Komplexe nur als Einheit agieren und dadurch das Ausschalten eines Partners zum Ausfall der Funktion des anderen führt. Demnach sollten $G\beta_5$ -defiziente Tiere einen ähnlichen Phentyp entwickeln, wie Tiere, bei denen alle Gene für die RGS-Proteine der R7 Subfamilie inaktiviert wurden. Allerdings unterscheiden sich die

G β ₅-defizienten von solchen RGS-defizienten Tieren durch einen erhöhten Tonus der Körper- sowie Pharyngealmuskulatur und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Acetylcholinesterase-Hemmern. So lässt diese Studie den Schluss zu, dass G β ₅ weitere, von RGS-Proteinen der R7 Subfamilie unabhängige Funktionen, besitzt (van Der Linden et al., 2001). Eine Interpretation dieser Daten wäre, dass G β ₅ möglicherweise im Komplex mit G γ oder anderen Partner die Effektoren moduliert (s. Abb. 29).

Bei Aminosäuresequenz-Analysen ist man auf eine Ähnlichkeit zwischen der G γ -Untereinheiten und dem konservierten N-terminalen Fragment der RGS-Proteinen der R7 Subfamilie gestoßen. So wurde eine sog. GGL (*G-Protein gamma like*)-Domäne identifiziert, die essentiell und ausreichend für die Interaktion mit G β ₅ ist. Dabei scheint ein konserviertes NPW-Motiv innerhalb dieser Domäne für die Interaktion mit G β ₅ entscheidend zu sein (Abb. 30. und Snow et al., 1999). Alle zu dem Zeitpunkt der Untersuchung bekannten G γ -Untereinheiten wiesen auf der analogen Position ebenfalls ein konserviertes NPF-Motiv auf (Abb. 30).

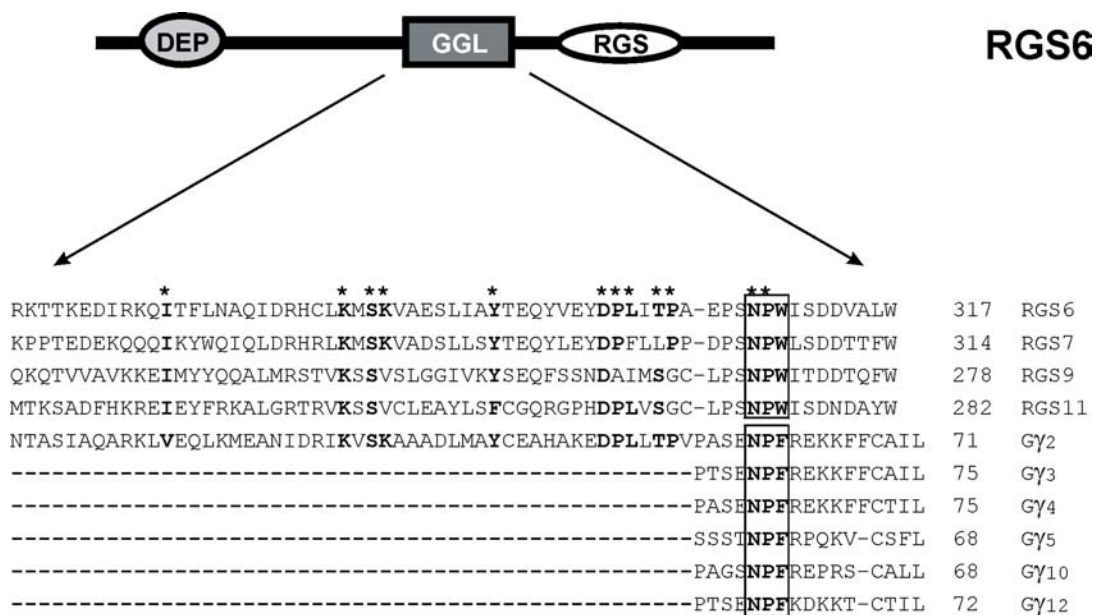


Abb. 30: Strukturelle Homologie zwischen den RGS-Proteinen der R7 Subfamilie und den G γ -Untereinheiten

