

Universität Ulm
Abteilung Pharmakologie und Toxikologie
Leiter: Prof. Dr. Peter Gierschik

**Analyse der Signaltransduktion des konstitutiv
aktiven, viralen Chemokinrezeptorhomologs
pUS28 und dessen Regulation durch die Kinase
G-Protein-gekoppelter Rezeptoren GRK6-C**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Claudia Kern
geb. in Mengen
Ulm 2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Barbara Möpps

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dietmar Fischer

Tag der Promotion: 16. Februar 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeine Einführung	1
1.2	Signaltransduktion über Transmembran-Rezeptoren	1
1.3	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	3
1.3.1	Heterotrimere G-Proteine	5
1.4	Chemokine und Chemokinrezeptoren	7
1.5	Das humane Zytomegalievirus	9
1.6	Das virale Chemokinrezeptorhomolog pUS28.....	11
1.7	Regulation der Aktivität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	12
1.8	Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	14
1.9	Phospholipase C-Enzyme.....	17
1.10	Rho-GTPasen	19
1.10.1	Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren.....	20
1.11	Ziele der Arbeit.....	22
2	Material.....	24
3	Methoden	34
3.1	Mikrobiologische Methoden	34
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	36
3.2.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	36
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	36
3.2.3	Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren	37
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	38
3.2.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	38
3.2.7	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	39
3.2.8	Auffüllreaktion	40
3.2.9	Ligation.....	40
3.2.10	Polymerasekettenreaktion.....	41
3.2.11	Automatisierte, nichtradioaktive DNA-Sequenzanalyse	43
3.2.12	Autoradiographie	45
3.3	Kultivierung von eukaryontischen Zellen	45

3.4	Proteinexpression in Insektenzellen	47
3.5	Proteinexpression in Säugetierzellen.....	51
3.6	Methoden zur Untersuchung der Rezeptoraktivierung.....	52
3.7	Proteinbiochemie.....	55
3.8	Chromatographische Methoden.....	62
3.9	Bestimmung der Kinaseaktivität von GRKs	64
3.10	Untersuchung von GRK-Lipid-Wechselwirkungen	66
4	Ergebnisse.....	68
4.1	Reindarstellung des rekombinanten mGRK6-C-Proteins	68
4.2	Herstellung und Expression von Mutanten von mGRK6-C.....	77
4.3	Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch mGRK6-C im zellfreien System	97
4.4	Funktionelle Regulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch mGRK6-C in intakten Zellen	102
4.5	Stimulation von Phospholipase C- β -Isoenzymen	118
4.6	Einfluss verschiedener G α -Untereinheiten auf die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription.....	121
4.7	Untersuchung zellulärer Aktivitäten von HA-pUS28 bei Koexpression von G α _{Q209L} bzw. G α _{16R186C}	124
4.8	Einfluss der Rho GTPasen RhoA, RhoAG14V und RhoAT19N auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription.....	134
4.9	Einfluss von p63RhoGEF auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription.....	136
4.10	Einfluss der <i>pleckstrin-homology</i> -Domäne von p63RhoGEF auf HA-pUS28-induzierte zelluläre Funktionen.....	139
5	Diskussion.....	143
6	Zusammenfassung.....	161
7	Literaturverzeichnis	164
8	Publikationen	179
9	Danksagung.....	181

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenosin
aa	<i>amino acid</i> (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAA	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
Ca	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ci	Curie
CIP	<i>alkaline calf intestinal phosphatase</i>
Cl	Chlor
CMF-PBS	Calcium- und magnesiumfreies PBS
cpm	<i>counts per minute</i> (Zählimpulse je Minute)
CREB	cAMP response-element binding protein
C-Terminus	Carboxylterminus
d	Tage
DAG	1,2-Diacyl- <i>sn</i> -glycerin
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
Dbl	<i>diffuse B-cell lymphoma</i>
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat

ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DH	<i>dbl homology</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	<i>50 % effective concentration</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
Fgd1	<i>faciogenital dysplasia protein 1</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
G	Guanosin
GABA	Gammaaminobuttersäure
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDI	<i>GDP dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosin- 5'-diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
G α	α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
G β	β -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Dimer eines heterotrimeren G-Proteins
h	Stunde

HA	Influenza-Virus-Hämagglutinin-12CA5-Epitop
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMW	<i>high molecular weight</i>
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IP	Inosit-monophosphat
IP ₂	Inosit-bisphosphat
IP ₃	D- <i>myo</i> -Inosit-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
K	Kalium
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
konz.	Konzentriert
LARG	<i>leukemia-associated RhoGEF</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Mol pro Liter
m/V	Masse pro Volumen
mA	Milliampere
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
Na	Natrium
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDZ	<i>PSD-95/DLG/ZO-1</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI-3-Kinase	Phosphatidylinosit-3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P-Rex	<i>PIP₃-dependent Rac exchanger</i>
PtdCho	L- α -Phosphatidylcholin
PtdIns	Phosphatidylinosit
PtdInsP	Phosphatidylinosit-4-phosphat
PtdInsP ₂	Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat
PtdSer	L- α -Phosphatidylserin
Rac	<i>ras-related C₃ botulinum toxin substrate</i>
RE	Restriktionsendonuklease
Rho	<i>ras-homologous protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>rod outer segment</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDF-1 α	<i>stromal cell-derived factor-1α</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf9-Zellen	Ovarialzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>
Sos	<i>Son of sevenless</i>
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
STI	<i>soybean trypsin inhibitor</i>
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>

TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tiam1	<i>T-cell lymphoma invasion- and metastasis-inducing protein 1</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Trio	<i>triple functional domain</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
U	<i>unit</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
VT	Volumenteil
W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid
Y	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Zellen lebender Organismen haben Mechanismen entwickelt, um Reize aus der Umwelt aufzunehmen und auf diese zu reagieren. Zu den auf die Zelle einwirkenden Reizen zählen neben mechanischen, akustischen, olfaktorischen und optischen Reizen des umgebenden Milieus auch Reize, die von einzelnen Zellen und/oder Zellverbänden ausgehen, wie Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren. Zellen besitzen sowohl membranständige als auch intrazelluläre Rezeptorproteine. Intrazelluläre Rezeptorproteine werden durch hydrophobe Signalmoleküle wie Steroidhormone aktiviert. Dagegen führt die Bindung von hydrophilen Botenstoffen, wie Peptidhormone, zu einer Aktivierung membranständiger Rezeptorproteine. In beiden Fällen kommt es nach Stimulation intrazellulärer Effektormolekülen zu einer spezifischen Zellantwort.

1.2 Signaltransduktion über Transmembran-Rezeptoren

Die Übertragung extrazellulärer Signale ins Zellinnere kann durch verschiedene Transmembranrezeptoren erfolgen. Aufgrund ihrer Wirkungsmechanismen werden membranständige Rezeptoren in fünf Klassen eingeteilt. Man unterscheidet Zytokinrezeptoren, Integrine, Rezeptortyrosinkinasen, Ionenkanäle und G-Proteingekoppelte Rezeptoren. Zytokine sind kleine Proteine mit einer molekularen Masse von 8-40 kDa, die eine Schlüsselrolle in der Regulation der Hämatopoese und der Induktion der Immunantwort spielen (Uings & Farrow, 2000). Die zu den Zytokinen entsprechenden Zytokinrezeptoren wurden aufgrund ihrer Vielzahl und aufgrund von Homologien in der Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne in die Klassen I-IV eingeteilt. So zählen zu der ersten und größten Klasse Zytokinrezeptoren, wie IL-4 und IL-6, während die zweite Klasse Rezeptorproteine der Interferon-Familie beinhaltet (Uings & Farrow, 2000). Integrine vermitteln als Transmembranproteine sowohl die Interaktion von Zellen untereinander, als auch die Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix. Integrine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind, übertragen extrazelluläre Signale auf intrazelluläre Tyrosinkinasen oder transmembranäre Wachstumsfaktor-Rezeptoren.

Aktiviert werden Integrine durch die Interaktion mit verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen, unter anderem auch durch Fibronectin und Kollagen (Uings & Farrow, 2000; Bershadsky *et al.*, 2003). Bei den Tyrosinkinassen unterscheidet man zwischen Rezeptortyrosinkinassen (RTKs) und zytoplasmatischen Tyrosinkinassen. Die RTKs weisen eine extrazelluläre, Liganden-bindende Domäne, einen transmembranären Abschnitt und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität auf. Nach dem Binden spezifischer Liganden, wie Wachstumsfaktoren (*epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF)) oder Insulin an die extrazellulären Domänen der RTKs kommt es zur Dimerisierung der monomeren Rezeptoren sowie im Fall des Insulinrezeptors zu einer Konformationsänderung der beiden transmembranären β -Untereinheiten. Dies führt zu einer Autophosphorylierung der Tyrosinreste an den zytoplasmatischen Domänen (Uings & Farrow, 2000; Pawson, 2002). Die so aktivierte Rezeptortyrosinkinase ist jetzt in der Lage intrazelluläre Effektorproteine, darunter Phospholipase C- γ -Isoenzyme und Phosphatidylinosit (PI)-3-Kinasen, durch Übertragung von Phosphatgruppen zu stimulieren (Uings & Farrow, 2000; Kim *et al.*, 2004). Zytoplasmatische Tyrosinkinassen, wie die Janus Kinase (JAK), *focal adhesion kinase* (FAK), Syk, Pyk oder Mitglieder der Src-Familie koppeln an Liganden-aktivierte, membranständige Rezeptoren, z. B. an Zytokinrezeptoren oder an Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Dadurch kommt es zu einer Signalübertragung auf *signal transducers and activators of transcription* (STAT)-Proteine oder zu einer Aktivierung von Proteinkinassen, wie PI-3-Kinasen oder Phospholipase C- γ -Isoenzymen (Parsons & Parsons, 1997; Parsons & Parsons, 2004). Weitere Vertreter der Transmembranproteine stellen Ionenkanäle dar. Ionenkanäle werden in die Liganden-abhängigen und spannungsabhängigen Ionenkanäle eingeteilt. Die Untereinheiten dieser Transmembranproteine sind zu einem pentameren Komplex zusammengeschlossen und bilden so eine zentrale Ionenpore. Eine Änderung des Membranpotentials verursacht bei spannungsabhängigen Ionenkanälen das Öffnen oder Schließen der hydrophilen Pore. Liganden-abhängige Ionenkanäle werden durch Interaktion mit einem extrazellulären Signalmolekül aktiviert. Bekannte Vertreter der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle sind der Glycinrezeptor, der nikotinische Acetylcholinrezeptor und der γ -Aminobuttersäure_A-Rezeptor (Maksay, 2005). Eine weitere bedeutende Klasse der membranständigen Rezeptoren bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). GPCRs umfassen die größte Gruppe an Transmembranproteinen in Säugetieren.

1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Im Genom des Menschen wurden *ca.* 865 verschiedene DNA-Sequenzabschnitte nachgewiesen, die für GPCRs kodieren (Fredriksson *et al.*, 2003; Milligan & Kostenis, 2006). Zu den spezifischen Liganden dieser Rezeptorklasse zählen neben Pheromonen, Geruchs- oder Geschmackstoffen, Nukleotiden, Lipiden, Peptiden auch Photonen und Ionen (Fredriksson *et al.*, 2003). GPCRs weisen hohe Übereinstimmungen in ihrer molekularen Struktur auf. So besitzen diese Rezeptoren einen extrazellulären, aminoterminalen Abschnitt, sieben *ca.* 20-30 Aminosäuren lange transmembranäre Domänen, welche die Plasmamembran in Form von α -Helices durchspannen und einen carboxylterminalen, intrazellulären Abschnitt (Gether, 2000). Drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen verbinden die sieben transmembranären Domänen miteinander. Die Stimulation des GPCRs erfolgt durch die spezifische Interaktion des Liganden mit extrazellulären Abschnitten des Rezeptors, welche die sogenannte Bindungstasche (*core*) bilden. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und einer nachfolgenden Rezeptor/G-Protein-Interaktion (Hamm, 1998; Gether, 2000). Dabei erfolgt die Interaktion des GPCRs mit den G-Proteinen vor allem über die zweite und dritte intrazelluläre Schleife sowie über den carboxylterminalen Abschnitt des Rezeptorproteins (Wong *et al.*, 2003). Das G-Protein dissoziiert in seine $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten und die Untereinheiten übertragen das Signal auf verschiedene intrazelluläre Effektorproteine wie Phospholipase C- β -Isoenzyme, PI-3-Kinasen, Ionenkanäle oder Adenylylzyklen (Marinissen & Gutkind, 2001; Offermanns, 2003). Auf diese Weise aktivieren GPCRs eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege, in die verschiedene Effektorproteine involviert sind. Nicht zuletzt deshalb führen Funktionsstörungen der GPCRs zu zahlreichen Krankheiten. Daher gewinnen Vertreter dieser Rezeptorklasse immer mehr an Bedeutung bei der Entwicklung von Medikamenten. Bereits heute wirken 50 % der angewandten Medikamente an GPCRs (Klabunde & Hessler, 2002; Lundstrom, 2005).

GPCRs wurden in nahezu jedem eukaryotischen Organismus, einschließlich der Insekten (Hill *et al.*, 2002) und Pflanzen (Josefsson, 1999) nachgewiesen. Es wurden mehrere Versuche unternommen, die vielfältigen Rezeptorproteine systematisch zu gruppieren. Dabei wurden verschiedene Parameter, wie strukturelle und physiologische Merkmale oder die Interaktion mit den Liganden berücksichtigt. Das am häufigsten verwendete

Gruppierungssystem wurde von Kolakowski (1994) eingeführt, welches GPCRs von Vertebraten und Invertebraten in die Klassen A-F einteilt. In diesem Gruppierungssystem sind auch GPCRs aufgeführt, die im Menschen nicht existieren. So beinhalten die Klassen D und E Pheromonrezeptoren aus den Hefen (STE2-, STE3-Rezeptoren) und zur Klasse F zählen vier cAMP-Rezeptoren von *Dictyostelium discoideum* (Gether, 2000). Die zahlreichsten Vertreter weist die Klasse A auf, zu der u. a. Rhodopsin, β -Adreno-, Angiotensin-, Serotonin- und Chemokinrezeptoren gehören (Pierce *et al.*, 2002). Zur Klasse B zählen die Sekretinrezeptoren und zur Klasse C die Glutamat- und γ -Aminobuttersäure_B-Rezeptoren. Basierend auf der Klassifizierung von Kolakowski entwickelte Fredriksson *et al.* das GRAFS System (Fredriksson *et al.*, 2003). Bei diesem System wurden GPCRs des Menschen aufgrund von durchgeführten Verwandtschaftsanalysen gruppiert. Dabei wurden die Rezeptoren in fünf Familien eingeteilt. Die Rhodopsin-Familie (ehemals Klasse A), die Familie der Sekretin-Rezeptoren (ehemals Klasse B), die Familie der Glutamat-Rezeptoren (ehemals Klasse C), die Familie der Adhäsions-Rezeptoren (ehemals Klasse B) und die Familie der *Frizzled*-Rezeptoren (ehemals Klasse F) (Fredriksson & Schiöth, 2005).

Zusätzlich zu den bereits genannten Merkmalen der einzelnen Rezeptorklassen weisen die GPCRs der einzelnen Klassen noch weitere gemeinsame Strukturmerkmale auf. So besitzen GPCRs der Klasse A mehrere konservierte Aminosäuresequenzabschnitte. Dies sind u. a. zwei Cysteine in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken maßgeblich zur Tertiärstruktur des Rezeptors beitragen. Des Weiteren weisen Rezeptoren dieser Klasse ein E/DRY-Motiv (Glu/Asp-Arg-Tyr-Motiv) am intrazellulär gelegenen Ende der dritten transmembranären Domäne und ein NSXXNPXXY-Motiv (Asp-Ser-XX-Asp-Pro-XX-Tyr) in der siebten transmembranären Domäne auf (Fredriksson *et al.*; 2003; Kalatskaya *et al.*, 2004). Die im carboxylterminalen Abschnitt der Rezeptoren der Klasse A vorhandenen Cysteinreste können posttranslational palmitoyliert werden. Dadurch wird eine Interaktion mit der Plasmamembran ermöglicht und es kommt zur Ausbildung einer vierten intrazellulären Schleife (Gether, 2000; Fritze *et al.*, 2003). Diese Schleife liegt als amphiphile α -Helix vor und spielt vermutlich eine wesentliche Rolle bei der G-Protein-Bindung (Palczewski *et al.*, 2000; Fritze *et al.*, 2003). Im Jahr 2000 gelang es erstmals Rhodopsin zu kristallisieren und auf diese Weise die dreidimensionale Struktur eines Rezeptors der Klasse A aufzuklären (Palczewski *et al.*,

2000; Stenkamp *et al.*, 2002; Sakmar *et al.*, 2002). Dabei konnte die postulierte Anordnung aus sieben transmembranären Domänen bestätigt werden. Des Weiteren lieferte die Strukturanalyse des Rhodopsins erste Hinweise darauf, dass auch die transmembranären Domänen von anderen GPCRs der Klasse A eine ähnliche Orientierung aufweisen. So ermöglicht die Kristallstruktur des Rhodopsinrezeptors neue Perspektiven für das *molecular modelling* anderer Rezeptoren dieser Klasse, z. B. der von Chemokinrezeptoren (Mirzadegan *et al.*, 2003; Berkhout *et al.*, 2003).

1.3.1 Heterotrimere G-Proteine

Die heterotrimeren G-Proteine spielen eine zentrale Rolle bei der Übertragung von Signalen aktivierter GPCRs auf intrazelluläre Effektoren. G-Proteine zählen zur Proteinfamilie der GTPasen und werden ubiquitär exprimiert (Offermanns, 2003). Die G-Proteine setzen sich aus den drei Untereinheiten, $G\alpha$ (39-46 kDa), $G\beta$ (37 kDa) und $G\gamma$ (8 kDa) zusammen. Im Genom des Menschen wurden 35 Gene identifiziert, die für die G-Protein Untereinheiten kodieren. Von den 35 Genen kodieren 16 für $G\alpha$ -, 5 für $G\beta$ - und 14 für $G\gamma$ -Untereinheiten (Milligan & Kostenis, 2006). Die $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit bilden eine funktionelle Einheit und liegen als Dimer vor. Dieses Dimer ist gegenüber Dissoziation sehr stabil, so dass sich die Proteine der einzelnen Untereinheiten nur unter denaturierenden Bedingungen voneinander trennen lassen (Offermanns, 2003). Die Interaktion des $G\beta\gamma$ -Dimers mit der Zellmembran wird durch ein Aminosäuremotiv, ein CAAX-Motiv (C: Cystein, A: aliphatische Aminosäure, X: beliebige Aminosäure, z. B. Leucin, Serin oder Methionin) am carboxylterminalen Abschnitt der $G\gamma$ -Untereinheit gewährleistet, welches eine posttranslationale Modifikation durch Isoprenylierung erlaubt (Milligan & Kostenis, 2006). Cysteinreste am aminoterminalen Abschnitt der $G\alpha$ -Untereinheit können posttranslational myristoyliert und/oder palmitoyliert werden und ermöglichen auf diese Weise eine Membranverankerung dieser G-Protein Untereinheit (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Offermanns, 2003). Die $G\alpha$ -Untereinheit umfasst zwei Domänen: eine GTPase-Domäne, die an der Bindung und Hydrolyse von GTP beteiligt ist und eine helikale Domäne, welche die Interaktion zwischen der GTPase-Domäne und dem GTP-Molekül unterstützt. Vor *ca.* 20 Jahren ermöglichten kristallographische Untersuchungen einen ersten Einblick in die Struktur und Funktionsweise der GTPase-Domäne. Den zentralen Abschnitt dieser Domäne bilden 6 miteinander verbundene β -

Faltblätter, die von 5 α -Helices umgeben sind. In der GTPase-Domäne finden sich Aminosäuresequenzabschnitte, die für die Interaktion mit dem GTP-Molekül wichtig sind. So kodieren die Aminosäuren 36-43 für das GXGXXGKS-Motiv, welches eine wichtige Rolle bei der Bindung von Phosphaten spielt. Die Aminosäuren 196-199 enthalten das DXXG-Motiv, das für die Interaktion mit Mg^{2+} notwendig ist. Das NKXD-Motiv (Aminosäure 264-264) und das TCAT-Motiv (Aminosäure 320-323) stellen Interaktionsstellen für das Guaninnukleotid-Molekül dar (Rens-Domiano & Hamm, 1995; Sprang, 1997). Im inaktiven Zustand bildet das $G\beta\gamma$ -Dimer zusammen mit der GDP-gebundenen $G\alpha$ -Untereinheit einen heterotrimeren Komplex. Nach Aktivierung des G-Proteins durch den Rezeptor kommt es an der $G\alpha$ -Untereinheit zu einem Austausch von GDP gegen GTP. Dabei stabilisiert Mg^{2+} als Kofaktor die Bindung von $G\alpha$ und GTP (Cabrera-Vera *et al.*, 2003). Das heterotrimere G-Protein dissoziiert daraufhin in seine $G\alpha_{GTP}$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheit. Sowohl die $G\alpha_{GTP}$, als auch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit sind jetzt in der Lage, mit intrazellulären Effektorproteinen zu interagieren und deren Aktivität zu regulieren (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Offermanns, 2003; Milligan & Kostenis, 2006). Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit wird das gebundene GTP unter Abspaltung eines Phosphatrestes zu GDP hydrolysiert und die G-Protein-vermittelte Signalübertragung beendet. Die $G\alpha_{GDP}$ -Untereinheit kann daraufhin wieder mit der $G\beta\gamma$ -Untereinheit reassoziieren und das so gebildete heterotrimere G-Protein steht nun wieder für einen neuen Aktivierungszyklus zur Verfügung. Unabhängig von der Aktivierung durch den Rezeptor können heterotrimere G-Proteine auch durch *activators of G Protein signaling* (AGS)-Proteine aktiviert werden (Cismowski, 2006). AGS-Proteine aktivieren G-Proteine, indem sie den GDP/GTP-Austausch an der $G\alpha$ -Untereinheit stimulieren. *Regulators of G Protein signaling* (RGS)-Proteine regulieren die Aktivität der heterotrimeren G-Proteine. Durch die Proteine der RGS-Familie wird die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit um das *ca.* 100-fache gesteigert (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Abramow-Newerly *et al.*, 2006).

Aufgrund von Übereinstimmungen in ihrer Struktur und Funktion werden die verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten in vier Familien eingeteilt: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Offermanns, 2003; Milligan & Kostenis, 2006). Die Mitglieder der verschiedenen Familien zeichnen sich dadurch aus, dass sie intrazelluläre

Effektorproteine beeinflussen. Dabei kann die Wirkung sowohl aktivierend, als auch inhibierend sein. So inhibieren einzelne Mitglieder der $G\alpha_{i/o}$ -Familie intrazelluläre Adenylzyklasen, während $G\alpha$ -Untereinheiten der $G\alpha_s$ -Familie diese Effektorproteine aktivieren (Milligan & Kostenis, 2006). Die Mitglieder der $G\alpha_{q/11}$ -Familie, $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{15/16}$, stimulieren die Isoenzyme der Phospholipase C- β und aktivieren auf diese Weise den Inositphospholipid-spezifischen Signalweg (Hubbard & Hepler, 2006). Von Mitgliedern der $G\alpha_{12/13}$ -Familie ist bekannt, dass sie Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEFs) stimulieren. RhoGEFs spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Rho-GTPasen. Zu den RhoGEFs, die durch $G\alpha_{12/13}$ stimuliert werden, zählen z. B. *leukemia associated RhoGEF* (LARG), p115 RhoGEF und PDZ-RhoGEF.

1.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine gehören zu den chemotaktisch wirksamen Zytokinen. Sie bilden eine eigene Superfamilie von Proteinen, deren Mitglieder eine Größe von 8 kDa aufweisen (Baggiolini, 2001; Le *et al.*, 2004). Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der gerichteten Migration von Leukozyten und bei der Regulation einer Vielzahl von weiteren Leukozytenfunktionen, wie der Differenzierung und Aktivierung (Baggiolini, 2001). Auf diese Weise sind sie als Entzündungs- und Immunmediatoren an der Generierung der Immunantwort bei verschiedenen Erkrankungen beteiligt. Zu den von Chemokinen beeinflussten inflammatorischen Erkrankungen zählen z. B. Rheumatoide Arthritis, Asthma, Psoriasis, Arteriosklerose und Multiple Sklerose (Charo & Ransohoff, 2006). Darüber hinaus sind Chemokine an Wundheilungsprozessen nach Verletzungen beteiligt. Zusätzlich dazu spielen Chemokine eine wichtige Rolle bei der Organentwicklung u. a. des Säugetierembryos. Ferner sind sie essentiell für die Hämatopoese und Angiogenese im adulten Tieren. Neuere Untersuchungen zeigen, dass Chemokine an der Tumorgenese und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt sind (Le *et al.*, 2004; Pistoia *et al.*, 2006). Vom Menschen sind *ca.* 50 verschiedene Chemokine bekannt. Diese werden aufgrund von Unterschieden in der Anzahl und Anordnung konservierter Cysteine in ihren Aminosäuresequenzen in vier Familien eingeteilt: die CXC(α)-, CC(β)-, C(γ)- und CX₃C(δ)-Subfamilie, wobei C die Cysteine und X eine beliebige Aminosäure darstellt (Murphy *et al.*, 2000; Lindow *et al.*, 2003). Der CC-Subfamilie werden die meisten bisher

bekannten Chemokine zugeordnet. Dagegen stellen Lymphotaktin α (XCL1) und β (XCL2) sowie Fractalkin (CX₃CL1) die einzigen bekannten Vertreter der C- bzw. der CX₃C-Subfamilie dar (Charo & Ransohoff, 2006). Während die CXC-, CC- und CX₃C-Chemokine vier konservierte Cysteine aufweisen, besitzen die C-Chemokine nur drei Cysteine. Bei den CC-Chemokinen liegen die ersten beiden Cysteine benachbart, bei den CXC-Chemokinen sind sie durch eine Aminosäure getrennt. Die Cysteine bilden untereinander Disulfidbrücken (Cys¹-Cys³ und Cys²-Cys⁴) aus und tragen auf diese Weise zur Tertiärstruktur, welche für die Rezeptorerkennung und für die biologische Aktivität des Chemokins notwendig ist (Baggiolini, 2001).

Bereits 1991 wurde mit Interleukin-8 (IL-8) das erste Chemokin identifiziert. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieses seine Wirkung über GPCRs, den Chemokinerezeptoren CXCR1 und CXCR2 vermittelt (Murphy & Tiffany, 1991; Holmes *et al.*, 1991; Baggiolini, 2001). Mittlerweile sind nahezu 20 Chemokinrezeptoren isoliert worden, die entsprechend der interagierenden Liganden als CC-, CXC-, C- und CX₃C-Rezeptoren bezeichnet werden (Baggiolini, 2001; Lindow *et al.*, 2003). Die meisten dieser Rezeptoren sind in der Lage, mit mehr als einem Chemokin zu interagieren. Chemokinrezeptoren werden in verschiedenen Zellen exprimiert. Dazu zählen neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, T- und B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Thrombozyten und Mastzellen, dendritische Zellen, sowie glatte Muskelzellen, Leberzellen, Gehirnzellen, Endothel- und Epithelzellen (Charo & Ransohoff, 2006). Ein Vertreter der Chemokinrezeptoren, der in einer Vielzahl dieser Zellen exprimiert wird, ist der CXCR4-Rezeptor. CXCR4 wird durch das Chemokin CXCL12 (*stromal cell-derived factor-1 α* , SDF-1) aktiviert. Dem Chemokinrezeptor CXCR4 kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Organanlage des Embryos zu. Darüber hinaus spielt der Rezeptor eine Schlüsselrolle in der Hämatopoese und Angiogenese in adulten Tieren. Des Weiteren wird der CXCR4-Rezeptor auch in Verbindung mit mehreren Krankheiten gebracht. So wurde gezeigt, dass das Chemokin CXCL12 vermehrt in atherosklerotischen Plaques exprimiert wird (Abi-Younes *et al.*, 2000). Studien an Enzephalitis erkrankten HIV-Patienten erbrachten den Nachweis, dass die vermehrte Expression von CXCR4 in neuronalen Zellen der Patienten in direktem Zusammenhang zu der Erkrankung steht (Petito *et al.*, 2001). Bereits zwei Jahre zuvor wurde gezeigt, dass für die Infektion von T-Lymphozyten durch das HI-Virus neben dem

Oberflächenrezeptor CD4 auch der Chemokinrezeptor CXCR4 als Korezeptor benötigt wird (Horuk, 1999; Baggiolini, 2001; Charo & Ransohoff, 2006). Neueste Untersuchungen belegen außerdem, dass bei einer Vielzahl unterschiedlicher malignen Erkrankungen CXCR4 der am häufigsten in Tumorzellen exprimierte Chemokinrezeptor ist (Pistoia, 2006; Zlotnik, 2006; Charo & Ransohoff, 2006).

Die Mehrzahl der Chemokinrezeptoren interagiert nach Aktivierung durch ihren spezifischen Liganden mit Mitgliedern der $G\alpha_i$ -Familie. Chemokinrezeptoren aktivieren auf diese Weise eine Vielzahl von Effektoren, wie Phospholipase C- β -Isoenzyme, Phosphoinosit 3-Kinasen (PI3-K) und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (Olson & Ley, 2002; Ogilvie *et al.*, 2004). Neben der $G\alpha_i$ -abhängigen Stimulation intrazellulärer Effektorproteine wird für Chemokinrezeptoren auch eine Interaktion mit den G-Protein Untereinheiten $G\alpha_q$ und $G\alpha_{16}$ beschrieben. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Chemokinrezeptoren mit Januskinasen interagieren und auf diese Weise eine Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges bewirken (Mellado *et al.*, 2001).

Interessanterweise wurde auch in den Genomen verschiedener DNA-Viren, die der Gattung der Herpes-, Pocken- und Lentiviren zugeordnet werden, Sequenzabschnitte identifiziert, die für GPCRs kodieren. Einige diese GPCR-Homologa weisen in ihren Aminosäuresequenzen große Übereinstimmungen mit den Aminosäuresequenzen von Chemokinrezeptoren auf (Alcami, 2003). Als Beispiele wären hier die von den Genomen des humanen Zytomegalievirus (HCMV) bzw. Kaposi-Sarkom Virus (HHV8) kodierten Chemokinrezeptorhomologa pUS28 und KSHV-GPCR zu nennen.

1.5 Das humane Zytomegalievirus

Das humane Zytomegalievirus gehört zur Familie der Herpesviren (Herpesviridae). Herpesviren verursachen eine Vielzahl von Krankheiten beim Mensch und beim Tier. Zu den wichtigsten humanpathogenen Vertretern zählen das Herpes-simplex-Virus (HSV-1 und HSV-2), Erreger der gleichnamigen Erkrankung Herpes-simplex, das Varizella-Zostervirus (VZV), Erreger von Windpocken und Gürtelrose, das Epstein-Barr-Virus und Kaposi-Sarkom-Virus, die beide eine Rolle bei der Ausbildung verschiedener Tumore spielen, sowie das humane Zytomegalievirus (HCMV). Aufgrund verschiedener

biologischer Merkmale wird die Familie der Herpesviren in die drei Subfamilien α , β und γ eingeteilt. Das HCMV wird der Unterfamilie der β -Herpesviren zugeordnet, die sich durch eine hohe Spezifität auszeichnet. Die Erstinfektion mit HCMV verläuft bei Personen mit intaktem Immunsystem in 99 % der Fälle ohne oder nur mit geringen Krankheitssymptomen. Bei immungeschwächten Personen, wie HIV-Erkrankten, Tumorpatienten oder Empfängern von Organ- und Knochenmarkstransplantationen, kann eine Infektion mit HCMV schwere Folgeerkrankungen verursachen. Zu den Folgeerkrankungen zählen Erkrankungen wie die Retinitis, Encephalitis, Pneumonie, Gastritis, Colitis, Ösophagitis und Leukopenie (Pass, 2001). Weitere Komplikationen bestehen bei Organempfängern in der Abstoßung des transplantierten Organs (Revello & Gerna, 2002; Landolfo *et al.*, 2003). Ein hohes Risiko stellt eine HCMV-Primärinfektion für Schwangere dar. Kommt es während der Schwangerschaft zu einer Infektion des Fetus mit dem HCMV-Virus, kann dies zu schweren Missbildungen am Kind führen. Sehr häufig treten Vergrößerungen der Leber und Milz, Petechien, ein Mikrozephalus oder eine Entzündung der Aderhaut und der Retina auf (Revello & Gerna, 2002; Ross *et al.*, 2006). Nach der Geburt weisen mehr als 90 % der infizierten Neugeborenen schwere Spätfolgen auf. Dabei kann es zu neurologischen Ausfällen wie einem frühkindlichen Hirnschaden kommen, der eine geistige Retardierung oder Innenohrschwerhörigkeit zur Folge haben kann (Revello & Gerna, 2002). Darüber hinaus scheint HCMV auch eine Rolle bei der Entstehung von Gefäßkrankheiten wie der Artherosklerose und der arteriellen Restenose zu spielen (Streblov *et al.*, 2001; Casarosa *et al.*, 2005). HCMV kann eine Vielzahl an Zellen, darunter Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen infizieren (Sinzger *et al.*, 1995). Die Infektion mit HCMV bewirkt nicht nur Veränderungen im Zellzyklus der Wirtszellen, sondern beeinflusst auch die Aktivierung intrazellulärer Signalwege. So kann es zu einer vermehrten Hydrolyse von Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat durch Phospholipase C- β -Isoenzyme oder einer anhaltenden Aktivierung von MAP-Kinasen kommen. Des Weiteren beeinflusst die Infektion mit HCMV auch die intrazelluläre oder virale Genexpression durch Aktivierung intrazellulärer Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor kappa B* (NF- κ B), *cAMP response element-binding protein* (CREB) und *serum response factor* (SRF) (Rodems & Spector, 1998; Chan *et al.*, 1996; DeMeritt *et al.*, 2004).

1.6 Das virale Chemokinrezeptorhomolog pUS28

Im Genom des HCMV wurden die vier offenen Leseraster (*open reading frames*, ORF) UL33, UL78, US27 und US28 identifiziert, deren Aminosäuren Sequenzhomologien zu humanen Chemokinrezeptoren aufweisen. Das offene Leseraster US28 gehört zu den *early genes* von HCMV und kodiert für das Protein pUS28, das in *ca.* 33 % der Aminosäuren mit dem humanen CC-Chemokinrezeptor CCR1 übereinstimmt (Beisser *et al.*, 2002). Von den vier viralen Chemokinrezeptorhomologia ist lediglich von pUS28 bekannt, dass es mit humanen Chemokinen wie CCL2 (*monocyte chemotactic protein*, MCP-1), CCL3 (*macrophage inflammatory protein*, MIP-1 α) und CCL5 (*regulated on activation of normal T-cell expressed and secreted*, RANTES) und CX₃CL1 (*fractalkine*) interagiert (Bodaghi *et al.*, 1998). Interessanterweise bindet das CX₃CL1 als eine Art „Adhäsionsmolekül“ an pUS28. CX₃CL1 ist vermutlich auch an der Ausbreitung des Virus im Wirtsorganismus beteiligt (Kledal *et al.*, 1998; Haskell *et al.*, 2000). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Interaktion von pUS28 mit Chemokinen wie CCL5 zu einem Anstieg der Konzentration von intrazellulären Ca²⁺-Ionen und zu einer erhöhten Aktivität der MAP-Kinasen 1/2 (ERK1/2) führt. Die beobachteten zellulären Effekte sollten dabei durch endogenes G α_i und G α_{16} vermittelt werden (Billstrom *et al.*, 1998). Neuere Untersuchungen anderer und der eigenen Arbeitsgruppe deuten jedoch auf eine konstitutive, Liganden-unabhängige Aktivität des Chemokinrezeptorhomologs pUS28 hin. So wurde sowohl in transfizierten COS-7-Zellen, als auch in infizierten humanen Fibroblasten eine konstitutive Aktivierung der Phospholipase C- β -Isoenzyme bei Expression von pUS28 beobachtet (Casarosa *et al.*, 2001; Minisini *et al.*, 2003). Interessanterweise wurde bei transientscher Expression von pUS28 in COS-7-Zellen auch eine konstitutive Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor*- κ B (NF- κ B) und *cyclic AMP response element binding protein* (CREB) nachgewiesen (Casarosa *et al.*, 2001; Waldhoer *et al.*, 2003). Neuere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe belegen außerdem eine konstitutive Aktivierung des *serum response*-Faktors (SRF) durch pUS28 (Tulone, Dissertation, 2004; Moepps & Gierschik, 2005). Die Aktivität von pUS28 wird ähnlich wie bei Chemokinrezeptoren durch intrazelluläre Proteinkinasen reguliert. So wurde eine Phosphorylierung von pUS28 durch GRK2 und GRK5 und eine Internalisierung des Chemokinrezeptorhomologs gezeigt (Miller *et al.*, 2003). Die Entfernung von Chemokinen aus der Umgebung von infizierten Zellen mittels der

Internalisierung des Chemokinrezeptorhomologs pUS28 könnte eine Strategie des Virus darstellen, die Immunabwehr des Wirts zu manipulieren (Miller *et al.*, 2003). Darüber hinaus könnte die homologe Desensibilisierung und Internalisierung von pUS28 zu einer β -Arrestin-abhängigen Stimulation weiterer intrazellulärer Effektoren, wie Vertretern der MAP/ERK-Signalkaskade führen (Lefkowitz & Shenoy, 2005; Shenoy *et al.*, 2006).

1.7 Regulation der Aktivität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Auf anhaltende oder wiederholte Stimulation reagieren GPCRs mit verminderter Aktivierbarkeit, ein Vorgang, der als Desensibilisierung bezeichnet wird (Gainetdinov *et al.*, 2004; Premont, 2005). Verursacht wird die verringerte Sensibilität des Rezeptors entweder kurzfristig durch eine Entkopplung des Rezeptors und der G-Protein-Untereinheit nach Phosphorylierung des Rezeptorproteins, oder langfristig durch Verringerung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche. Dabei wird die Abnahme der Rezeptordichte sowohl durch eine verringerte Proteinsynthese, als auch durch eine vermehrte Endocytose bestehender Rezeptorproteine hervorgerufen (Ferguson, 2001).

An der Desensibilisierung von GPCRs sind Proteinkinasen beteiligt, die durch Phosphorylierung von Serin/Threoninresten in der dritten zytoplasmatischen Schleife und/oder im carboxylterminalen Abschnitt des GPCRs die Wechselwirkung des Rezeptorproteins mit dem G-Protein hemmen. Bei der Regulierung der GPCRs durch intrazelluläre Proteinkinasen unterscheidet man zwischen der homologen und der heterologen Desensibilisierung (Ferguson, 2001). Bei der homologen Desensibilisierung erkennen Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) den Agonist-besetzten, aktivierten Rezeptor und phosphorylieren diesen. Dadurch erhöht sich die Affinität für inhibitorische Proteine, den sogenannten Arrestinen, die im Folgenden an den phosphorylierten Rezeptor binden. Durch die Bindung der Arrestine kommt es zu sterischen Veränderungen, welche die Interaktion des Rezeptors mit der G-Protein Untereinheit beeinträchtigen und den GTP/GDP-Austausch an der $G\alpha$ -Untereinheit blockieren. Dies resultiert schließlich in einer fast vollständigen Abnahme der Rezeptorsensibilität (Kohout & Lefkowitz, 2003; Gainetdinov *et al.*, 2004; Lefkowitz &

Shenoy, 2005; Premont, 2005). Arrestine wiederum können an Clathrin und das Clathrin-Adapter Protein AP2 binden und auf diese Weise die Internalisierung des Rezeptor-Arrestin-Komplexes durch die sogenannte Clathrin-abhängige Endozytose einleiten (Mousavi *et al.*, 2004; Gainetdinov *et al.*, 2004). Nach Entfernen der Phosphate und des Arrestins kann der internalisierte Rezeptor entweder in Lysosomen abgebaut (*downregulation*) oder zurück an die Zelloberfläche transportiert werden (*resensitization*) (Gainetdinov *et al.*, 2004). Eine wesentliche Rolle bei der Phosphorylierung von GPCRs durch GRKs spielen membranständige Phospholipide. Sie erhöhen als Kofaktoren nachweislich die Aktivität der Kinase (Onorato *et al.*, 1995; DebBurman *et al.*, 1996).

Bei der heterologen Desensibilisierung werden Rezeptoren durch *second-messenger* abhängige Proteinkinasen phosphoryliert. Zu diesen Proteinkinasen zählen u. a. die cAMP (zyklische Adenosinmonophosphat)-abhängige Proteinkinase A (PKA), sowie MAP-Kinasen und die Proteinkinase C (PKC), die von Diacylglycerin und Ca^{2+} -Ionen aktiviert wird (Gainetdinov *et al.*, 2004). Das Prinzip der heterologen Desensibilisierung beruht auf einer Art „*feedback*-Mechanismus“. So führt die Stimulation des β_2 -Adrenozeptors durch Adrenalin zu einer Aktivierung der Adenylylzyklase über $G\alpha_s$ und zu einem nachfolgenden Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. Die dadurch stimulierte *second-messenger*-abhängige Proteinkinase PKA phosphoryliert Serin/Threoninreste am aktivierten β_2 -Adrenozeptor. Dabei beschränkt sich die Phosphorylierung durch PKA nicht nur auf aktivierte Rezeptoren, wie bei der homologen Desensibilisierung, sondern schließt auch nicht-aktivierte Rezeptorproteine mit ein (Gainetdinov *et al.*, 2004). Durch die Phosphorylierung der PKA wird die Interaktion zwischen den $G\alpha$ -Untereinheiten und den Rezeptoren verhindert, sodass es schließlich zu einer Inhibierung der Signalweiterleitung durch die G-Proteine kommt (Freedman & Lefkowitz, 1996; Pierce *et al.*, 2002). Die Regulation durch andere *second-messenger*-abhängige Proteinkinasen wie PKC oder MAP-Kinasen verläuft nach dem gleichen Prinzip. Dabei können nicht nur GPCRs durch die Kinasen phosphoryliert und reguliert werden, sondern auch intrazelluläre Effektorproteine wie z. B. die Adenylylzyklase und Phospholipase C. Im Unterschied zur homologen Desensibilisierung bewirkt die Phosphorylierung durch *second-messenger*-abhängige Proteinkinasen keine erhöhte Affinität des Rezeptors zu Arrestinen. Daher wird vermutet, dass Arrestine bei der heterologen Desensibilisierung keine Rolle spielen (Bünemann & Hosey, 1999). Des Weiteren unterscheiden sich die Positionen der Serin/Threonin-Reste,

welche durch *second-messenger*-abhängige Proteinkinasen phosphoryliert werden, von denen, die von GRKs phosphoryliert werden. Jedoch handelt es sich bei den genannten Formen der Desensibilisierung nicht um zwei voneinander unabhängige Regulationssysteme. So können GRKs und Arrestine durch PKA und PKC phosphoryliert und somit in einem als *cross-talk* bezeichneten Vorgang in ihrer Aktivität reguliert werden (Chuang *et al.*, 1996).

Neben Proteinkinasen tragen auch Mitglieder der *regulators of G protein signaling* (RGS)-Familie zur Regulation der von GPCRs induzierten zellulären Funktionen bei. RGS-Proteine inhibieren die durch Rezeptoren und aktivierte G-Proteine stimulierten zellulären Funktionen, indem sie als GTPase-aktivierende (GAP)-Proteine die intrinsische Aktivität und somit die Hydrolyse von gebundenem GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit erhöhen (Zhong & Neubig, 2001; Neubig & Siderovski, 2002; Siderovski & Willard, 2005). Mittlerweile sind 25 Mitglieder der RGS-Familie bekannt, welche die charakteristische *ca.* 130 AS lange *RGS-homology domain*-(RH)-Domäne aufweisen. Über die physiologische Rolle von RGS-Proteinen ist noch relativ wenig bekannt. Neueste Untersuchungen an RGS9-2-defizienten Mäusen deuten darauf hin, dass RGS-Proteine bei der Regulation neuronaler Rezeptoraktivitäten im Gehirn eine wichtige Funktion haben (Zhong & Neubig, 2001; Gainetdinov *et al.*, 2004; Garzon *et al.*, 2005; Hepler, 2005). Nicht zuletzt deshalb gewinnen RGS-Proteine bei der Pharmakotherapie von Erkrankungen des zentralen Nervensystems immer mehr an Bedeutung (Neubig & Siderovski, 2002).

1.8 Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die Familie der Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) in Säugetieren umfasst zurzeit sieben verschiedene Mitglieder, GRK1-7. Die Aminosäuresequenzen von GRK1-7 stimmen in 53-93 % ihrer Aminosäuren überein (Freedman & Lefkowitz, 1996; Pitcher *et al.*, 1998; Gainetdinov *et al.*, 2004). Aufgrund der Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen und aufgrund von funktionellen Ähnlichkeiten werden GRKs in drei Subfamilien eingeteilt. Die erste Subfamilie besteht aus GRK1 (Rhodopsinkinase) und GRK7. Die zweite Subfamilie umfasst GRK2 (β -adrenerge Rezeptorkinase 1) und GRK3 (β -adrenerge Rezeptorkinase 2) und zu der dritten Subfamilie, der GRK4-Subfamilie, zählen GRK4, GRK5 und GRK6. Hinzu kommt, dass von Vertretern der GRK4-Familie

zahlreiche Varianten existieren, die durch alternatives Spleißen aus den entsprechenden Genen hervorgegangen sind. So wurden von der humanen GRK4 und der humanen und der murinen GRK6 jeweils vier Spleißvarianten identifiziert (Premont *et al.*, 1996; Moepps *et al.*, 1999; Premont *et al.*, 1999). Die Mitglieder der ersten Subfamilie, GRK1 und GRK7, werden auch als „visuelle Kinasen“ bezeichnet, da sie hauptsächlich in den Stäbchen und Zapfen der Retina auftreten. GRK4 wurde überwiegend im Hodengewebe und in geringen Mengen auch im Gehirn nachgewiesen. Dagegen werden die anderen GRKs ubiquitär exprimiert (Pitcher *et al.*, 1998; Gainetdinov *et al.*, 2004). Die Proteine der GRKs weisen große strukturelle Gemeinsamkeiten auf. So besitzen sie eine zentrale, hochkonservierte katalytische Domäne, die von einem amino- und carboxylterminalen Abschnitt flankiert wird. Die katalytische Domäne umfasst 236-266 Aminosäuren und wird in zwölf Subdomänen unterteilt (Inglese *et al.*, 1993; Hanks & Hunter, 1995). Der aminoterminalen Abschnitt ist *ca.* 185 Aminosäuren lang und ist vermutlich an der Rezeptorerkennung der GRKs beteiligt (Palczewski *et al.*, 1993; Pitcher *et al.*, 1998). Darüber hinaus liegen Hinweise vor, dass der aminoterminalen Abschnitt auch die Interaktion der Kinase mit Membranlipiden der Zellmembran vermittelt (Pitcher *et al.*, 1996; Noble *et al.*, 2003). Der carboxylterminale Abschnitt der GRKs variiert sowohl in der Länge, als auch in der Struktur. In ihm finden sich Sequenzabschnitte, die für die Interaktion der Kinase mit der Zellmembran von Bedeutung sind. So weisen die Mitglieder der GRK1-Subfamilie in ihrer Aminosäuresequenz ein carboxylterminal gelegenes CAAX-Motiv auf, welches posttranslational isoprenyliert und carboxymethyliert werden kann (Inglese *et al.*, 1992; Gainetdinov *et al.*, 2004). Dabei wird GRK1 farnesyliert, während GRK7 geranylgeranyliert wird. GRK2 und GRK3 sind in inaktivem Zustand im Zytosol lokalisiert und werden erst nach Rezeptorstimulation an die Zellmembran transloziert. Die Membraninteraktion dieser Kinasen wird durch die sogenannte *pleckstrin homology domain* (PH-Domäne) im carboxylterminalen Aminosäuresequenzabschnitt 553-656 der GRKs, sowie durch die überlappende G β γ -Bindungsdomäne im Aminosäuresequenzabschnitt 546-670 der Kinasen gewährleistet (Pitcher *et al.*, 1995; Daaka *et al.*, 1997). Über diese Abschnitte ist GRK2 in der Lage, sowohl an das G β γ -Dimer als auch an das negativ geladene Membranphospholipid PtdInsP₂ zu binden. Durch die Interaktion mit der Zellmembran wird die Aktivität der Kinase hinsichtlich der Phosphorylierung membranständiger Substrate deutlich gesteigert (Pitcher *et al.*, 1995). Die Mitglieder der GRK4-Subfamilie, GRK4, GRK5 und GRK6 besitzen weder ein

CAAX-Motiv, noch eine PH-Domäne oder einen Interaktionsbereich für G β γ . Dennoch sind diese Kinasen in der Lage, an die Zellmembran zu binden. Verantwortlich dafür sind zwei unterschiedliche Sequenzabschnitte in den Aminosäuresequenzen der Mitglieder der GRK4-Subfamilie. So wurden für GRK4 und die humane GRK6-A (hGRK6-A) im carboxylterminalen Abschnitt Cysteinreste nachgewiesen, die posttranslational palmitoyliert werden können (Gainetdinov *et al.*, 2004). Die posttranslationale Modifikation von hGRK6-A erfolgt an den Cysteinresten C⁵⁶¹, C⁵⁶² und C⁵⁶⁵. Die Palmitoylierung fördert nicht nur die Membranassoziation von hGRK6-A, sondern erhöht auch nachweislich die Phosphorylierungsaktivität der Kinase (Loudon & Benovic, 1997; Stoffel *et al.*, 1998). Dabei wird davon ausgegangen, dass ein dynamischer Wechsel zwischen Palmitoylierung und Depalmitoylierung die Aktivität der Kinase und somit die Phosphorylierung von Rezeptorsubstraten reguliert. Auch in den GRK4-Proteinen wurden Cysteinreste in vergleichbaren Positionen wie im hGRK6-A-Protein nachgewiesen, so dass davon auszugehen ist, dass auch die GRK4-Kinasen einer ähnlichen Palmitoylierung bzw. Depalmitoylierung unterliegen (Premont *et al.*, 1995; Loudon & Benovic, 1997). Eine andere Form der Membraninteraktion wurde für die humane GRK5 beschrieben. Diese Kinase weist basische Aminosäuren im carboxylterminalen Aminosäuresequenzabschnitt im Bereich der Aminosäuren 552-562 auf, die eine Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden erlauben (Pronin *et al.*, 1998). Bei den Vertretern der GRK4-Subfamilie wurden noch weitere Lipidinteraktionsstellen im aminoterminalen Abschnitt und im konservierten carboxylterminalen Abschnitt identifiziert (Pronin *et al.*, 1998, Vatter/Stoesser *et al.*, 2005). So wurden zum einen basische Aminosäuren im aminoterminalen Abschnitt von GRK 5 und 6 (Aminosäuren 22-29) bzw. von GRK4 (Aminosäuren 21-28) (Pitcher *et al.*, 1996; Vatter/Stoesser *et al.*, 2005) und zum anderen basische Aminosäuren im konservierten carboxylterminalen Abschnitt von GRK4 (Aminosäuren 552-562) und GRK6 (Aminosäuren 553-563) identifiziert, die vermutlich ein spezifisches Binden an negativ geladene Phospholipide ermöglichen (Pronin *et al.*, 1998; Vatter/Stoesser *et al.*, 2005). Alle Mitglieder der GRK-Familie weisen in ihrem aminoterminalen Abschnitt hohe Homologie zu RGS-Proteinen auf (Day *et al.*, 2004). Für GRK2 wurde gezeigt, dass sie über ihre RGS-Domäne aktivierte G α_q -Proteine bindet und auf diese Weise die Rezeptor-vermittelten zellulären Funktionen spezifisch inhibiert (Sterne-Marr *et al.*, 2003; Day *et al.*, 2004).

1.9 Phospholipase C-Enzyme

Phospholipase C-Isoenzyme spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation vieler intrazellulärer Signalmoleküle (Harden & Sondek, 2006). Mehr als 100 verschiedene extrazelluläre Signalmoleküle bewirken über Stimulation membranständiger Rezeptoren eine Aktivierung der Phospholipase C-Isoenzyme. Die PLC-Isoenzyme setzen das Membranphospholipid Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdInsP₂) in die intrazellulären *second messenger* D-*myo*-Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2 Diacyl-*sn*-glycerin (DAG) um. IP₃ bewirkt seinerseits als *second messenger* die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern und DAG induziert die Aktivierung der Proteinkinase C (Harden & Sondek, 2006). Bisher sind in Säugetieren vierzehn verschiedene PLC-Isoenzyme bekannt, die aufgrund von Unterschieden ihrer Struktur und Aktivierungsmechanismen in fünf Klassen unterteilt werden: PLCβ₁₋₄, PLCγ₁₋₂, PLCδ₁₋₄, PLCε, PLCζ und PLCη₁₋₂ (Cockroft, 2006; Harden & Sondek, 2006). Während PLCβ₃, PLCγ₁ und PLCδ₁ ubiquitär exprimiert werden, weisen PLCβ₁, PLCβ₂, PLCβ₄ und PLCγ₂ eine hohe Gewebespezifität auf (Illenberger *et al.*, 2003a). So wurde vermehrt Protein von PLCβ₁ im Zentralnervensystem, aber auch in Organen wie der Lunge oder den Nieren nachgewiesen (Smrcka & Sternweis, 1993; Illenberger *et al.*, 2003a). PLCβ₂ wird hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen, wie myelischen HL-60-Zellen oder neutrophilen Granulozyten exprimiert (Jiang *et al.*, 1997; Rebecchi & Pentylala, 2000). Die Expression des PLCβ₄-Proteins wurde überwiegend in der Retina und im Gehirn nachgewiesen (Adamski *et al.*, 1999; Rebecchi & Pentylala, 2000). Das PLCγ₂-Isoenzym wird überwiegend in lymphoiden Zellen, wie T-Zellen und B-Zellen exprimiert und spielt u. a. eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von B-Zellen (Wen *et al.*, 2004). Die erst kürzlich entdeckten PLC-Isoformen PLCη₁ und PLCη₂ wurden in verschiedenen neuronalen Geweben nachgewiesen. Dagegen wurde für PLCζ eine spezifische Expression in Spermien beobachtet (Saunders *et al.*, 2002; Cockroft, 2006). Die verschiedenen PLC-Isoenzyme weisen strukturelle Homologien auf. So besitzen sie (i) eine X- und Y- Domäne, die das katalytische Zentrum des Enzyms bilden, (ii) vier *EF-hand* Motive und (iii) eine einzelne C2-Domäne (Harden & Sondek, 2006). Des Weiteren besitzen alle Isoformen mit Ausnahme von PLCζ eine *ca.* 130 Aminosäuren lange *pleckstrin homology* (PH)-Domäne im aminoterminalen Abschnitt (Rebecchi & Pentylala, 2000; Harden & Sondek, 2006). Die PH-Domäne ermöglicht sowohl eine Interaktion mit Membranphospholipiden wie PtdInsP₂

und IP₃ als auch mit der G-Protein Untereinheit Gβγ. Von der Gβγ-Untereinheit wird vermutet, dass sie über die PH-Domäne einen regulatorischen Einfluss auf bestimmte PLCβ-Isoenzyme ausübt (Wang *et al.*, 1999b). Zwischen der PH-Domäne und der katalytischen Domäne der PLC-Isoenzyme befinden sich vier *EF-hand* Motive, deren Funktionen noch nicht eindeutig geklärt sind. Jedoch liegen Hinweise vor, dass über die *EF-hand* Motive Ca²⁺ gebunden wird (Harden & Sondek, 2006). Für die carboxylterminale, ca. 120 Aminosäuren lange C2-Domäne wurde gezeigt, dass sie sowohl Ca²⁺ als auch Lipide bindet. Darüber hinaus wurde für die PLCβ-Isoenzyme nachgewiesen, dass diese über die C2-Domäne mit GTP-gebundenen Gα_q-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine interagieren (Wang *et al.*, 1999a; Rebecchi & Pentylala, 2000). Zu den Rezeptoren, welche die Gα_q-PLCβ-Signalkaskade aktivieren, gehören z. B. Bradykinin-, Angiotensin II-, Histamin- und Serotoninrezeptoren (Rhee & Bae, 1997; Parrish *et al.*, 2005). Die PLCβ-Isoenzyme werden aber nicht nur durch Mitglieder der Gα_q-Subfamilie aktiviert, sondern auch durch Gβγ-Dimere der G_{i/o}-Familie (Camps *et al.*, 1992). GPCRs, die über Gβγ-Dimere PLCβ-Isoenzyme aktivieren sind z. B. Adenosin A1-, Muskarin M2- und Somatostatin-Rezeptoren (Murthy *et al.*, 1996; Rebecchi & Pentylala, 2000). Die Sensitivität der PLCβ-Isoenzyme gegenüber der Stimulation durch Gβγ ist jedoch sehr unterschiedlich. Während PLCβ₂ und PLCβ₃ durch Gβγ deutlich aktiviert werden, wird PLCβ₁ nur sehr schwach stimuliert. Für PLCβ₄ wurde keine Stimulation durch Gβγ-Dimere beobachtet (Rebecchi & Pentylala, 2000). In der eigenen Arbeitsgruppe wurden PLCβ-Isoenzyme als neue Effektoren für Rho-GTPasen identifiziert. So wurde in *in-vitro*-Experimenten und intakten Zellen gezeigt, dass PLCβ₂ durch die Rho-GTPasen Rac 1, Rac2 und Cdc42 jedoch nicht durch RhoA stimuliert wird (Illenberger *et al.*, 2003a; Illenberger *et al.*, 2003b). Die Aktivität von PLCβ-Isoenzymen wird durch Proteinkinasen mittels eines negativen intrazellulären *feedback*-Mechanismus reguliert. Nach Aktivierung der PLCβ-Isoenzyme bewirkt der intrazelluläre Anstieg der Ca²⁺-Ionenkonzentration die Stimulation von intrazellulären Adenylzyklasen. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels und zur Aktivierung der Proteinkinase A, die daraufhin die PLCβ-Isoenzyme phosphoryliert (Rebecchi & Pentylala, 2000). Die durch Ca²⁺-Ionen und DAG aktivierte Proteinkinase C (PKC) trägt ebenfalls zur Regulation der PLCβ-Aktivität bei (Litosch, 2002).

1.10 Rho-GTPasen

Rho-GTPasen gehören zur Superfamilie der monomeren, kleinen GTPasen. Die Aminosäuresequenzen der Rho-GTPasen stimmen in *ca.* 30 % der Aminosäuren mit Ras überein. Rho-Proteine besitzen molekulare Massen von 20-30 kDa und werden in allen eukaryotischen Zellen exprimiert (Takai *et al.*, 2001; Jaffe & Hall, 2005). Wie die heterotrimeren G-Proteine fungieren auch die Rho-GTPasen als molekulare Schalter in der Signaltransduktion, indem sie einen alternierenden Zyklus zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen und aktiven, GTP-gebundenen Zustand durchlaufen. Dabei wird der Wechsel zwischen aktivem und inaktivem Zustand durch verschiedene Regulatorproteine kontrolliert. So katalysieren Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*Rho-guanine exchange factors*, GEFs) den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP und aktivieren auf diese Weise die Rho-GTPasen (Schmidt & Hall, 2002). Die Inaktivierung der Rho-GTPasen wird durch Rho-GTPase-aktivierende Proteine (*GTPase-activating proteins*, GAPs) reguliert. Im Gegensatz zu den RhoGEFs erhöhen die RhoGAPs die intrinsische GTP-Hydrolyseaktivität (Bernards, 2003). Eine weitere Gruppe der Regulatorproteine, die Rho-GDP-Dissoziationsinhibitoren (*GDP dissociation inhibitors*, GDIs), verhindert die Aktivierung der Rho-GTPasen durch Hemmung der GDP-Freisetzung aus den Rho-GTPasen (Bishop & Hall, 2000). Bisher wurden 22 Rho-Proteine in Säugetieren nachgewiesen, die aufgrund von Sequenzunterschieden in acht Gruppen einteilt werden: 1.) Rho (RhoA, RhoB, RhoC), 2.) Rac (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG), 3.) Cdc42 (Cdc42, TCL, TC10, Wrch-1, Chp), 4.) Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE), 5.) RhoBTB (RhoBTB1, RhoBTB2), 6.) RhoH (RhoH/TTF), 7.) RhoD (RhoD, Rif), 8.) Miro (Miro-1, Miro-2) (Aspenström *et al.*, 2004). Rho-GTPasen spielen eine zentrale Rolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletts und der Mikrotubuli sowie des vesikulären Transports in der Zelle. So sind Rho-GTPasen an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt wie dem Zellwachstum, der Ausbildung der Zellpolarität, der Gentranskription, des Zellzykluses (G1-Phase-Progression), der Zelldifferenzierung und der Zellbewegung (Ridley, 2001; Etienne-Manneville & Hall, 2002; Jaffe & Hall, 2005; Hall, 2005). Interessanterweise kommen Rho-, Rac- und Cdc42-Proteine unterschiedliche Funktionen bei der Organisation des Aktinzytoskeletts zu. Während die Expression von RhoA-Proteinen die Ausbildung von Aktin-Streßfasern und fokalen Adhäsionskomplexen fördert, bewirkt die Expression von Rac-Proteinen die Ausbildung von *lamellipodia* und *membrane*

ruffles. Die Expression von Cdc42 führt dagegen zur Bildung von *filopodia* und *microspikes* (Jaffe & Hall, 2005; Hall, 2005). Die von Rho-Proteinen ausgelösten Veränderungen des Aktinzytoskeletts können durch verschiedenste Clostridien-Toxine gehemmt werden. So wirken die Toxine A und B aus *Clostridium difficile* als Glycosyltransferasen und inaktivieren durch Übertragung von Glycosylresten sowohl Rho-, Rac- als auch Cdc42-Proteine. Im Gegensatz dazu inhibiert die ADP-Ribosyltransferase C3 von *Clostridium botulinum* spezifisch die Aktivität der Rho-Isoformen RhoA, RhoB und RhoC (Voth & Ballard, 2005; Aktories & Barbieri, 2005). Zu den von Rho-GTPasen regulierten intrazellulären Funktionen zählt auch die Gentranskription (Jaffe & Hall, 2005; Hall, 2005; Posern & Treisman, 2006). So konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die durch Rho-Proteine verursachten Änderungen des Aktinzytoskeletts eine Aktivierung des Koaktivators MAL bewirken. Dieser wird daraufhin aus dem Zytoplasma in den Nukleus transloziert und aktiviert den Transkriptionsfaktor SRF (Miralles *et al.*, 2003; Posern & Treisman, 2006). Auch der Transkriptionsfaktor NF κ B wird durch Mitglieder der Rho-Familie reguliert (Jaffe & Hall, 2005). Des Weiteren gibt es Hinweise dafür, dass Rho-, Rac- und Cdc42-Proteine die Gentranskription auch über die Aktivierung von Proteinkinasen, wie der *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) oder der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (p38 MAPK) stimulieren (Puls *et al.*, 1999; Jaffe & Hall, 2005; Gallagher *et al.*, 2004).

1.10.1 Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren

Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEFs) aktivieren Rho-GTPasen, indem sie den Austausch von GDP zu GTP katalysieren. Die größte Gruppe innerhalb der RhoGEFs stellen die Mitglieder der Dbl-Familie dar. Mittlerweile sind *ca.* 69 Mitglieder der Dbl-Familie der RhoGEFs im Menschen identifiziert worden (Rossman & Sondek, 2005). Als gemeinsame strukturelle Merkmale weisen die Mitglieder der Dbl-Proteine zwei hintereinander liegende Domänen auf, eine hochkonservierte *Dbl-homology* (DH)-Domäne und eine carboxylterminal von der DH-Domäne gelegene *pleckstrin-homology* (PH)-Domäne. Die DH-Domäne interagiert spezifisch mit der RhoGTPase, katalysiert den Austausch von GDP gegen GTP und führt somit zur Aktivierung der Rho-GTPase. Die PH-Domäne bindet Phospholipide der Plasmamembran und reguliert dadurch die Aktivität des GEFs und dessen subzelluläre Lokalisation (Schmidt & Hall, 2002; Rossman &

Sondek, 2005). Die DH-Domäne ist nach einem RhoGEF benannt, das 1985 als erstes Säugetier-GEF in Zellen aus einem diffusen B-Zell-Lymphom identifiziert und deshalb als *diffuse B-cell lymphoma* (Dbl) bezeichnet worden war (Eva & Aaronson, 1985). Aufgrund der Tatsache, dass das Dbl-Protein einen Aminosäuresequenzabschnitt von ca. 180 Aminosäuren enthielt, der hohe Übereinstimmung zu Cdc24, einem Regulator von Cdc42 in Hefen, aufwies, wurde auf seine Funktion als RhoGEF geschlossen. Durch *in-vitro* Untersuchungen wurde gezeigt, dass Dbl den Guaninnukleotidaustausch von Cdc42 katalysiert und die in Dbl und Cdc24 konservierte DH-Domäne für die GEF-Aktivität notwendig ist (Hart *et al.*, 1991; Hart *et al.*, 1994). Mit Ausnahme von drei konservierten Regionen (CR1, CR2, CR3), die jeweils zwischen 10 und 30 Aminosäuren lang sind, zeigen die DH-Domänen der verschiedenen RhoGEFs nur eine geringe Sequenzübereinstimmung. RhoGEFs mit derselben Substratspezifität besitzen häufig nur eine Sequenzidentität von < 20 %. Dennoch haben Röntgenstruktur- und NMR-Analysen der DH-Domänen von β -PIX (RhoGEF 7), Sos1 (*son of sevenless homolog 1* (Drosophila)), Trio (*triple functional domain* (PTPRF *interacting*)) und Tiam1 (*T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*) ergeben, dass eine große Ähnlichkeit in Bezug auf die dreidimensionale Struktur der RhoGEFs besteht (Schmidt & Hall, 2002). Die zahlreichen Mitglieder der RhoGEF-Familie weisen gegenüber Rho-GTPasen eine unterschiedliche Spezifität auf. Während einige RhoGEFs mit großer Spezifität nur die Aktivität einer einzigen Rho-GTPase regulieren, z. B. Fgd1 die Aktivität von Cdc42 (Zheng *et al.*, 1996) und p115RhoGEF die Aktivität von RhoA (Hart *et al.*, 1996), aktivieren andere RhoGEFs mehrere GTPasen. So katalysiert Dbl den Nukleotidaustausch von Cdc42 und RhoA (Hart *et al.*, 1994) und Vav1 den Nukleotidaustausch von Cdc42-, Rac- und Rho-Proteinen (Olson *et al.*, 1996). Zu den spezifisch die Aktivität von RhoA regulierenden RhoGEFs zählen neben p115RhoGEF auch PDZ-RhoGEF und LARG. Die Aktivierung der RhoGEFs erfolgt bei p115RhoGEF und PDZ-RhoGEF durch $G\alpha_{12/13}$ und bei LARG sowohl durch $G\alpha_{12/13}$ als auch durch $G\alpha_{q/11}$ (Chikumi *et al.*, 2002; Vogt *et al.*, 2003). Erst vor kurzem wurde ein weiteres RhoA-spezifisches GEF identifiziert, das p63RhoGEF, für das gezeigt wurde, dass es durch $G\alpha_{q/11}$ aktiviert wird (Souchet *et al.*, 2002; Lutz *et al.*, 2004). Über mögliche Funktionen von p63RhoGEF liegen erst wenige Hinweise vor. So wurde das p63RhoGEF-Protein insbesondere im zentralen Nervensystem und in Sarcomeren des Herzmuskels nachgewiesen. Letzteres führte zur Vermutung, dass

p63RhoGEF eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Kontraktion von Herzmuskelzellen spielt (Souchet *et al.*, 2002).

1.11 Ziele der Arbeit

Chemokine und ihre Rezeptoren kontrollieren immunologische und inflammatorische Prozesse indem sie die gerichtete Migration von Leukozyten regulieren und eine Vielzahl weiterer Leukozytenfunktionen stimulieren. Chemokine aktivieren durch Interaktion mit Chemokinrezeptoren eine Vielzahl von Effektoren, wie Phospholipase C- β -Isoenzyme, Phosphoinosit 3-Kinasen (PI3-K), RhoGTPasen, Mitogen-aktivierten Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren. Bei anhaltendem oder wiederholtem Stimulus von Chemokinrezeptoren durch ihre Liganden kommt es zur Verringerung oder zum völligen Verlust der Aktivierbarkeit der Rezeptoren, ein Vorgang, der als homologe Desensibilisierung bezeichnet wird. An der Desensibilisierung der Chemokinrezeptoren sind Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) beteiligt. GRKs gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen, die durch Phosphorylierung der Liganden-gebundenen Chemokinrezeptoren deren Aktivität regulieren. Derzeit sind in Säugetieren sieben Mitglieder der GRK-Familie bekannt, GRK1-7. Die Proteine der GRK-Familie weisen große strukturelle Gemeinsamkeiten auf. So besitzen sie eine zentrale, hochkonservierte katalytische Domäne, die von variablen amino- und carboxylterminalen Abschnitten flankiert wird.

In unserer Arbeitsgruppe war mit mGRK6-C eine Isoform der GRK6 der Maus isoliert worden, die sich durch das Fehlen eines Bereichs des carboxylterminalen Abschnitts auszeichnet, für den angenommen wird, dass er für die Interaktion der Kinasen mit der Plasmamembran und/oder mit dem aktivierten Rezeptorprotein verantwortlich ist und/oder die Aktivität der Kinase reguliert. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe mit dem CXC-Chemokinrezeptor CXCR4 und dem vom Genom des humanen Zytomegalievirus-kodierten Chemokinrezeptorhomologs pUS28 hatten gezeigt, dass die transiente Expression dieser Proteine in COS-7-Zellen nicht nur zu einer $G\alpha_q$ -vermittelten Aktivierung von Phospholipase C- β -Isoenzymen sondern auch zur vermehrten Transkription von *serum response factor* (SRF)-regulierten Genen führt. Darüber hinaus lagen Hinweise aus Ergebnissen eigener Untersuchungen vor, dass die durch den Liganden-

aktivierten CXCR4-Rezeptor und das konstitutiv aktive Rezeptorhomolog pUS28 beeinflussten zellulären Funktionen durch GRKs reguliert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu klären, (i) welchen Einfluss mGRK6-C auf die vom aktivierten humanen CXCR4 (hCXCR4) und von pUS28 regulierten Zellfunktionen hat, (ii) welche funktionelle Bedeutung die Interaktion von mGRK6-C mit der Plasmamembran für diesen Einfluss hat und (iii) welche strukturellen Voraussetzungen der mGRK6-C für die Interaktion des Enzyms mit der Plasmamembran entscheidend sind. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, welche Signaltransduktionskomponenten an der durch pUS28 ausgelösten Steigerung der Transkription SRF-regulierter Gene beteiligt sind.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid-Lösung 30 % 4K Mix	AppliChem, Darmstadt
Adefo Entwickler/Fixierer RTU60	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Agar Agar Serva high gel-strength	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniumformiat	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumpersulfat	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Ampicillin, Natrium-Salz	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
ATP, Dinatriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Bacto Yeast Extract	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
Borax (Decahydrat)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
BSA Fraktion V	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
D(+)-Glucose Monohydrat	Merck, Darmstadt
Digitonin	Calbiochem, Merck KG, Darmstadt
Dithiothreitol	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
DMEM	GIBCO Invitrogen cell culture, Karlsruhe
DMEM Inositol-freies Medium	MP biomedical, Ohio, USA
DMSO	Roth, Karlsruhe
Dowex 1 x 8 resin, 100 x 200 mesh, Cl ⁻ form	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL™ Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA, Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Genaxis Biotechnologie, Spechbach
Fötale Kälberserum	GIBCO Invitrogen cell culture, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fungizone®	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe

Gentamicin	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
HEPES (für Zellkultur)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
IPTG	Boehringer, Mannheim
Immunglobulin G, (IgG) Kaninchen	Sigma, Deisenhofen
Immunglobulin G, (IgG) Maus	Sigma, Deisenhofen
L- α -Phosphatidylcholine, Dimyristoyl (C14:0)	Sigma, Deisenhofen
L- α -Phosphatidyl-L-Serin	Sigma, Deisenhofen
Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumcholat	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
Natriumformiat	Fluka, Neu-Ulm
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Pepstatin A	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdInsP ₂)	Sigma, Deisenhofen
Pluronic F-68 [®]	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Deisenhofen
PolyFect [®] Transfection Reagent	Quiagen GmbH, Hilden
Ponceau S-Konzentrat	Sigma, Deisenhofen
Protein G-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Pyronin Y	Sigma, Deisenhofen
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A	Zinser Analytic, Frankfurt
TEMED	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
Thimerosal	Sigma, Deisenhofen

TNM-FH-Insect Medium	Sigma, Deisenhofen
Tris (ultrarein)	USB Corporation, Ohio, USA
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Linz Österreich
Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI)	Fluka, Neu-Ulm
Tween [®] 20	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Boehringer, Mannheim

Alle verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien, Biochemikalien und Lösungsmittel wurden in p. a.-Qualität von Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Radioaktiv markierte Chemikalien

D- <i>myo</i> -[2- ³ H(N)]-Inositol (370-925 GBq/mmol)	Amersham Biosciences, Freiburg
[γ - ³² P]ATP (>5000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Freiburg

2.3 Enzyme, Kits und Nukleinsäuren

ABI PRISM [®] BigDye [®]	
Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
BaculoGold [™] Baculovirus DNA	Pharmingen, Hamburg
Desoxynukleosidtriphosphat-Set	Boehringer, Mannheim
DNA-Marker III	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Dual-Luciferase [®] Report Assay System	Promega, Madison, USA
HMW-Marker	Sigma, Deisenhofen
Klenow Enzym	Roche Diagnostics, Mannheim
Nucleobond [™] AX PC-Kit-100	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin [™] -Kit	Macherey-Nagel, Düren
<i>Pfu</i> -Turbopolymerase	Stratagene, Heidelberg
PolyFect [®] Transfection Reagent	Quiagen, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

<i>QuikChange</i> TM <i>Site-Directed Mutagenesis</i> Kit	Stratagene, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TA Cloning Kit [®]	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Sigma, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Zero Blunt [®] PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.4 Verbrauchsmaterial

Agfa Cronex5 Medical X-Ray Film	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Blotpapier GB002	Schleicher & Schuell, Dassel
B&W Isoplate 96-Loch-Testplatte	Wallac Oy, Turku Finnland
Kanüle 25 GI 0,5 x 25mm Nr. 18	Becton Dickinson, Heidelberg
Nitrozellulosemembranfilter (0.45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Polycarbonat Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Protran Nitrozellulose	Schleicher & Schuell, Dassel
Reagiergefäße (1,5 ml, 39 x 10,8 mm Ø, farblos)	Sarstedt, Nürnberg
Spritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzenfilter Millex [®] -GS (0,22 µm)	Millipore Corporation Bedford, USA
Spritzenfilter Millex [®] -HA (0,45 µm)	Millipore Corporation Bedford, USA
Szintillationsröhrchen (20ml)	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Zellkulturflaschen, 75 cm ² und 150 cm ²	Renner, Dannstadt
Zellkulturschalen, Ø 100 mm	Renner, Dannstadt
6-/24-Loch-Zellkultur-Testplatten	Renner, Dannstadt

2.5 Säulen und Gele für die Chromatographie

HiTrap [®] Heparin-Sepharose-Säule, 1 ml/5 ml	Amersham Biosciences, Freiburg
HiTrap [®] -SP-Sepharose-Säule, 1 ml/5 ml	Amersham Biosciences, Freiburg
Protein G-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Superdex TM 75 (HiLoad 26/60)	Amersham Biosciences, Freiburg

2.6 Pro- und eukaryontische Zellstämme

<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Clontech/ITC Biotechnology, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF'	Stratagene, Heidelberg
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9)-Zellen	Invitrogen, Heidelberg
COS-7 (<i>African green monkey kidney cells-7</i>)	American Type Culture Collection, Rockville, USA. Freundlicher Weise von der Abteilung Virologie, Universität Ulm zur Verfügung gestellt.

2.7 Plasmide

pCR [®] 2.1 (TA-Cloning-Kit)	Invitrogen, Karlsruhe
pCR [®] Blunt	Invitrogen, Karlsruhe
pVL1393	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA 3.1 (+/-)	Invitrogen, Karlsruhe
pTEJ-8	freundlicherweise von Dr. W. Schwartz, Abteilung Pharmakologie, Universität Kopenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt.

2.7.1 Vorhandene Plasmid-DNA-Konstrukte

Folgende DNA-Konstrukte waren entweder in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden oder wurden selbst hergestellt und für die Experimente in dieser Arbeit verwendet:

mGRK6-C-pBluescript [™] II SK(-)	
mGRK6-C-pcDNA3.1(+)	
mGRK6-C-N ⁺ C ⁻ -pcDNA3.1(+)	
mGRK6-C-N ⁻ C ⁺ -pcDNA3.1(+)	
mGRK6-C-N ⁻ C ⁻ -pcDNA3.1(+)	
HA-US28 _{AD169} -pTEJ-8	
G α_{q-EE^-} , G α_{11-EE^-} , G α_{14-EE^-} , G α_{16-EE^-} -pcDNA3.1(+)	UMR cDNA Resource Center, Rolla, USA
G α_{qQ209L} -pcDNA3.1(+)	UMR cDNA Resource Center, Rolla, USA

G $\alpha_{16R186C}$ -pcDNA3.1(+)	UMR cDNA Resource Center, Rolla, USA
bPLC β_1 -pcDNA3.1(-)	T. Piechulek, Ulm
hPLC β_2 -pcDNA3.1(-)	Dr. B. Möpps, Ulm
hPLC β_3 -pcDNA3.1(+)	T. Piechulek, Ulm
bPLC β_1 -pVL1393	Dr. D. Illenberger, Ulm
RhoAWT-pcDNA3.1(+)	PD Dr. K. Giehl, Ulm
RhoAG14V-pcDNA3.1(+)	PD Dr. K. Giehl, Ulm
RhoAT19N-pcDNA3.1(+)	PD Dr. K. Giehl, Ulm
p63RhoGEF-pcDNA3.1(+)	Dr. T. Wieland, Heidelberg
p63RhoGEF-PH-pcDNA3.1(+)	Dr. T. Wieland, Heidelberg
C3-Exoenzym-pCis-2	Dr. T. Wieland, Heidelberg
pSRE.L	Dr. T. Wieland, Heidelberg
pRL-TK	Promega, Madison, USA

2.8 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron Corporation, Ulm bezogen.

2.8.1 Vektor-spezifische Oligonukleotide

pCR 2.1-reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
pCR 2.1-universe	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
pCR Blunt-reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
pCR Blunt-universe	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
pcDNA 3.1-reverse	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'
pcDNA 3.1-universe	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
pVL-sense:	5'-CTG TTT TCG TAA CAG T-3'
pVL-antisense:	5'-TGA GTT TTT GGT TCT TGC CG-3'
pTEJ8seq2	5'-TTC AGT GTT AGA CTA GTA-3'

2.8.2 GRK6-spezifische Oligonukleotide

GRK-1	5'-AGC CCA TGG AGC TCG AGA ACA TGG TA
-------	---------------------------------------

GRK6-2	5'-TCA CGC TTG GGC ACT GAA GAG TGC CTG TAG CAA T-3'
GRK6-3	5'-GGG AAT CGC AAA GGC GCG AGC GCG GCA TGG CGC CAG ATG C-3'
GRK6-4	5'-GCA TCT GGC GCC ATG CCG CGC TCG CGC CTT TGC GAT TCC C-3'
GRK6-5	5'-TCA GGT GTT TTT GGT CAC TGG T-3'

2.8.3 Phospholipase C- β_1 -spezifische Oligonukleotide

PLC β_1 -1	5'-TTC GGA TCC GCC ACC ATG GAG CAG AAG CTG ATC TCC GAG GAG GAC CTG CTG CCA GCG CTC TTT GTC TA-3'
PLC β_1 -2	5'-TGT GAA TTC TCA CAG AGG GGT ATC AAA CTC T-3'

2.9 Rekombinante Baculoviren

HA-mCXCR4	Dr. Barbara Möpps, Ulm
HA-hCXCR1	Dr. Barbara Möpps, Ulm
HA-RDC	Dr. Barbara Möpps, Ulm
mGRK6-C	Dr. Barbara Möpps, Ulm
mGRK6-C/N ⁻ C ⁺	C. Stößer, Ulm
mGRK6-C/N ⁺ C ⁻	C. Stößer, Ulm
mGRK6-C/N ⁻ C ⁻	C. Stößer, Ulm

2.10 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Bestimmung des Molekulargewichts verschiedener Proben wurde der *high molecular weight marker* (HMW) von der Firma Sigma, Deisenhofen verwendet.

Protein	Molekulargewicht (kD)
Myosin, Kaninchenmuskel	205
β -Galaktosidase, <i>E. coli</i>	116
Phosphorylase b, Kaninchenmuskel	97.4
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	29

2.11 Peptide

Die verwendeten humanen CXC-Chemokine CXCL8 und CXCL12 wurden von der Firma PeproTech Inc, London bezogen.

2.12 Antikörper

Primäre Antikörper gegen:

HA (12CA5)	Monoklonales Maus-IgG	Boehringer, Mannheim
Anti-Pep1/2	Polyklonales Kaninchen-IgG	Eurogentec, Belgien
Anti-Myc	Polyklonales Maus-IgG	Cell Signalling Technology, Danvers, USA

Sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper:

Anti-Kaninchen-IgG	Ziegen-IgG	Sigma, Deisenhofen
Anti-Maus-IgG	Ziegen-IgG	Sigma, Deisenhofen

2.13 Spezielle Geräte

ABI 310 PRISM™ Genetic Analyser	Perkin-Elmer, Weiterstadt
ÄKTA™ <i>explorer</i> 100	Amersham Biosciences, Freiburg

Brutschrank Kelvitron [®] T	Heraeus Instruments, Fellbach
Certomat HK (Temperaturregeleinheit)	Braun, Melsungen
Certomat R (Schüttlereinheit)	Braun, Melsungen
Concentrator 5301 (<i>speed vac</i>)	Eppendorf, Hamburg
Easy Breeze Air Gel Dryer, Hoefer	Amersham Biosciences, Freiburg
Elektrophoresekammer groß (SDS-PAGE)	Hoefer-Amersham Biosciences, Freiburg
Elektrophoresekammer klein (SDS-PAGE)	Sigma, Deisenhofen
Flüssigszintillationszähler, LSC 2200 CA	Canberra Packard, Dreieich
Horizontalgelkammer	MBT-Brand, Heidelberg
Immunoblot Transferkammer	Renner GmbH, Darmstadt
Immunoblot Transferkammer Hoefer [™] miniVE	Amersham Biosciences, Freiburg
J2-HS Zentrifuge	Beckman Instruments, München
Magnetrührer IkaCombimag RET	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Milli-Q ^{UF} PLUS	Millipore, Eschborn
Minifuge GL	Heraeus Christ, Osterode
Minifuge T	Heraeus Sepatech, Osterode
Multilabel Readers Mithras LB940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Netzgerät EPS 3500	Amersham Biosciences, Freiburg
Photometer Gene Quant pro	Amersham Biosciences, Freiburg
pH-Meter P207	Consort, Turnhout
Optima [™] TLX Ultrazentrifuge	Beckman Instruments, München
Sicherheitswerkbank Uniflow UVUB 1200	Uni Equip, Martinsried
Sonifier [®] B-12	Branson Sonicator Power Co., Dansbury, CO
Sonorex R4 102 Transistor (Ultraschallbad)	Bandelin electronic, Berlin
Sorvall Ultrazentrifuge OTD50B	Du Pont Instruments, Bad Nauheim
Spektrophotometer DU 640	Beckman Instruments, München
Thermocycler PTC-200	MJ-Research, Biozym, Oldendorf
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator IL 200M	Bachofer, Reutlingen
Überkopfmischer Reax2	Heidolph, Kehlheim
Videodokumentationsystem CF8/1 DX	Kappa Meßtechnik GmbH, Gleichen

2.14 Software

GraphPad Prism®	Version 3.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA.
Micrografx Designer 9.0	Micrografx Inc. 2001, München.
Micrografx Picture Publisher 9	Micrografx Inc. 2001, München
Microsoft Word 1997	Microsoft Corp., Washington, USA
Microsoft Excel 1997	Microsoft Corp., Washington, USA
PC/Gene 6.85	IntelliGenetics,CH
PGProt	Prof. Dr. P. Gierschik, Abt. Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm
SHARP-Scanner Scan JX/WIN V4.0	Krystek EDV, Hamburg

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Herstellung von Luria-Bertani (LB)-Medium

Die verwendeten *E. coli*-Stämme DH5 α und XL1-Blue MRF' wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert. Das LB-Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Die Selektion der Vektor-tragenden Bakterien erfolgte je nach kodierter Resistenz durch Zugabe eines Antibiotikums zum Medium z.B. von Ampicillin (50 μ g/ml). Um LB-Agarplatten herzustellen, wurde der LB-Agar autoklaviert, auf Handwärme abgekühlt und nach Zugabe des Antibiotikums in sterile Petrischalen gegossen. Diese wurden nach dem Erstarren des Agars bei 4 °C gelagert.

LB-Medium:	1 % (m/V) Bactotrypton, 0,5 % (m/V) Hefeextrakt, 1 % (m/V) NaCl
LB-Agar:	2 % (m/V) Agar in LB-Medium
Antibiotikumlösung:	50 mg/ml in ddH ₂ O, durch einen Zelluloseacetatfilter (0,22 μ m Porenweite) sterilfiltriert

3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Eine Einzelkolonie des Bakterienstammes *E. coli* DH5 α wurde von der Agarplatte mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 2,5 ml LB-Medium überführt. Nach Inkubation über Nacht auf dem Bakterienschüttler bei Standardbedingungen (37 °C und 200 Upm) wurden mit dieser Vorkultur weitere 50 ml LB-Medium angeimpft und diese Bakterienkultur unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm (OD₆₀₀) weiterinkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (2 000 g, 10 min, RT), in 40 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2 000 g, 10 min, RT) wurden die Bakterien in 2,5 ml 100 mM CaCl₂-Puffer resuspendiert und mit 550 μ l sterilem, kaltem Glycerin (86 % ig) versetzt. Die somit zur Aufnahme von DNA kompetenten Zellen wurden dann in 100 μ l Aliquots portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter DH5 α - bzw. XL1-Blue MRF'-Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, mit 7,5 µl eines Ligationsansatzes (siehe 3.2.9) oder 1 µl einer Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock bei 42 °C für 30 s führte zur Perforation der Bakterienwand und zur Aufnahme der zur Transformation zugesetzten Plasmid-DNA. Die Bakterien wurden danach 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl LB-Medium, in dem 10 mM MgSO₄ und 0,2 % (m/V) Glukose enthalten waren, wurden die Bakterien schließlich für 60 min unter Standardbedingungen inkubiert. Ein Aliquot dieser Bakterienkultur (bei Plasmidtransformation) bzw. der gesamte Transformationsansatz (bei einer Ligation) wurde mit einem Drygalsky-Spatel auf zuvor getrocknete LB-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert.

SOC-Medium: 2 % (m/V) Bactotrypton, 0,5 % (m/V) Hefeextrakt, 10 mM NaCl,
 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 0,2 % (m/V) Glucose

Die Transformation in XL1-Blue MRF' Supercompetent Cells erfolgte nach Angaben des Herstellers (Stratagene). Das für die Regeneration der Zellen notwendige NZY⁺-Nährmedium wurde dazu folgendermaßen hergestellt: Für einen Liter Medium wurden 10 g NZ-Amin A (Casein-Hydrolysat), 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl eingewogen und autoklaviert. Zusätzlich wurden noch 12,5 ml einer sterilfiltrierten 1 M MgCl₂-Lösung, 12,5 ml einer sterilen 1 M MgSO₄-Lösung und 20 ml einer 20 %igen (m/V) sterilen Glucose-Lösung hinzugefügt.