Schematische Darstellung der Domänen-Organisation des RGS6-Proteins (oben) und Vergleich der Aminosäuresequenzen innerhalb der GGL-Domänen (unten). Abgeleitete Proteinsequenzen von RGS6 (Genbank# P49758), RGS7 (Genbank# PP49802), RGS9 (Genbank# P49805), RGS11 (Genbank# O94810), G γ ₂ (Genbank# JC7290), G γ ₃ (Genbank# P29798), G γ ₄ (Genbank# P50153), G γ ₅ (Genbank# P30670), G γ ₁₀ (Genbank# P50151), G γ ₁₂ (Genbank# Q9UBI6), mit Hilfe des Programm-Moduls Megalign des Programmes DNASTAR verglichen. Identische oder konservativ substituierte Aminosäuren sind fett gedruckt bzw. mit Stern markiert. Die laufenden Nummern der letzten Aminosäuren sind jeweils rechts angezeigt. Das NPW- bzw. NPF-Motiv ist umrahmt.

Das daraus resultierende Konzept ging – analog zur Vorstellung über klassische G β γ -Heterodimere – von einer konstitutiven Assoziation des G β $_5$ mit seinen physiologischen Interaktionspartnern aus. Da RGS-Proteine im Gegensatz zu G γ einen detergentstabilen Komplex mit G β $_5$ bilden, wurde angenommen, dass die RGS-Proteine der R7 Subfamilie die physiologischen Partner für G β $_5$ sind (Snow et al., 1999, Witherow et al., 2000). Aus diesem Grund wurden Proteine, die ein NPW-Motiv innerhalb der GGL-Domäne enthalten als potentielle selektive Interaktionspartner für G β $_5$ betrachtet. Entsprechend diesem Konzept wurde die Frage gestellt, ob auch weitere Proteine existieren, die ein NPW-Motiv innerhalb der GGL-Domäne aufweisen. Dazu wurde ein Screening der Datenbanken mit einer modifizierten Aminosäuresequenz von G γ $_2$ durchgeführt (Abb 32). Dabei wurden in der Tat einige Polypeptide gefunden, die ein NPW-Motiv aufweisen. Dabei handelte es sich um G γ -Untereinheiten, die vor kurzem kloniert wurden (Schulz et al., 1999; Huang et al., 1999; Jansen et al., 1999). Darunter waren auch die zuletzt entdeckten humane und murine G γ $_{13}$ -Untereinheiten (Abb. 31). Interessanterweise scheint das NPW-Motiv bei dieser G γ -Familie konserviert zu sein. So besitzt der Nematode *Caenorhabditis elegans* bzw. die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nur zwei G γ -Untereinheiten, die alternativ jeweils das NPF- oder das NPW-Motiv aufweisen (Abb. 31). Zusammenfassend stellen die Mitglieder der G γ $_{13}$ -Familie weitere potentielle Komplexpartner der G β $_5$ -Untereinheit dar.

RKTTKEDIRKQITFLNAQIDRHCLKMSKVAESLIAYTEQYVEYDPLITPA-EPSNPWISDDVALW	317	RGS6
EEWDVPQMKKEVESLKYQLAFQREMSSKTIPELLKWIEDGIPKDPFLNPDLMKNNPWVEK GK-CTIL	67	hG γ $_{13}$
EEWDVPQMKKEVESLKYQLAFKREMSKTIPELLKWIEDGIPKDPFLNPDLMKNNPWVEKAK-CTIL	67	mG γ $_{13}$
NMDRDALKKQIENMKYQASMERKWPLSKSIAEMRSFIEENEKNDPLINAPDKKNNPWAEK GK-CVIM	72	DmG γ $_2$
----MDKSDMQRTVDSLRSQNLNIERTPITVSAEELRRFTESQEDPLVNPIDKKNNPWAEKSKSCSML	62	C.e1.G γ $_2$
NTASIAQARKLVEQLKMEANIDRIKVSAAAADLMAYCEAHAKEDPLITPVPASENPFREK KFFCAIL	71	hG γ $_2$

Abb. 31: G γ $_{13}$ ist ein potenzieller Komplexpartner für G β $_5$.