3.1.4 Selektion von transformierten Bakterien

Die Selektion von Bakterien, welche die rekombinante Plasmid-DNA aufgenommen hatten, erfolgte in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums. Bei Bakterien, welche die Plasmide pBluescript oder pCR2.1 (Original TA Cloning[®] Kit, Invitrogen) enthielten, konnte zusätzlich eine blau/weiß-Selektion mit Hilfe der Substanzen IPTG und X-Gal durchgeführt werden. Blaue Bakterienkolonien enthielten Plasmide ohne rekombinante DNA und konnten daher eine funktionsfähige β -Galaktosidase herstellen. Nach Stimulation durch den Induktor IPTG setzte die β -Galaktosidase das farblose Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff um. Bei Bakterien mit rekombinanten Plasmiden verursachte die Insertion eine Inaktivierung des β -Galaktosidase-Gens (*lacZ*). Diese Bakterien

produzierten keine β -Galaktosidase und die Kolonien blieben milchig-weiß. Ein Aliquot (200 μ l) des Transformationsansatzes (siehe 3.1.3) wurde auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Falle der blau/weiß-Selektion wurden vor dem Ausplattieren je 10 μ l IPTG- und X-Gal-Lösung zu dem Aliquot gegeben.

IPTG-Lösung: 0,1 M in ddH₂O

X-Gal-Lösung: 10 % (m/V) in DMF

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Nachdem Plasmid-tragenden *E. coli* DH5 α bzw. XL1-Blue MRF'-Zellen in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37 °C und 200 Upm inkubiert wurden, folgte die Präparation von Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen. Dazu wurden Nukleospin-Kits (Minipräparation) für die DNA-Präparationen aus 2,5 ml-Bakteriensuspension und Nukleobond AX 100 Kits (Midipräparationen) für die DNA-Präparation aus 50 ml-Bakteriensuspension nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration einer Lösung wurde spektralphotometrisch durch die Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Eine optische Dichte (1 OD) entspricht dabei 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA, 33 μ g/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA oder 40 μ g/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde über das Verhältnis der Extinktionen der Lösung bei 260 und 280 nm ($OD_{260/280}$) bestimmt. Bei reinen Nukleinsäurelösungen erhält man Werte zwischen 1,8 und 2,0, niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch Proteine oder Phenol hin.

3.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Zur Entfernung von Proteinen, die bei der Extraktion von Nukleinsäuren aus Zellen, aber auch bei der Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen anfielen, wurden die wässrigen Nukleinsäurelösungen mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und nach dem Durchmischen für 5 min mit 12 500 g bei RT zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt, um das restliche Phenol zu entfernen und wie oben zentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden aus dem Überstand durch Zugabe von 2,5 Volumen 100 % Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung pH 5,0 und einer Inkubation von mindestens 30 min bei -20 °C ausgefällt. Die Fällung von Nukleinsäuren aus größeren Volumina erfolgte durch den Zusatz von 0,7 Volumen Isopropanol und einer Inkubation von 20 min bei RT. Nach der Zentrifugation des Fällungsansatzes für 10 min mit 12 500 g bei RT wurde das Pellet mit 70%igem (V/V) Ethanol gewaschen und wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend entweder im Heizblock bei 37 °C, im Exsikkator oder in einem Vakuumkonzentrator (*speed vac*) getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden entsprechend ihres Molekulargewichts in Agarosegelen mit Hilfe einer Horizontalgelapparatur elektrophoretisch aufgetrennt. Die Konzentration der eingesetzten Agarose richtete sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente.

Agarosekonzentration [% (m/V)]	Trennbereich linearer DNA [kb]
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

nach Sambrook *et al.* (1989)

Zunächst wurde die Agarose in Elektrophoresepuffer (1x TAE) aufgekocht, nach Abkühlen auf *ca.* 60 °C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, der sich zwischen die Basen der Nukleinsäuren einlagert und unter UV-Beleuchtung eine rot-orange Fluoreszenzstrahlung ($\lambda = 560$ nm) emittiert. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 6:1 (V/V) mit Probenpuffer vermischt, in die Taschen des erstarrten Gels geladen und bei einer konstanten Feldstärke von 10 V/cm in 1 x TAE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung des Gels erfolgte unter UV-Beleuchtung ($\lambda = 312$ nm) auf einem Transilluminator (Bachofer). Das Gelbild wurde mit einem Videodokumentationssystem (Kappa Meßtechnik) erfasst.

1x TAE: 40 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA,
0,1 % (V/V) Essigsäure

Ethidiumbromidlösung: 10 mg Ethidiumbromid in 1 ml ddH₂O, dunkel gelagert

6x DNA-Probenpuffer: 30 % (V/V) Glycerin, 50 mM EDTA, 0,25 % (m/V)
Bromphenolblau

3.2.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurde die gewünschte DNA-Bande auf dem Transilluminator unter UV-Beleuchtung mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß mit bekanntem Leergewicht überführt. Das Gefäß mit dem Gelstück wurde gewogen und somit das Gewicht des Gelstücks bestimmt. Anschließend wurde die DNA aus dem Gelstück mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert.

3.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA-Spaltungen wurden mit Restriktionsendonukleasen (RE) nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

Standardansatz: 1 µg (Plasmid-)DNA
0,3 µl Restriktionsendonukleasen (10 U/µl)

1,5 µl 10 x Restriktionspuffer
ad 15 µl mit ddH₂O

Der Restriktionsansatz wurde bei der empfohlenen Temperatur für mindestens 1 h inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 5 µl 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem bekannten Marker (Marker III [Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker]) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Spaltungsprodukte wurden danach unter UV-Beleuchtung analysiert.

3.2.7 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um bei der Ligation (siehe 3.2.9) eine Rezirkularisierung von linearisierter Plasmid-DNA zu verhindern, wurden Vektoren, die nur mit einer Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden, dephosphoryliert. Dazu wurde alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) verwendet, welche den Phosphatrest am 5'-Ende des linearisierten Vektors entfernt. Zunächst wurde die Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde alkalische Phosphatase zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C weiter inkubiert.

CIP-Ansatz: 2-3 µg (Plasmid-)DNA
 3 µl 10 x Restriktionspuffer
 1,5 µl Restriktionsendonuklease (10 U/µl)
 ad 30 µl mit ddH₂O
nach 30 min bei 37 °C 3 µl CIP (1 U/µl)

Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte die Hitzeinaktivierung der alkalischen Phosphatase für 10 min bei 68 °C. Anschließend wurde der Ansatz mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und die linearisierte, dephosphorylierte Plasmid-DNA in einem 1 % (m/V) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die entsprechende DNA-Bande wurde aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Quiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Zur DNA-Mengenabschätzung wurde ein Aliquot des linearisierten, dephosphorylierten Vektors in einem 1 % (m/V) Agarosegel zusammen mit einem DNA-Größenstandard bekannter Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Qualität der CIP-Behandlung zu kontrollieren, wurde ausserdem ein Aliquot des

linearisierten, dephosphorylierten Vektors in einen Ligationsansatz (siehe 3.2.9) eingesetzt. Nach der Transformation und dem Ausstreichen der Bakterien auf LB-Platten des entsprechenden Antibiotikums, vermittelt die Zahl der Bakterienkolonien einen Eindruck über die Wirksamkeit der CIP-Behandlung.

3.2.8 Auffüllreaktion

Mit der *E. coli*-DNA-Polymerase I ohne 3'→5'-Exonukleaseaktivität, dem Klenow-Fragment, können einzelsträngige, 5'-überhängende Enden von DNA-Fragmenten (*sticky ends*) partiell aufgefüllt werden. Es entsteht ein Doppelstrang mit glattem Ende (*blunt end*), so dass eine Ligation zwischen zwei DNA-Strängen, die mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden, möglich ist. Nachdem das DNA-Fragment mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen von der ursprünglichen Plasmid-DNA abgetrennt wurde, erfolgte die Zugabe des Klenow-Fragments zu diesem Ansatz.

Ansatz: 2-3 µg DNA-Fragment
 2 µl 10 x Restriktionspuffer
 1,5 µl Restriktionsendonuklease (10 U/µl)
 ad 30 µl mit ddH₂O

nach 1 h bei 37 °C erfolgt die Zugabe von

8 µl 10 mM dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
2 µl Klenow-Fragment (2 U/µl)

Nach Inkubation bei 37 °C für 45 min wurde das Enzym für 10 min bei 68 °C hitzeinaktiviert. Das linearisierte, aufgefüllte DNA-Fragment wurde in einem 1 % (m/V) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Quiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

3.2.9 Ligation

Um rekombinante Plasmide herstellen und in kompetente Bakterien einschleusen zu können, müssen ein DNA-Fragment (*insert*) und ein Plasmidvektor mit Hilfe einer Ligase über Phosphodiesterbindungen verknüpft werden.

Standard-Ligationsansatz:	1,5 µl	10 x Ligationspuffer
	1 µl	Vektor (ca. 20 ng)
	5 µl	DNA-Fragment (ca. 100 ng)
	1,5 µl	T4-Ligase (1 U/µl)
	ad 15 µl mit ddH ₂ O	

Die Inkubation erfolgte bei 15 °C für 16 h.

3.2.10 Polymerasekettenreaktion

Mit der *polymerase chain reaction* (PCR) kann enzymatisch *in vitro* ein bestimmter DNA- oder cDNA-Bereich mit Hilfe zweier Oligonukleotide (Primer), die den zu amplifizierenden Bereich in 5'→3'-Richtung begrenzen, vervielfältigt werden. Das Grundprinzip basiert auf sich wiederholenden Zyklen der DNA-Doppelstrangdenaturierung (*denaturation*), der Anbindung beider Oligonukleotide an ihre jeweilige Matrize (*annealing*) und der Verlängerung der Komplementärstränge an der entsprechenden Matrize (Primer *extension*) durch eine thermostabile DNA-Polymerase entweder aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermus aquaticus* (Mullis & Faloona 1987; Saiki *et al.*, 1988) oder anderen thermophilen Bakterien. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die PCR-Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus cDNA, sowie zur Herstellung modifizierter DNA und für die automatisierte, nichtradioaktive DNA-Sequenzanalyse (*cycle sequencing*) angewendet. Alle PCR-Versuche wurden in einem *thermocycler* (PTC-200, MJ-Research) durchgeführt.

3.2.10.1 Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von etwa 500 bis 2 000 bp angewendet.

Standard-PCR-Ansatz:	5 µl	10 x <i>Taq</i> -Puffer
	1 µl	10 µM Oligonukleotid 1
	1 µl	10 µM Oligonukleotid 2
	1 µl	10 mM dNTP-Mix
	x µl	Matrizen-DNA

0,3 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl mit ddH₂O

Die Konzentration jedes Oligonukleotids im PCR-Ansatz beträgt 0,2 µM. Die *Taq*-DNA-Polymerase wurde bei Erreichen der *annealing*-Temperatur im ersten Zyklus oder bereits vor Beginn des Programms, bei 94 °C, hinzupipettiert (*hot start*). Die *annealing*-Temperatur lässt sich anhand der Oligonukleotid-Sequenzen berechnen: Jedem A- und T-Nukleotid entsprechen 2 °C, jedem G- und C-Nukleotid 4 °C (Nelson & Brutlag, 1979).

PCR-Standardprogramm:

	Denaturierung	<i>annealing</i>	Extension
Start	94 °C, 3 min		
Zyklen 1-35	94 °C, 1 min	x °C, 2 min	72 °C, 2 min
Ende			72 °C, 10 min; dann 4 °C

Vor dem Zyklusprogramm wurden alle Matrizenstränge vollständig denaturiert (Start); die Schlußextension (Ende) diente dazu, unvollständig synthetisierte Stränge aufzufüllen. Nach Beendigung der PCR wurde ein 25 µl-Aliquot des PCR-Ansatzes auf ein 1 % (m/V) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Beleuchtung analysiert.

3.2.10.2 Einfügung von Mutationen in eine DNA-Sequenz

Mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) können in eine DNA-Sequenz Punktmutationen eingefügt oder Nukleotide so verändert werden, dass in dem kodierten Protein eine einzelne Aminosäure ausgetauscht wird oder mehrere Aminosäuren deletiert oder eingefügt werden. Dazu lagern sich zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide, welche die gewünschte Mutation tragen, an die rekombinante DNA an. Mittels der *Pfu Turbo* Polymerase (Stratagene) werden die in ihrer Sequenz veränderten DNA-Stränge amplifiziert. Durch Einbau der Oligonukleotide kommt es zur Ausbildung von Strangbrüchen. Im Anschluß an die PCR wird die methylierte, nicht-mutierte DNA durch das Enzym DpnI gespalten. Die Vermehrung der mutierten DNA erfolgt in XL1-Blue MRF'-Zellen.

PCR-Ansatz:	5 µl	10 x Reaktionspuffer
	1,25 µl	<i>sense</i> Oligonukleotid
	1,25 µl	<i>antisense</i> Oligonukleotid
	1 µl	10 mM dNTP-Mix
	2 µl	Matrizen-DNA (100 ng)
	1 µl	<i>Pfu Turbo</i> DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
	<i>ad</i> 50 µl mit ddH ₂ O	

Die Konzentration jedes Oligonukleotids im PCR-Ansatz beträgt 125 ng.

PCR-Programm zum Austausch von Aminosäuren:

	Denaturierung	<i>annealing</i>	Extension
Start	95 °C, 30 s		
Zyklen 1-16	95 °C, 30 s	55 °C, 1 min	68 °C, 1 min pro kb
Ende			4 °C

Die nicht-mutierte DNA wurde anschließend mit Hilfe von 1 µl DpnI (10 U/µl) für 1 h bei 37 °C gespalten. Danach wurde 1 µl des Ansatzes nach Angaben des Herstellers in kompetente XL1-Blue MRF'-Zellen transformiert.

3.2.11 Automatisierte, nichtradioaktive DNA-Sequenzanalyse

Das automatisierte Sequenzierverfahren besteht aus einer Kombination von linearer (*single primer*) PCR und der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). Die rekombinante DNA eines Plasmids kann je nach Bedarf von beiden Seiten der *multiple cloning site* mit zwei vektorspezifischen Oligonukleotiden ansequenziert werden, wobei das eine Oligonukleotid komplementär zum *sense*-Strang, das andere zum *antisense*-Strang des Vektors bindet. Ausgehend von den damit erhaltenen Sequenzen der 5'- und 3'-Regionen der rekombinanten DNA können *insert*-spezifische Oligonukleotide synthetisiert werden mit deren Hilfe Sequenzen weiter stromabwärts (*downstream*) vom Startkodon bzw. stromaufwärts (*upstream*) vom Stoppkodon ermittelt werden können. Mit Hilfe dieser als *primer walking* bezeichneten Methode konnten die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten DNA-Konstrukte auf ihre Richtigkeit hin überprüft werden. Damit eine unidirektionale Strangsynthese mit einem definierten Startpunkt erfolgen kann, wird

pro Sequenzieransatz ein Oligonukleotid eingesetzt. Vom 3'-OH-Ende des gebundenen Oligonukleotids aus beginnend wird ein zur Matrize komplementärer Strang unter Verwendung der vier 2'-Desoxynukleotide (dNTPs) synthetisiert. Parallel dazu erfolgt der Einbau von fluoreszenzmarkierten 2', 3'-Didesoxynukleotiden (ddNTPs) und damit der rein statistische Strangabbruch, da bei den ddNTPs die für die Elongation nötige 3'-OH-Gruppe fehlt. Bei der *dye terminator*-Methode sind die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Somit entstehen unterschiedlich lange fluoreszenzfarbstoffmarkierte DNA-Stücke, die auf einem automatischen Sequenz-Analysengerät untersucht werden können.

Nach der Elongation der Oligonukleotide durch PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase (*cycle sequencing*) wurde die DNA gefällt, in Ladepuffer gelöst und nach der Denaturierung auf die Gelmatrix aufgetragen. Durch Laserabtastung der mit Farbstoff markierten DNA-Fragmente während der Kapillargelelektrophorese im Sequenz-Analysengerät wurde die DNA-Sequenz ermittelt.

Standardansatz: 4 µl *BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix*
 1 µl dsDNA-Plasmid (200-400 ng)
 2,5 µl Sequenzier-*primer* (2 pmol/µl)
 ad 10 µl mit ddH₂O

Cycle sequencing-Programm:

	Denaturierung	<i>Annealing</i>	Extension
Start	96 °C, 2 min 30 s		
Zyklen 1-25	96 °C, 30 s	51 °C, 20 s	60 °C, 4 min
Ende			60 °C, 5 min; dann 4 °C

Nach Beendigung der PCR wurden 90 µl ddH₂O zugegeben, die DNA für 10 min bei 4 °C mit 2,5 Volumen 100 % Ethanol gefällt und für 20 min bei Raumtemperatur und 15 800 g zentrifugiert. Das DNA-Pellet des Sequenzieransatzes wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in der *speed vac* getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 11 µl *Template Suppression Reagent* (ABI) gelöst, für 2 min bei 90 °C denaturiert, kurz auf Eis inkubiert und in den Probenwechsler des Sequenzers gestellt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillargelelektrophorese (POP6 Rapid Polymer, ABI) mit 1 x *Genetic Analysis*

Buffer (ABI) für 36 min bei 50 °C und 15 kV. Die Sequenzierungen wurden von Frau S. Gierschik durchgeführt.

3.2.12 Autoradiographie

Autoradiographie ist der indirekte Nachweis radioaktiver Substanzen durch Exposition von Röntgenfilmen. Der Röntgenfilm wird v. a. von β - und γ -Strahlen geschwärzt, wobei die Schwärzung von der Intensität der Strahlung und der Expositionszeit abhängig ist. Dieser Effekt kann durch Verwendung von Verstärkerfolien gesteigert werden, da diese Folien auf ihrer Oberfläche phosphoreszierende Stoffe enthalten, die radioaktive Strahlung in Licht umwandeln. Da Röntgenfilme gegenüber Licht empfindlicher sind als gegenüber radioaktiver Strahlung, kommt es zu einer Empfindlichkeitssteigerung des Nachweises. Eine Exposition bei -80 °C erhöht die Empfindlichkeit des Röntgenfilmes zusätzlich.

Die Röntgenfilme wurden manuell wie folgt entwickelt:

2-3 min Adefo RTU60 Entwickler -Lösung

Waschen mit H₂O

1-3 min Adefo RTU60 Fixierlösung

Danach wurde der Film mit ddH₂O gewaschen und luftgetrocknet.

3.3 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

3.3.1 Kultivierung von Insektenzellen

3.3.1.1 Medien

Für die Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Zellen wurden Medien verwendet, die von den Firmen PAN™Biotech GmbH, Aidenbach und Sigma, Deisenhofen bezogen wurden. Dem Medium mussten teilweise noch FCS und Antibiotika zugesetzt werden.

Medium für die Kultivierung von adhärenen Sf9-Insektenzellen

500 ml TNM-FH-Insect-Medium (Sigma)

50 ml fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert, steril filtriert)

500 μ l Gentamicin (50 mg/ml)

Medium für die Kultivierung von Suspensionskultur

- TNM-FH-Medium (von PAN, enthält bereits 10 % FCS) für *Sf9*-Zellen versetzt mit
- 2 ml Pluronic F-68[®] (10 % m/V) auf 100 ml Medium
- 1 ml Fungizone[®] (250 µg/ml) auf 100 ml Medium

3.3.1.2 Kultivierung von Insektenzellen

Für die adhärente Kultur wurden *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*)-Zellen in 15 ml TNM-FH-Medium bei 27 °C in 75 cm²-Kulturflaschen (Renner, Dannstadt) kultiviert. Wenn die Zellen konfluent gewachsen waren (*ca.* 2×10^7 Zellen/Flasche), wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen anschließend vom Boden der Kulturflaschen mit frischem Medium abgespült. In Abhängigkeit von der Zelldichte wurden die Zellen 1:2 bzw. 1:3 verdünnt und in neue Kulturflaschen überführt. Für die Suspensionskultur wurde von 7-10 konfluent gewachsenen Kulturschalen mit *Sf9*-Zellen das Medium abgesaugt, die Zellen mit frischem Medium abgelöst und in einen sterilen Fernbachkolben überführt. Die Zellzahl pro ml wurde durch Auszählen eines mit Trypanblau-Lösung (0,5 % in 0,85 %iger NaCl-Lösung) verdünnten Aliquots mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Sie betrug im günstigsten Fall 2×10^6 Zellen/ml (das entspricht 800×10^6 Zellen in 400 ml Medium), mindestens jedoch $0,5 \times 10^6$ und maximal $3,5 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Zellen wurden bei Bedarf durch Zugabe von neuem Medium verdünnt. Der Fernbachkolben wurde bei 27 °C und 80 Upm geschüttelt. Die Generationszeit der Zellen betrug unter diesen Umständen ungefähr 48 h.

3.3.2 Kultivierung von Säugerzellen

3.3.2.1 Medien

Für die Kultivierung von COS-7 (*Monkey African green kidney*)-Zellen wurde DMEM-Medium (ohne Natriumpyruvat, mit 4 500 mg/l Glucose, mit L-Glutamin) verwendet, das von der Firma Gibco Invitrogen, Karlsruhe bezogen wurde. Dem Medium wurden 10 % FCS (*fetal calf serum*), 2 mM L-Glutamin, sowie eine Lösung aus 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Auf den Zusatz von Natriumpyruvat und HEPES-Puffer wurde verzichtet, da diese Komponenten keinen Einfluß auf das Zellwachstum hatten.

3.3.2.2 Kultivierung von Säugerzellen

Die adhärenenten COS-7-Zellen wurden in 10 ml DMEM-Medium bei 37 °C in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre und 10 % CO₂ in 10 cm Kulturschalen (Renner, Dannstadt) kultiviert. Die konfluent gewachsenen Zellen (ca. 4 x 10⁶ Zellen/Schale) wurden mit 5 ml sterilem 1x CMF-PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min im Brutschrank von der Kulturschale abgelöst (trypsinisiert). Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 8 ml Medium gestoppt, die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt und die Zellen für 5 min bei 173 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Medium resuspendiert. 0,5 ml Zellsuspension wurden anschließend in eine neue Kulturschale ausgesät und mit 9,5 ml frischem Medium aufgefüllt.

10 x CMF-PBS: 27 mM KCl, 81 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 14,7 mM KH₂PO₄,
1,4 M NaCl

Trypsin/EDTA-Lösung (PAA): 0,05 %/ 0,02 % (m/V) in PBS, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

3.4 Proteinexpression in Insektenzellen

Für die Expression von Proteinen in Insektenzellen wurde das Baculovirus-Expressionssystem (Pharmingen) verwendet. In diesem eukaryontischen Expressionssystem sind die meisten posttranslationalen Modifikationen der rekombinant exprimierten Proteine wie Acylierungen, Phosphorylierungen und Methylierungen möglich. Bei der Baculovirus-DNA handelt es sich um eine modifizierte Form der DNA des *Autographa californica nuclear polyhedrosis viruses* (AcNPV), die eine letale Deletion enthält. Durch homologe Rekombination mit einem entsprechenden Transfervektor (z.B. pVL1392 oder pVL1393) kann diese Deletion kompensiert werden. Die Baculovirus-Transfervektoren besitzen zudem einen starken Promotor für das viruseigene Polyhedringen, das in der modifizierten Baculovirus-DNA deletiert ist. Nach erfolgreicher Rekombination kontrolliert dieser, der inklonierten cDNA vorgeschaltete, Polyhedrinpromotor die Expression der rekombinanten Proteine.

3.4.1 Transfektion

Die Insektenzellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode nach Graham und van der Eb (1973) transfiziert. Von frisch umgesetzten, zu 60 % konfluent gewachsenen

Insektenzellen (*ca.* 4×10^6 Zellen pro 25 cm²-Kulturflasche) wurde nach maximal 30 min das Medium abgesaugt und durch 750 µl frisches Medium für die Kultivierung von adhären Zellen ersetzt. Der Transfektionsansatz bestand aus 10 µg rekombinanter Transfervektor-DNA und 0,5 µg Baculogold™ Baculovirus DNA, welche vor der Zugabe von 750 µl Transfektionspuffer für 5 min bei RT inkubiert wurden. Danach wurde der Ansatz gemischt und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Durch die Zugabe von Calciumchlorid zu dem phosphatgepufferten Zellkulturmedium entsteht ein Calciumphosphatpräzipitat mit darin eingeschlossener DNA, das auf die Zellen absinkt und von diesen durch Endozytose aufgenommen wird. Nach Inkubation für 4 h bei 27 °C wurde der Überstand abgenommen und 4 ml frisches Medium zupipettiert. Die Zellen wurden 4 Tage bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium, das die rekombinanten Viren enthielt, abgenommen und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Vor einer Infektion von Insektenzellen zur Proteinexpression musste der Virustiter durch mindestens drei Amplifikationen erhöht werden.

Transfektionspuffer: 25 mM HEPES/NaOH pH 7,1, 125 mM NaCl, 125 mM CaCl₂

3.4.2 Amplifikation der Baculoviren

Für die Amplifikation der Viren wurden $6,5 \times 10^6$ Zellen (das entspricht 60 % konfluenten Zellen) in eine 10 cm-Kulturschale (Renner, Dannstadt) ausgesät. Nach dem Absetzen der Zellen (*ca.* 30 min) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Virusüberstand für 1 h bei 27 °C stehen gelassen. Anschließend wurden 10-13 ml Medium zugegeben und die Zellen für mindestens 2 Tage bei 27 °C inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, abgelöste Zellen abzentrifugiert (250 g) und der Überstand (Viruslösung) bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.4.3 Infektion von Insektenzellen

Die Infektion erfolgte analog zur Amplifikation. Die Virusmenge sowie die Dauer der Infektion für eine optimale Expression des rekombinanten Proteins wurde anhand der Proteinmenge auf SDS-Polyacrylamidgelen bestimmt. Gleiches galt für das Verhältnis der Virusmengen bei Koinfektionen. Das Volumen der eingesetzten Viruslösungen lag zwischen 0,4 und 1 ml pro 10 cm-Kulturschale. Die Infektion erfolgte 2 Tage. Um größere

Proteinmengen zu produzieren, wurden Suspensionskulturen von Insektenszellen infiziert. Die Zellen ($8-10 \times 10^8$) wurden mit 250 g für 5 min abzentrifugiert und in 20 ml Medium und 30 ml Virussuspension in einem sterilem 50 ml-Röhrchen resuspendiert. Nach Inkubation bei 27 °C für 1 h wurden die Zellen in einen sterilen Fernbachkolben überführt und mit 350 ml frischem Medium auf eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml verdünnt.

3.4.4 Proteinpräparation der Kinase mGRK6-C, sowie der Mutanten der mGRK6-C

Nachdem *Sf9*-Zellen mit Baculoviren infiziert wurden, welche für mGRK6-C oder die Mutanten mGRK6-C/N⁻C⁺, mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ kodierten, wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen von den Kulturschalen oder -flaschen abgespült und in 15 bzw. 50 ml Röhrchen bei 250 g abzentrifugiert. Der Überstand aus Amplifikationskulturen konnte als Viruslösung für weitere Infektionen steril abgenommen und bei 4 °C dunkel gelagert werden. Die nachfolgende Proteinpräparation der mGRK6-C sowie der Mutanten der mGRK6-C wurde im Wesentlichen nach Loudon und Benovic (1994) durchgeführt. Nach der Zentrifugation der Zellen einer 10 cm-Kulturschale, wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet auf Eis überführt und mit 200 µl HE-Puffer, der 250 mM NaCl enthielt, versetzt (bei 150 cm² Kulturflasche entsprechend 400 µl Puffer). Die Zellen wurden resuspendiert und homogenisiert, indem die Zellsuspension mindestens sechsmal durch eine 0.5 x 23 mm (18 gauge) Kanüle auf- und abgezogen wurde. Zelltrümmer und nicht lysierte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 323 g, 4 °C und 1 min abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals für 30 min bei 300 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde abgenommen und in 20 µl Portionen aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Im Falle von Suspensionskulturen erfolgte der Zellaufschluß mit Hilfe von Ultraschall. Dazu wurden die Zellen zunächst in 50 ml Röhrchen überführt und bei 250 g abzentrifugiert. Nach dem Waschen der Zellen mit kaltem CMF-PBS wurden die Zellen auf Eis mit HE-Puffer, der 250 mM NaCl enthielt, versetzt (ca. 1 ml Puffer pro 2×10^7 Zellen). Die Zellsuspension wurde dreimal für 20 s durch Ultraschall homogenisiert und zwischen den Aufschlußphasen 1 min lang auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 30 min bei 40 000 g und 4 °C wurden Zelltrümmer und Zellorganellen abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals für 30 min bei 300 000 g und

4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand für spätere säulenchromatographische Auftrennungen in ein 50 ml Röhrchen überführt, ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

HE-Puffer: 20 mM HEPES pH 7,5, 10 mM EDTA pH 7,5, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 20 µg/ml Leupeptin, 200 µg/ml Benzamidin

3.4.5 Proteinpräparation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren/*Sf9*-Membranpräparation und Solubilisierung

Im Rahmen der Solubilisierungsversuche wurden *Sf9* Zellen mit Baculoviren infiziert, welche für verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kodierten. Die Proteinpräparation der Rezeptoren und die anschließende Solubilisierung der Membranproteine erfolgte im Wesentlichen nach einem Protokoll von Ohtaki *et al.*, (1998). Zur Ernte wurden die Zellen von den Kulturschalen abgespült und in 15 ml Röhrchen bei 250 g abzentrifugiert. Die mit Viren für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren infizierten Insektenzellen wurden nach der Ernte in 600 µl Lysepuffer pro 10 cm-Kulturschale resuspendiert und homogenisiert, indem die Zellsuspension mindestens sechsmal durch eine 0,5 x 23 mm (18 gauge) Kanüle auf- und abgezogen wurde. Zelltrümmer und nicht lysierte Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 700 g und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und 60 min bei 100 000 g und 4 °C zentrifugiert, um die partikuläre Fraktion (Pellet) von der löslichen (Überstand) zu trennen. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in einem definierten Volumen Lysepuffer resuspendiert. Zur Solubilisierung der Membranproteine wurde das resuspendierte Pellet zusätzlich noch mit 1 % Digitonin und 0,4 % Natrium-Cholat (Rinken *et al.*, 1994) versetzt. Anschließend wurde die Probe bei 4 °C durch „über-Kopf-Rotation“ ca. 16 h lang inkubiert. Erneut wurde der Ansatz für 60 min bei 100 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die darin enthaltenen solubilisierten Rezeptorproteine durch Immunpräzipitation mit Protein G-Agarose und einem spezifischen Antikörper selektiv gebunden.

Lysepuffer : 10 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA pH 7,5, 0,5 mM PMSF, 10 µg/ml Pepstatin, 20 µg/ml Leupeptin

3.4.5.1 Immunpräzipitation der solubilisierten Rezeptorproteine

Nach der Solubilisierung membranärer Rezeptorproteine aus Sf9-Zellen, konnten die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die am aminoterminalen Abschnitt mit einem Hamagglutinin (HA)-tag versehen waren, mit einem gegen diesen HA-tag gerichteten Antikörper immunpräzipitiert werden. Dazu wurden 40 µl Protein G-Agarose (Roche, Penzberg) dreimal mit 500 µl Lysepuffer (siehe 3.4.5) gewaschen. Anschließend wurde die Protein G-Agarose mit 300 µl Lysepuffer und mit 100 µl des monoklonalen HA-Antikörpers 12CA5 (Boehringer) für mindestens 2 Stunden bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert, um den Antikörper mit seinem Fc-Teil an die Protein G-Agarose zu binden. Der Antikörper/Protein G-Agarosekomplex wurde durch Zentrifugation für 1 min bei 2 000 g und 4 °C pelletiert, dreimal mit Lysepuffer gewaschen und anschließend zusammen mit dem 100 000 g Überstand, welcher die solubilisierten Rezeptorproteine enthielt, für mindestens 2 Stunden bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert. Die mit Rezeptor/Antikörper-Komplex beladene Protein G-Agarose wurde danach durch Zentrifugation (2 000 g, 4 °C, 1 min) pelletiert und das Pellet dreimal mit Lysepuffer gewaschen. Ein Aliquot der Agarose wurde in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine auf Nitrozellulose transferiert und das immunpräzipitierte Rezeptorprotein mit einem entsprechenden Antikörper detektiert.

3.5 Proteinexpression in Säugetierzellen

3.5.1 Transfektion von Säugerzellen

Die COS-7-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz PolyFect[®] von der Firma Qiagen transfiziert. Bei diesem Transfektionsreagenz handelt es sich um sphärische Moleküle, deren Verzweigungen von einem Zentrum ausgehen und geladene Aminogruppen am Ende tragen. Aufgrund der positiven Ladung des PolyFect-Moleküls wird die Interaktion mit negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren ermöglicht. Der Transport des PolyFect-DNA-Komplexes erfolgt mittels Endocytose ins Zellinnere. Für die Transfektion wurden 8×10^4 Zellen/Vertiefung in eine 24 Loch-Platte (2×10^5 Zellen/Vertiefung auf eine 6 Loch-Platte) ausgesät. Am nächsten Tag wurden pro Vertiefung ca. 0,6 µg Plasmid-DNA (bzw. 1,5 µg DNA/Vertiefung der 6 Loch-Platte) mit 60 µl (100 µl) DMEM-Medium gemischt, welches kein Serum und kein Antibiotikum enthielt. Zu diesem Ansatz wurden 6

μl (10 μl) PolyFect[®] hinzu gegeben. Der Ansatz wurde anschließend *ca.* 10 s lang durch Vortexen gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die am Vortag ausgesäten Zellen mit 400 μl (1,5 ml) DMEM-Vollmedium pro Vertiefung versetzt. Nach Ablauf der 10 min Inkubationszeit wurden zu dem DNA-Reaktionsansatz 350 μl (600 μl /Vertiefung) DMEM-Vollmedium gegeben, durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt und auf die Zellen pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden (5 Stunden) im Brutschrank bei 37 °C, mit 10 % CO₂ und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre.

3.6 Methoden zur Untersuchung der Rezeptoraktivierung

3.6.1 Luziferase-Assay

Um die Aktivierung des *serum response*-Faktors (SRF) zu messen, wurde das *Dual-Luciferase Report Assay System* (Promega, Madison) verwendet. Dieses System beruht auf der Kotransfektion der Zellen mit den zwei Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK. pSRE.L trägt die cDNA der Luziferase des amerikanischen Glühwürmchens *Photinus pyralis* (*firefly*-Luziferase). Die *firefly*-Luziferase steht unter der Kontrolle des transkriptionellen Regulatorelements SRE.L. Dies ist ein Derivat des *serum response element* (SRE) von *c-fos*. SRE wurde so modifiziert, dass es nur den Transkriptionsfaktor SRF, aber nicht den *ternary complex factor* (TCF) binden kann. Die Transkription der *firefly*-Luziferase-cDNA wird somit durch die Bindung von SRF an den Promotor des Reporterplasmids induziert. Die Produktion der *firefly*-Luziferase ist dadurch ein Maß für die Aktivität des SRF. Das zweite Reporterplasmid, pRL-TK, trägt die cDNA der Luziferase der Koralle *Renilla reniformis* (*Renilla*-Luziferase), welches unter der Kontrolle des Promotors des *Herpes-simplex*-Virus-Thymidinkinasegens (HSV-TK) steht. Die *Renilla*-Luziferase wird konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert. Die Bestimmung der Aktivität der Reportergerneprodukte erfolgte nach den vom Hersteller des Assaysystems gemachten Angaben. Es wurde zunächst die Aktivität der *firefly*-Luziferase durch Zugabe des Substrats (*Luziferase Assay Reagent II*) ermittelt. Diese Reaktion wurde durch Zugabe des *Stop&Glo*-Reagenz gestoppt. Das *Stop&Glo*-Reagenz enthält auch das Substrat der *Renilla*-Luziferase, dadurch konnte im direkten Anschluss die *Renilla*-Luziferase-Aktivität bestimmt werden. Die *Renilla*-Luziferase-Aktivität ist ein Maß für die

Transfektionseffizienz. Die für die *firefly*-Luziferase-Aktivität ermittelten Werte wurden anhand der Transfektionseffizienz korrigiert.

Einen Tag vor der Transfektion wurden 8×10^4 COS-7-Zellen pro Vertiefung einer 24 Loch-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre und 10 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit dem gewünschten rekombinanten Plasmid, dem Luziferase-Reporterplasmid (*firefly*) und dem Kontroll-Reporterplasmid (*Renilla*) kotransfiziert. Das Verhältnis Reporterplasmid zu rekombinantem Plasmid war dabei 1:10. Die Transfektion wurde mit dem Transfektionsreagenz PolyFect[®] (Qiagen) analog zu 3.5.1 durchgeführt. Die Gesamtmenge der transfizierten DNA betrug 0,6-0,8 µg/Vertiefung. Um die DNA-Menge konstant zu halten wurde, falls erforderlich, mit dem entsprechenden leeren Expressionsvektor kotransfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1 x CMF-PBS gewaschen und mit 60 µl des 1 x Lysispuffers (*Passive Lysis Buffer*) des *Dual-Luciferase Report Assay System* (Promega, Madison) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT auf der Wippe, wurden die lysierten Zellen in Eppendorfgefäße überführt und für 10 min zentrifugiert (15 800 g, RT). Die Messung der Reporterogenaktivität erfolgte mit Hilfe des Multilabel Readers Mithras (Berthold Technologies, Bad Wildbad). Dazu wurden 10 µl des Zellextraktes mit 50 µl *Dual-Luciferase*[®] Lösung LARII versetzt. Nach der Bestimmung der *firefly*-Luziferase-Aktivität wurde durch Zugabe von 25 µl Stop & Glo[®]-Reagenz zum Ansatz die Reaktion abgestoppt und stattdessen die Enzymaktivität der *Renilla*-Luziferase bestimmt. Von allen Proben wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 3.0.

3.6.2 Messung von Inositphosphaten in COS-7-Zellen

Durch Stimulation der PLC- β -Isoenzyme wird das Substrat Phosphatidylinosit 4,5-bisphosphat (PtdInsP₂) in die *second messenger*-Produkte D-*myo*-Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacyl-*sn*-glycerin (DAG) gespalten. Durch weitere hydrolytische Spaltungen wird aus IP₃ schließlich IP₂ und IP gebildet. Die durch Aktivierung der Phospholipase C- β -Isoenzyme entstandenen Inositphosphate wurden mittels Anionenaustauschchromatographie in Anlehnung an eine Arbeit von Offermanns und

Simon (1995) analysiert. Für die Messung der Inositphosphate wurden 2×10^5 COS-7-Zellen pro Vertiefung einer 6 Loch-Platte ausgesät und bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 10% CO_2 über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit jeweils $1,5\text{ }\mu\text{g}$ rekombinanter Plasmid-DNA und dem Transfektionsreagenz PolyFect[®] transfiziert (siehe 3.5.1). Danach wurden die Zellen für 5 Stunden bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 10% CO_2 inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte die radioaktive Markierung der Zellen. Dazu wurde das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen jeweils mit 2 ml eines Inositol-freien DMEM-Mediums, welches 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin sowie 3 $\mu\text{Ci/ml}$ D-*myo*-[2-³H] Inositol enthielt, versetzt. Die Zellen wurden für weitere 17 Stunden bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 10% CO_2 inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit vorgewärmtem sterilem 1 x CMF-PBS gewaschen. Zur Stabilisierung der Inositphosphate wurden die Zellen anschließend mit 1 ml Inositol-freiem DMEM-Medium (2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin) und 10 μl einer 1 M LiCl-Lösung für mindestens 1 Stunde bei Standardbedingungen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit vorgewärmtem 1 x CMF-PBS gewaschen und durch Zugabe von 800 μl eiskalter 10 mM Ameisensäure pro Vertiefung für 1 Stunde auf Eis lysiert. Die Lyse wurde durch Zusatz von 1,8 ml 10 mM Ammoniak-Lösung pro Vertiefung beendet und ein definiertes Volumen der Überstände (2,4 ml) auf mit Dowex-Harz (0,8 ml) gepackte Säulen gegeben. Die Säulen wurden mit je 3 ml ddH₂O gewaschen und die nicht gebundenen Bestandteile in Abfallgefäßen gesammelt. Anschließend wurde das Diacylglycerin mit 3 ml einer 60 mM Natriumformiat/5 mM Natriumtetraborat-Lösung von den Säulen eluiert und verworfen. Die Elution der Inositphosphate, die aufgrund von elektrostatischen Anziehungskräften an das positiv geladene Harz gebunden hatten, erfolgte durch Zugabe von 3 ml 1 M Ammoniumformiat/0,1 M Ameisensäure-Lösung in vorbereitete Szintillationsgefäße, die zuvor mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A von Zinser Analytic) versetzt worden waren. Die Radioaktivität wurde mittels eines Flüssigszintillationszählers (LSC 2200 CA) von der Firma Packard gemessen.

DMEM-Medium (Inositol-frei): 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin

D-*myo*-[2-³H] Inositol: 25 Ci/mmol

3.6.2.1 Regeneration des Dowex-Harzes

Zur Regeneration des Dowex-Harzes wurden zunächst 9 ml 2 M Ammoniumformiat/0,1 M Ameisensäure auf die Säulen gegeben. Anschließend wurden die Säulen zur Neutralisation mit 10 ml ddH₂O gewaschen. Bis zur Wiederverwendung wurden die Säulen verschlossen und befüllt mit 3 ml ddH₂O gelagert.

3.6.2.2 Präparation der Anionenaustauschmatrix

Um die Bindung von Inositphosphaten an das Dowex-Harz zu ermöglichen, musste dieses von der Chlorid-Form in die Formiat-Form überführt werden. Dazu wurden 150 ml Dowex-1 Harz (ClForm) in 500 ml 1 N NaOH für eine Stunde bei RT inkubiert, wobei die basische Lösung mit einem Glasstab alle 5 Minuten gerührt wurde. Nach der Sedimentation der gelb-orangen Matrix wurde der Überstand dekantiert und erneut mit 500 ml 1 N NaOH Lösung versetzt. Wiederum wurde die Matrix eine Stunde lang mit der basischen Lösung inkubiert und alle 5 Minuten durch Rühren gemischt. Nach der Sedimentation wurde der Überstand dekantiert und zur Neutralisation 500 ml 1 M Ameisensäure auf die Matrix gegeben. Während der nun folgenden Inkubation für eine Stunde unter Rühren konnte ein Farbumschlag des Harzes von orange-gelb zu weiß beobachtet werden. Nach der Sedimentation wurde der Überstand dekantiert und das Harz dreimal mit ddH₂O gewaschen. Die präparierte Matrix wurde anschließend in 150 ml ddH₂O aufgenommen und entweder direkt zur Befüllung der Säulen verwendet oder bei 4 °C gelagert.

3.7 Proteinbiochemie

3.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach der Methode von Bradford (1976) wurden alle Werte durch Doppelbestimmung ermittelt. Zur Erstellung einer Eichgerade wurden 0, 10, 20, 30 und 40 µl (entsprechend 0, 3,4, 6,8, 10,2 und 13,6 µg Protein) einer Proteinstandardslösung (0,34 mg/ml Rinder-IgG) eingesetzt. Von den zu messenden Proben wurden jeweils 30 µl einer geeigneten Verdünnung (bei 300 000 g-Überständen der *Sf9*-Fernbachkolben eine 1:40-Verdünnung) eingesetzt. Die Proben wurden mit ddH₂O auf 800 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 200 µl Bradfordreagenz gemischt. Die Extinktion

wurde bei 595 nm bestimmt und die Proteinkonzentration der Probe durch lineare Regression der Eichgerade mittels des *PG Prot*-Computerprogramms ermittelt.