Vergleich der Aminosäuresequenz von Proteinen, die als Homologe zur modifizierten Aminosäuresequenz G γ $_2$ (Genbank# JC7290) identifiziert wurden, wobei das Sequenzfragment DPLLTPVPASENPF in G γ $_2$ durch das DPLITPAEPSNPW Fragment aus RGS6 (Genbank# P49758) ersetzt wurde. Die Suche wurde in Datenbanken NCBI-Swissprot und NCBI-EST durchgeführt. Identische oder konservativ substituierte Aminosäuren sind fett gedruckt bzw. mit Stern markiert. Die laufenden Nummern der letzten Aminosäuren sind jeweils rechts angezeigt. Das NPW-Motiv ist umrahmt.

Die vor kurzem publizierte Arbeit von Blake et al., die ebenso von einer selektiven Assoziation zwischen G β $_5$ - und G γ $_{13}$ ausgingen, befasst sich mit der funktionellen Charakterisierung von rekombinanten G β $_{1-5}\gamma$ $_2$ - bzw. G β $_{1-5}\gamma$ $_{13}$ -Heterodimeren. In dieser Studie konnte weder eine Selektivität bei der Komplexbildung zwischen G β $_{1-5}$ mit G γ $_{13}$ -Untereinheit noch ein Unterschied zwischen G β $_{5}\gamma$ $_2$ und G β $_{5}\gamma$ $_{13}$ bezüglich der Stabilität der

gebildeten Komplexen bzw. der Regulation von PLC- β_2 und GIRK1/4 festgestellt werden. Ein Versuch, G $\beta_5\gamma_{13}$ bzw. andere G $\beta_5\gamma$ -Dimere aus Geweben oder Zelllinien zu isolieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht unternommen. Daher scheint die Interpretation von Autoren, dass G $\beta_5\gamma$ -Dimere aufgrund ihrer Dissoziierbarkeit unnatürlich seien (Blake et al., 2001), verfrüht, zumal der Einsatz von 0,1 % SDS in einem schon ohne hin detergenzreichen Extraktionspuffer (Snow et al., 1998, 1999; Blake et al., 2001) für viele *in vivo* existierende Proteinkomplexe erfahrungsgemäß jenseits der Toleranzgrenze liegt. Die Dissoziierbarkeit erschwert den Nachweis von G $\beta_5\gamma$ -Komplexen *in vivo*, doch dies allein kann nur sehr eingeschränkt als Kriterium für die Beurteilung der Existenz eines Komplexes *in vivo* herangezogen werden.

Ein Koisolationsansatz unter milden Extraktionsbedingungen (0,2 % des nicht-ionischen Detergenz C12E10), der konzeptionell für eine systematische Identifikation von Interaktionspartnern des G β_5 aus Hirngewebe mittels Immunoaffinitätschromatographie ausgearbeitet und durchgeführt wurde (Zhang und Simonds, 2000), könnte aufgrund der fehlenden Isolation von G $\beta_5\gamma$ -Komplexen eher als ein negatives Urteil über deren Existenz bzw. „Natürlichkeit“ betrachtet werden. Allerdings wurden in dieser Studie lediglich die in grösseren Mengen vorkommenden G β_5 /RGS6- und G β_5 /RGS7-Komplexe identifiziert. Dagegen konnten weitere Interaktionspartner von G β_5 , wie z.B. RGS9 (Makino et al., 1998) und RGS11 (Snow et al., 1998), weder massenspektrometrisch noch immunologisch in den Eluaten detektiert werden, obwohl sie mit anderen Methoden im Hirn bereits nachgewiesen wurden (Gold et al., 1997; Rahman et al., 1999). Aufgrund dieser ungeklärten negativen Ergebnisse ermöglicht auch die Studie von Zhang und Simonds keine endgültige Aussage darüber, ob G $\beta_5\gamma$ -Komplexe *in vivo* existieren. Ein Koisolationsverfahren mittels stabil in einer Zelllinie exprimierten affinitätsmarkierten G β_5 (siehe 6.5) soll in der Zukunft die Frage der Existenz von G $\beta_5\gamma$ -Komplexen klären.