Bradfordreagenz: 0,04 % (m/V) Coomassie Brilliantblau G 250, 21 % (V/V) Ethanol, 42,5 % (V/V) ortho-Phosphorsäure

Zur Herstellung des Bradfordreagenz wurde ein 1 l-Glasgefäß und ein Magnetrührstab mit 85 %iger H_3PO_4 gespült und mit ddH₂O gewaschen. Das Coomassie-Brilliantblau wurde im Glasgefäß in dem entsprechenden Volumen Ethanol gelöst. Nach Zugabe der Phosphorsäure wurde die Lösung für weitere 60 min gerührt, mit ddH₂O auf das Endvolumen aufgefüllt und anschließend über einen Faltenfilter abfiltriert und bei 4 °C gelagert.

3.7.2 Proteinbestimmung mit Hilfe eines BSA-Proteinstandards

Die zuvor beschriebene Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Messung der Extinktion des Protein-Farbstoff-Komplexes bei 595 nm. Dabei liegt das im Bradford-Reagenz enthaltene Farbstoff-Molekül Coomassie-Brilliantblau G250 im ungebundenen Zustand in drei verschiedenen Absorptionsformen vor, die durch sukzessives Protonieren der Sulfatgruppe des Moleküls entstehen. Im protonierten Zustand (Kation) weist der Farbstoff eine rotbraune Farbe auf und wird bei einer Wellenlänge von 470 nm detektiert. Die blaue, anionische Form hingegen hat eine Wellenlänge von 595 nm und das neutrale Molekül weist bei 650 nm eine grüne Farbe auf. Unter sauren Bedingungen liegt das Molekül hauptsächlich in der protonierten, kationischen Form vor (470 nm) und wechselt durch Bindung von Proteinen in eine stabile, blaue, anionische Form (595 nm) (Compton & Jones, 1985). Bestimmte Pufferkomponenten, Proteaseinhibitoren und manche Detergenzien können dieses Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Ladungszuständen beeinflussen und somit die Extinktion verändern (Bio-Rad, Instruction Manual, Quick Start™ Bradford Protein Assay; Simpson, A laboratory manual, 2004). Zu diesen Substanzen zählen auch HEPES, EDTA, DTT und PMSF, welche bei der Proteinpräparation und bei der Aufreinigung der Rezeptorkinase mGRK6-C verwendet wurden. Um die Proteinmenge der sequentiell aufgereinigten Rezeptorkinasen möglichst genau zu bestimmen, wurde ein Kontrollgel mit Hilfe eines BSA-Proteinstandards angefertigt. Dazu wurde aus Rinderserumalbumin (Fraktion V, Serva) eine Stammlösung

mit 10 mg/ml BSA hergestellt. Durch weiteres Verdünnen dieser Lösung konnten schließlich Konzentrationen von 1-5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hergestellt und zusammen mit einem Aliquot der mGRK6-C-Probe auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach Größe aufgetrennt werden. Im Anschluß an die Coomassie-Färbung konnten die 67 kDa großen Proteinbanden der unterschiedlichen BSA-Konzentrationen mit der Proteinbande der gereinigten mGRK6-C verglichen und somit die Proteinkonzentration der Kinase ermittelt werden.

3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurden zwei Vertikalapparaturen verwendet: zum einen das Hoefer-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) mit 16 x 18 cm großen Glasplatten und 1,5 mm dicken Abstandshaltern für große Gele und zum anderen das Sigma-System (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) mit 8 x 10 cm großen Glasplatten und 1 mm dicken Abstandshaltern für kleine Gele. Zuerst wurde die Trenngellösung zwischen die Glasplatten gegossen.

Trenngellösung:	Prozent (m/V) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	10 %
	Monomerlösung	11 ml
	Trenngelpuffer	8,25 ml
	H ₂ O	13 ml
	10 % (m/V) SDS	330 μl
	10 % (m/V) APS	330 μl
	TEMED	20 μl

Vor der Zugabe von SDS, APS und TEMED wurde die Lösung kurz entgast. Die angegebene Menge von *ca.* 33 ml war für ein großes Gel oder vier kleine Gele ausreichend. Die Trenngellösung wurde mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und der Kamm eingesetzt.

Sammelgellösung:	Prozent (m/V) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	6 %
	Monomerlösung	2 ml
	Sammelgelpuffer	2,5 ml
	H ₂ O	5,3 ml
	10 % (m/V) SDS	100 µl
	10 % (m/V) APS	100 µl
	TEMED	10 µl

Die angegebene Menge von *ca.* 10 ml war für ein großes Gel oder vier kleine Gele ausreichend. Die Proteinproben sowie die Markerproteinlösung wurden mit gleichen Volumina 2 x Probenpuffer versetzt und mit einer 100 µl Hamilton Spritze in die mit 1 x Tankpuffer gespülten Geltaschen geladen. Große Gele wurden „trocken“-geladen, d.h. die Taschen wurden mit Tankpuffer ausgespült und wieder entleert, bevor die mit Probenpuffer versetzten Proteinproben aufs Gel geladen wurden. Anschliessend wurden die Taschen mit 1 x Tankpuffer aufgefüllt, sodass eine ebene Fläche entstehen konnte. Die Elektrophorese wurde in 1 x Tankpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 45 mA für ein großes Gel (90 mA bei zwei Gelen) oder bei konstanter Spannung von 105 V für kleine Gele durchgeführt. Die Auftrennung wurde beendet, wenn der Farbmarker das Ende des Geles erreicht hatte.

Monomerlösung: 30% (m/V)-Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)-Fertiglösung

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8

90,75 g Tris wurden in 400 ml ddH₂O gelöst, der pH mit *ca.* 16 ml konz. HCl auf 8,8 eingestellt, mit ddH₂O auf 500 ml aufgefüllt und die Lösung über einen 0,45 µm Filter filtriert.

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8

12 g Tris wurden in 160 ml ddH₂O gelöst, der pH mit *ca.* 9 ml konz. HCl auf 6,8 eingestellt, mit ddH₂O auf 200 ml aufgefüllt und die Lösung über einen 0,45 µm Filter filtriert.

10 x Tankpuffer: 250 mM Tris, 1,9 M Glycin

1 x Tankpuffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1% (m/V) SDS pH 8,6

2 x Probenpuffer: 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % (m/V) SDS, 20 % (V/V) Glycerin, 10 % (V/V) β -Mercaptoethanol, 0,002 % (m/V) PyroninY

3.7.4 Färbung von Polyacrylamidgelen

3.7.4.1 Coomassie-Brilliantblau-Färbung

Nach der Gelelektrophorese wurde das Trenngel in einer Schale mit 200 ml Färbelösung für 30 min bei 60 °C im Schüttelbad inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel in Entfärber überführt und so lange bei 60 °C inkubiert, bis sich die gefärbten Proteinbanden deutlich vom entfärbten Hintergrund abhoben. Nach 30 min wurde die Entfärbelösung gewechselt.

Färbelösung: 0,14 % (m/V) Coomassie Brilliantblau R 250, 50 % (V/V) Methanol, 10 % (V/V) Essigsäure

Entfärber: 10 % (V/V) Methanol, 10 % (V/V) Essigsäure

3.7.4.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde gemäß des Protokoll „Silver Staining with PlusOne Staining Kit Protein“ (Amersham Bioscience) durchgeführt. Dabei wurden die zu verwendenden Puffer, ebenfalls laut Protokoll, aus analysenreinen Chemikalien hergestellt. Die Konzentrationsangaben der Lösungen stammen aus dem Originalprotokoll des Herstellers. Die folgenden Schritte wurden alle mit einem Flüssigkeitsvolumen von 250 ml auf dem Schüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel 2 mal für je 15 min mit Hilfe der Fixierlösung fixiert und anschliessend für 30 min im sogenannten „Sensitizing“ inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit ddH₂O wurde für 20 min die Silberlösung dazugegeben. Durch zwei weitere Waschschritten für je 1 min mit ddH₂O wurde das überschüssige Silbernitrat entfernt. In der Entwicklerlösung wurde das Trenngel nun so lange inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren, der Hintergrund sich aber noch nicht einfärbte. Nach zweimaligem Waschen mit ddH₂O wurde die Reaktion mit 3,65 g/250 ml ddH₂O EDTA gestoppt und das Gel nach drei weiteren Waschschritten für je 5 min mit ddH₂O im Kühlraum bei 4 °C in ddH₂O gelagert.

Fixierlösung: 40 % (V/V) Ethanol, 10 % (V/V) Essigsäure,

- Sensitizing:** 75 ml Ethanol, 10 ml Natriumthiosulphat (5 %), 17 g Natriumacetat in 250 ml ddH₂O
- Silberlösung:** 25 ml Silbernitrat (2,5 %) in 250 ml ddH₂O
- Entwicklerlösung:** 6,25 g Natriumcarbonat, 100 µl Formaldehyd in 250 ml ddH₂O

3.7.5 Trocknen von gefärbten Gelen

Um Gele für längere Zeit aufbewahren zu können, wurden diese mit dem Easy Breeze-System (Hofer-Amersham Pharmacia, Freiburg) getrocknet. Hierzu wurden die Gele über Nacht in 4 % (V/V) Glycerin eingelegt, danach luftblasenfrei zwischen zwei, in warmem Leitungswasser vorgequollener Cellulosefolien in einen Rahmen eingespannt und für ca. 4 Stunden in dem *Gel Dryer* getrocknet.

3.7.6 Immunoblotting von Proteinen (*Western-blot*)

Um Proteine mit spezifisch gegen sie gerichteten Antikörpern nachweisen zu können, musste das Protein bzw. das Proteingemisch zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden anschließend aus dem Gel auf Nitrocellulosemembran transferiert werden.

3.7.6.1 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel und ein Stück Nitrocellulosemembran (Protran) passender Größe mit Transferpuffer getränkt. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt, das Sandwich zwischen zwei Schaumstoffschwämmen und einer Lage Blotpapier GB002 (Schleicher & Schuell, Daßel) in eine Plastikhalterung eingespannt und in die mit Transferpuffer I gefüllte Immunoblot-Transferkammer überführt. Das Gel war der Kathode, die Membran der Anode zugewandt, so daß die negativ geladenen Proteine aus dem Gel zur Membran hinwanderten. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 125 mA und einer Leistung von 2 W für 12 h. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceaurot (0,2% (m/V)) gefärbt. Die Markerbanden wurden markiert und die Membran in ddH₂O entfärbt.

Transferpuffer I: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (V/V) Methanol pH 8,6

Für kleine Gele wurde wahlweise eine zweite, wesentlich schnellere Transfermethode in einer Blotkammer von Amersham Pharmacia (Hofer™ miniVE) eingesetzt. Die eigentliche Blotkammer besteht aus zwei nach aussen abgedichteten Graphitplatten (Anode und Kathode), zwischen denen das Sandwich aus Blotpapier, Gel, Nitrozellulosemembran und Blotpapier mit Hilfe von Schaumstoffschwämmen eingespannt war. Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer II gefüllt, in einen Kühlwassertank gehängt und die Proteine bei konstanter Stromstärke von 400 mA für 1 Stunde 25 min auf die Membran transferiert.

Transferpuffer II: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (V/V) Methanol, 0,1 % (m/V) SDS, pH 8,6

3.7.6.2 Immunchemischer Nachweis transferierter Proteine

Die Membran wurde nach dem Transfer für 1 h in Blotto inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu blockieren. Die nachfolgende Inkubation mit dem in TBS/Tween verdünnten ersten Antikörper wurde für 1 h durchgeführt. Der Antikörperlösung wurde als Konservierungsmittel 0,05 % (m/V) Thimerosal zugesetzt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBS/Tween wurde der zweite, in TBS/Tween 1:1 000 bis 1:2 000 verdünnte Antikörper (Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG) für 30-60 min auf den Blot gegeben und danach dreimal mit TBS/Tween und einmal mit TBS (jeweils für 5 min) gewaschen. Sämtliche Inkubationen wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt. In Abhängigkeit des eingesetzten Antikörpers wurde anstelle von TBS auch PBS verwendet. Der Nachweis der Immunkomplexe erfolgte mit Hilfe des ECL™-Systems durch Inkubation der Membran in einer 1:1-Mischung der jeweiligen Lösungen 1 und 2 für 1-5 min. Die Chemolumineszenzsignale wurden durch Schwärzung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

TBS: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl

PBS: 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl pH 7,5

TBS/Tween: 0,05 % (V/V) Tween 20 in TBS

PBS/Tween: 0,5 % (V/V) Tween 20 in PBS

Blotto: 5 % (m/V) Magermilchpulver in TBS/Tween je nach Antikörper auch in PBS/Tween

3.8 Chromatographische Methoden

Alle säulenchromatographischen Auftrennungen wurden bei 4 °C durchgeführt.

3.8.1 Kationenaustausch-Chromatographie

Zur Anreicherung der in *Sf9*-Insektenzellen rekombinant hergestellten Rezeptorkinasen wurde die Kationenaustausch-Chromatographie an einer SP-Sepharose-Matrix (Amersham Pharmacia) eingesetzt (Loudon & Benovic, 1994). Die dafür verwendeten 5 ml-HiTrap[®]-Säulen und das FPLC- bzw. ÄKTA-System stammten von Amersham Pharmacia, Freiburg. Die Säulen wurden mit HE-Puffer mit 15 % (V/V) NaCl äquilibriert. Um den Salzgehalt der Proben (250 mM NaCl) nach der Poteinpräparation auf 150 mM NaCl zu reduzieren, wurden die 300 000 g Überstände mit HE-Puffer ohne NaCl verdünnt (abhängig von der Expression bis zu 570 mg Gesamtprotein). Anschließend wurden die Proben filtriert (0,45 µm) und auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 1 ml/min und es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt. Die Matrix wurde mit 8 Säulenvolumina gewaschen und die Proteine mit einem 50 ml-Gradient von HE-Puffer mit 50 % (V/V) NaCl eluiert. Die Analyse der Proteine, die in den Fractionen enthaltenen waren, erfolgte durch SDS-PAGE und Immunoblotting oder Coomassie Blau-Färbung.

HE-Puffer: 20 mM HEPES pH 7,5, 10 mM EDTA pH 7,5, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 20 µg/ml Leupeptin, 200 µg/ml Benzamidin

HE-Puffer + 1 M NaCl

3.8.2 Affinitätschromatographie

3.8.2.1 Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose

Die Affinitätschromatographie an der Heparin-Sepharose-Matrix (Amersham Pharmacia) wurde zur weiteren Reinigung der zuvor über Kationenaustausch-Chromatographie

angereicherten Proteine eingesetzt. Die 1 (5) ml-HiTrap[®]-Säule wurde mit Hilfe des FPLC- oder ÄKTA-Systems mit HE-Puffer gewünschter NaCl-Konzentration äquilibriert. Das vorgereinigte Protein (mGRK6-C bzw. Mutanten der mGRK6-C) wurde mit HE-Puffer ohne NaCl verdünnt. Die Salzkonzentration der Probe (mGRK6-C, Mutanten der mGRK6-C) wurde dabei zunächst auf 100 mM NaCl reduziert. Aufgrund des Elutionsverhaltens der mGRK6-C Probe, wurde die Proteinlösung im Rahmen weiterer affinätschromatographischer Aufreinigungen, auf 300 mM NaCl reduziert. Nach dem Auftragen der Probe, wurde die Matrix mit 40 Säulenvolumina (8 Säulenvolumina) gewaschen. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 (1) ml/min. Das Protein wurde mit HE-Puffer mit 1 M NaCl in einem linearen Gradienten von 50 ml (z. B. 0,3-1 M NaCl für mGRK6-C; 0,1-1 M für die Mutanten der mGRK6-C) eluiert. Die Analyse der Proteine, die in den Fraktionen (1 ml) enthalten waren, erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließender Silber- oder Coomassie Blau-Färbung.

3.8.3 Gelfiltration

Um die Salzkonzentration des sequentiell gereinigten, rekombinanten Proteins der mGRK6-C auf 100 mM NaCl zu reduzieren, wurde im Anschluß an die Affinitätschromatographie eine Gelfiltration an der Superdex[™] 75-HiLoad-Säule (prep grade, 26 mm x 60 cm, 320 ml Volumen, FPLC-System) von Amersham Pharmacia durchgeführt. Mit Hilfe dieser Fertigsäule wurde der Salzgehalt von bis zu 4 ml gefilterter (0,45 µm) Probe reduziert. Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei 1 ml/min und es wurden 5 ml-Fractionen gesammelt. Die Säulenmatrix wurde in 20 % (V/V) Ethanol gelagert und vor dem Probenauftrag zunächst mit ddH₂O und anschließend mit 1,5 Säulenvolumina Puffer S äquilibriert. Die Trennung der Proteine wurde nach der Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel durch Coomassie Blau-Färbung bzw. Silberfärbung kontrolliert.

Puffer S: 20 mM HEPES pH 7,5, 10 mM EDTA pH 7,5, 1 mM DTT, 100 mM NaCl

3.9 Bestimmung der Kinaseaktivität von GRKs

Die Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinasen wurde über die Phosphorylierung verschiedener Substrate durch diese Kinasen ermittelt. In Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ überträgt die Kinase die radioaktiv markierte γ -Phosphatgruppe des Adenosintriphosphates auf das Substrat. Das somit radioaktiv markierte, phosphorylierte Substrat kann nach Auftrennung über SDS-PAGE autoradiographisch nachgewiesen werden.

3.9.1 *In vitro*-Bestimmung der Kinaseaktivität von GRKs

3.9.1.1 Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Phosvitin als Substrat

Die Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Phosvitin als Substrat wurde in Anlehnung an Loudon und Benovic (1994) durchgeführt. Phosvitin ist ein *ca.* 45 kD großes saures Protein, das als Substrat für die hGRK6 beschrieben wurde (Loudon & Benovic, 1994). Die zu untersuchende GRK (5-10 μM) wurde in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA pH 7,5 und 3,7 mM MgCl_2 zusammen mit 6,25 μg Phosvitin (Sigma, Deisenhofen) und 1,3 μl ATP-Mix (final 100 μM ATP) für 1 h bei 30 °C in 15 μl Gesamtvolumen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 μl 2 x Probenpuffer (siehe 3.7.3) gestoppt und die Proteine über SDS-PAGE auf einem 10 % Acrylamidgel bei konstanter Stromstärke (105 V) aufgetrennt. Die Exposition des Coomassie-gefärbten Gels mit einem Röntgenfilm erfolgte über Nacht bei -80 °C in einer Filmkassette.

ATP-Mix (für 19 Ansätze): 19 μl 1,5 mM ATP
5 μl $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (10 mCi/ml, > 5000 Ci/mmol)

3.9.1.2 Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Rhodopsin als Substrat

Die Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Rhodopsin als Substrat wurde ebenfalls in Anlehnung an Loudon und Benovic (1994) durchgeführt. Rhodopsin und der ATP-Mix wurden unter Rotlicht zu der Rezeptorkinase und dem Puffer gegeben und die Reaktion anschließend durch Belichtung gestartet.

Reaktionsansatz: 1,5 μl 10 x TEM-Puffer

x μ l	GRK (5-10 μ M)
1 μ l	ROS-Membranen (240 nM, d. h. 1:50 Verdünnung in 50 mM Tris/HCl pH 7,4)
1,3 μ l	ATP-Mix [1 μ l 1,5 mM ATP, 0,3 μ l [γ - ³² P]ATP (10 mCi/ml, > 5000 Ci/mmol)]
ad 15 μ l mit ddH ₂ O	

Die Belichtung erfolgte für 10 min bei 30 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine auf einem 10 % Acrylamidgel bei einer konstanten Spannung von 105 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Coomassie-gefärbte Gel wurde über Nacht mit einem Röntgenfilm bei -80 °C in einer Filmkassette exponiert.

EM-Puffer: 200 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM EDTA pH 7,5 und 37 mM MgCl₂

3.9.1.3 Aktivitätsbestimmung der GRKs mit solubilisierten, immunpräzipitierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren als Substrat

Um zu überprüfen, ob eine spezifische Interaktion zwischen der sequentiell gereinigten mGRK6-C und bestimmten solubilisierten Rezeptoren stattfindet, wurde die Phosphorylierungsaktivität gegenüber dem Rezeptorsubstrat überprüft. Dazu wurden zunächst *Sf9*-Insektenzellen mit Baculoviren infiziert, welche für verschiedene, Hämagglutinin (HA)-gekoppelte, Chemokinrezeptoren kodierten. Nach der Solubilisierung der membranären Rezeptorproteine, wurden diese mit Hilfe des monoklonalen HA-Antikörpers 12CA5 (Boehringer) selektiv an Protein-G-Agarose gebunden. Anschließend erfolgte die Aktivitätsbestimmung der GRKs mit den solubilisierten, immunpräzipitierten Chemokinrezeptoren. Die Pufferbedingungen entsprachen dabei den Bedingungen wie bei der Phosphorylierung von Rhodopsin (siehe 3.9.1.2). Die Chemokinrezeptoren wurden nach Zugabe der Rezeptorkinase mGRK6-C und radioaktiv markiertem [γ -³²P]ATP mit ihren Liganden, den Chemokinen, stimuliert. Die Konzentration der Liganden betrug im Ansatz 200 nM.

Reaktionsansatz:	1,5 μ l	10 x TEM-Puffer
	x μ l	GRK (5-10 μ M)

5 μ l	Protein G-Agarose mit gebundenem, solubilisierten Chemokinrezeptor
1,3 μ l	ATP-Mix [1 μ l 1,5 mM ATP, 0.3 μ l [γ - 32 P]ATP (10 mCi/ml, > 5000 Ci/mmol)]
1,5 μ l	2 μ M Ligand (final 200 nM)
<i>ad</i> 15 μ l mit ddH ₂ O	

Nach Inkubation für 10 min bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μ l 2 x Probenpuffer gestoppt. Die Auftrennung der Proteine und die Autoradiographie erfolgte wie unter 3.8.1.2 beschrieben.

3.10 Untersuchung von GRK-Lipid-Wechselwirkungen

Die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Varianten der mGRK6-C und Phospholipiden wurde in Anlehnung an die von Pronin *et al.* (1998) beschriebenen Methode durchgeführt. Für diese Analyse wurden *Sf9*-Insektenzellen mit Baculoviren infiziert, die für mGRK6-C sowie für die verschiedenen Mutanten der mGRK6-C kodierte. Anschließend wurden die exprimierten, rekombinanten Proteine der einzelnen Rezeptorkinasen säulenchromatographisch gereinigt und in die Analyse (siehe 3.7) eingesetzt.

3.10.1 Herstellung von Lipidvesikeln

Zur Herstellung von Phospholipidvesikeln wurden L- α -Phosphatidylcholin (PtdCho), L- α -Phosphatidylserin (PtdSer) und Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdInsP₂) verwendet. Alle Lipide wurden in Chloroform gelöst, PtdCho und PtdSer in einer Konzentration von 10 mg/ml, PtdInsP₂ mit 5 mg/ml, und bei 4 °C dunkel gelagert. Als Grundsubstanz für die Vesikel diente PtdCho, dem entweder 5 % (m/V) PtdSer oder 5 % (m/V) PtdInsP₂ zugesetzt wurde. Um die verschiedenen Vesikel herzustellen, wurden die in Chloroform gelösten Phospholipide in einem Glasröhrchen gemischt und unter Stickstoff-Atmosphäre eingedampft. Das Pellet wurde in Vesikel-Puffer aufgenommen. Zur Bildung der Phospholipidvesikel wurde die Suspension 30 min bei RT gut gemischt und anschließend für 15 min im Ultraschallbad behandelt.

Vesikel-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA pH 8,0

3.10.2 Bindungsexperiment an Lipidvesikel

Um die Bindung der verschiedenen mGRK6-C-Varianten an Phospholipide zu untersuchen, wurden *ca.* 3 bis 10 pmol der jeweiligen Kinase ohne und mit frisch hergestellten Phospholipidvesikeln (0,017, 0,17, 1,7 und 10 mg Phospholipid pro ml) in Inkubationspuffer in einem Gesamtvolumen von 30 μ l für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 25 min mit 100 000 *g* bei 4 °C wurden die Ansätze in eine lösliche (Überstand) und eine lipidhaltige, partikuläre Fraktion (Pellet) separiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 30 μ l Inkubationspuffer resuspendiert. Jeweils 15 μ l der löslichen und partikulären Fraktion wurden mit 2 x Probenpuffer versetzt und die Proteine auf einem 10 % Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Über *Western blot* (siehe 3.6.5) wurde die Verteilung der Mutanten der mGRK6 in den verschiedenen Fraktionen analysiert.

Inkubationspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl

4 Ergebnisse

4.1 Reindarstellung des rekombinanten mGRK6-C-Proteins

4.1.1 Expression und Reinigung von mGRK6-C

In unserer Arbeitsgruppe wurden die cDNAs von vier Spleißvarianten der GRK6 der Maus isoliert, welche für mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C und mGRK6-D kodieren. Die von den Spleißvarianten kodierten Proteine stimmen in der Aminosäuresequenz des aminoterminalen Bereichs und der katalytischen Domäne überein, unterscheiden sich jedoch in der Länge und im Aufbau des carboxylterminalen Abschnitts. So befinden sich im carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-A Cysteine, die posttranslational palmitoyliert werden können, während mGRK6-B in diesem Abschnitt basische Aminosäuren aufweist. Sowohl die Cysteine als auch die basischen Aminosäuren vermitteln in den beiden mGRK6-Varianten sehr wahrscheinlich die Membraninteraktion. Im Vergleich zu den anderen Varianten fehlen mGRK6-C basische Aminosäuren oder Cysteine im carboxylterminalen Abschnitt. Dennoch wurden in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe eine Lokalisation von mGRK6-C in der Zellmembran von intakten Zellen und die Phosphorylierung von Substraten durch mGRK6-C im zellfreien System nachgewiesen (Vatter, Dissertation, 2000). Um einen detaillierten Einblick in die Struktur und somit in die mögliche Funktion der mGRK6 zu erlangen, sollte zunächst rekombinantes mGRK6-C Protein in größeren Mengen produziert und dieses an einer SP- und Heparin-Sepharose Matrix sequentiell gereinigt werden. Anschließend sollte das gereinigte mGRK6-C-Protein in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dirk Bossemeyer am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg kristallisiert werden.

Für die Kristallisierung wurde das rekombinante mGRK6-C Protein mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems exprimiert (Pharmingen). Dazu wurden *Sf9*-Zellen mit mGRK6-C-kodierender cDNA in Anwesenheit von Baculovirus-DNA transfiziert und die über homologe Rekombination erhaltenen Baculoviren bis zu einem geeigneten Titer amplifiziert. Entsprechende Mengen dieses Virusamplifikats wurden dazu verwendet,

mehrere 400 ml *Sf9*-Zellsuspensionen in Fernbachkolben zu infizieren. Nach einer Inkubation von 48 h wurden die infizierten Zellen der einzelnen Fernbachkolben geerntet und bei 250 g abzentrifugiert. Um für den nachfolgenden Zellaufschluss geeignete Pufferbedingungen zu wählen, wurde zunächst der *pI*-Wert von mGRK6-C unter Verwendung des PC/GENE-Programms anhand der Aminosäuresequenz ermittelt (PHYSICHEM). Da der berechnete *pI*-Wert von mGRK6-C bei 8,39 liegt und somit größer pH 8,0 ist, wurde für den nachfolgenden Zellaufschluss der pH-Wert des Extraktionspuffers HE-Puffer mit 250 mM NaCl auf pH 7,5 eingestellt. *Sf9*-Zellen aus zwei Kulturansätzen wurden aufgeschlossen und das Zelllysat durch Zentrifugation in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion aufgetrennt. Um die Salzkonzentration der aus diesen Zelllysaten gewonnenen löslichen Fraktion auf 150 mM NaCl zu reduzieren, wurden die Proben mit NaCl-freiem HE-Puffer verdünnt. Das in der löslichen Fraktion enthaltene, rekombinante mGRK6-C Protein wurde anschließend an der Kationenaustausch-Matrix SP-Sepharose angereichert und aufgereinigt. Die Reinigung des rekombinanten mGRK6-C-Proteins ist in den Abbildungen 1 bis 3 dargestellt.

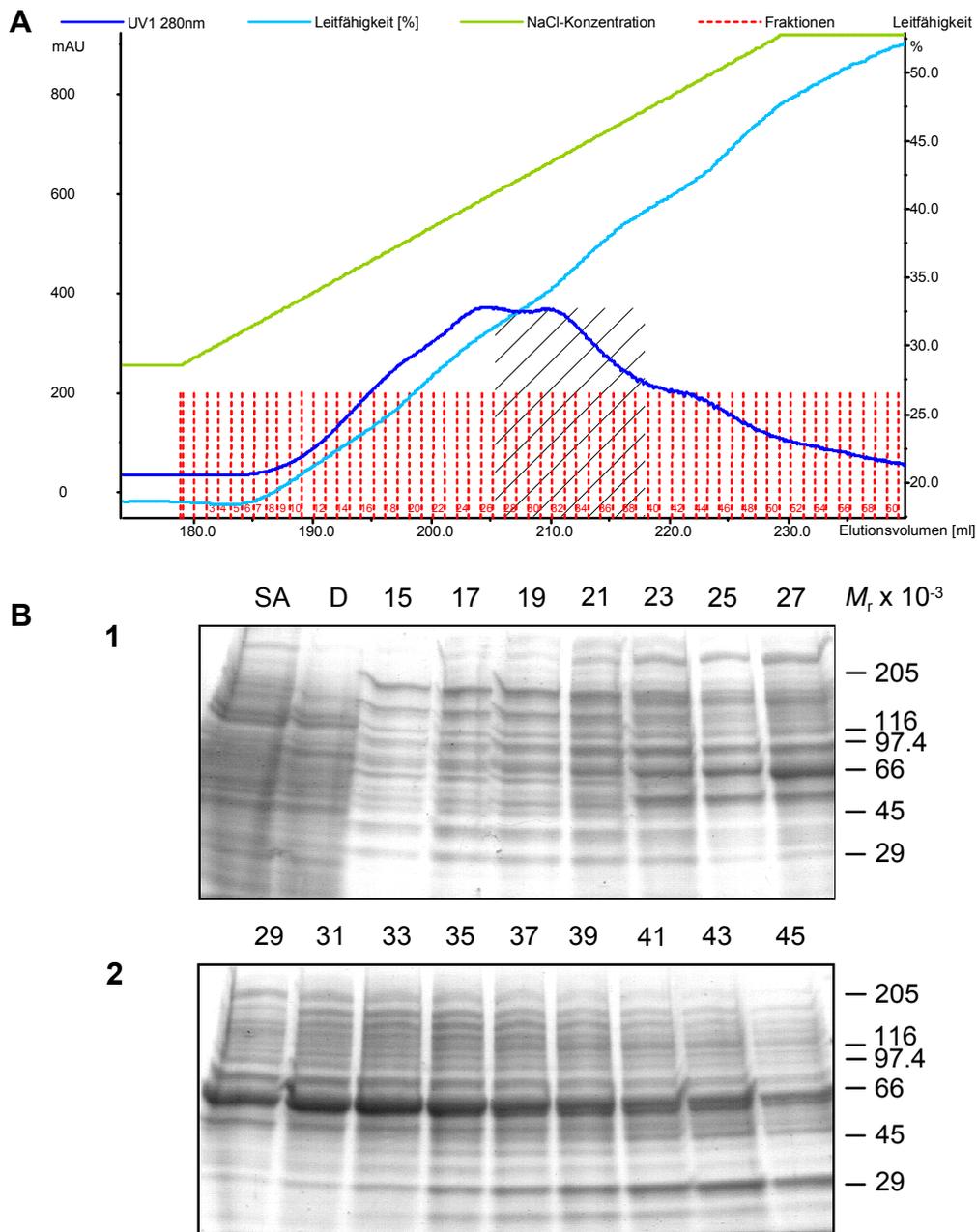
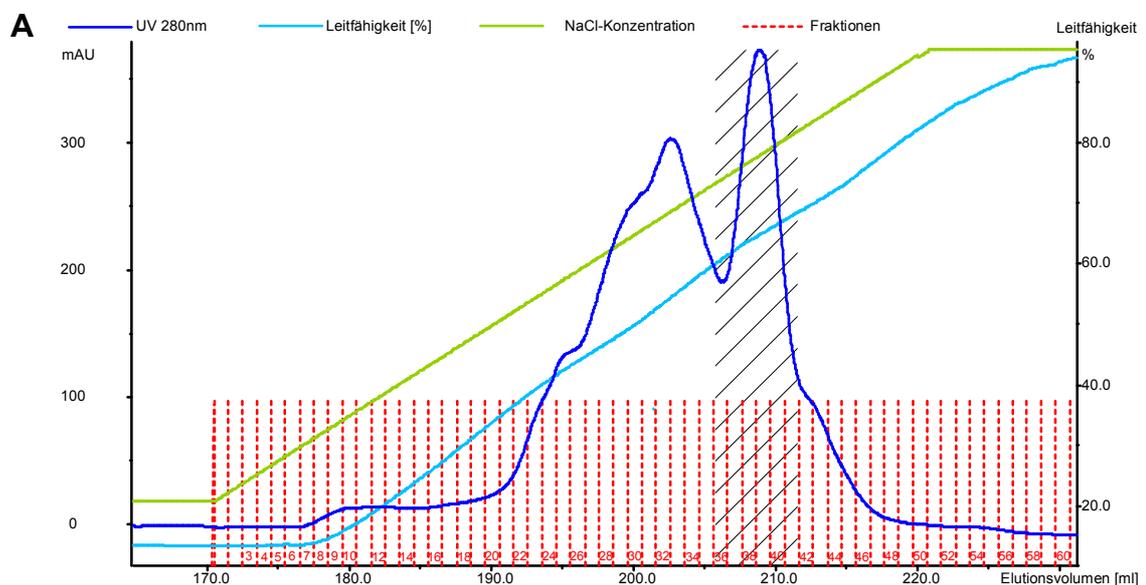


Abb. 1: Analyse des säulenchromatographisch an einer SP-Sepharose-Matrix gereinigten, rekombinanten mGRK6-C-Proteins durch Coomassie Brilliantblau-Färbung. (A) Nachdem *Sf9*-Insektenzellen mit mGRK6-C-kodierenden Baculoviren infiziert worden waren, wurden die Zellen aufgeschlossen und das Zelllysate durch Zentrifugation bei 300 000 g in eine lösliche und partikuläre Fraktion aufgetrennt. Um die NaCl-Konzentration der löslichen Fraktion auf 150 mM NaCl zu reduzieren, wurde die Probe mit NaCl-freiem Puffer verdünnt. Anschließend wurde die verdünnte Probe an einer SP-Sepharose-Matrix (5 ml HiTrap-Säule, ÄKTA-System) chromatographiert (50 ml-Gradient von 150-500 mM NaCl, Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). (B 1+2) Die eluierten Proteine wurden in einem 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (15 µl Proteinlösung einer Fraktion/Spur) und mit Coomassie

Brilliantblau gefärbt. Der Säulenauftrag (SA), der Säulendurchfluss (D) und die Nummer der analysierten Fraktionen sind markiert. Die Lage des Molekulargewichtsstandards ist rechts angegeben.

(Abb. 1 A) Nach Chromatographie an der SP-Sepharose-Matrix wurde das rekombinante mGRK6-C Protein, welches in den Fraktionen um den Elutionspeak enthalten war, in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (Abb. 1 B 1+2). Die Färbung zeigte, dass in den Fraktionen 27-39 angereichertes mGRK6-C Protein mit einer molekularen Masse von 64 kD enthalten war. Der Salzgehalt der Proben lag bei 280-380 mM NaCl. Um für die nachfolgende Reinigung an einer Heparin-Sepharose-Affinitätsmatrix eine ausreichende Proteinmenge an mGRK6-C zu haben, wurden weitere SP-Sepharose Aufreinigungen durchgeführt. Anhand der Elutionsprofile und mit Hilfe von Western *blot*-Analysen wurden wiederum diejenigen Fraktionen identifiziert, die das rekombinante mGRK6-C Protein enthielten. Alle auf diese Weise gewonnenen, mGRK6-C enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und die Salzkonzentration des Gesamteluats (*ca.* 339 mM NaCl) rechnerisch ermittelt.



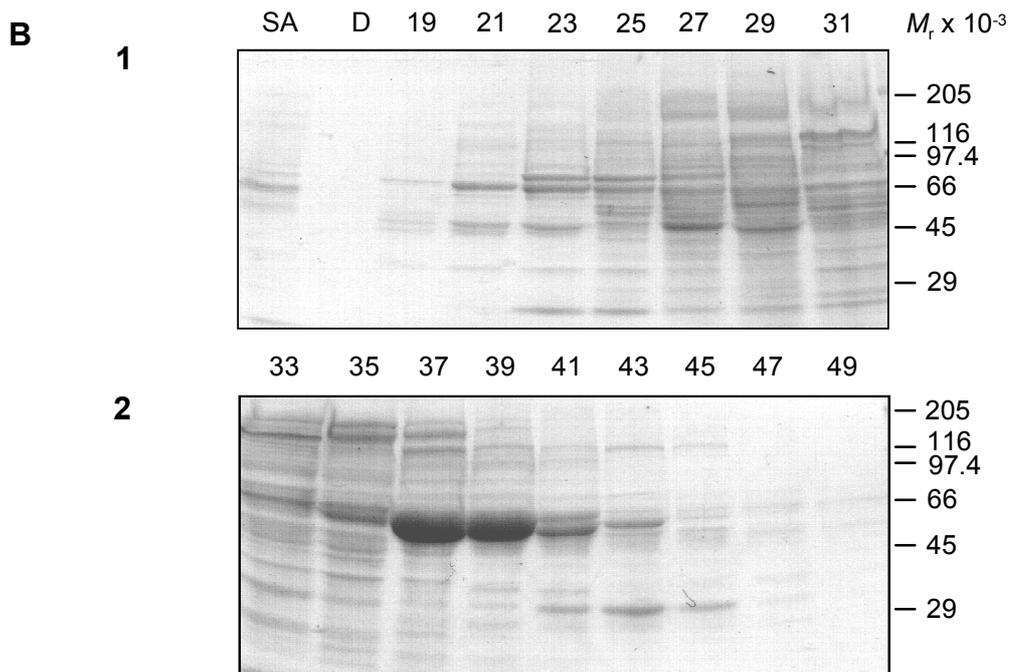
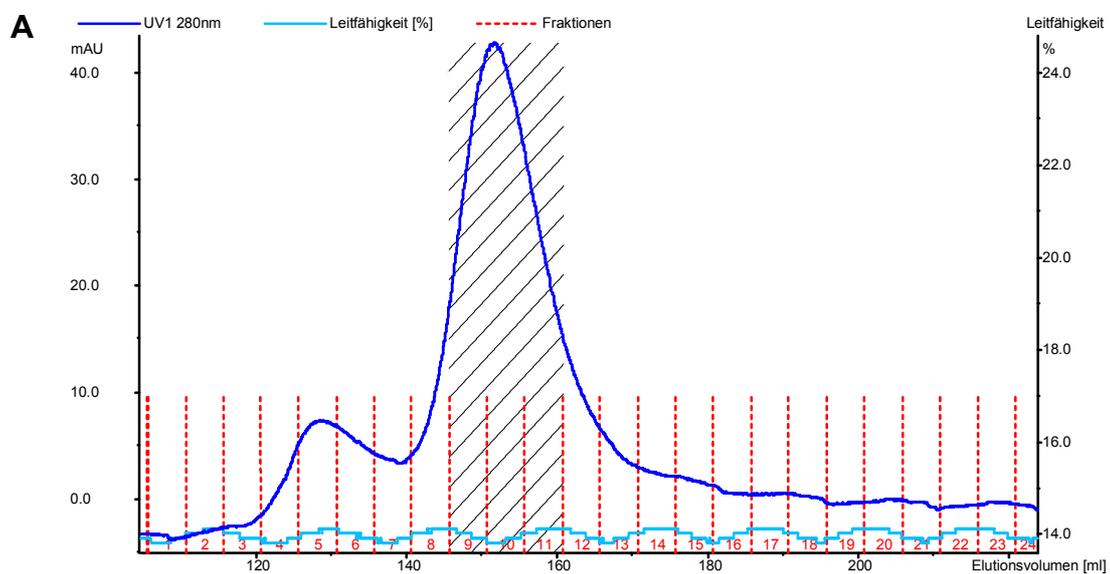


Abb. 2: Analyse der säulenchromatographisch an einer Heparin-Sepharose-Matrix gereinigten, rekombinanten mGRK6-C durch Coomassie Brilliantblau-Färbung. (A) Für die Aufreinigung der rekombinanten mGRK6-C an der Heparin-Sepharose-Matrix wurden die mGRK6-C-enthaltenen Fraktionen mehrerer SP-Sepharose-Aufreinigungen (z. B.: Fraktion 27-39 **Abb. 1 B 1+2**) vereinigt. Um die Salzkonzentration auf 100 mM NaCl zu reduzieren, wurde das im Gesamteluat enthaltene rekombinante Protein mit NaCl-freiem Puffer verdünnt. Für die weitere Aufreinigung wurde die verdünnte Probe an einer Heparin-Sepharose-Matrix (5 ml HiTrap-Säule, ÄKTA-System) chromatographiert (50 ml-Gradient von 0,1-1 M NaCl, Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). (B) Die eluierten Proteine wurden in einem 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (15 μ l Proteinlösung einer Fraktion/Spur) und mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. Der Säulenauftrag (SA), der Säulendurchfluss (D) und die Nummer der analysierten Fraktionen sind markiert. Die Lage des Größenstandards ist angegeben.

(Abb. 2 A) Nach Reduktion der Salzkonzentration auf 100 mM NaCl durch Zusatz von NaCl-freiem HE-Puffer, wurde die Proteinlösung chromatographisch an einer Heparin-Sepharose-Matrix gereinigt (50 ml Gradient von 0,1-1 M NaCl). Die gereinigten Proteine, welche in den Fraktionen um den Elutionspeak enthalten waren, wurden anschließend im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (Abb. 2 B 1+2). Die Färbung ergab, dass vor allem die Fraktionen 37-39 das gereinigte, rekombinante Protein mit der molekularen Masse von 64 kDa enthielten (644-674 mM NaCl). Da für die Kristallisierung eine möglichst NaCl-freie und sehr reine Proteinlösung nötig war, wurde

mit dem rekombinanten Protein der Fraktionen 37-39 der Heparin-Sepharose-Chromatographie zusätzlich eine Gelfiltration an Superdex™ 75-Material (HiLoad-Säule, 320 ml Gelbettvolumen) durchgeführt (Abb. 3 A). Auf diese Weise wurde die Salzkonzentration der Proteinlösung auf 100 mM NaCl reduziert. Da durch die Gelfiltration nicht nur eine Reduktion der Salzkonzentration in der Proteinlösung erreicht worden war, sondern die Proteine auch aufgrund des großen Säulenvolumens stark verdünnt worden waren, mußte sichergestellt werden, dass ausreichende Mengen an gereinigtem, rekombinatem Protein von mGRK6-C vorhanden waren. Dazu wurde eine weitere sequentielle Aufreinigung von SP-Sepharose gereinigter mGRK6-C an Heparin-Sepharose, sowie an Superdex™ 75-Material durchgeführt. Erneut wurden die Proteine, welche in den Fraktionen um den Elutionspeak der Gelfiltration enthalten waren, mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Brilliantblau- (Gelfiltration 1) bzw. Silberfärbung (Gelfiltration 2) auf ihre Reinheit und ihre Menge hin überprüft (Abb. 3 B 1+2). Hierbei wurden sowohl bei der ersten Gelfiltration als auch bei der zweiten Gelfiltration die Fraktionen 9 und 10 als solche mit hohem Proteingehalt an reinem, rekombinatem mGRK6-C Protein identifiziert.



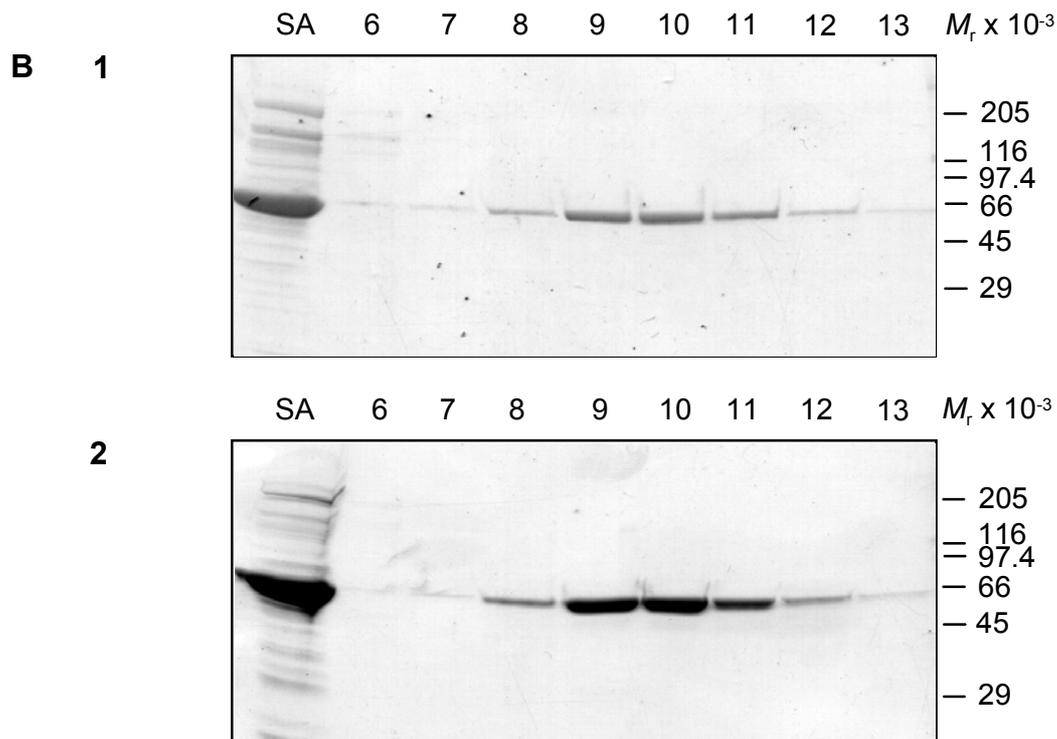


Abb. 3: Gelfiltration von mGRK6-C über Superdex™ 75-Material. (A) Das gereinigte mGRK6-C Protein in den Fraktionen 37-39 (Abb. 2 B 1+2) der Heparin-Sepharose-Aufreinigung wurde mittels Gelfiltration an Superdex™ 75-Material (Superdex™ 75-HiLoad-Säule, FPLC-System) von höhermolekularen, verunreinigenden Proteinen abgetrennt. (B 1+2) Die eluierten Proteine, welche in den Fraktionen 6 bis 13 des Elutionsprofils um den Elutionspeak enthalten waren, wurden in einem 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (15 µl der Proteinlösung einer Fraktion/Spur) und die Proteine durch Coomassie Brilliantblau- (1) bzw. Silber-Färbung (2) analysiert. Die Fraktionsnummern sowie die Position des Molekulargewichtsstandards sind angegeben.

Neben der Reinheit einer Proteinlösung ist die Menge an eingesetztem Protein ein weiteres wichtiges Kriterium für eine erfolgreiche Kristallisierung von Proteinen. Um die Konzentration der durch Gelfiltration gewonnen mGRK6-C-Proteinlösung zu ermitteln, wurde der Gehalt an Protein mit dem Gehalt an Protein einer BSA-Proteinstandardlösung verglichen. Dazu wurde jeweils ein Aliquot (10 µl) der Fraktionen 9 und 10 aus den zwei voneinander unabhängigen Aufreinigungen an der Superdex™ 75-Säule und steigende Proteinkonzentrationen (1-5 µg) einer BSA-Standardproteinlösung in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine zur Analyse mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt (Abb. 4 A). Der Vergleich der mGRK6-C-Proben mit dem

BSA-Standardprotein ergab, dass der Proteingehalt der einzelnen Proben aus den beiden Aufreinigungsschritten ungefähr der Menge von je 2-3 μg des BSA-Standards entsprach. Somit konnte für die Fraktionen 9 und 10 eine Proteinkonzentration von je 0,2-0,3 mg/ml rechnerisch ermittelt werden. Da für die Gelfiltration eine Fraktionsgröße von 5 ml gewählt worden war, hatten die einzelnen Proben jeweils einen Proteingehalt von 1-1,5 mg. Die gesamte Proteinmenge an gereinigtem mGRK6-C-Protein betrug somit *ca.* 4-6 mg. Um sicherzustellen, dass in den Proben für die Kristallisierung aktives Protein enthalten war, wurde jeweils ein Aliquot aus den Fraktionen 9 und 10 der beiden säulenchromatographischen Aufreinigungen mit dem membranären Substrat Rhodopsin versetzt und der Rezeptor anschließend durch Belichtung aktiviert. Wie die Ergebnisse des in Abb. 4 B dargestellten Autoradiogramms zeigen, wurde für das rekombinante mGRK6-C-Protein in den einzelnen Fraktionen Phosphorylierungsaktivität gegenüber Rhodopsin nachgewiesen.

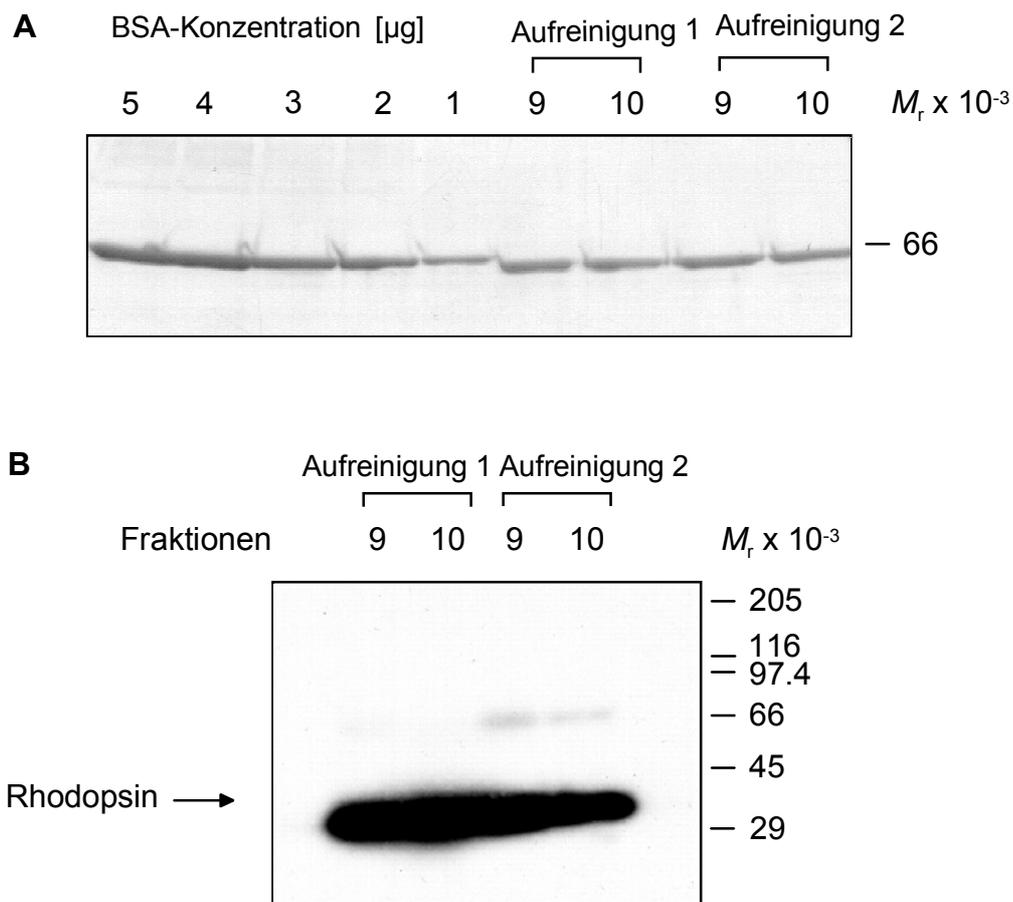


Abb. 4: Reinheit und Aktivität des mGRK6-C-Proteins. (A) Um die Konzentration der mGRK6-C enthaltenden Proteinlösungen der Fraktionen 9 und 10 zu ermitteln, wurden jeweils 10

μl der gereinigten Proteinlösung sowie 1-5 μg des BSA-Proteinstandards in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel (m/V) elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine zur Analyse mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. **(B)** Zur Ermittlung der Aktivität des mGRK6-C-Proteins wurde 240 nM Rhodopsin mit jeweils 1 μl der mGRK6-C enthaltenden Fraktionen versetzt und die Phosphorylierung von Rhodopsin durch mGRK6-C nach 10 minütiger Belichtung des Reaktionsansatzes untersucht. Die Reaktion wurde gestoppt, das Reaktionsgemisch wurde in einem 10 % igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und ein Röntgenfilm für 16 h mit dem Gel exponiert. Die Position des phosphorylierten Substrats Rhodopsin im Autoradiogramm ist angezeichnet.

Für die Kristallisationsversuche wurde die mGRK6-C-Proteinlösung anschließend an das Deutsche Krebsforschungszentrum in Heidelberg versandt. Neben dem ersten Versuch, das rekombinante mGRK6-C-Protein für die Kristallisierung aufzureinigen, wurden noch drei weitere Aufreinigungen des mGRK6-C-Proteins durchgeführt und die Proben mit 3 mg, 3,2 mg und 4 mg Proteingehalt zu weiteren Kristallisationsversuchen nach Heidelberg geschickt. Um die Kristallisierung durchführen zu können, mussten die Proben zunächst ankonzentriert werden. Dazu wurden verschiedene Pufferzusammensetzungen und pH-Werte ausgetestet. Nahezu verlustfrei ließen sich die Proben in einem Puffer mit 5 mM HEPES-Bis-Tris pH 7,1, 30 mM NaCl und 2 mM DTT ankonzentrieren. Durch das Ankonzentrieren wurden die Proteinkonzentrationen der vier mGRK6-C-Proben auf 12-14 mg/ml, 9,95-15 mg/ml, 7,5-13 mg/ml und 7-12 mg/ml erhöht. Des Weiteren wurden für die Kristallisierung des mGRK6-C-Proteins verschiedene Kristallisations-Kits der Firma Hampton Research verwendet. Dabei wurde überprüft, ob sich das mGRK6-C-Protein in Anwesenheit verschiedener Kristallisationsalze und bei Verwendung verschiedener Salzkonzentrationen (Hampton SaltRx™), bzw. in Anwesenheit von Polyethylenglykol und verschiedener Ionen (Hampton PEG/Ion Screen™) kristallisieren ließ. Auch die Bedeutung der Veränderung des pH-Werts und der Einfluss von Kristallisationshilfen wie Polymeren, flüchtigen und nicht-flüchtigen organischen Verbindungen wurde in verschiedenen Versuchsansätzen überprüft (Hampton Crystal Screen™). Ausserdem wurde der Einfluss von Zusätzen wie MgCl_2 , CaCl_2 , Ca^{2+} -Acetat, EDTA, ATP, Adenosin 5'-(β,γ -imido-)triphosphat (AMPPNP) ein inaktives ATP-Analogon, Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat und Tween auf die Kristallisierung von mGRK6-C ausgetestet. Trotz des

breiten Spektrums an gewählten Kristallisationsbedingungen blieben die bisherigen Versuche, das mGRK6-C-Protein zu kristallisieren, erfolglos.

4.2 Herstellung und Expression von Mutanten von mGRK6-C

Eine wichtige Voraussetzung für die effektive Regulierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch GRKs ist die Interaktion der Kinase mit der Membran (Stoffel *et al.*, 1998). Die Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass mGRK6-C lösliche und membrangebundene Substrate wie Phosvitin und Rhodopsin, phosphoryliert und das mGRK6-C vorwiegend membranassoziiert vorliegt (Vatter, Dissertation, 2000). Darüber hinaus hatten Rekonstitutionsversuche mit artifiziell erzeugten Lipidvesikeln gezeigt, dass mGRK6-C mit verschiedenen Phospholipiden, darunter Phosphatidylinosit (PtdIns), Phosphatidylinosit-4-phosphat (PtdInsP) und Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdInsP₂), interagiert (Vatter, Dissertation, 2000). Aufgrund der Tatsache, dass mGRK6-C über einen verkürzten carboxylterminalen Abschnitt verfügt, der keine basischen Aminosäuren oder palmitoylierbaren Cysteine enthält, die eine Membraninteraktion vermitteln könnten, war zu Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit unklar, wie die Kinase mit Phospholipiden der Plasmamembran interagiert. Daher sollte zunächst untersucht werden, welche Abschnitte des mGRK6-C Proteins zur Interaktion von mGRK6-C mit Phospholipiden beitragen. Wie Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gezeigt hatten, besitzen die Mitglieder der GRK4-Subfamilie, darunter GRK6, in den aminoterminalen und carboxylterminalen Abschnitten Phospholipidbindungsstellen, die unter anderem eine Interaktion mit PtdInsP₂ ermöglichen (Pitcher *et al.*, 1996, Pronin *et al.*, 1998). Aminosäuresequenz-Motive, die potentielle Bindungsstellen für PtdInsP₂ und andere Phospholipide darstellen, finden sich auch in der Aminosäuresequenz der mGRK6-C. Dies sind zum einen das Aminosäuresequenz-Motiv N²²RKGKSKKW³⁰ im aminoterminalen Abschnitt und Q⁵⁵³RLFSRQR⁵⁶⁰ im carboxylterminalen Abschnitt des Proteins. Beide Aminosäuresequenzmotive zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an basischen Aminosäuren aus (unterstrichen). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Änderungen in der Aminosäuresequenz dieser potentiellen PtdInsP₂-Bindungsstellen die Interaktion von mGRK6-C mit den Phospholipiden beeinflussen und

ob diese zu einer Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität der Kinase führen. Um diesen Fragen nachgehen zu können, wurden die drei basischen Aminosäuren Lysin²⁶, Lysin²⁸ und Lysin²⁹ im aminoterminalen Abschnitt (Abb. 5 rot markiert) sowie die drei basischen Aminosäuren Arginin⁵⁵⁴, Arginin⁵⁵⁸ und Arginin⁵⁶⁰ im carboxylterminalen Abschnitt (Abb. 5 rot markiert) durch die neutrale Aminosäure Alanin ersetzt.

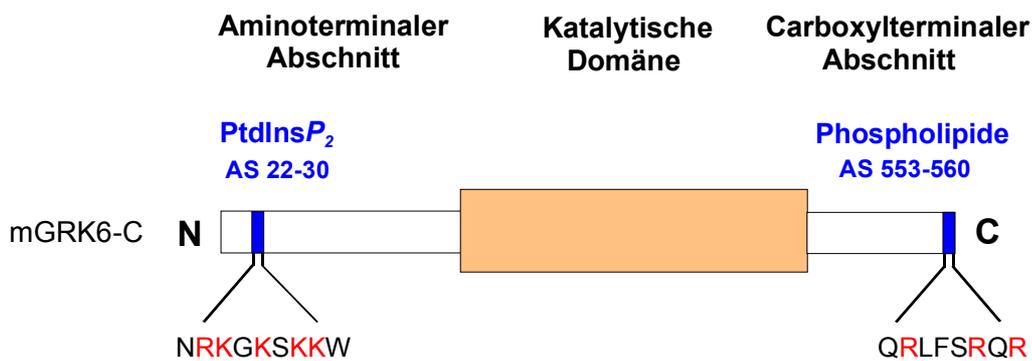


Abb. 5: Schematische Darstellung der funktionellen Abschnitte von mGRK6-C. Die Positionen der aminoterminalen (N) und carboxylterminalen Abschnitte (C) sowie der katalytischen Domäne sind dargestellt. Die putativen Aminosäuresequenzabschnitte, die eine Interaktion von mGRK6-C mit PtdInsP₂ und/oder anderen Phospholipiden ermöglichen, sind blau gekennzeichnet. Die basischen Aminosäuren, welche für die Interaktion mit den Phospholipiden eine Rolle spielen könnten, sind rot markiert.

4.2.1 Herstellung der am carboxylterminalen Abschnitt veränderten Mutante mGRK6-C/N⁺C⁻

Zur Herstellung der cDNA von mGRK6-C/N⁺C⁻, welche für eine mGRK6-C mit veränderten Aminosäuren im carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-C kodiert, wurde eine PCR mit den GRK6-spezifischen Oligonukleotiden GRK6-1 und GRK6-2 durchgeführt. Durch das Oligonukleotid GRK6-2 wurden die Arginin-kodierenden Nukleotidsequenzen durch Alanin-kodierende ersetzt und somit an den Positionen 554, 558 und 560 des Proteins Alanine eingebracht (Abb. 6).

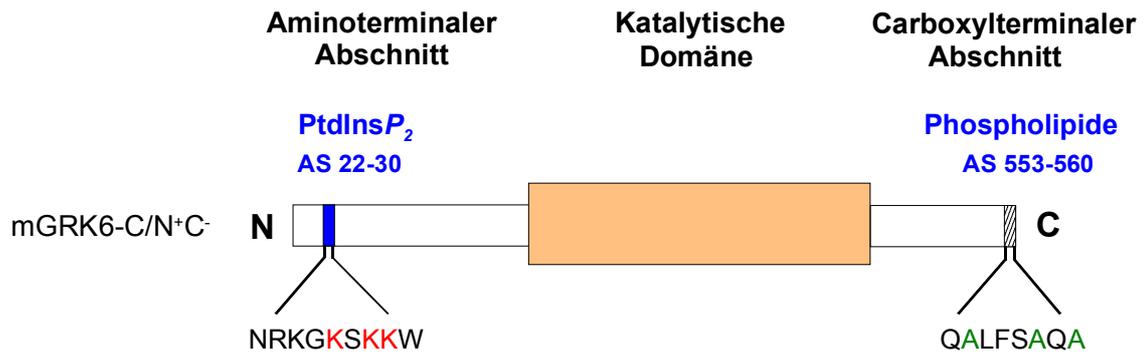


Abb. 6: Herstellung der Mutante mGRK6-C/N⁺C⁻ durch Austausch von Aminosäuren am carboxylterminalen Abschnitt. Der carboxylterminale Bereich von mGRK6-C, in welchem die basischen Aminosäuren (Arginine) durch neutrale Aminosäuren (Alanine) ersetzt wurden, ist durch Schraffur gekennzeichnet. Die Alanine sind grün markiert.

Als *template* für die PCR diente die cDNA von mGRK6-C in pBluescript™ II SK(-). Die *annealing*-Temperatur der Oligonukleotide lag bei 66 °C. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und ein 1683 bp großes PCR-Produkt aus dem Gel isoliert. Anschließend wurde das Fragment in den Vektor pCR2.1 ligiert und das Plasmid in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Für die nachfolgende Proteinexpression in *Sf9*-Zellen musste die cDNA in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 überführt werden. Dazu wurde die veränderte cDNA mit der Restriktionsendonuklease EcoRI aus dem Plasmid pCR2.1 herausgeschnitten und das Fragment in einen mit EcoRI-linearisierten und mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierten Vektor pVL1393 ligiert. Die Nukleotidsequenz des cDNA-pVL1393-Plasmids wurde durch Sequenzierung überprüft.

4.2.2 Herstellung der am aminoterminalen Abschnitt veränderten Mutante mGRK6-C/N⁻C⁺

Zur Herstellung der cDNA von mGRK6-C/N⁻C⁺, welche für eine mGRK6-C mit veränderten Aminosäuren im aminoterminalen Abschnitt von mGRK6-C kodierte, wurde eine PCR unter der Verwendung des *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis* Kit und der Oligonukleotide GRK6-3 und GRK6-4 durchgeführt. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide wurden Lysin-kodierende Nukleotidsequenzen durch Alanin-kodierende ersetzt und somit Alanine an Position 26, 28 und 29 des von dieser cDNA kodierten Proteins eingebracht (Abb. 7).

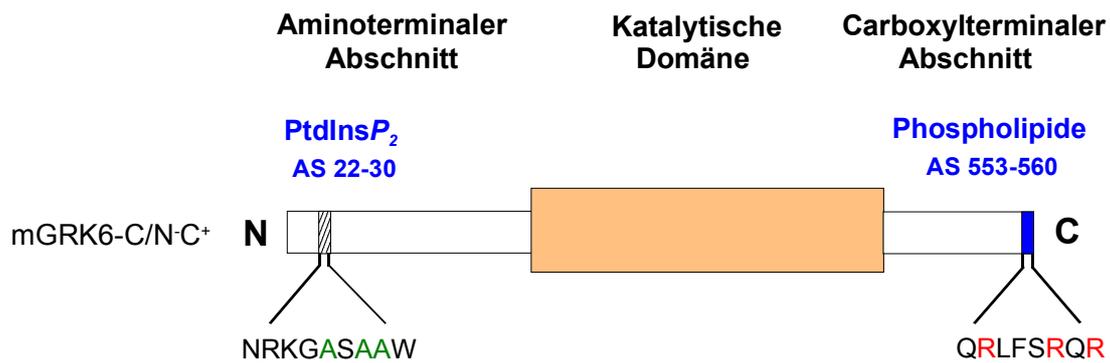


Abb. 7: Herstellung der Mutante mGRK6-C/N⁻C⁺ durch Austausch von Aminosäuren am aminoterminalen Abschnitt. Der aminoterminaler Bereich von mGRK6-C, in welchem die basischen Aminosäuren (Lysine) durch neutrale Aminosäuren (Alanine) ersetzt wurden, ist durch Schraffur gekennzeichnet. Die Alanine sind grün markiert.

Als *template* für die PCR diente die cDNA von mGRK6-C in pBluescript™ II SK(-), welche in der Arbeitsgruppe bereits vorlag. Der Verdau der methylierten, nicht-mutierten DNA des *templates* durch Zusatz des Enzyms DpnI wurde durch Auftrennung eines Teils der PCR-Produkte in einem 1 %igen Agarosegel kontrolliert. Mit der mutierten, nicht-abgebauten DNA wurden anschließend *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen transformiert. Die Nukleotidsequenz der mutierten cDNA wurde durch Sequenzierung überprüft. Für eine nachfolgende Proteinexpression der Mutante mGRK6-C/N⁻C⁺ in *Sf9*-Zellen wurde die cDNA mGRK6-C/N⁻C⁺ in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 ligiert. Dazu wurde die cDNA zunächst mit der Restriktionsendonuklease HindIII aus dem Vektor pBlueskript™ II SK(-) herausgeschnitten und die 5'-Überhänge der mGRK6-C/N⁻C⁺ kodierenden cDNA mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt. Anschließend wurde das cDNA-Fragment mittels Gelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel von der Vektor-DNA getrennt und aus dem Gel extrahiert. Nach zusätzlicher Restriktion mit der Endonuklease EcoRI wurde die mGRK6-C/N⁻C⁺ kodierende cDNA schließlich in einen, mit den Restriktionsenzymen SmaI und EcoRI linearisierten Vektor pVL1393 ligiert.

4.2.3 Herstellung der am amino- und carboxylterminalen Abschnitt veränderten Mutante mGRK6-C/N⁺C⁻

Zur Herstellung der cDNA von mGRK6-C/N⁺C⁻, welche für eine mGRK6-C mit veränderten Aminosäuren im amino- und carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-C kodierte, wurde eine PCR unter der Verwendung des *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis* Kit und der Oligonukleotide GRK6-3 und GRK6-4 durchgeführt. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide wurden wiederum die Lysin-kodierenden Nukleotidsequenzen durch Alanin-kodierende ersetzt und somit Alanine an den Positionen 26, 28 und 29 des von dieser cDNA kodierten Proteins eingebracht (Abb. 8). Jedoch wurde dieses Mal die bereits veränderte mGRK6-C/N⁺C⁻-kodierende cDNA als *template* eingesetzt.

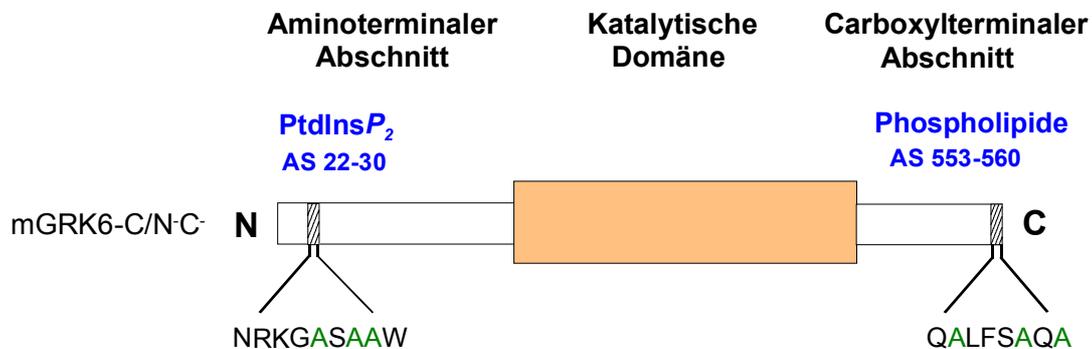


Abb. 8: Herstellung der Mutante mGRK6-C/N⁺C⁻ durch Austausch von Aminosäuren am aminoterminalen und carboxylterminalen Abschnitt. Der amino- und carboxylterminale Bereich von mGRK6-C, in welchem die basischen Aminosäuren (Lysine und Arginine) im amino- und carboxylterminalen Abschnitt durch neutrale Aminosäuren (Alanine) ersetzt wurden, ist durch Schraffur gekennzeichnet. Die Alanine sind grün markiert.

Der Verdau der methylierten, nicht-mutierten DNA des *templates* durch Zusatz des Enzyms DpnI wurde durch Auftrennung eines Teils der PCR-Produkte in einem 1 %igen Agarosegel kontrolliert. Mit der mutierten, nicht-abgebauten DNA wurden anschließend *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen transformiert. Die Nukleotidsequenz der mutierten cDNA wurde durch Sequenzierung überprüft. Für eine nachfolgende Proteinexpression in Sf9-Zellen wurde die cDNA mGRK6-C/N⁺C⁻ in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 ligiert. Hierzu wurde die cDNA zunächst mit der Restriktionsendonuklease EcoRI aus dem Vektor pCR2.1 herausgeschnitten. Das dabei erhaltene, 1683 bp große cDNA-Fragment wurde anschließend in einem 1 %igen (m/V) Agarosegel mittels Gelelektrophorese von der

Vektor-DNA getrennt, aus dem Gel extrahiert und in den vorbereiteten Vektor pVL1393 ligiert.

4.2.4 Expression und Reinigung von mGRK6-C, mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻

Zur Herstellung von mGRK6-C/N⁺C⁻-, mGRK6-C/N⁻C⁺- und mGRK6-C/N⁻C⁻-kodierenden Baculoviren wurden *Spodoptera frugiperda* 9 (*Sf9*)-Insektzellen mit der für mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ kodierenden cDNA in Anwesenheit von Baculovirus-DNA transfiziert. Die über homologe Rekombination erhaltenen Baculoviren wurden anschließend bis zu einem geeigneten Titer amplifiziert und entsprechende Mengen dieses Virusamplikats zur Infektion von *Sf9*-Insektzellen eingesetzt. In einem parallelem Ansatz wurden *Sf9*-Insektzellen mit mGRK6-C-kodierenden Viren infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 39 h wurden die Zellen geerntet, gewaschen und das Zellpellet mit Extraktionspuffer (HE-Puffer mit 250 mM NaCl) versetzt. Nach Aufschluss der Zellen wurde das Zelllysate durch Zentrifugation in eine partikuläre (Pellet) und eine lösliche Fraktion (Überstand) separiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in einem definierten Volumen an Extraktionspuffer resuspendiert (z. B. 200 µl). Anschließend wurde jeweils ein Aliquot der löslichen und der partikulären Fraktion auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression der Proteine wurde mittels Western *blot*-Analyse untersucht. Im Immunoblot mit dem mGRK6-spezifischen Anti-Pep1/2-Antikörper konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten Proteine der Mutanten mGRK6-C/N⁻C⁺, mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ und mGRK6-C in ähnlichen Mengen in den Baculovirus-infizierten *Sf9*-Insektzellen exprimiert worden waren (Abb. 9).

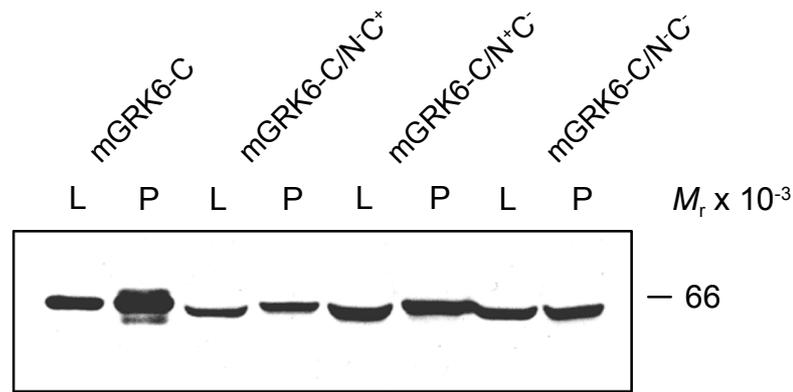


Abb. 9: Analyse der Proteinexpression von mGRK6-C und von den Mutanten mGRK6-C/N⁺C⁺, mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ in Sf9-Zellen. Nach Infektion von Sf9-Zellen mit mGRK6-C und mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁺C⁺- und mGRK6-C/N⁻C⁻-kodierenden Baculoviren, wurden die Zellen aufgeschlossen und das Zellysate durch Zentrifugation in eine lösliche (L) und partikuläre (P) Fraktion aufgetrennt. Die partikuläre Fraktion wurde in Extraktionspuffer resuspendiert. Die in der partikulären und löslichen Fraktion enthaltenen Proteine wurden in einem 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot unter Verwendung des mGRK6-spezifischen Antikörpers Anti-Pep1/2 analysiert.

Um ausreichende Mengen an gereinigtem Protein der mGRK6-C Mutanten isolieren zu können, wurden jeweils 400 ml Sf9-Zellen im Fernbachkolben mit mGRK6-C/N⁺C⁺-, mGRK6-C/N⁺C⁻- und mGRK6-C/N⁻C⁻-kodierenden Baculoviren infiziert. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet und aufgeschlossen. Der pH-Wert des zum Zellaufschluss eingesetzten Extraktionspuffers wurde anhand der für jede Kinase berechneten *pI*-Werte (PHYSICHEM, PC/GENE-Programm) so eingestellt, dass dieser eine Aufreinigung an der Kationenaustauschmatrix SP-Sepharose erlaubte. Für die drei mGRK6-C Mutanten wurden folgende *pI*-Werte ermittelt: mGRK6-C/N⁺C⁺, *pI* 8,14; mGRK6-C/N⁺C⁻, *pI* 8,15 und mGRK6-C/N⁻C⁻, *pI* 7,87. Da die *pI*-Werte von mGRK6-C/N⁺C⁺ und mGRK6-C/N⁺C⁻ ungefähr bei pH 8,0 lagen, wurde für den Zellaufschluss ein Extraktionspuffer mit einem pH-Wert von 7,5 verwendet. Der *pI*-Wert der Mutante mGRK6-C/N⁻C⁻ hingegen war mit *pI* 7,84 etwas niedriger. Daher wurde für den Aufschluss der Zellen, die diese Kinase exprimierten, der Extraktionspuffer auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die Aufreinigung der drei mGRK6-C-Mutanten wurde wie für mGRK6-C beschrieben durchgeführt (siehe 4.1.1). Zunächst wurden die rekombinanten Proteine der mGRK6-C Mutanten an einer SP-Sepharose-Matrix angereichert. Die anschließende

Elution der gebundenen Proteine von der Säulenmatrix erfolgte mit Hilfe eines steigenden NaCl-Gradienten. Die Salzkonzentrationen, bei welchen die rekombinanten Proteine der mGRK6-C Mutanten von der SP-Sepharose Matrix eluierten, lagen zwischen 200-300 mM NaCl. Nach der Chromatographie wurden die Proteine analysiert, welche in den Fraktionen um den Elutionspeak enthalten waren. Dazu wurde ein Aliquot der Proteinlösung im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. Die Fraktionen, in welchen die Mutanten der mGRK6-C angereichert waren, wurden anschließend vereinigt und die mGRK6-C-Proteine durch Chromatographie an einer Heparin-Sepharose-Affinitätsmatrix weiter aufgereinigt. Die Salzkonzentrationen, bei welchen die angereicherten Proteine der mGRK6-C Mutanten von der Heparin-Sepharose-Matrix eluierten, lagen zwischen 400-500 mM NaCl. Erneut wurde im Anschluss an die Chromatographie ein Aliquot der Proteinlösung aus den Fraktionen um den Elutionspeak mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert und immunochemisch analysiert. Mit Hilfe des GRK6-spezifischen Antikörpers Anti-Pep1/2 wurden die Fraktionen ermittelt, in denen sich die größte Menge an gereinigtem, rekombinantem Protein der Mutanten mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ oder mGRK6-C/N⁻C⁻ befand (Abb. 10).

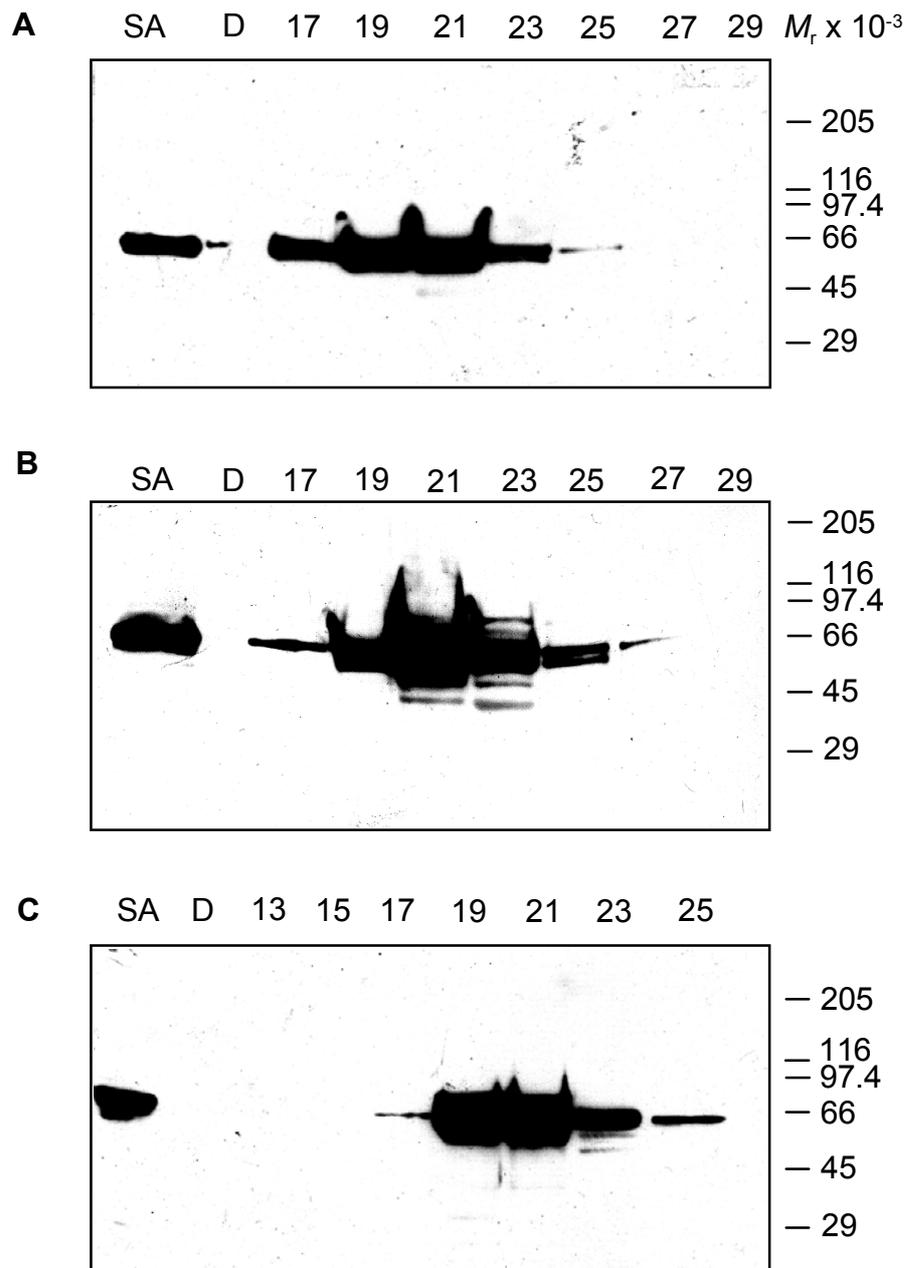


Abb. 10: Analyse der säulenchromatographisch an einer SP- und Heparin-Sepharose-Matrix gereinigten Proteine von mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ mittels *Western-blot-Analyse*. Nach sequentieller Aufreinigung der rekombinanten Proteine von mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ an einer SP- und Heparin-Sepharose-Matrix wurden die in einem Aliquot (15 μ l) aus den Fraktionen um den Elutionspeak enthaltenen Proteine in einem 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot mit Hilfe des Antikörpers Anti-Pep1/2 analysiert. (**A:** mGRK6-C/N⁺C⁻, **B:** mGRK6-C/N⁻C⁺, **C:** mGRK6-C/N⁻C⁻) Der Säulenauftrag (SA), der Säulendurchfluss (D) und die Nummern der analysierten Fraktionen sind markiert. Die Lage des Größenstandards ist eingezeichnet.

4.2.5 Interaktion der drei mGRK6-C-Mutanten, mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ mit verschiedenen Lipiden

Um zu klären, ob die Veränderung der Aminosäuresequenz der potentiellen Phospholipidbindungsstellen im mGRK6-C-Protein die Interaktion mit verschiedenen Phospholipiden beeinträchtigt, wurde die Wechselwirkung des wildtypischen mGRK6-C-Proteins, und der drei mGRK6-C Mutanten mit verschiedenen Phospholipiden in Vesikelbindungsexperimenten überprüft. Für die Untersuchung wurden die unterschiedlich geladenen Phospholipide L- α -Phosphatidylcholin (PtdCho), L- α -Phosphatidylserin (PtdSer) und Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdInsP₂) verwendet. PtdSer wird als neutraler Ladungsträger eingesetzt, während PtdCho über eine positiv geladene Seitenkette verfügt und PtdInsP₂ aufgrund seiner Phosphatgruppen eine negative Ladung besitzt. Von den zuvor über SP- und Heparin-Sepharose-Matrix gereinigten Proteinen der mGRK6-C, sowie der Mutanten mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ wurde zunächst zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen ein Kontrollgel mit einem BSA-Proteinstandard angefertigt. Danach wurden zwischen 8 und 10 pmol der gereinigten Proteine mit steigenden Konzentrationen der unterschiedlichen Phospholipidvesikel inkubiert und schließlich durch Zentrifugation in eine lipidfreie lösliche und eine lipidhaltige partikuläre Fraktion separiert. Die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-*blot*-Analyse untersucht.

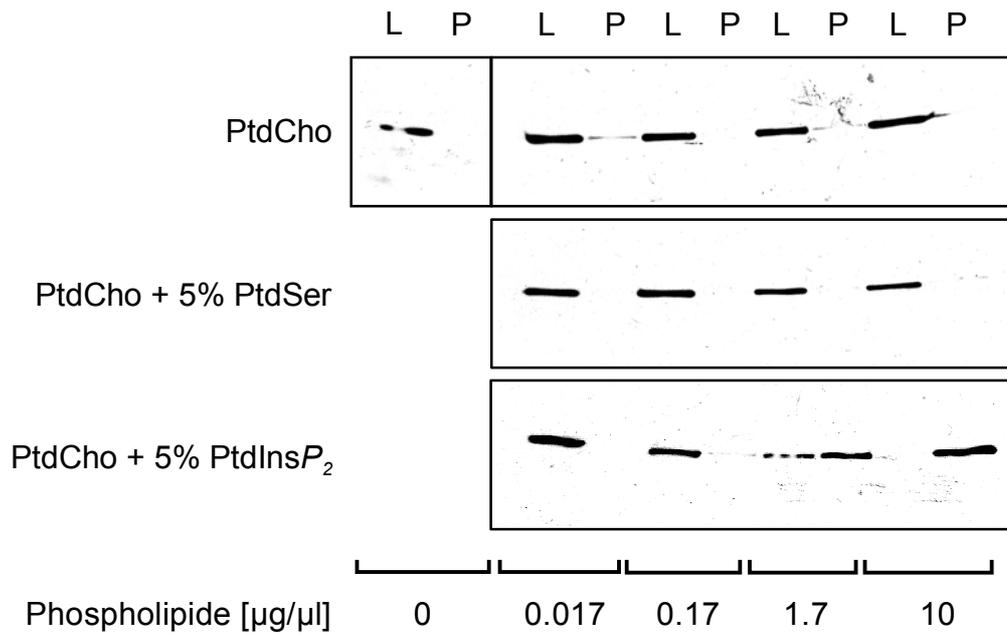


Abb. 11: Analyse der Wechselwirkung von mGRK6-C mit verschiedenen Phospholipidvesikeln. Nach der Aufreinigung an einer SP- und Heparin-Sephrose-Matrix wurden 10 pmol der gereinigten mGRK6-C ohne oder mit 0,017, 0,17, 1,7 und 10 µg/µl Phospholipidvesikeln aus reinem Phosphatidylcholin (PtdCho) oder unter Zusatz von 5 % Phosphatidylserin (PtdSer) bzw. Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdInsP₂) in Anwesenheit von 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 100 000 g wurden die Ansätze in eine lösliche lipidfreie (L) und eine partikuläre lipidhaltige Fraktion (P) separiert. Für die nachfolgende Analyse im Immunoblot wurden jeweils die in 15 µl der löslichen und partikulären Fraktionen enthaltenen Proteine in einem 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit dem mGRK6-spezifischen Antikörper Anti-Pep1/2 analysiert.

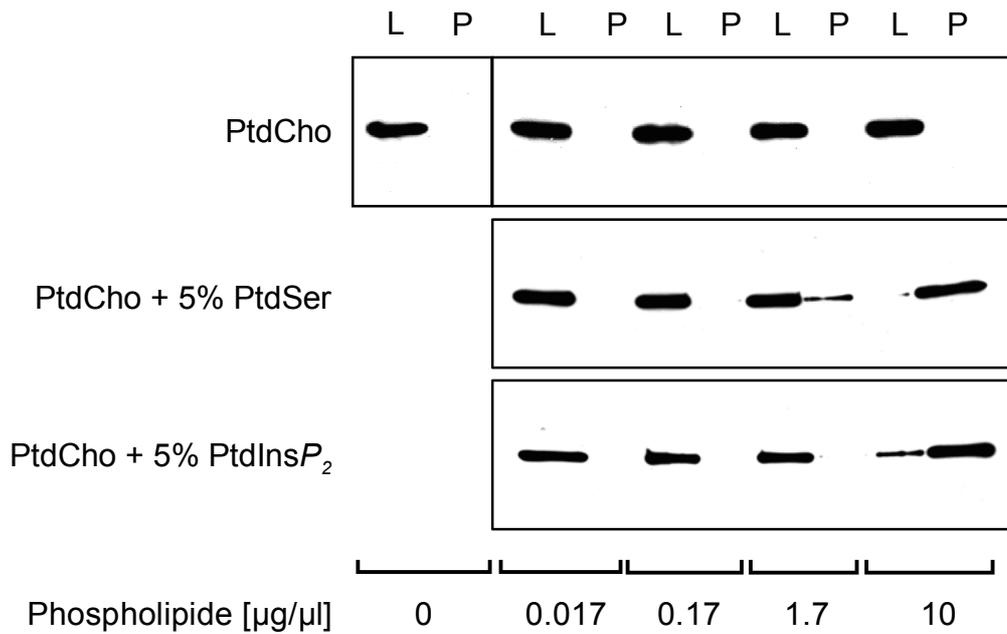


Abb. 12: Analyse der Wechselwirkung von mGRK6-C/N^{C+} mit verschiedenen Phospholipidvesikeln. Nach der Aufreinigung an einer SP- und Heparin-Sephrose-Matrix wurden 10 pmol der gereinigten Mutante mGRK6-C/N^{C+} ohne oder mit 0,017, 0,17, 1,7 und 10 µg/µl Phospholipidvesikeln aus reinem Phosphatidylcholin (PtdCho) oder unter Zusatz von 5 % Phosphatidylserin (PtdSer) bzw. Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdInsP₂) in Anwesenheit von 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 100 000 g wurden die Ansätze in eine lösliche lipidfreie (L) und eine partikuläre lipidhaltige Fraktion (P) separiert. Für die nachfolgende Analyse im Immunoblot wurden jeweils die in 15 µl der löslichen und partikulären Fraktionen enthaltenen Proteine in einem 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit dem mGRK6-spezifischen Antikörper Anti-Pep1/2 analysiert.

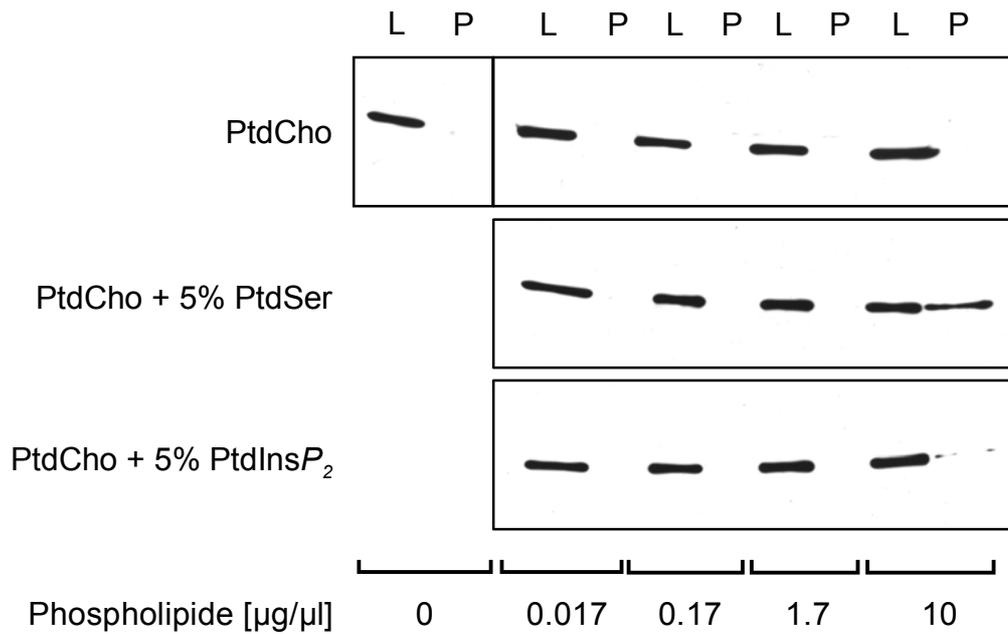


Abb. 13: Analyse der Wechselwirkung von mGRK6-C/N⁺C⁻ mit verschiedenen Phospholipidvesikeln. Nach der Aufreinigung an einer SP- und Heparin-Sephrose-Matrix wurden 10 pmol der gereinigten Mutante mGRK6-C/N⁺C⁻ ohne oder mit 0,017, 0,17, 1,7 und 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Phospholipidvesikeln aus reinem Phosphatidylcholin (PtdCho) oder unter Zusatz von 5 % Phosphatidylserin (PtdSer) bzw. Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdIns P_2) in Anwesenheit von 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 100 000 g wurden die Ansätze in eine lösliche lipidfreie (L) und eine partikuläre lipidhaltige Fraktion (P) separiert. Für die nachfolgende Analyse im Immunoblot wurden jeweils die in 15 μl der löslichen und partikulären Fraktionen enthaltenen Proteine in einem 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit dem mGRK6-spezifischen Antikörper Anti-Pep1/2 analysiert.

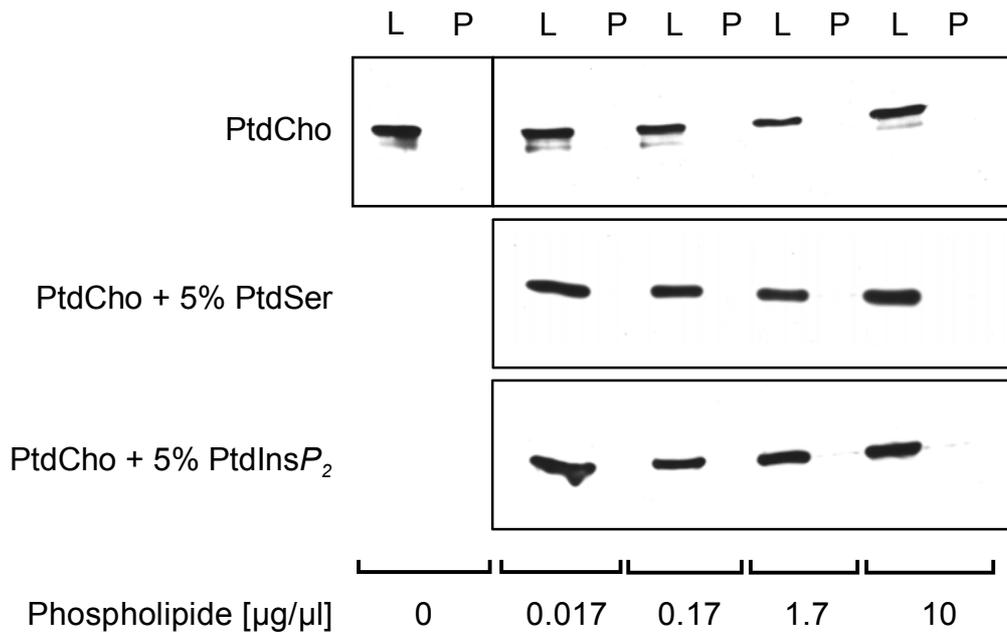


Abb. 14: Analyse der Wechselwirkung von mGRK6-C/N⁻C⁻ mit verschiedenen Phospholipidvesikeln. Nach der Aufreinigung an einer SP- und Heparin-Sephrose-Matrix wurden 8 pmol der gereinigten Mutante mGRK6-C/N⁻C⁻ ohne oder mit 0,017, 0,17, 1,7 und 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Phospholipidvesikeln aus reinem Phosphatidylcholin (PtdCho) oder unter Zusatz von 5 % Phosphatidylserin (PtdSer) bzw. Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdInsP₂) in Anwesenheit von 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 100 000 g wurden die Ansätze in eine lösliche lipidfreie (L) und eine partikuläre lipidhaltige Fraktion (P) separiert. Für die nachfolgende Analyse im Immunoblot wurden jeweils die in 15 μl der löslichen und partikulären Fraktionen enthaltenen Proteine in einem 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit dem mGRK6-spezifischen Antikörper Anti-Pep1/2 analysiert.

Die in Abbildung 11-14 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass weder die Mutanten mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ noch mGRK6-C mit dem positiv geladenen PtdCho interagieren. Bei den Phospholipiden PtdSer und PtdInsP₂ wurden Unterschiede in der Wechselwirkung mit den jeweiligen mGRK6-Polypeptiden beobachtet. Die mGRK6-C wies keine Wechselwirkung mit den artifiziell erzeugten PtdSer-enthaltenden Lipidvesikeln auf, während bei steigenden Konzentrationen an PtdInsP₂ eine Interaktion mit dem Phospholipid PtdInsP₂ nachweisbar war. Letzteres war an einer zunehmenden Verschiebung des Proteins aus der lipidfreien löslichen Fraktion in die lipidhaltige partikuläre Fraktion zu erkennen (Abb. 11). Die Verschiebung des Proteins aus der lipidfreien löslichen Fraktion in die lipidhaltige partikuläre Fraktion war dabei

vollständig. Bei der Mutante mGRK6-C/N⁻C⁺ wurde sowohl bei hohen Konzentrationen an PtdSer als auch bei hohen Konzentrationen an PtdInsP₂ in den Vesikeln eine Interaktion beobachtet (Abb. 12). Die Mutante mGRK6-C/N⁺C⁻ zeigte ebenfalls bei hohen Konzentrationen an PtdSer eine Wechselwirkung mit dem Phospholipid. Eine vollständige Verschiebung des Proteins in die partikuläre Fraktion war hier allerdings nicht zu beobachten. Mit PtdInsP₂ dagegen interagierte mGRK6-C/N⁺C⁻ selbst bei hohen Phospholipidkonzentrationen nur sehr schwach. Der Hauptanteil des Proteins befand sich nach wie vor in der löslichen Fraktion (Abb. 13). Die Ergebnisse in Abbildung 14 zeigen, dass für die Mutante mGRK6-C/N⁻C⁻ selbst bei der höchsten eingesetzten Lipidkonzentration weder mit dem Phospholipid PtdSer noch mit PtdInsP₂ eine Interaktion nachweisbar war.

4.2.6 Untersuchung der enzymatischen Aktivität von mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻

Die Bindungsstudien an den Lipidvesikeln hatten gezeigt, dass die Interaktion der drei mGRK6-C Mutanten mit den jeweiligen Phospholipiden unterschiedlich war. Um zu klären, ob die Unterschiede in der Membraninteraktion der einzelnen Mutanten mit Unterschieden in der Aktivität der einzelnen Kinasen korrelierten, wurde die Phosphorylierung des membranständigen Rhodopsins und des löslichen Phosvitins als Substrat durch die verschiedenen Kinasen überprüft. In die Aktivitätsanalysen wurden die an der Heparin-Sepharose-Matrix gereinigten Proteine von mGRK6-C/N⁻C⁺, mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ eingesetzt. Die Untersuchungen wurden mit Proteinen aus den Fraktionen durchgeführt, die um den Elutionspeak gesammelt worden waren (siehe 4.2.4). Die gereinigten Kinase wurden in Anwesenheit von [γ -³²P]ATP zum einen mit Phosvitin inkubiert, zu anderem mit Rhodopsin versetzt. Rhodopsin wurde durch Belichtung aktiviert. Nach dem Abstoppen der Reaktion und der Auftrennung der Proben in einem SDS-Polyacrylamidgel konnte die Übertragung der radioaktiv markierten γ -Phosphatgruppe auf die Substrate autoradiographisch nachgewiesen werden. Die in Abbildung 15-17 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass alle drei mGRK6-C-Mutanten sowohl das membranständige Rhodopsin als auch das lösliche Phosvitin phosphorylierten.

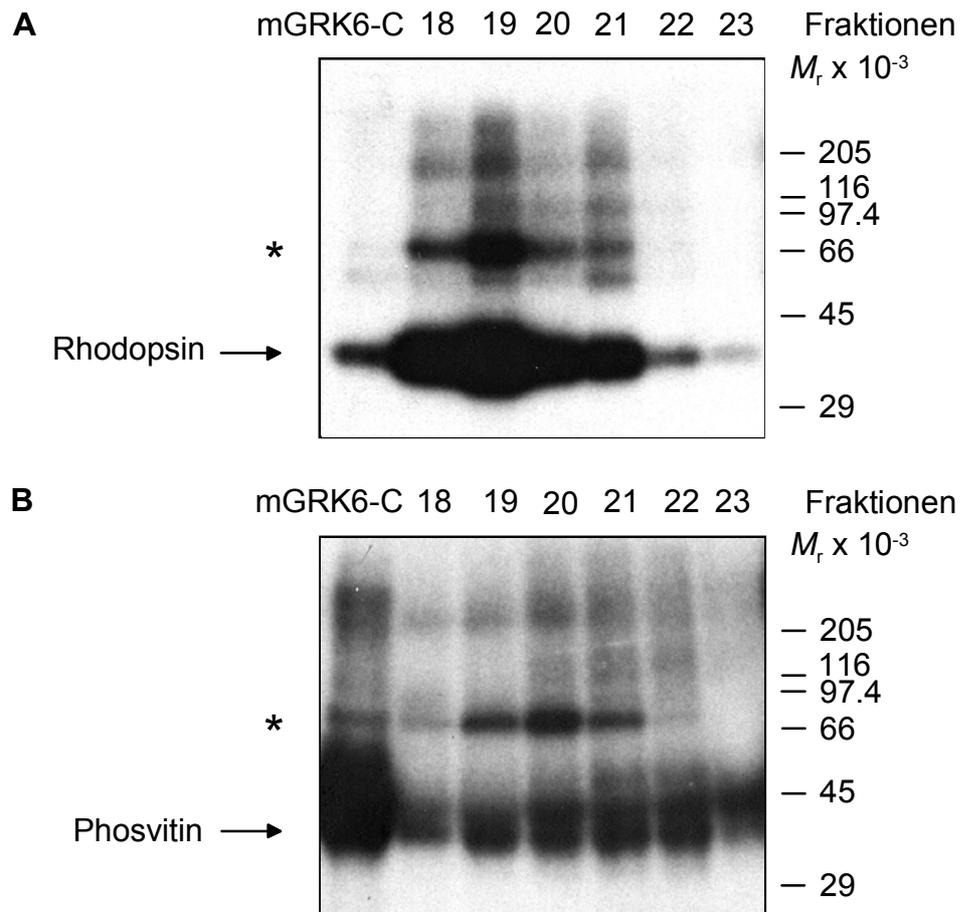


Abb. 15: Phosphorylierung von membranständigem Rhodopsin und löslichem Phosvitin durch mGRK6-C/N⁺C⁺. Nach Aufreinigung der mGRK6-C-Mutante mGRK6-C/N⁺C⁺ an einer SP- und Heparin-Sepharose-Matrix wurde die Aktivität des gereinigten Proteins überprüft. **(A)** Lichtabhängige Phosphorylierung von Rhodopsin. Je 1,5 µl gereinigtes Protein aus den Fraktionen 18-23 wurden mit 120 nM Rhodopsin im Dunkeln versetzt und der Rezeptor durch Belichtung aktiviert. **(B)** Phosphorylierung von Phosvitin. Je 1,5 µl gereinigtes Protein aus den Fraktionen 18-23 wurden mit 6,25 µg Phosvitin inkubiert. Zum Vergleich wurde die Phosphorylierung von Rhodopsin (A) bzw. Phosvitin (B) durch wildtypisches mGRK6-C-Protein ermittelt (mGRK6-C). Die Reaktionen wurden gestoppt und die enthaltenen Proteine in 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurde mit Röntgenfilmen für 6 h exponiert. Die Positionen der phosphorylierten Substrate Rhodopsin und Phosvitin sowie der autophosphorylierten Kinase (*) sind markiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage des Molekulargewichtstandards sind eingezeichnet.

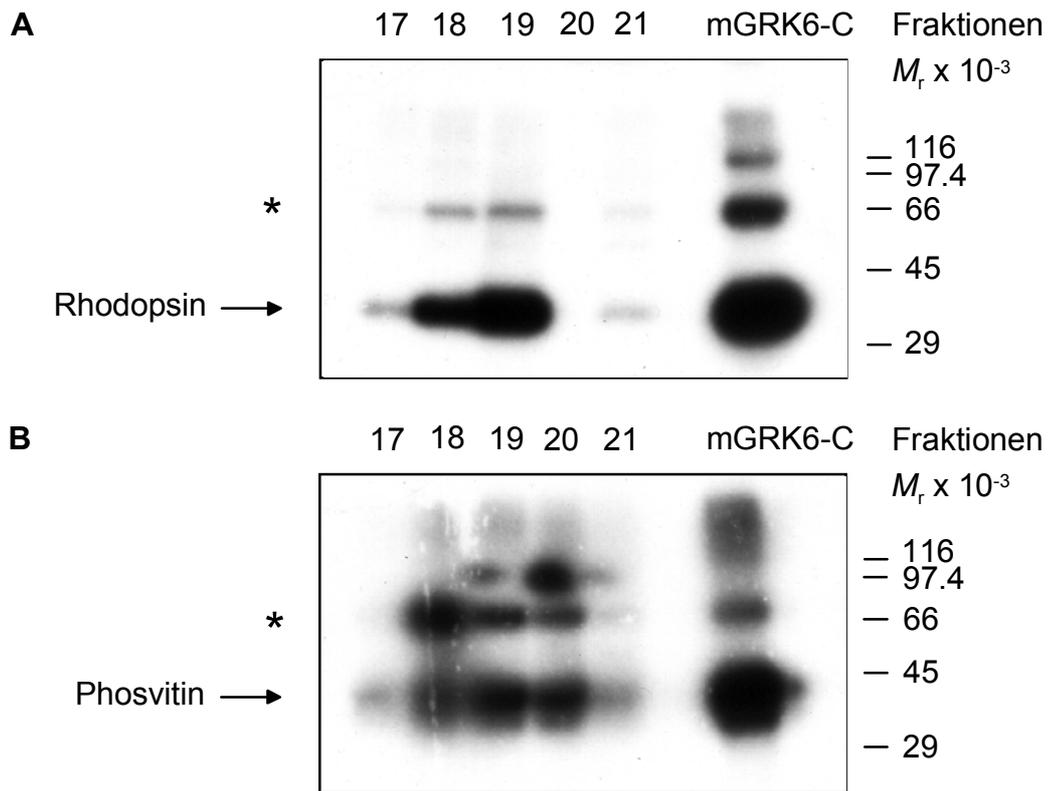


Abb. 16: Phosphorylierung von membranständigem Rhodopsin und löslichem Phosvitin durch mGRK6-C/N⁺C⁻. Nach Aufreinigung der mGRK6-C Mutante mGRK6-C/N⁺C⁻ an einer SP- und Heparin-Sepharose-Matrix wurde die Aktivität des gereinigten Proteins überprüft. **(A)** Lichtabhängige Phosphorylierung von Rhodopsin. Je 1 μ l gereinigtes Protein aus den Fraktionen 17-21 wurden mit 240 nM Rhodopsin im Dunkeln versetzt und der Rezeptor durch Belichtung aktiviert. **(B)** Phosphorylierung von Phosvitin. Je 1 μ l gereinigtes Protein aus den Fraktionen 17-21 wurden mit 6,25 μ g Phosvitin inkubiert. Zum Vergleich wurde die Phosphorylierung von Rhodopsin (A) bzw. Phosvitin (B) durch zuvor an SP- und Heparin-Sepharose-Matrix gereinigtem, wildtypischem mGRK6-C-Protein ermittelt (mGRK6-C). Die Reaktionen wurden gestoppt und die enthaltenen Proteine in 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurden mit Röntgenfilmen für 16 h exponiert. Die Positionen der phosphorylierten Substrate Rhodopsin und Phosvitin sowie der autophosphorylierten Kinase (*) sind markiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage des Molekulargewichtstandards sind eingezeichnet.

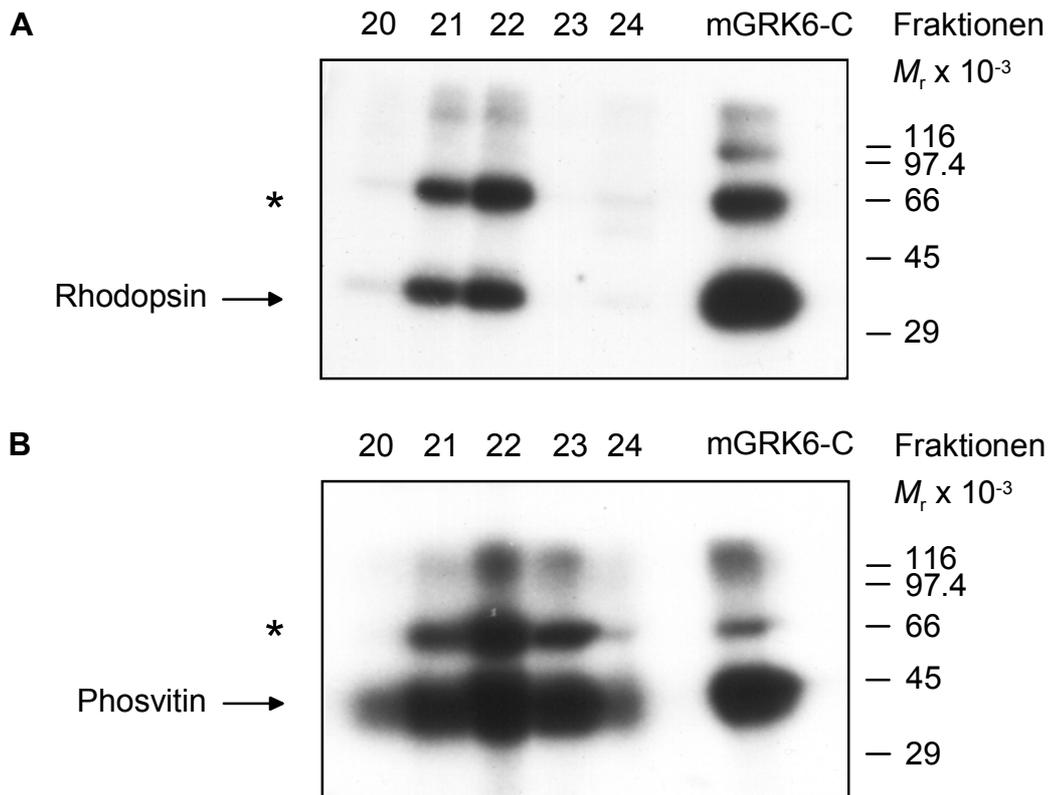


Abb. 17: Phosphorylierung von membranständigem Rhodopsin und löslichem Phosvitin durch mGRK6-C/N⁺C⁻. Nach Aufreinigung der mGRK6-C Mutante mGRK6-C/N⁺C⁻ an einer SP- und Heparin-Sepharose-Matrix, wurde die Aktivität des gereinigten Proteins überprüft. **(A)** Lichtabhängige Phosphorylierung von Rhodopsin. Je 1 μ l gereinigtes Protein der Fraktionen 20-24 wurden mit 240 nM Rhodopsin im Dunkeln versetzt und der Rezeptor durch Belichtung aktiviert. **(B)** Phosphorylierung von Phosvitin. Je 1 μ l gereinigtes Protein aus den Fraktionen 20-24 wurden mit 6,25 μ g Phosvitin inkubiert. Zum Vergleich wurde die Phosphorylierung von Rhodopsin (A) bzw. Phosvitin (B) durch zuvor an SP- und Heparin-Sepharose-Matrix gereinigtem, wildtypischem mGRK6-C-Protein ermittelt (mGRK6-C). Die Reaktionen wurden gestoppt und die enthaltenen Proteine in 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurden mit Röntgenfilmen für 16 h exponiert. Die Positionen der phosphorylierten Substrate Rhodopsin und Phosvitin sowie der autophosphorylierten Kinase (*) sind markiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage des Molekulargewichtstandards sind eingezeichnet.

Um zu klären, ob die rekombinanten Proteine der mGRK6-C Mutanten und des wildtypischen Proteins Unterschiede in der Phosphorylierungsaktivität aufweisen, wurden etwa gleich große Mengen der sequentiell gereinigten Kinasen mGRK6-C, mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁺C⁻ in den Phosphorylierungsassay eingesetzt (Abb. 16 und 17 A+B). Dabei wurde deutlich, dass mGRK6-C in Bezug auf die Phosphorylierung von

Rhodopsin die höchste Phosphorylierungsaktivität aufwies. Ein Vergleich der beiden Mutanten mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ lieferte erste Hinweise darauf, dass mGRK6-C/N⁺C⁻ das Substrat Rhodopsin stärker phosphoryliert als mGRK6-C/N⁻C⁻. Um zu untersuchen, ob sich mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ hinsichtlich ihrer Affinität zum membranständigen Rezeptorsubstrat unterscheiden, wurden beide Proteine mit steigenden Mengen Rhodopsin versetzt und die Phosphorylierung des membranständigen Substrats durch die Kinasen analysiert (Abb. 18). Für diese Untersuchungen wurden gereinigte Proteine der Fraktionen 18 und 19 von mGRK6-C/N⁺C⁻ und der Fraktionen 21 und 22 von mGRK6-C/N⁻C⁻ eingesetzt. Die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass bei beiden Mutanten die Zunahme des phosphorylierten Proteins mit steigenden Mengen an eingesetztem Rhodopsin korrelierte. Jedoch zeigte die Mutante mGRK6-C/N⁺C⁻ bereits bei geringen Mengen an Rhodopsin eine wesentlich stärkere Phosphorylierung des Substrats. Dieses Ergebnis zeigt, dass mGRK6-C/N⁺C⁻ eine höhere Affinität zum Substrat besitzt als mGRK6-C/N⁻C⁻.

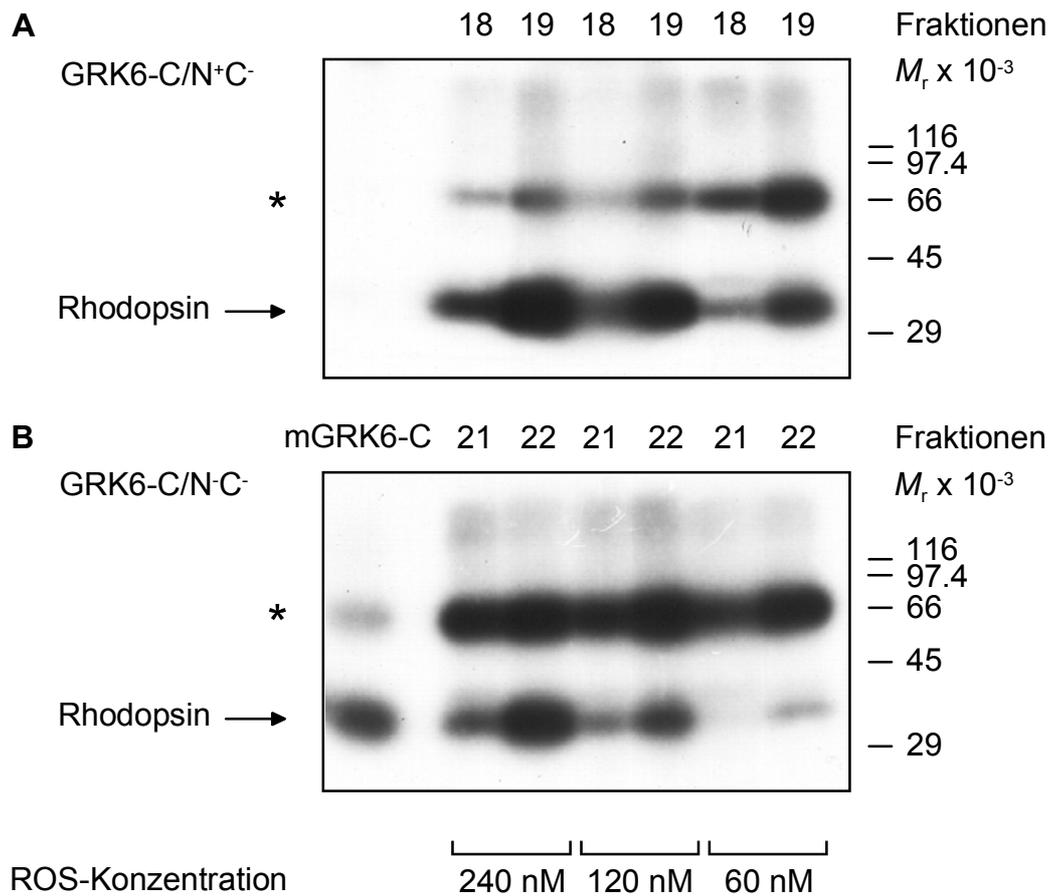


Abb. 18: Vergleich der Phosphorylierung von membranständigem, lichtaktiviertem Rhodopsin durch mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻. Nach sequentieller Aufreinigung von mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ an einer SP- und Heparin-Sepharose-Matrix wurde je 1 μ l (**A**) der mGRK6-C/N⁺C⁻- und (**B**) mGRK6-C/N⁻C⁻-Proteinlösungen aus den Fraktionen 21 und 22 bzw. 18 und 19 um den Elutionspeak mit steigenden Mengen Rhodopsin (60 nM, 120 nM, 240 nM) versetzt und der Rezeptor durch Belichtung aktiviert. Zum Vergleich wurde die Phosphorylierung von 240 nM Rhodopsin durch gereinigtes, wildtypisches mGRK6-C-Protein ermittelt. Die Reaktionen wurden gestoppt und die Proteine in 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurden mit Röntgenfilmen für 15 h exponiert. Die Positionen des phosphorylierten Rhodopsins sowie der autophosphorylierten Kinase (*) sind markiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage des Molekulargewichtstandards sind eingezeichnet.

4.3 Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch mGRK6-C im zellfreien System

4.3.1 Solubilisierung von Rezeptorproteinen

Unter der Vielzahl an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die durch GRKs reguliert werden, befinden sich auch mehrere Chemokinrezeptoren. Innerhalb der CC-Subfamilie der Chemokinrezeptoren wird beispielsweise CCR5 von den GRKs 2, 3, 5 und 6 und CCR2b von GRK3 phosphoryliert (Pitcher *et al.*, 1998, Hüttenrauch *et al.*, 2005). Von Mitgliedern der CXC-Subfamilie der Chemokinrezeptoren, wie CXCR1, CXCR2 und CXCR4 ist ebenfalls bekannt, dass ihre Aktivität von GRKs reguliert wird (Haribabu *et al.*, 1997, Pitcher *et al.*, 1998). Unklar ist dabei, welche Mitglieder der GRK-Subfamilien die jeweiligen CXC-Rezeptoren phosphorylieren. Um zu klären, ob aktivierte Chemokinrezeptoren auch Rezeptorsubstrate der mGRK6, speziell der mGRK6-C darstellen, sollte die Phosphorylierung des CXC4-Rezeptors der Maus (mCXCR4) und des CXCR1-Rezeptors des Menschen (hCXCR1) durch mGRK6-C im zellfreien System analysiert werden. Dazu sollten die CXC-Rezeptorproteine in *Sf9*-Insektenzellen exprimiert und aus der Zellmembran solubilisiert werden. Anschließend sollten die solubilisierten Rezeptorproteine als Rezeptorsubstrate in einen Phosphorylierungsassay mit sequentiell gereinigten Proteinen von mGRK6-C eingesetzt und die Phosphorylierung der solubilisierten Rezeptorproteine überprüft werden. Dazu wurden zunächst *Sf9*-Insektenzellen mit Baculoviren infiziert, welche für die Hämagglutinin (HA)-Epitop-tragenden Chemokinrezeptoren mCXCR4-A (HA-mCXCR4-A) und hCXCR1 (HA-hCXCR1) kodierten. Die Zellen wurden geerntet, aufgeschlossen und die Zellextrakte durch eine differentielle Zentrifugation in eine partikuläre und lösliche Fraktion separiert (Abb. 19 A). Die membranären Rezeptorproteine wurden unter Verwendung eines Digitonin- (1 %) und Natrium-Cholat-haltigen (0,2 %- 0,6 %)-Lysepuffers aus der partikulären Fraktion solubilisiert. Das Verhältnis von solubilisiertem Rezeptorprotein zum noch in der partikulären Fraktion befindlichen Rezeptorprotein wurde im Immunoblot analysiert. Die HA-Epitop-tragenden Proteine wurden mit einem Anti-HA-Antikörper detektiert.

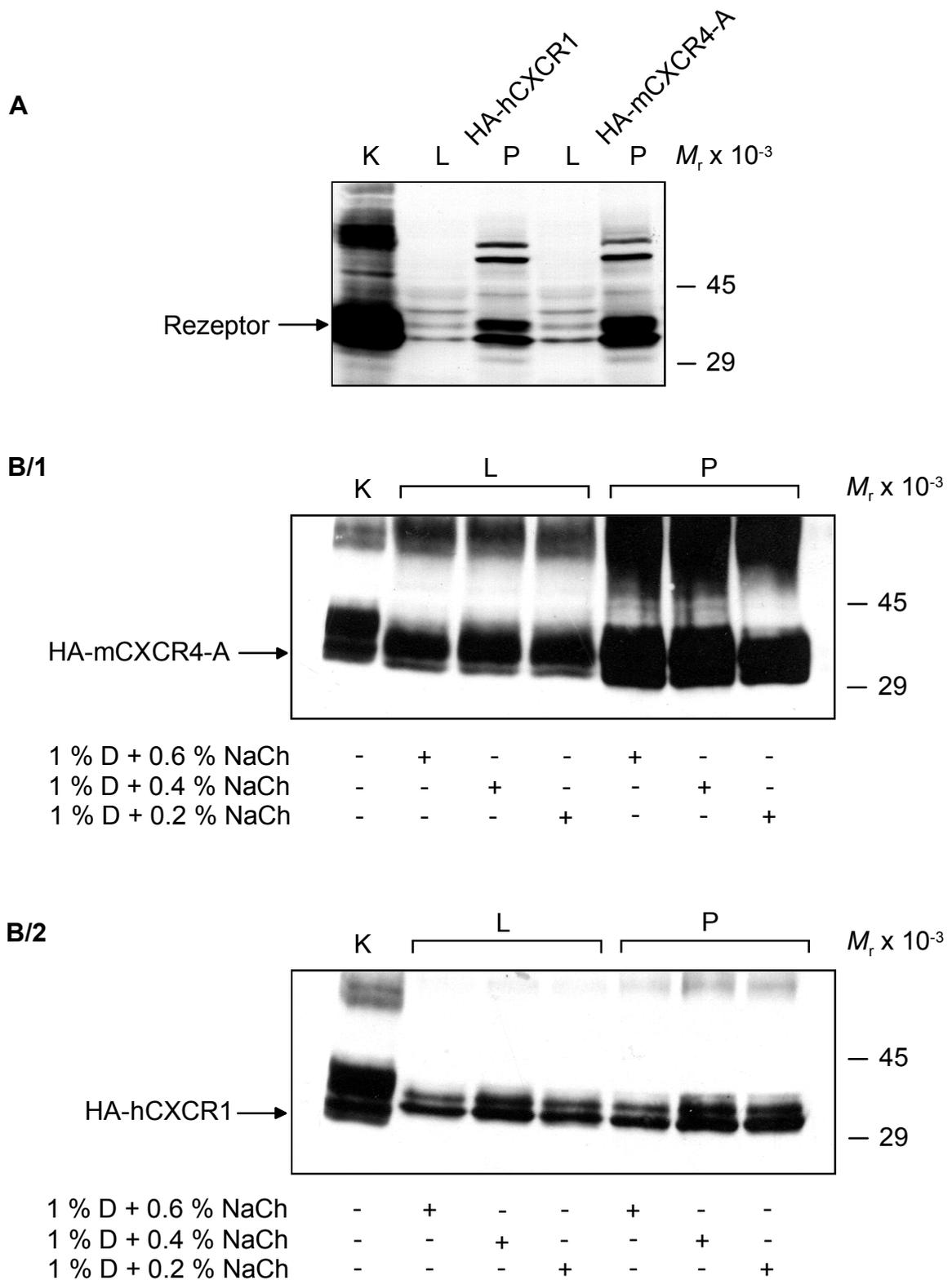


Abb. 19: Solubilisierung von rekombinanten Rezeptorproteinen aus Membranen von Baculovirus-infizierten Insektenzellen. (A) *Sf9*-Insektenzellen wurden mit HA-mCXCR4-A- und HA-hCXCR1-kodierenden Baculoviren infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Zellextrakte durch differentielle Zentrifugation in eine partikuläre (P) und

lösliche Fraktion (L) aufgetrennt. **(B 1+2)** Die partikuläre Fraktion wurde in Extraktionspuffer resuspendiert und mit Digitonin (D, Endkonzentration 1 %), sowie steigenden Konzentrationen an Natrium-Cholat (NaCh, Endkonzentrationen 0,2-0,6 %) versetzt. Nach Inkubation der Proben durch „über-Kopf-Rotation“ bei 4 °C wurden die Zellysate bei 100 000 g zentrifugiert. Die in einem Aliquot (15 µl) der löslichen (L) und partikulären Fraktion (P) enthaltenen Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-HA-Antikörper analysiert. Die Spezifität des Anti-HA-Antikörpers wurde mit Hilfe eines HA-Epitop-tragenden RDC-1-Proteins (Kontrolle, K) nachgewiesen. Die Positionen des zur Kontrolle aufgetragenen Rezeptorproteins und der solubilisierten Proteine HA-mCXCR4-A **(B1)** und HA-hCXCR1 **(B2)** sind angegeben. Der Größenstandard ist auf der rechten Seite der Abbildung eingezeichnet.

Die in Abbildung 19 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass unabhängig von der zur Solubilisierung eingesetzten Menge an Natrium-Cholat nur *ca.* 30 % des HA-mCXCR4-A-Proteins nach Solubilisierung mit Digitonin und Natrium-Cholat in der löslichen Fraktion nachzuweisen war (Abb. 19 B/1). Der überwiegende Teil des Proteins verblieb demnach in der partikulären Fraktion. Die Solubilisierung des HA-hCXCR1-Rezeptorproteins mit Digitonin und Natrium-Cholat lieferte ein besseres Ergebnis. So wurde zwischen 40-50 % des Proteins nach Solubilisierung in der löslichen Fraktion detektiert (Abb. 19 B/2). In einem weiteren Ansatz wurde untersucht (nicht dargestellt), ob für die Solubilisierung der Rezeptorproteine die Anwesenheit von Digitonin allein im Extraktionspuffer ausreicht und welchen Einfluss unterschiedliche Konzentrationen von Digitonin (1,0-1,2 %) mit oder ohne 0,4 % Natrium-Cholat im Extraktionspuffer auf die Solubilisierung der HA-mCXCR4-A- und HA-hCXCR1-Proteine hat. Dabei zeigte sich, dass in Abwesenheit von Natrium-Cholat im Extraktionspuffer die Menge an solubiliertem HA-hCXCR1-Protein abnahm. Im Gegensatz dazu war die Anwesenheit von 1,0-1,2 % Digitonin im Extraktionspuffer für die Solubilisierung des Rezeptorproteins HA-mCXCR4-A ausreichend.

4.3.2 Immunpräzipitation solubilisierter Rezeptorproteine

Um die solubilisierten Rezeptorproteine als Rezeptorsubstrate in einen Phosphorylierungsassay mit gereinigtem mGRK6-C-Protein einsetzen zu können, sollten diese zunächst durch Immunpräzipitation aus den löslichen Fraktionen angereichert

werden. Dazu wurde ein Anti-HA-Antikörper an Protein G-Agarose gebunden und mit den solubilisierten HA-mCXC4-A- und HA-hCXC1-Rezeptorproteinen inkubiert. Die über den Anti-HA-Antikörper an die Protein G-Agarose gebundenen HA-mCXCR4-A- und HA-hCXCR1-Proteine wurden durch Zentrifugation präzipitiert und im Immunoblot analysiert. Zur Kontrolle wurden Zellextrakte aus nicht-infizierten *Sf9*-Zellen hergestellt und die Proteine der partikulären Fraktion entsprechend solubilisiert. In einem Ansatz wurden diese solubilisierten Proteine mit Protein G-Agarose allein und in einem weiteren Ansatz mit Protein G-Agarose, an welche zuvor der HA-Antikörper gebunden worden war, inkubiert. Für die anschließende Analyse im Immunoblot wurden die über den Anti-HA-Antikörper an die Protein G-Agarose gebundenen Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die in Abbildung 20 A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die solubilisierten HA-mCXCR4-A- und HA-hCXCR1-Proteine unter Verwendung des HA-Antikörpers immunpräzipitiert werden konnten. So wurden mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers Proteine mit einer molekularen Masse von 45 kDa im Immunoblot nachgewiesen (Abb. 20 A linke Hälfte: HA-mCXCR4-A, rechte Hälfte: HA-hCXCR1). Im Gegensatz dazu wurden aus den zur Kontrolle analysierten Extrakten keine Proteine mit entsprechenden Größen immunpräzipitiert (Abb. 20 B). Dies zeigt, dass die solubilisierten Rezeptorproteine beider Chemokinrezeptoren spezifisch an die Protein G-Agarose gebunden hatten.

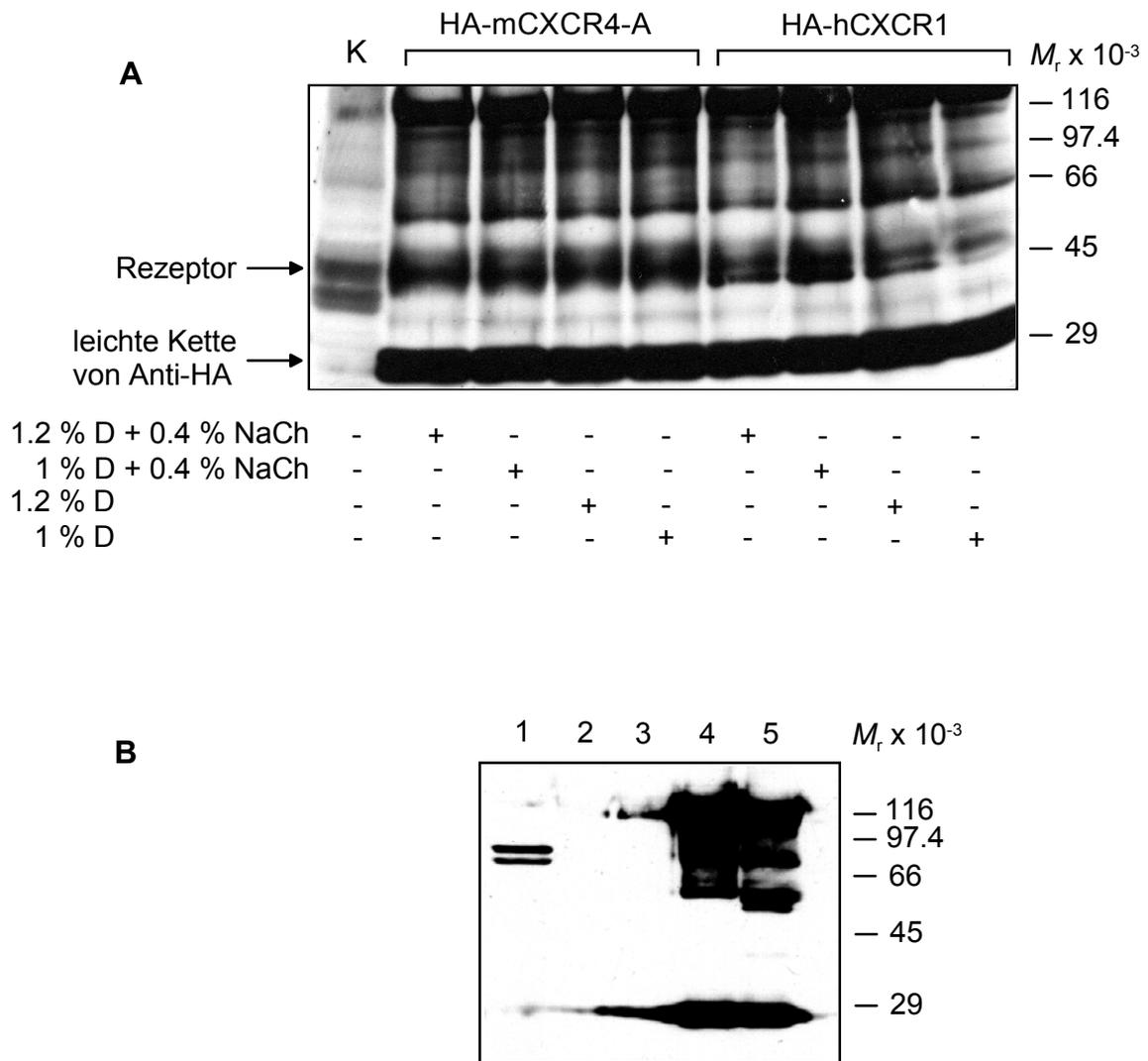


Abb. 20: Immunpräzipitation der solubilisierten HA-mCXCR4-A und HA-hCXCR1-Rezeptorproteine. (A) *Sf9*-Insektenzellen wurden mit HA-mCXCR4-A- und HA-hCXCR1-kodierenden Baculoviren infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Zellextrakte durch differentielle Zentrifugation in eine partikuläre (P) und lösliche Fraktion (L) aufgetrennt. Die Rezeptorproteine wurden in Anwesenheit von 1 % bzw. 1,2 % Digitonin (D) oder 1 % bzw. 1,2 % Digitonin (D) und 0,4 % Natrium-Cholat (NaCh) im Extraktionspuffer aus den partikulären Fraktionen solubilisiert. Die solubilisierten Proteine wurden mit dem Anti-HA-Antikörper an Protein G-Agarose gebunden und immunpräzipitiert. Die so gebundenen Proteine wurden in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-HA-Antikörper analysiert. Die Spezifität des Anti-HA-Antikörpers wurde mit Hilfe eines HA-Epitop-tragenden RDC1-Proteins (Kontrolle, K) nachgewiesen. Die Positionen des HA-RDC1-Proteins, der HA-mCXCR4- und HA-hCXCR1-Proteine und der leichten Kette des an die Protein G-Agarose gebundenen Anti-HA-Antikörpers sind angegeben. Der Größenstandard ist auf der rechten Seite der Abbildung

ingezeichnet. **(B)** Zur Kontrolle wurden Lysate aus mittels 1 % Digitonin und 0,4 % Natrium-Cholat solubilisierten Sf9-Zellen mit Protein G-Agarose inkubiert. Ein Aliquot (5 µl) der Proben wurde im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und im Immunoblot mit dem Anti-HA-Antikörper inkubiert (1: Zelllysat aus Sf9-Zellen, 2: Protein G-Agarose, 3: Protein G-Agarose + Zelllysat, 4: Protein G-Agarose + Anti-HA-Antikörper, 5: Protein G-Agarose + Anti-HA-Antikörper + Zelllysat).

4.3.3 Versuch der Phosphorylierung der solubilisierten Rezeptorproteine

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die solubilisierten, immunpräzipitierten HA-mCXCR4-A- und HA-hCXCR1-Proteine durch Zugabe ihrer Liganden zu aktivieren und die Phosphorylierung der Rezeptorproteine durch mGRK6-C zu analysieren. Dazu wurden die über den Anti-HA-Antikörper an Protein G-Agarose gebundenen Rezeptorproteine mit gereinigtem, rekombinantem mGRK6-C-Protein versetzt. Um die Rezeptorproteine zu aktivieren, wurde den Reaktionsansätzen 200 nM CXCL12 im Fall von HA-mCXCR4-A, 200 nM CXCL8 im Fall von HA-hCXCR1 oder entsprechende Mengen des Lösungsmittels (Kontrolle) zugegeben. Zur Kontrolle wurden 240 nM membranständiges Rhodopsin mit entsprechenden Mengen mGRK6-C versetzt und der Rezeptor durch Belichtung aktiviert. Die Analyse der Phosphorylierung der Substrate ergab, dass nur membranständiges Rhodopsin von mGRK6-C phosphoryliert worden war (nicht dargestellt). Eine Phosphorylierung der solubilisierten Rezeptorproteine HA-mCXCR4-A und HA-hCXCR1 durch mGRK6-C konnte nicht nachgewiesen werden.

4.4 Funktionelle Regulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch mGRK6-C in intakten Zellen

4.4.1 Einfluss von mGRK6 und den mGRK6-Mutanten auf die hCXCR4-stimulierte *serum response factor*-abhängige transkriptionelle Genaktivierung

Da in den vorausgegangenen Untersuchungen keine Phosphorylierung des solubilisierten Rezeptorproteins HA-mCXCR4-A durch mGRK6-C im zellfreien System nachgewiesen worden war, sollte untersucht werden, ob zelluläre Funktionen von CXCR4 durch

mGRK6-C in intakten Zellen reguliert werden. Vorausgegangene Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass es bei heterologer Expression der humanen CC-Chemokinrezeptoren CCR2a und CCR2b und Stimulation durch ihren Liganden CCL2 zur transkriptionellen Genaktivierung eines vom Transkriptionsfaktor *serum-response-factor* (SRF) regulierten Reportergens kommt (Passarge, Diplomarbeit, 2006). Um zu untersuchen, ob auch die heterologe Expression des humanen CXCR4 (hCXCR4) nach Stimulation mit humanem CXCL12 (hCXCL12) zu einer SRF-abhängigen transkriptionellen Genaktivierung führt und welchen Einfluss die Expression von mGRK6-C bzw. der Mutanten mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ auf die hCXCR4-stimulierte SRF-abhängige Gentranskription hat, wurden diese Proteine in COS-7-Zellen transient exprimiert und die SRF-abhängige transkriptionelle Genaktivierung des Luziferase-Reportergens analysiert.

Die SRF-abhängige Gentranskription wurde mit Hilfe des *Dual Luciferase[®] Reporter Assay Systems* untersucht. Dieses System beruht auf der Kotransfektion der Zellen mit zwei Reporterplasmiden. Das erste Reporterplasmid pSRE.L (*firefly*) trägt die cDNA der Luziferase des amerikanischen Glühwürmchens *Photinus pyralis* (*firefly*-Luziferase) unter der Kontrolle des transkriptionellen Regulatorelements SRE.L. Letzteres ist ein Derivat des *serum response element* (SRE) von *c-fos*, welches derart modifiziert wurde, dass es den Transkriptionsfaktor SRF, nicht jedoch den *ternary complex factor* (TCF) binden kann. Somit wird die Transkription des *firefly*-Luziferase-Gens durch die Bindung von SRF an den Promotor des Reporterplasmids induziert und die Produktion der *firefly*-Luziferase ist ein Maß für die Aktivität des SRF. Das zweite Reporterplasmid, pRL-TK, trägt die cDNA der Luziferase der Koralle *Renilla reniformis* (*Renilla*-Luziferase) unter der Kontrolle des Promotors des *Herpes-simplex-Virus*-Thymidinkinasegens (HSV-TK). Dieser Promotor erlaubt die konstitutive Expression der *Renilla*-Luziferase auf niedrigem Niveau. Die Bestimmung der Aktivität der Reporterengenprodukte erfolgte nach den vom Hersteller des Assaysystems gemachten Angaben. Dazu wurde zunächst die Aktivität der *firefly*-Luziferase durch Zugabe des Substrats (*Luziferase Assay Reagent II*) ermittelt. Diese Reaktion wurde durch Zugabe des *Stop&Glo*-Reagenz gestoppt. Da das *Stop&Glo*-Reagenz auch das Substrat der *Renilla*-Luziferase enthält, konnte im direkten Anschluss die *Renilla*-Luziferase-Aktivität bestimmt werden. Die *Renilla*-Luziferase-Aktivität ist ein Maß für die

Transfektionseffizienz. Die für die *firefly*-Luziferase-Aktivität ermittelten Werte wurden anhand der Transfektionseffizienz korrigiert.

Zur Expression von HA-hCXCR4 und mGRK6-C wurden COS-7-Zellen mit den pRL-TK Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK und den Expressionsplasmiden HA-hCXCR4-pcDNA3.1(+) und/oder mGRK6-C-pcDNA3.1(+) oder den entsprechenden Mengen des Leervektors kotransfiziert. Nach 22 Stunden wurde den Zellen für 5 weitere Stunden 100 nM hCXCL12 oder die entsprechende Menge Lösungsmittel zugegeben. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt.

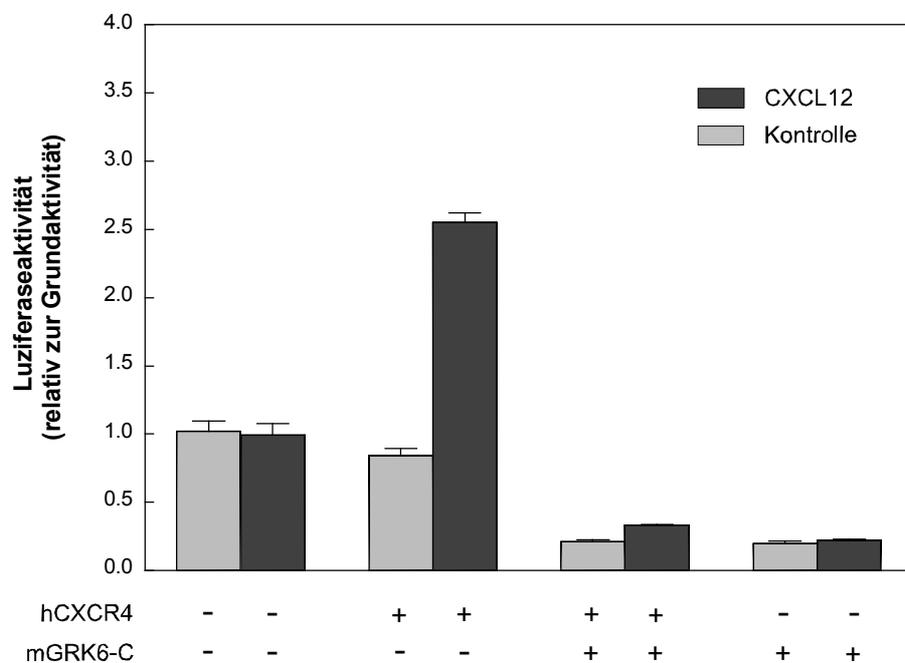


Abb. 21: Einfluss von mGRK6-C auf die HA-hCXCR4-stimulierte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils 0,06 μg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,2 μg des Expressionsplasmids HA-hCXCR4-pcDNA3.1(+) und/oder 0,4 μg des Expressionsplasmids mGRK6-C-pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 22 Stunden wurde den Zellen 100 nM CXCL12 oder die entsprechenden Mengen Lösungsmittel zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für weitere 5 Stunden inkubiert und die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass HA-hCXCR4-exprimierende Zellen bei Zugabe von 100 nM hCXCL12 eine Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription um den *ca.* 3-fachen Wert gegenüber Zellen ohne Zugabe von hCXCL12 aufwiesen. Die Koexpression von mGRK6-C mit HA-hCXCR4 führte zu einer *ca.* 50 %igen Inhibierung der durch Zugabe des Liganden hCXCL12 induzierten, HA-hCXCR4-stimulierten SRF-abhängigen Gentranskription. Des Weiteren zeigte sich, dass die Expression von mGRK6-C in COS-7-Zellen in einer *ca.* 80 %igen Abnahme der basalen SRF-abhängigen Gentranskription resultierte. Die Ergebnisse zeigen, dass es bei heterologer Expression von HA-hCXCR4 in COS-7-Zellen zu einer Liganden-induzierten Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription kommt, und dass diese durch Koexpression von mGRK6-C spezifisch inhibiert wird.

Da es in Anwesenheit des wildtypischen mGRK6-C-Proteins zu einer Inhibierung der von hCXCR4-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription gekommen war, sollte im Folgenden geklärt werden, ob auch die Expression von mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ einen Einfluss auf die HA-hCXCR4-stimulierten SRF-abhängigen Gentranskription hat. Dabei sollte insbesondere der Frage nachgegangen werden, ob die Veränderung der potentiellen Lipidinteraktionsstellen von mGRK6-C zu Veränderungen der inhibitorischen Wirkung von mGRK6-C auf die HA-hCXCR4-stimulierte SRF-abhängige Gentranskription führt. Um die mGRK6-Mutanten in COS-7-Zellen exprimieren zu können, mussten zunächst für die Transfektion von Säugetierzellen geeignete mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻-kodierende Expressionsplasmide hergestellt werden. Dazu wurden zunächst die cDNAs von mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ aus dem Insektenzell-spezifischen Expressionsvektor pVL1393 mit der Restriktionsendonuklease EcoRI herausgeschnitten und in den mit EcoRI-linearisierten und mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierten Expressionsvektor pcDNA3.1(+) ligiert. Die cDNA von mGRK6-C/N⁻C⁺ wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI aus dem Vektor pVL1393 herausgeschnitten und in den mit BamHI und EcoRI linearisierten Expressionsvektor pcDNA3.1(+) ligiert. Die korrekte Orientierung und die Nukleotidsequenz der mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻-cDNAs in pcDNA3.1(+) wurden durch Sequenzierung überprüft. Im Folgenden wurden COS-7-Zellen mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK und den Expressionsplasmiden mGRK6-C/N⁻C⁺-pcDNA3.1(+), mGRK6-C/N⁺C⁻-pcDNA3.1(+), mGRK6-C/N⁻C⁻-

pcDNA3.1(+) und/oder dem Expressionsplasmid HA-hCXCR4-pcDNA3.1(+) oder den entsprechenden Mengen des Leervektors kotransfiziert. Nach 22 Stunden wurde den Zellen für 5 weitere Stunden 100 nM hCXCL12 oder die entsprechende Menge Lösungsmittel zugegeben. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt.

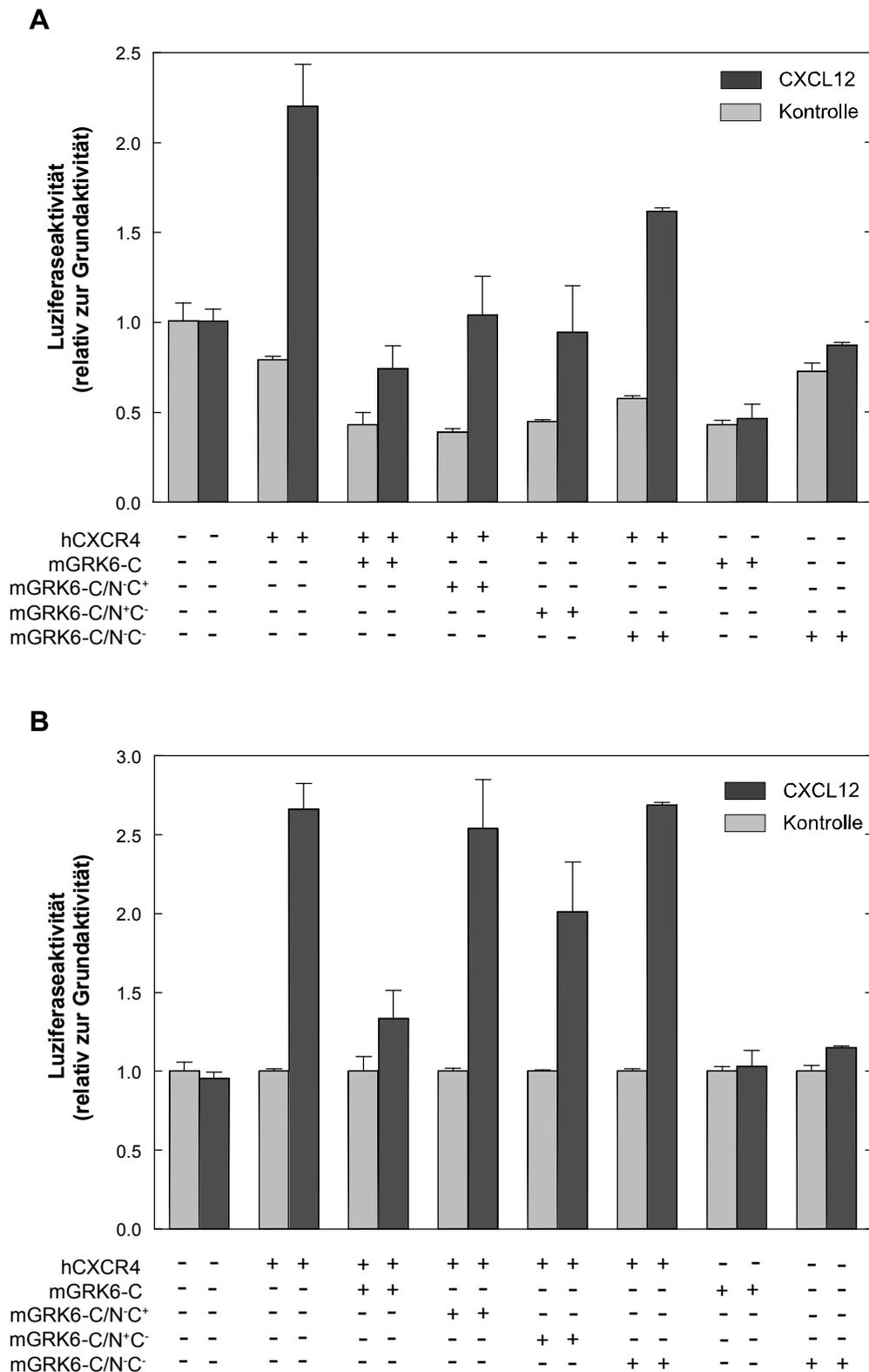


Abb. 22: Einfluss von mGRK6-C/N⁺C⁺, mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ auf die Liganden-stimulierte, HA-hCXCR4-induzierte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription (A) COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils $0,06 \mu\text{g}$ DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit $0,2 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids HA-hCXCR4-

pcDNA3.1(+) und/oder 0,4 µg der Expressionsplasmide mGRK6-C-pcDNA3.1(+), mGRK6-C/N⁺C⁻-pcDNA3.1(+), mGRK6-C/N⁺C⁻-pcDNA3.1(+), oder mGRK6-C/N⁻C⁻-pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 22 Stunden wurde den Zellen 100 nM CXCL12 oder die entsprechenden Mengen Lösungsmittel zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für weitere 5 Stunden inkubiert und die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen. **(B)** Darstellung der auf den Wert der Liganden-unabhängigen Stimulation normierten Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription.

Die in Abbildung 22 A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es bei Zugabe von CXCL12 zu hCXCR4-exprimierenden Zellen zu einer *ca.* 3-fachen Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription kam. Bei Koexpression von mGRK6-C nahm diese Stimulation um *ca.* 50 % wieder ab. Bei Koexpression von hCXCR4 mit mGRK6-C/N⁺C⁺ bzw. mit mGRK6-C/N⁺C⁻ kam es ebenfalls zu einer Abnahme der Liganden-stimulierten hCXCR4-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription. Jedoch lag die Inhibierung der hCXCR4-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription mit *ca.* 13 % bei mGRK6-C/N⁺C⁺ und *ca.* 27 % bei mGRK6-C/N⁺C⁻ deutlich unter der, die für das wildtypische Protein beobachtet worden war. Die Koexpression von hCXCR4 mit mGRK6-C/N⁻C⁻ hatte nach Stimulation mit CXCL12 nur eine geringe Abnahme von *ca.* 7 % der durch hCXCR4-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription zur Folge. Des Weiteren zeigte sich, dass es auch bei Expression von mGRK6-C/N⁻C⁺, mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ in COS-7-Zellen zu einer Abnahme der basalen SRF-abhängigen Gentranskription kam. Diese lag bei *ca.* 50 %. Um den Einfluss der Expression der verschiedenen mGRK6-Mutanten auf die hCXCR4-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription besser miteinander vergleichen zu können, wurden die ermittelten Werte jeweils auf die Liganden-unabhängige Stimulation der hCXCR4-exprimierenden Zellen allein bzw. der hCXCR4- und mGRK6-Mutanten-koexprimierenden Zellen normiert und somit die „-fache Stimulation“ ermittelt. Die in Abbildung 22 B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass für hCXCR4-exprimierende Zellen nach Zugabe von CXCL12 eine *ca.* 2,7-fache Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen zu beobachten war. Bei Koexpression von hCXCR4 mit mGRK6-C wurde dagegen nur noch eine *ca.* 1,3-fache Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription beobachtet. COS-7-

Zellen, welche hCXCR4 und mGRK6-C/N⁺C⁻ koexprimierten, zeigten nach Ligandenzugabe noch eine *ca.* 2-fache Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription. Dagegen kam es bei Koexpression von hCXCR4 mit mGRK6-C/N⁻C⁻ bzw. mit mGRK6-C/N⁻C⁺ zu keiner Abnahme der von hCXCR4-induzierten Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription. Diese Ergebnisse zeigen, dass die potentiellen Membranbindungsstellen des wildtypischen mGRK6-C Proteins eine wichtige Rolle für die Regulation hCXCR4-induzierter zellulärer Funktionen, wie der SRF-abhängigen Gentranskription spielen. So reduziert der Austausch von basischen Aminosäuren gegen neutrale Aminosäuren in der potentiellen carboxylterminalen Membranbindungsstelle den regulatorischen Einfluss der Kinase auf die hCXCR4-induzierte SRF-abhängige Gentranskription deutlich. Änderungen in der potentiellen aminoterminalen bzw. der amino- und carboxylterminalen Membranbindungsstellen des mGRK6-C-Proteins hoben den regulatorischen Einfluss der Kinase auf die SRF-abhängigen Gentranskription sogar ganz auf.

4.4.2 Einfluss von mGRK6 und mGRK6-Mutanten auf die pUS28-stimulierte *serum response*-Faktor-abhängige transkriptionelle Genaktivierung

Vorausgegangene Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass es bei Expression des vom humanen Zytomegalievirus (HCMV)-kodierte Chemokinrezeptorhomologs HA-pUS28 in COS-7-Zellen zu einer konstitutiven Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription eines Reportergens kommt (Tulone, Dissertation, 2004). Bei pUS28 handelt es sich um das Proteinprodukt des HCMV-kodierte offenen Leserasters US28. Im Folgenden sollte der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss die Expression von mGRK6-C bzw. mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ auf die Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription durch das konstitutiv aktive Chemokinrezeptorhomolog pUS28 hat. Um dies zu untersuchen, wurden COS-7-Zellen mit cDNAs, welche für HA-pUS28, mGRK6-C, bzw. mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ kodierten, kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt.

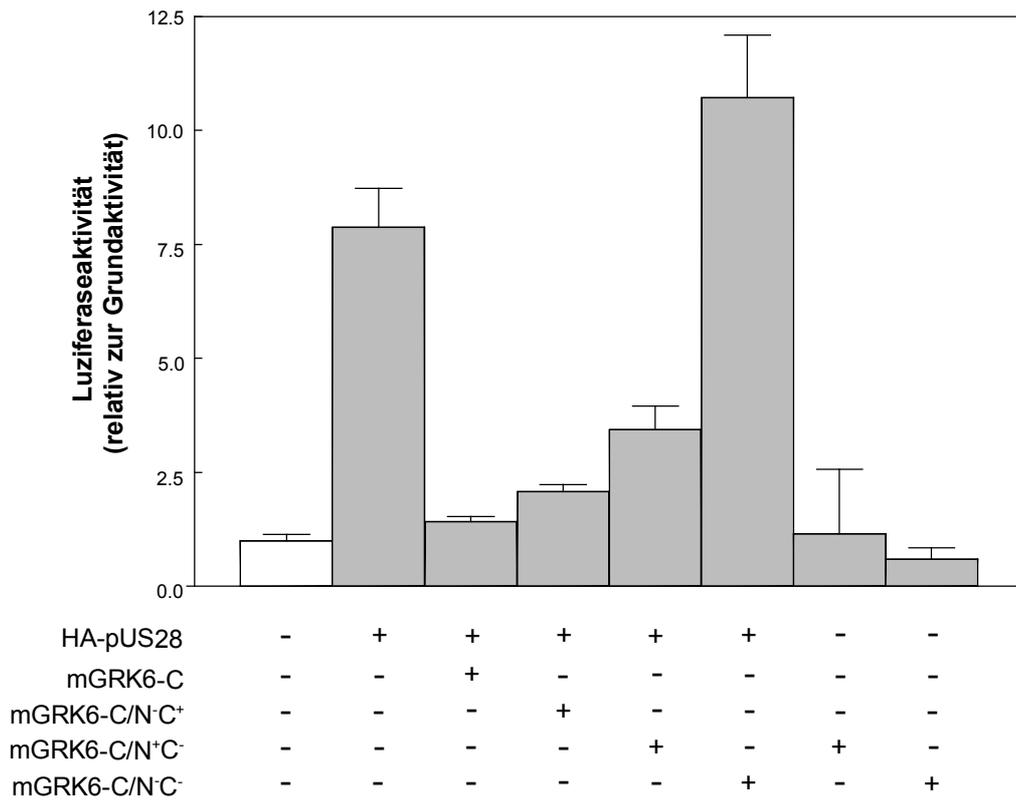


Abb. 23: Einfluss von mGRK6-C, mGRK6-C/N⁺C⁺, mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ auf die pUS28-induzierte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils $0,06 \mu\text{g}$ DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit $0,2 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ8 und/oder $0,4 \mu\text{g}$ der Expressionsplasmide mGRK6-C-pcDNA3.1(+), mGRK6-C/N⁺C⁺-pcDNA3.1(+), mGRK6-C/N⁺C⁻-pcDNA3.1(+), mGRK6-C/N⁻C⁻-pcDNA3.1(+), oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es bei den Lysaten aus den HA-pUS28-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Lysaten aus Kontrollzellen zu einer *ca.* 8-fachen Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription kam. Bei Koexpression von mGRK6-C mit HA-pUS28 wurde die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription nahezu vollständig inhibiert. Die Koexpression von HA-pUS28 mit mGRK6-C/N⁺C⁺ bzw. mGRK6-C/N⁺C⁻ resultierte ebenfalls in einer fast vollständigen Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription. Jedoch war die

Inhibierung geringer, als die in Anwesenheit von mGRK6-C beobachtete. So kam es bei Expression von mGRK6-C/N⁺C⁺ noch zu einer *ca.* 2-fachen und bei Expression von mGRK6-C/N⁺C⁻ noch zu einer *ca.* 4-fachen Zunahme der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription. Überraschend war, dass bei Koexpression von HA-pUS28 mit mGRK6-C/N⁻C⁻ eine *ca.* 11-fache Stimulation der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription beobachtet wurde, während für HA-pUS28-exprimierende Zellen nur eine *ca.* 8-fache Stimulation nachgewiesen worden war. Warum es bei Koexpression von HA-pUS28 mit mGRK6-C/N⁻C⁻ zu einer Zunahme der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription kommt, ist unklar. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die potentiellen Membranbindungsstellen des wildtypischen mGRK6-C Proteins auch für die Regulation der vom konstitutiv aktiven pUS28 induzierten SRF-abhängigen Gentranskription eine wichtige Rolle spielen. So nimmt die mGRK6-C vermittelte Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription ab, sobald die an der Interaktion mit der Membran beteiligten basischen Aminosäuren in mGRK6-C durch neutrale Aminosäuren ersetzt werden. Das Entfernen von basischen Aminosäuren aus den potentiellen Membraninteraktionsstellen im aminoterminalen und carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-C wie in mGRK6-C/N⁻C⁻ führt zur Aufhebung der Regulation der konstitutiven pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription durch die Kinase.

Ergebnisse der Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die Koexpression von HA-pUS28 mit der G α_q -Untereinheit zu einer synergistischen Steigerung der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription führt (Tulone, Dissertation, 2004). Daher sollte als Nächstes untersucht werden, welchen Einfluss die Koexpression von mGRK6-C bzw. mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription bei Expression von G α_q -Untereinheiten hat. Dazu wurde HA-pUS28 mit G α_{q-EE} und mGRK6-C bzw. mGRK6-C/N⁺C⁻, mGRK6-C/N⁻C⁺ und mGRK6-C/N⁻C⁻ in COS-7-Zellen koexprimiert und die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten ermittelt.

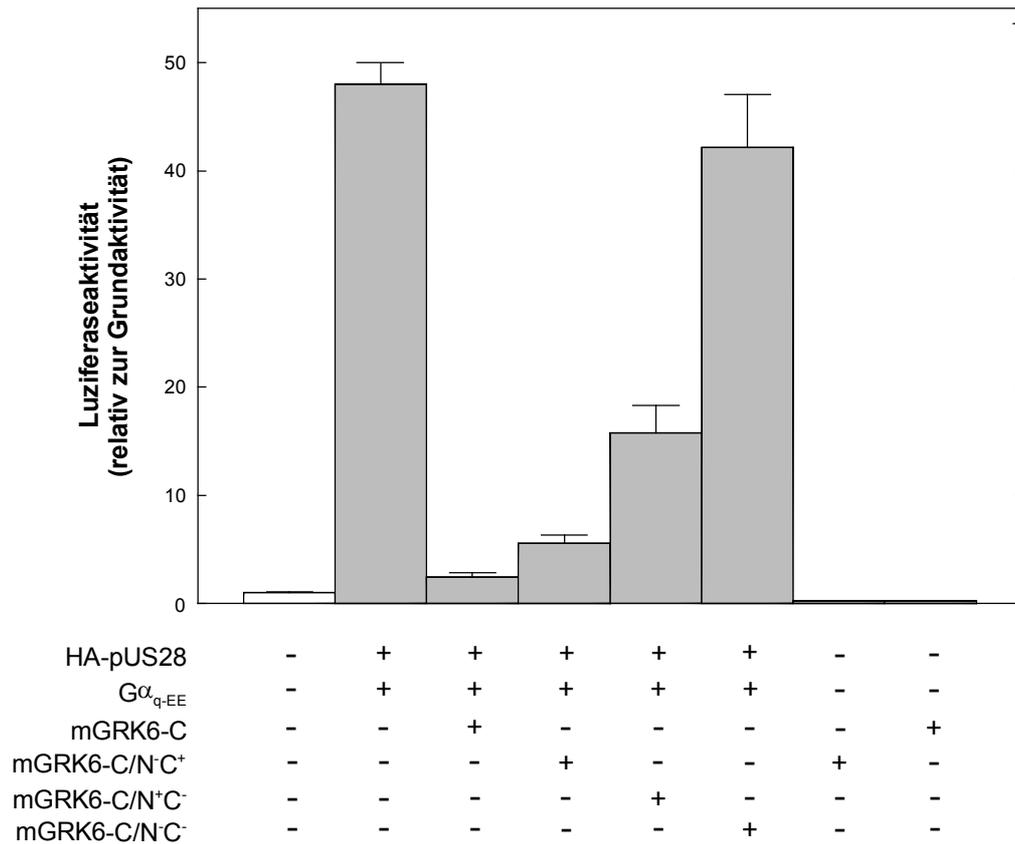
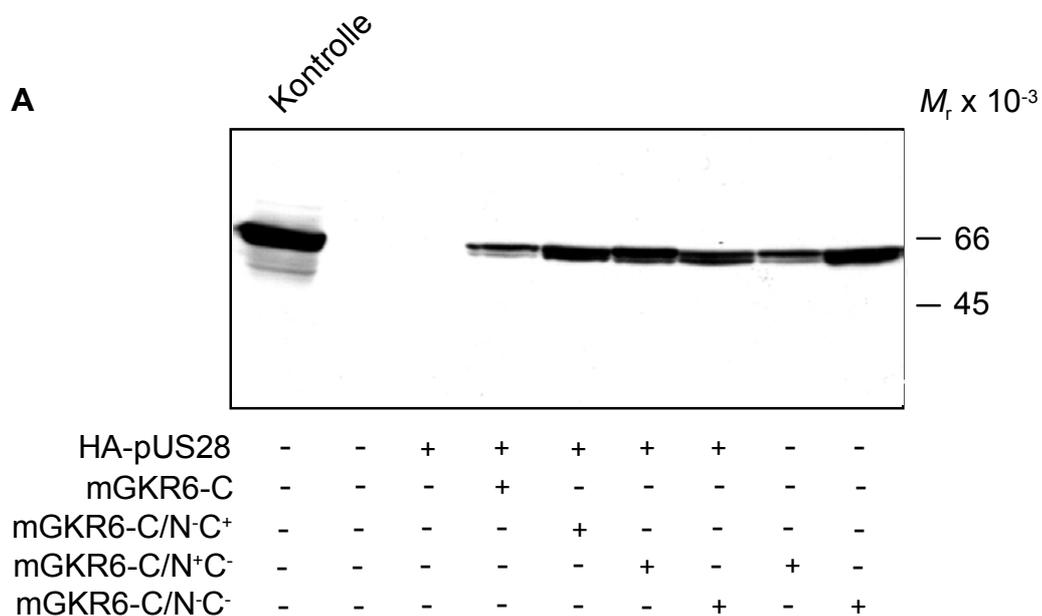


Abb. 24: Einfluss von mGRK6-C, mGRK6-C/N⁻C⁺, mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ auf die pUS28-induzierte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von $G\alpha_q$ -Untereinheiten. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils 0,06 μ g DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,2 μ g und 0,05 μ g der Expressionsplasmide HA-pUS28-pTEJ8 und $G\alpha_{q-EE}$ -pcDNA3.1(+) und/oder 0,4 μ g der Expressionsplasmide mGRK6-C-pcDNA3.1(+), mGRK6-C/N⁺C⁺-pcDNA3.1(+), mGRK6-C/N⁺C⁻-pcDNA3.1(+), oder mGRK6-C/N⁻C⁻-pcDNA3.1(+), oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Koexpression von pUS28 und $G\alpha_{q-EE}$ zu einer *ca.* 50-fachen Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription führte. Diese Aktivierung wurde durch Koexpression von mGRK6-C fast vollständig inhibiert. Die Koexpression von HA-pUS28 mit $G\alpha_{q-EE}$ und den Mutanten mGRK6-C/N⁺C⁺ und mGRK6-C/N⁺C⁻ verursachte ebenfalls eine starke Inhibierung der SRF-abhängigen Gentranskription. Dabei bewirkte mGRK6-C/N⁺C⁺ eine *ca.* 90 %ige und mGRK6-C/N⁺C⁻

eine *ca.* 70 %ige Inhibierung der SRF-abhängigen Gentranskription. Dagegen kam es bei Koexpression von HA-pUS28 und $G\alpha_{q-EE}$ mit mGRK6-C/N⁻C⁻ zu keiner Inhibierung der SRF-abhängigen Gentranskription. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch in Anwesenheit von $G\alpha_{q-EE}$ die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription spezifisch durch mGRK6-C inhibiert werden kann. Wiederum sind dabei für die Regulation der pUS28/ $G\alpha_{q-EE}$ -induzierten SRF-abhängigen Gentranskription die basischen Aminosäuren in den potentiellen Lipidinteraktionsstellen am amino- bzw. carboxylterminalen Abschnitt der Kinase mGRK6-C von Bedeutung.

Um ausschließen zu können, dass die beobachteten Unterschiede in der Regulation der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription durch mGRK6-C und den mGRK6-C-Mutanten auf Unterschiede in der Expression der Kinasen zurückzuführen waren, wurde die Expression der GRKs in *Western blot*-Analysen mit einem mGRK6-spezifischen Antikörper überprüft.



dargestellt. Die Abbildungen zeigen, dass die Expression der drei mGRK6-C-Mutanten in Anwesenheit von pUS28 allein (**A**) oder in Anwesenheit von pUS28 und $G\alpha_{q-EE}$ (**B**) ähnlich sind. Im Vergleich zu den Mutanten war die Expression von mGRK6-C sowohl in Anwesenheit von pUS28 allein (**A**) als auch in Anwesenheit von pUS28 und $G\alpha_{q-EE}$ (**B**) etwas geringer. Diese Ergebnisse zeigen, dass obwohl die mGRK6-C Mutanten eine stärkere Expression als das wildtypische mGRK6-C Protein aufwiesen, die Expression der Mutanten eine geringere Inhibition der pUS28- bzw. pUS28/ $G\alpha_{q-EE}$ -induzierten SRF-abhängigen Gentranskription zur Folge hatte. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der potentiellen Membraninteraktionsstellen für die Funktionen des mGRK6-Proteins.

4.4.3 Einfluss der *RGS homology domain* von mGRK6-C auf die Aktivität des konstitutiv aktiven Chemokinrezeptorhomologs pUS28

Untersuchungen von Miller *et al.* und Casarosa *et al.* haben gezeigt, dass die Desensibilisierung des Chemokinrezeptorhomologs pUS28 durch GRK2 und GRK5 auf unterschiedliche Art und Weise erfolgt (Miller *et al.*, 2003; Casarosa *et al.*, 2001). Während GRK5 die zellulären Funktionen des Chemokinrezeptorhomologs durch Phosphorylierung hemmt, erfolgt die Inhibierung durch GRK2 vermutlich durch das Binden von $G\alpha_q$ an die *regulator of G protein signalling (RGS) homology domain* der Kinase. RGS-Proteine zeichnen sich durch eine charakteristische, ca. 120 Aminosäuren große RGS-Domäne aus und katalysieren als GTPase *activating proteins* (GAPs) die GTP-Hydrolyse sowohl von Mitgliedern der $G\alpha_q$ -Familie als auch von $G\alpha_{i/o}$. Zahlreiche Mitglieder der GRK-Familie weisen in ihrem aminoterminalen Abschnitt Sequenzhomologie zu der RGS-Domäne auf, weshalb dieser Bereich auch als *RGS homology domain* (RH) bezeichnet wird (Sterne-Marr *et al.*, 2003). Für die humane GRK6 (hGRK6) wurde die RH-Domäne im Bereich von Aminosäure 52-171 lokalisiert. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von hGRK6 und mGRK6-C zeigte, dass 110 Aminosäuren in der Aminosäuresequenz von mGRK6-C mit den 119 Aminosäuren der RH-Domäne von hGRK6 übereinstimmen. Aufgrund der Tatsache, dass es bei Expression von mGRK6-C zu einer Inhibierung der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen

Gentranskription gekommen war, sollte im Folgenden geklärt werden, ob diese Inhibierung auf die GAP-Funktion dieser potentiellen RH-Domäne zurückzuführen ist. Um diese Frage klären zu können, wurde zunächst eine den aminoterminalen Abschnitt der mGRK6-C-kodierende cDNA (GRK6-C N-term) hergestellt. Diese cDNA kodiert für ein Protein mit 185 Aminosäuren und umfasst neben dem Aminoterminus den potentiellen Bereich der RH-Domäne. Als *template* wurde die cDNA von mGRK6-C verwendet, die im Klonierungsvektor pBluescriptTMII Sk(-) vorlag. Die *annealing*-Temperatur der Oligonukleotide A1 und GRK6-RGS lag bei 64 °C. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 % (m/V) Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und in den Vektor pCR Zero Blunt[®] (Invitrogen) ligiert. Für die Expression in COS-7-Zellen wurde die cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-) ligiert. Dazu wurde die mGRK6-C N-term-kodierende cDNA mit Hilfe der Restriktionsendonuklease EcoRI aus dem Vektor pCR Zero Blunt[®] herausgeschnitten, in einem 1 % (m/V) Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel aufgereinigt und in einen mit EcoRI-linearisierten und mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierten Vektor pcDNA3.1(-) ligiert. Die Orientierung und Nukleotidsequenz der DNA wurde durch Sequenzierung überprüft.

Um zu klären, welchen Einfluss die Expression der potentiellen RH-Domäne von mGRK6-C auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription hat, wurde mGRK6-C N-term zusammen mit HA-pUS28 bzw. mit HA-pUS28 und $G\alpha_{q-EE}$ in COS-7-Zellen exprimiert und die HA-pUS28-induzierten SRF-abhängige Gentranskription ermittelt.

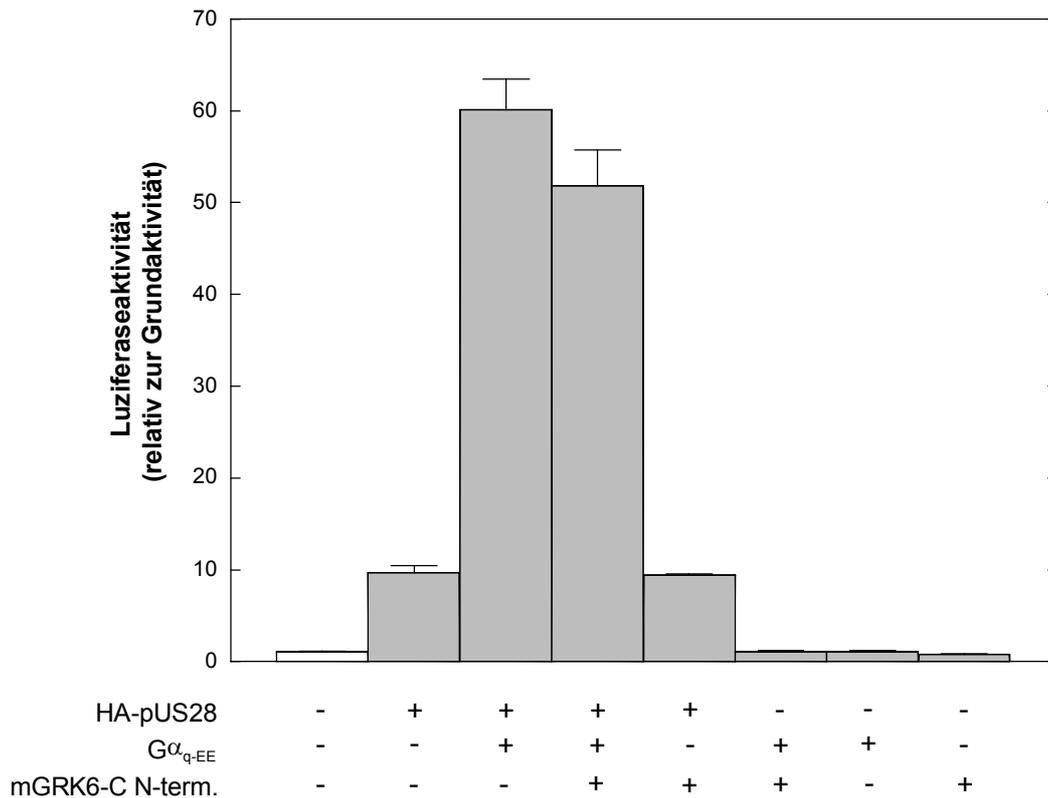


Abb. 26: Einfluss von mGRK6-C N-term auf die HA-pUS28 bzw. HA-pUS28/G α_{q-EE} -induzierte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils 0,06 μg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,2 μg des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ8 und/oder 0,2 μg des Expressionsplasmids mGRK6-C N-term-pcDNA3.1(-) und/oder 0,05 μg des Expressionsplasmids G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von mGRK6-C N-term keine bzw. nur eine minimale Inhibierung der HA-pUS28-induzierten Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription in Ab- bzw. Anwesenheit von G α_{q-EE} zur Folge hatte. Somit scheint für die Regulation der zellulären Funktionen von HA-pUS28 durch mGRK6-C die katalytische Aktivität und nicht eine potentielle GAP-Aktivität von mGRK6-C von Bedeutung zu sein.

4.5 Stimulation von Phospholipase C- β -Isoenzymen

Wie eigene Untersuchungen und die anderer Arbeitsgruppen gezeigt haben, kommt es sowohl bei transienter Expression von pUS28 in COS-7-Zellen als auch bei Infektion von humanen Fibroblasten mit pUS28-exprimierenden humanen Cytomegalieviren zu einer Stimulation von Phospholipase C- β -Isoenzymen (Casarosa *et al.*, 2001; Minisini *et al.*, 2003). Phospholipase C- β -Isoenzyme setzen membranäres Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat zu D-*myo*-Inosit-1,4,5-triphosphat (IP₃) und 1,2-Diacyl-*sn*-glycerin (DAG) um, was die Freisetzung von intrazellulären Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Reticulum bzw. die Aktivierung von Proteinkinase C-Isoenzymen zur Folge hat. Da die vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt hatten, dass die transiente Expression von mGRK6-C in HA-pUS28-exprimierenden COS-7-Zellen einen inhibierenden Effekt auf die von HA-pUS28-vermittelte zelluläre Funktion hat, sollte im Folgenden geklärt werden, ob und wenn ja, welchen Einfluss die Expression von mGRK6-C auf die Aktivierung der Phospholipase C- β -Isoenzyme durch HA-pUS28 hat. Dazu wurde HA-pUS28 mit G α_{q-EE} und mGRK6-C in COS-7-Zellen koexprimiert und die Bildung der Inositphosphate bestimmt.

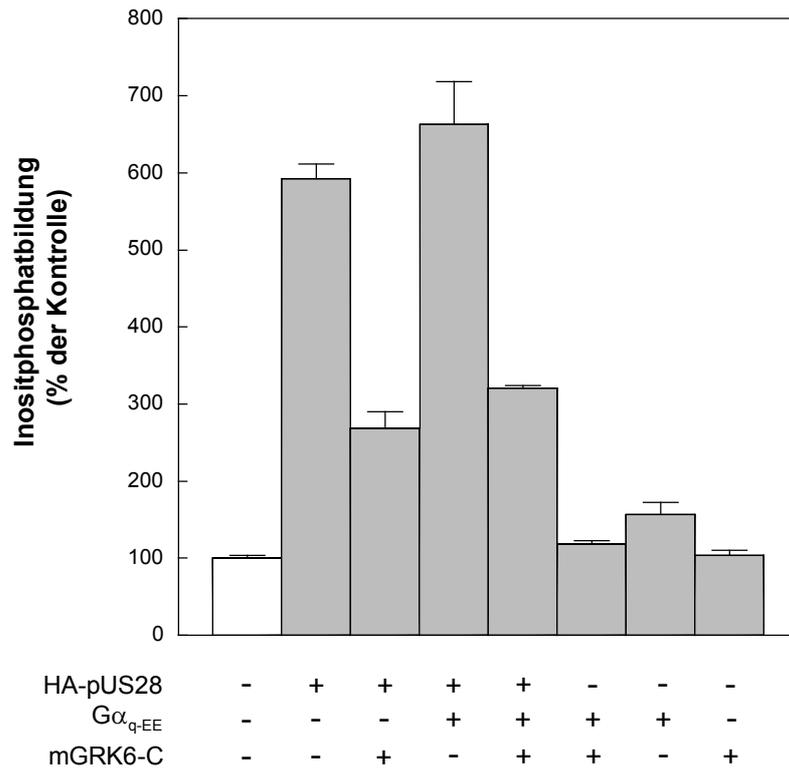


Abb. 27: Bestimmung der Inositphosphatbildung in HA-pUS28-, G α_{q-EE} - und mGRK6-C-exprimierenden COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (2×10^5) wurden mit jeweils 0,5 μ g DNA des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und 0,5 μ g G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder mGRK6-C-pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 17 Stunden in Inositol-freiem DMEM-Medium mit 3 μ Ci/ml D-*myo*-[2- 3 H(N)]-Inositol inkubiert. Danach wurden die Zellen für 1 Stunde mit 10 mM LiCl inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Bildung der Inositphosphate gemessen. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 27 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Expression von HA-pUS28 in COS-7-Zellen zu einer *ca.* 6-fache Zunahme der Inositphosphatbildung im Vergleich zu den Kontrollzellen führte. Diese Zunahme wurde durch Koexpression von G α_{q-EE} noch etwas erhöht. Die Koexpression von mGRK6-C mit HA-pUS28 resultierte in einer deutlichen Abnahme der Inositphosphatbildung im Vergleich zur Inositphosphatbildung von Zellen, die HA-pUS28 allein exprimierten. So sank die Inositphosphatbildung um *ca.* 50 %. Die Koexpression von mGRK6-C mit HA-pUS28 und G α_{q-EE} führte ebenfalls zu einer Abnahme der Inositphosphatbildung um *ca.* 50 % gegenüber der Inositphosphatbildung von Zellen, die HA-pUS28 und G α_{q-EE} koexprimierten. Diese

Ergebnisse zeigen, dass die von HA-pUS28 induzierte und durch PLC β -Isoenzyme vermittelte Inositphosphatbildung durch Expression von mGRK6-C inhibiert werden kann. Da die vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt hatten, dass Veränderungen der potentiellen Lipidinteraktionsstellen von mGRK6-C Einfluss auf die inhibitorische Wirkung von mGRK6-C auf die HA-pUS28-stimulierte SRF-abhängige Gentranskription haben, sollte als Nächstes untersucht werden, ob dies auch für die pUS28-induzierte und durch PLC β -Isoenzyme-vermittelte Inositphosphatbildung gilt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde HA-pUS28 zusammen mit mGRK6-C/N \bar{C} und G α_{q-EE} in COS-7-Zellen exprimiert und die Bildung von Inositphosphaten bestimmt.

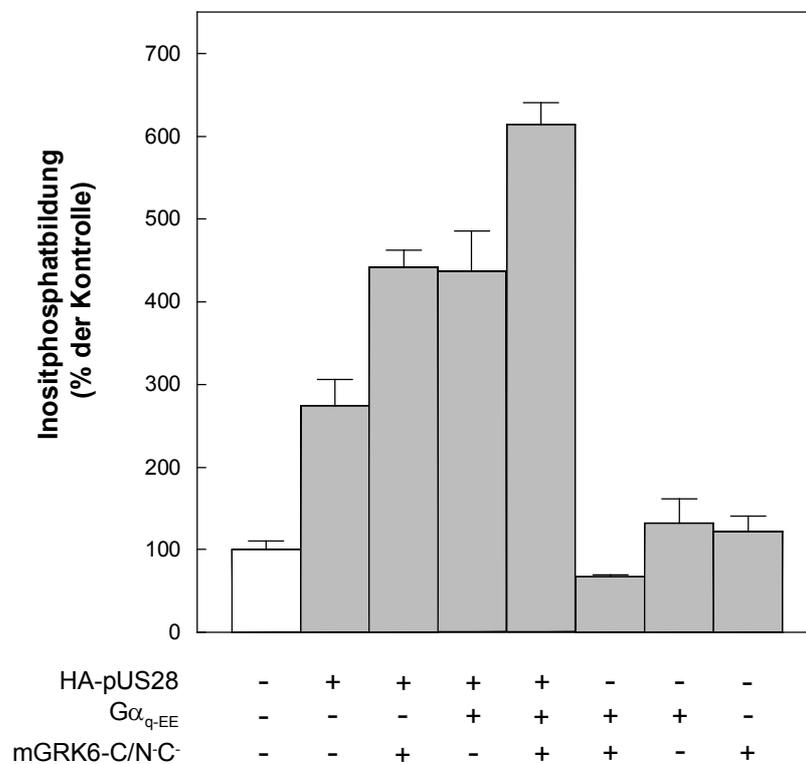


Abb. 28: Bestimmung der Inositphosphatbildung in HA-pUS28-, G α_{q-EE} - und mGRK6-C/N \bar{C} -exprimierenden COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (2×10^5) wurden mit jeweils 0,5 μ g DNA des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und 0,5 μ g DNA der Expressionsplasmide G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder mGRK6-C/N \bar{C} -pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 17 Stunden in Inositol-freiem DMEM-Medium mit 3 μ Ci/ml D-*myo*-[2- 3 H(N)]-Inositol inkubiert. Danach wurden die Zellen für 1 Stunde mit 10 mM LiCl inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Bildung der Inositphosphate gemessen. Die in der

Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Wie die in Abbildung 28 dargestellten Ergebnisse zeigen, wurde die PLC β -vermittelte Inositphosphatbildung durch Expression von mGRK6-C/N \cdot C \cdot nicht gehemmt, sondern es kam sogar zu einer Zunahme der Inositphosphatbildung von *ca.* 60 %. Auch bei Koexpression von HA-pUS28 und G α_{q-EE} mit mGRK6-C/N \cdot C \cdot kam es zu einer 40 %igen Zunahme der Inositphosphatbildung gegenüber der Inositphosphatbildung von Zellen, die HA-pUS28 mit G α_{q-EE} allein exprimierten. Die Tatsache, dass die Mutante mGRK6-C/N \cdot C \cdot keinen inhibitorischen Einfluss auf die HA-pUS28-vermittelten zellulären Funktionen hatte, zeigt, dass für die beobachtete Inhibierung des wildtypischen mGRK6-C-Proteins die Interaktion mit der Plasmamembran von entscheidender Bedeutung ist.

4.6 Einfluss verschiedener G α -Untereinheiten auf die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription

Vorausgegangene Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass es in Anwesenheit von G α_q zu einer synergistischen Steigerung der durch HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription kommt. Deshalb sollte im Folgenden geklärt werden, ob auch die Expression anderer Vertreter der G α_q -Familie einen stimulatorischen Einfluss auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription hat. Dazu wurde HA-pUS28 zusammen mit den G-Protein Untereinheiten G α_{q-EE} , G α_{11-EE} , G α_{14-EE} und G α_{16-EE} , welche über Sequenzabschnitte verfügten, die für ein EE-Epitop kodierten, in COS-7-Zellen exprimiert. Anschließend wurde die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription ermittelt.

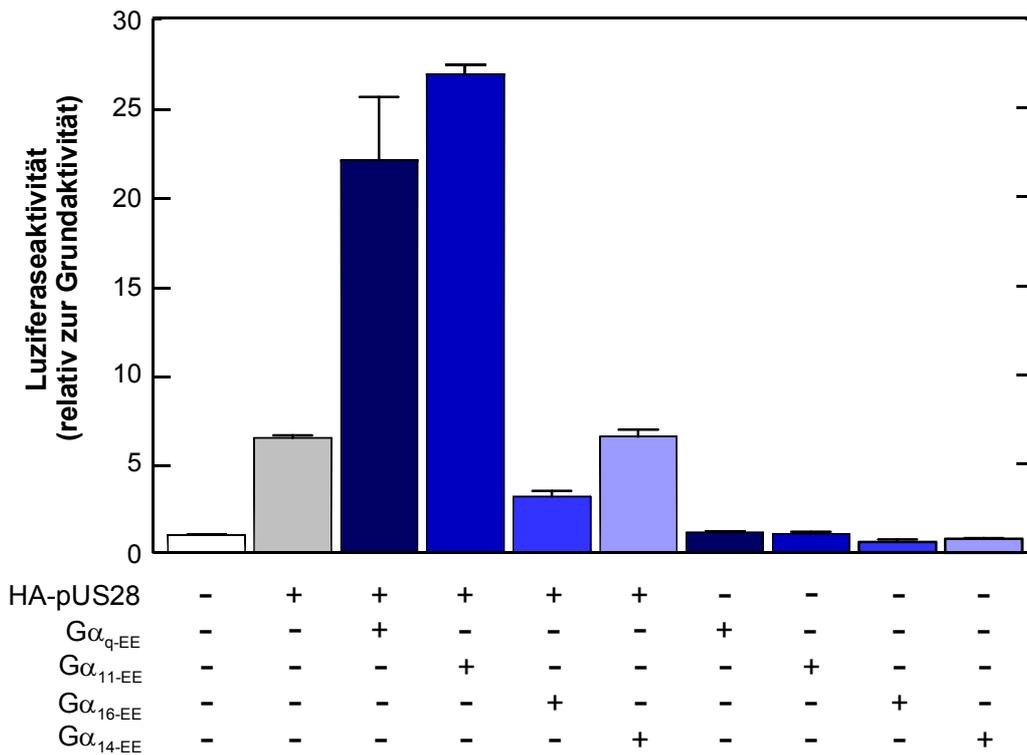


Abb. 29: Einfluss der Expression von Mitgliedern der $G\alpha_q$ -Familie auf die HA-pUS28-stimulierte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils 0,06 μg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,2 μg des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder 0,1 μg der Expressionsplasmide $G\alpha_{q-EE}$ -pcDNA3.1(+), $G\alpha_{11-EE}$ -pcDNA3.1(+), $G\alpha_{14-EE}$ -pcDNA3.1(+), bzw. $G\alpha_{16-EE}$ -pcDNA3.1(+), oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass HA-pUS28-exprimierende Zellen eine Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription auf den *ca.* 6-fachen Wert gegenüber der SRF-abhängigen Gentranskription von Kontrollzellen aufwiesen. Die Koexpression von $G\alpha_{q-EE}$ bzw. $G\alpha_{11-EE}$ mit HA-pUS28 bewirkte eine deutliche synergistische Steigerung (um das *ca.* 4- bzw. 4,5-fache) der HA-pUS28-stimulierten SRF-abhängigen Gentranskription. Dagegen hatte die Koexpression von $G\alpha_{14-EE}$ mit HA-pUS28 keine Erhöhung der SRF-abhängigen Gentranskription zur Folge. Die Koexpression von $G\alpha_{16-EE}$ mit HA-pUS28 verursachte sogar eine *ca.* 50 %ige Abnahme der HA-pUS28-

induzierten SRF-abhängigen Gentranskription. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Vertreter der $G\alpha_q$ -Familie hinsichtlich des Einflusses auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige deutlich unterscheiden.

4.6.1 Inhibierung der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription durch $G\alpha_{16-EE}$

Aufgrund der Tatsache, dass die Expression von $G\alpha_{16-EE}$ zu einer Inhibierung der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription geführt hatte, sollte als nächstes geklärt werden, ob diese Inhibierung mit den zur transienten Transfektion eingesetzten $G\alpha_{16-EE}$ -cDNA-Mengen korrelierte. Dazu wurden COS-7-Zellen mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRT-TK und der DNA des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ8 sowie mit steigenden DNA-Mengen des Expressionsplasmids $G\alpha_{16-EE}$ -pcDNA3.1(+) kotransfiziert.

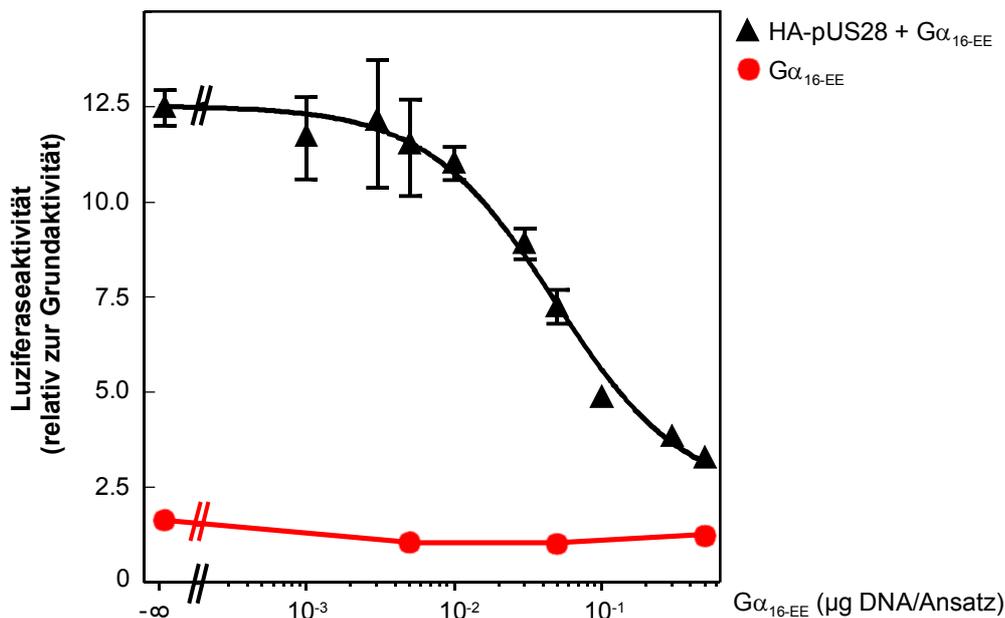


Abb. 30: Inhibierung der HA-pUS28-induzierten *serum-response-factor*-abhängigen Gentranskription durch $G\alpha_{16-EE}$. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils $0,06 \mu\text{g}$ DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit $0,2 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder steigenden Mengen ($0,001$ - $0,5 \mu\text{g}$) des Expressionsplasmids $G\alpha_{16-EE}$ -pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige

Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 30 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es bereits bei geringen Mengen von 0,01 μg des zur Transfektion eingesetzten Expressionsplasmids $G\alpha_{16\text{-EE}}\text{-pcDNA3.1(+)}$ zu einer Abnahme der HA-pUS28-stimulierten SRF-abhängigen Gentranskription kam. Je größer die Menge des zur Transfektion eingesetzten Expressionsplasmids $G\alpha_{16\text{-EE}}\text{-pcDNA3.1(+)}$ war, desto stärker wurde die HA-pUS28-stimulierte SRF-abhängige Gentranskription gehemmt. Die alleinige Expression von $G\alpha_{16\text{-EE}}$ hatte keinen Einfluß auf die basale SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen.

4.7 Untersuchung zellulärer Aktivitäten von HA-pUS28 bei Koexpression von $G\alpha_{\text{qQ209L}}$ bzw. $G\alpha_{16\text{R186C}}$

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass eine Aktivierung der G-Proteine $G\alpha_{\text{q}}$ und $G\alpha_{16}$ zu einer Stimulation der Phospholipasen $\text{PLC}\beta_1$ und $\text{PLC}\beta_2$ führt (Lee *et al.*, 1992). Da die vorausgegangenen eigenen Untersuchungen gezeigt haben, dass sich $G\alpha_{\text{q}}$ und $G\alpha_{16}$ bezüglich ihres Einflusses auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängigen Gentranskription unterscheiden, sollte im Folgenden geklärt werden, ob dies auch für die Vermittlung der HA-pUS28-induzierten Stimulation der $\text{PLC}\beta$ -Isoenzyme durch die beiden G-Protein-Untereinheiten zutrifft. Um dieser Frage nachzugehen, wurde HA-pUS28 mit den aktivierten G-Protein Untereinheiten $G\alpha_{\text{qQ209L}}$ und $G\alpha_{16\text{R186C}}$ in COS-7-Zellen koexprimiert und die Bildung von Inositphosphaten in den transfizierten Zellen untersucht.

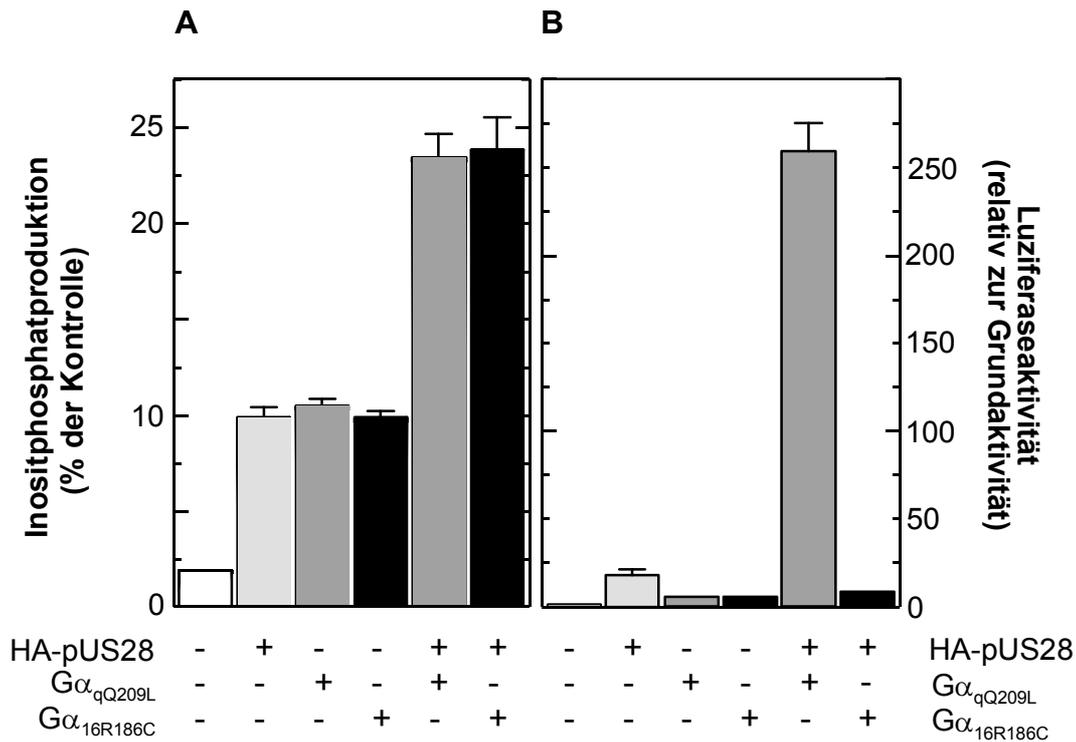


Abb. 31: Einfluss von $G\alpha_{qQ209L}$ und $G\alpha_{16R186C}$ auf die HA-pUS28-induzierte Inositphosphatbildung (A) und auf die HA-pUS28-stimulierte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription (B) in COS-7-Zellen. (A) COS-7-Zellen (2×10^5) wurden mit jeweils 0,5 μg DNA des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder 0,5 μg der Expressionsplasmide $G\alpha_{qQ209L}$ -pcDNA3.1(+) oder $G\alpha_{16R186C}$ -pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 17 Stunden in Inositol-freiem DMEM-Medium mit 3 $\mu\text{Ci/ml}$ D-*myo*-[2- $^3\text{H(N)}$]-Inositol inkubiert. Danach wurden die Zellen für 1 Stunde mit 10 mM LiCl inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Bildung der Inositphosphate gemessen. (B) COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils 0,06 μg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,2 μg des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder 0,4 μg des Expressionsplasmids $G\alpha_{16R186C}$ -pcDNA3.1(+) bzw. 0,05 μg des Expressionsplasmids $G\alpha_{qQ209L}$ -pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 31 A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Koexpression sowohl von $G\alpha_{qQ209L}$ als auch von $G\alpha_{16R186C}$ mit HA-pUS28 zu einer Zunahme der HA-pUS28-

stimulierten Inositphosphatbildung führte. Bei alleiniger Expression der G-Protein Untereinheiten in COS-7-Zellen war ein *ca.* 5-facher Anstieg der Inositphosphatbildung gegenüber der Inositphosphatbildung von Kontrollzellen zu beobachten. Die Koexpression der $G\alpha$ -Untereinheiten mit HA-pUS28 führte zu einer, wenn auch geringen, synergistischen Steigerung der Inositphosphatproduktion um das *ca.* 1,2-fache.

Parallel zur Bestimmung der Inositphosphatproduktion wurde die SRF-abhängige Gentranskription bei Koexpression von HA-pUS28 mit den G-Protein-Untereinheiten $G\alpha_{qQ209L}$ und $G\alpha_{16R186C}$ in COS-7-Zellen analysiert. Die in Abbildung 31 B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die HA-pUS28-stimulierte SRF-abhängige Gentranskription bei Expression von HA-pUS28 gegenüber der SRF-abhängigen Gentranskription von den Kontrollzellen um das *ca.* 8-fache zunahm. In Anwesenheit von $G\alpha_{qQ209L}$ wurde eine synergistische Steigerung der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription beobachtet, die in einer *ca.* 15-fachen Zunahme gegenüber der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription deutlich wurde. Dagegen verursachte die Expression von $G\alpha_{16R186C}$ in COS-7-Zellen eine Abnahme der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription um *ca.* 50 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass die von HA-pUS28 regulierten zellulären Funktionen durch die Interaktion mit spezifischen G-Protein-Untereinheiten bestimmt werden. So wurde die pUS28-induzierte PLC β -vermittelte Inositphosphatproduktion sowohl durch Koexpression von $G\alpha_q$ als auch $G\alpha_{16}$, die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription nur durch Koexpression von $G\alpha_q$ stimuliert.

4.7.1 Einfluss von Phospholipase C- β -Isoenzymen auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription

Das Ergebnis, dass HA-pUS28 durch Aktivierung von $G\alpha_q$ zwei unterschiedliche zelluläre Signalwege reguliert, führt zur Frage, ob diese Regulation unabhängig voneinander erfolgt. Um zu überprüfen, ob HA-pUS28 durch Aktivierung der PLC β -Isoenzyme die SRF-abhängige Gentranskription stimuliert, wurde HA-pUS28 mit PLC β_3 und $G\alpha_{q-EE}$ in COS-7-Zellen koexprimiert und die Zellen anschließend auf die Bildung von Inositphosphaten oder auf die Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription untersucht.

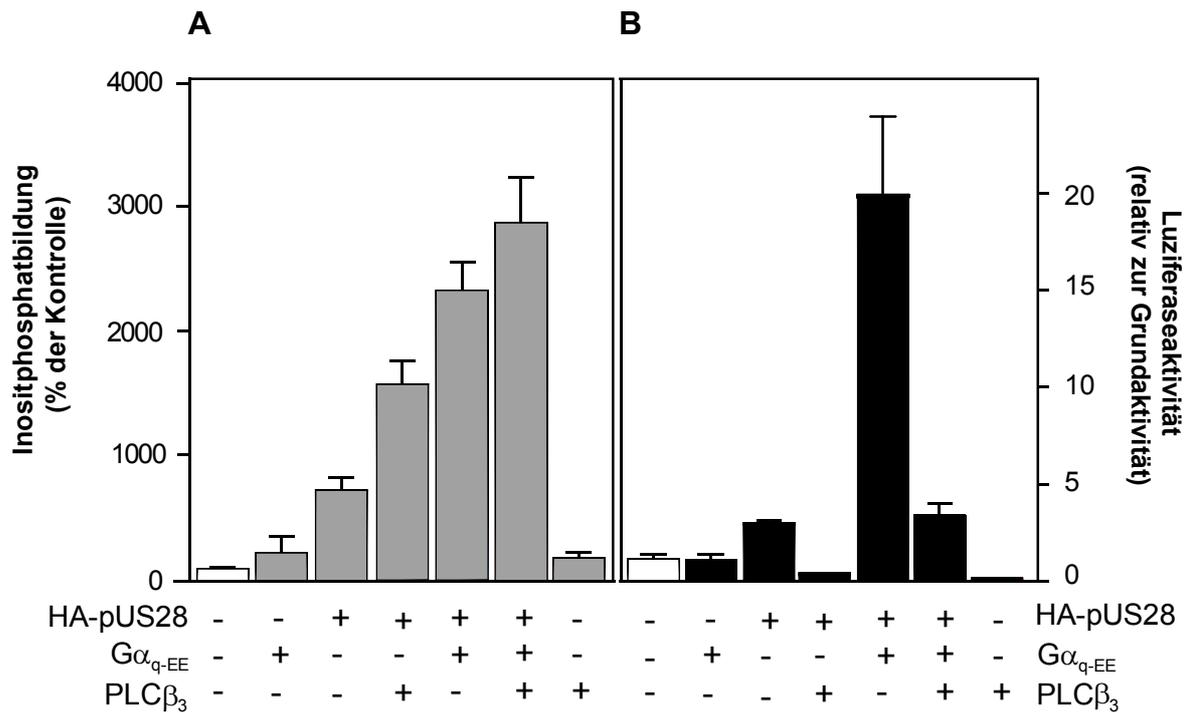


Abb. 32: Einfluss von PLC β_3 auf die HA-pUS28-stimulierte Inositphosphatbildung (A) und auf die HA-pUS28-stimulierte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription (B) in COS-7-Zellen. (A) COS-7-Zellen (2×10^5) wurden mit jeweils $0,5 \mu\text{g}$ DNA des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder $0,5 \mu\text{g}$ der Expressionsplasmide G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) oder PLC β_3 -pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 17 Stunden in Inositol-freiem DMEM-Medium mit $3 \mu\text{Ci/ml}$ D-*myo*-[2- ^3H (N)]-Inositol inkubiert. Danach wurden die Zellen für 1 Stunde mit 10 mM LiCl inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Bildung der Inositphosphate gemessen. (B) COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils $0,06 \mu\text{g}$ DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit $0,2 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder $0,4 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids PLC β_3 -pcDNA3.1(+) bzw. $0,05 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 32 A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Koexpression von PLC β_3 mit HA-pUS28 zu einer Zunahme der gebildeten Inositphosphate führte. Die

Inositphosphatbildung stieg dabei auf den *ca.* 2-fachen Wert gegenüber der Inositphosphatbildung von HA-pUS28 allein exprimierenden Zellen an. Die zusätzliche Expression von $G\alpha_{q-EE}$ führte zu einer weiteren Zunahme der HA-pUS28-induzierten Inositphosphatbildung in Anwesenheit von $PLC\beta_3$. In parallel durchgeführten Untersuchungen wurde der Einfluss von $PLC\beta_3$ auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription untersucht. Die in Abbildung 32 B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von $G\alpha_{q-EE}$ um den *ca.* 7-fachen Wert im Vergleich zur SRF-abhängigen Gentranskription von HA-pUS28 allein exprimierender COS-7-Zellen zunahm. Dagegen führte die Koexpression von $PLC\beta_3$ mit HA-pUS28 und $G\alpha_{q-EE}$ zu einer *ca.* 80 %igen Inhibierung der SRF-abhängigen Gentranskription gegenüber der SRF-abhängigen Gentranskription von Zellen, die HA-pUS28 und $G\alpha_{q-EE}$ exprimierten. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Aktivierung der HA-pUS28-stimulierten zellulären Funktionen sehr wahrscheinlich Effektorproteine um die Bindung von $G\alpha_q$ konkurrieren.

4.7.2 Analyse der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription in Anwesenheit verschiedener Phospholipase C- β -Isoenzyme

Um zu überprüfen, ob die Expression von anderen $PLC\beta$ -Isoenzymen, wie $PLC\beta_1$ und $PLC\beta_2$, einen ähnlichen Einfluss auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription hat wie $PLC\beta_3$, wurde HA-pUS28 mit $PLC\beta_1$ bzw. $PLC\beta_2$ und $G\alpha_{qQ209L}$ in COS-7-Zellen koexprimiert und die HA-pUS28-stimulierte SRF-abhängige Gentranskription analysiert. Dabei wurde untersucht, welchen Einfluss steigende Mengen der zur transienten Transfektion eingesetzten $PLC\beta_1$ - bzw. $PLC\beta_2$ -cDNAs auf die HA-pUS28-stimulierte SRF-abhängige Gentranskription haben.

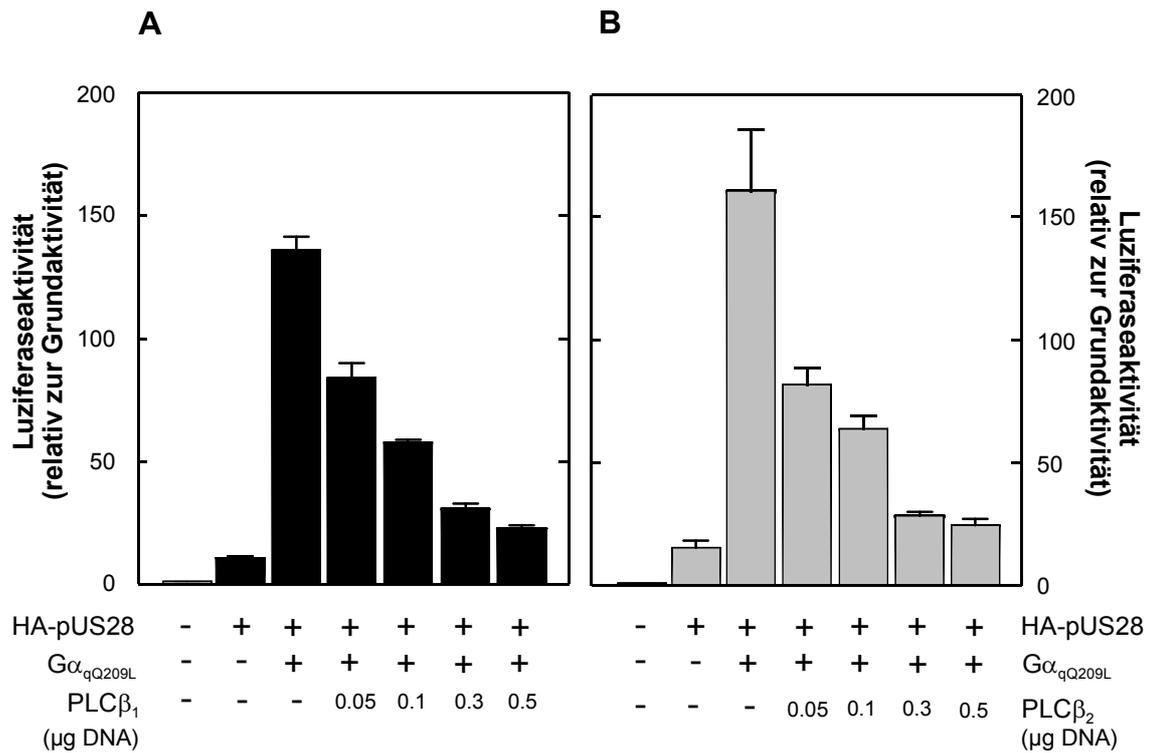


Abb. 33: Inhibierung der HA-pUS28-induzierten *serum-response-factor*-abhängigen Gentranskription durch PLC β_1 und PLC β_2 . COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils 0,06 μg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,2 μg des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8, 0,05 μg des Expressionsplasmids $G\alpha_{Q209L}$ -pcDNA3.1(+) und mit steigenden Mengen (0,05-0,5 μg) des Expressionsplasmids PLC β_1 -pcDNA3.1(+) (**A**) oder PLC β_2 -pcDNA3.1(+) (**B**) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 33 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass je größer die Menge der zur Transfektion eingesetzten Expressionsplasmide PLC β_1 -pcDNA3.1(+) bzw. PLC β_2 -pcDNA3.1(+) war, desto stärker wurde die HA-pUS28-stimulierte SRF-abhängige Gentranskription gehemmt. Dies zeigt, dass sich die PLC β -Isoformen nicht hinsichtlich ihres inhibitorischen Einflusses auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription unterscheiden.

4.7.3 Analyse der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription bei Koexpression von PLC β_1 -CT

Aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass PLC β -Isoenzyme mittels einer C2-Domäne im carboxylterminalen Abschnitt des Proteins GTP-gebundene G α_q -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine binden können (Wang *et al.*, 1999a) und auf diese Weise als *scavenger*-Proteine fungieren. Um zu klären, ob die PLC β -Isoenzyme auch in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit als *scavenger*-Proteine fungieren und die HA-pUS28-induzierten zellulären Funktionen durch Bindung der G α -Untereinheit inhibieren, wurde eine Mutante von PLC β_1 (PLC β_1 -CT) hergestellt. Diese Mutante besteht nur aus dem carboxylterminalen Abschnitt der PLC β_1 , der für die Bindung der G α -Untereinheit verantwortlich ist. Die Herstellung der PLC β_1 -CT-kodierenden cDNA erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide PLC β_1 -1 bzw. PLC β_1 -2. Das Oligonukleotid PLC β_1 -1 verfügte zusätzlich über einen 5'-Sequenzabschnitt, welcher für ein Myc-Epitop kodierte. Als *template* wurde das Plasmid PLC β_1 -pVL1393 verwendet, das freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Illenberger zur Verfügung gestellt worden war (Illenberger *et al.*, 2003a). Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR[®]-Blunt ligiert und die Nukleotidsequenz der PCR-Produkte durch Sequenzierung überprüft. Für die Proteinexpression in COS-7-Zellen wurde die cDNA mit der Restriktionsendonuklease EcoRI aus dem Vektor pCR[®]-Blunt herausgeschnitten und das 1294 bp große Fragment in ein mit EcoRI linearisiertes und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliertes Plasmid pcDNA3.1(+) ligiert. Die korrekte Orientierung und die Nukleotidsequenz der PLC β_1 -CT-cDNA in pcDNA3.1(+) wurde durch Sequenzierung überprüft. Um den Einfluss von PLC β_1 -CT auf die HA-pUS28-induzierten zellulären Funktionen zu untersuchen, wurden COS-7-Zellen mit steigenden Mengen (0,01-0,5 μ g) des Expressionsplasmids PLC β_1 -CT-pcDNA3.1(+) und/oder dem Expressionsplasmid HA-pUS28-pTEJ-8 oder G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) kotransfiziert und die Zellen anschließend auf die Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription oder die Bildung von Inositphosphaten untersucht.

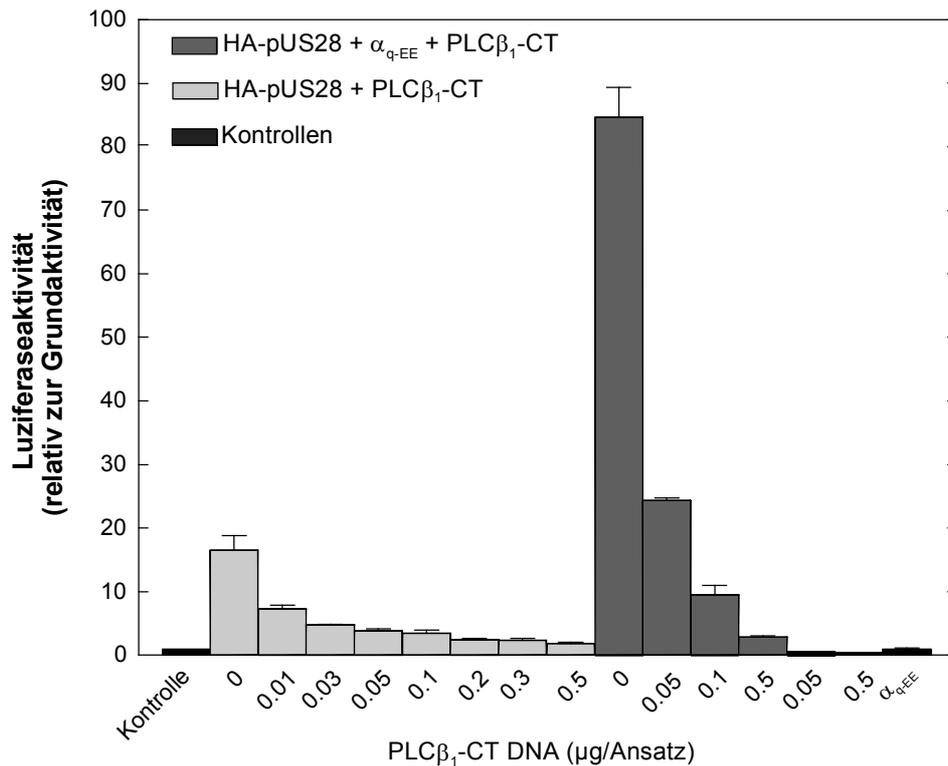


Abb. 34: Inhibierung der HA-pUS28-induzierten *serum-response-factor*-abhängigen Gentranskription durch Expression von PLCβ₁-CT. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils 0,06 µg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,2 µg des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder 0,05 µg des Expressionsplasmids Gα_{q-EE}-pcDNA3.1(+) oder mit steigenden Mengen (0,01-0,5 µg) des Expressionsplasmids PLCβ₁-CT-pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 34 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass bereits geringe Mengen des zur Transfektion eingesetzten Expressionsplasmids PLCβ₁-CT-pcDNA3.1(+) zu einer Abnahme der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription führten. Dies war unabhängig von der Ab- bzw. Anwesenheit der G-Protein Untereinheit Gα_{q-EE}. Je größer die Menge des zur Transfektion eingesetzten Expressionsplasmids PLCβ₁-CT-pcDNA3.1(+) war, desto stärker wurde die HA-pUS28-stimulierte SRF-abhängige Gentranskription gehemmt. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass PLCβ-Isoenzyme als potentielle *scavenger*-Proteine um die Bindung der Gα_q-Untereinheit mit Effektoren

konkurrieren und auf diese Weise die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription inhibieren.

Die Proteinexpression der Mutante PLC β_1 -CT in den transfizierten COS-7-Zellen wurde mittels *Western blot*-Analyse überprüft. Dazu wurden die in COS-7-Zelllysaten enthaltenen Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und PLC β_1 -CT unter Verwendung eines Anti-Myc-Antikörpers nachgewiesen.

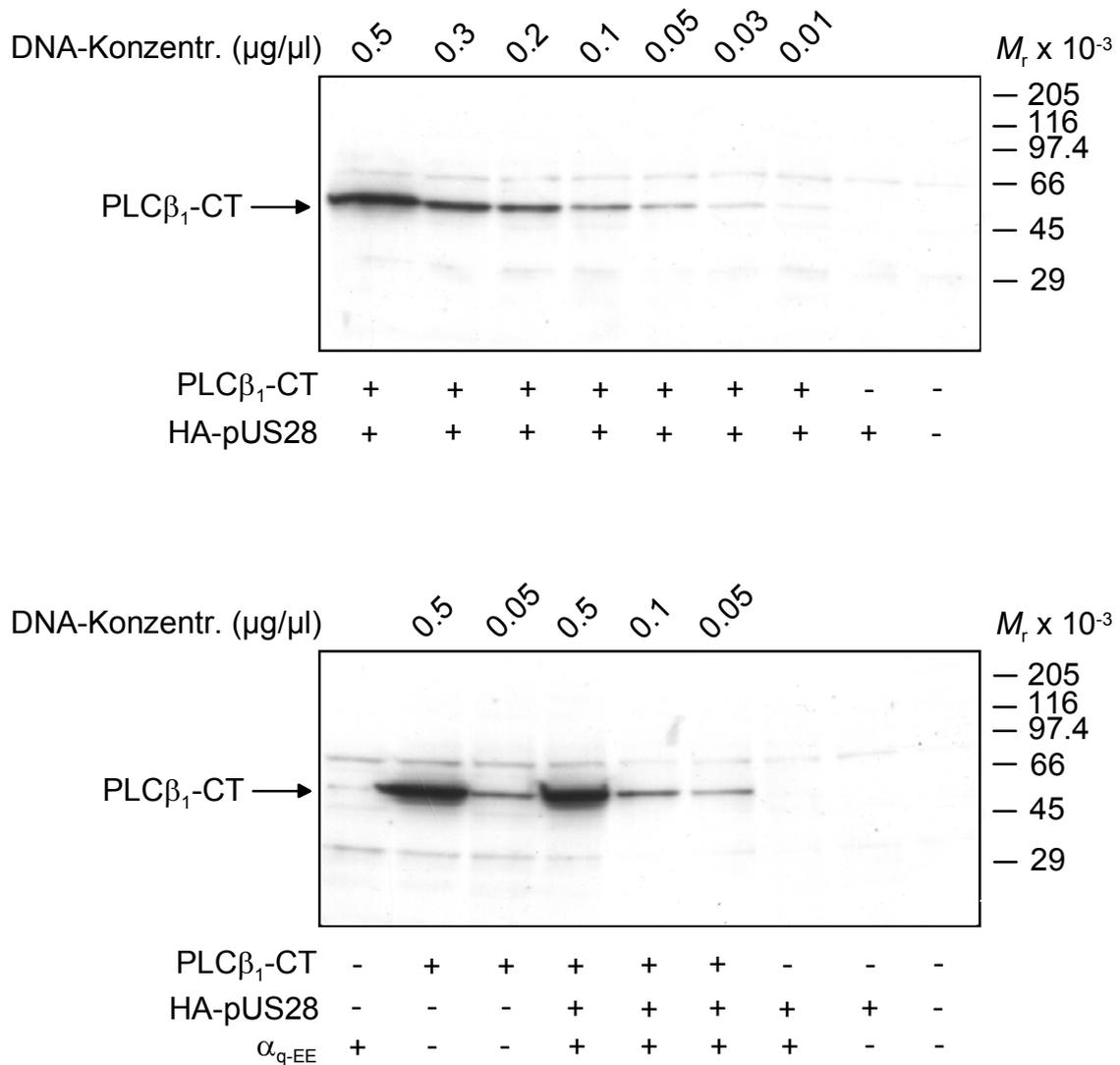


Abb. 35: Proteinexpression von PLC β_1 -CT-Myc. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils 0,06 μg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,2 μg des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder 0,05 μg des Expressionsplasmids G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) oder mit steigenden Mengen (0,01-0,5 μg) des Expressionsplasmids PLC β_1 -CT-pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24

Stunden wurden die Zellen aufgeschlossen und die Expression der PLC β_1 -CT-Proteine mittels *Western-blot*-Analyse überprüft. Dazu wurden die in COS-7-Zelllysaten enthaltenen Proteine in einem 10 % (w/v) Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die PLC β_1 -CT-Proteine mit einem Anti-Myc-Antikörper nachgewiesen. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards sind auf der rechten Seite der Abbildung eingezeichnet.

Der in Abbildung 35 dargestellte immunochemische Nachweis von PLC β_1 -CT zeigt, dass dieses Protein eine molekulare Masse von *ca.* 47 kDa besitzt. Des Weiteren zeigen die in Abbildung 35 dargestellten Ergebnisse, dass die Expression von PLC β_1 -CT mit steigenden zur Transfektion eingesetzten cDNA-Mengen korrelierte.

Aufgrund der Tatsache, dass die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von PLC β_1 -CT inhibiert wurde, stellte sich die Frage, welchen Einfluss PLC β_1 -CT auf die HA-pUS28-stimulierte Inositphosphatbildung hat.

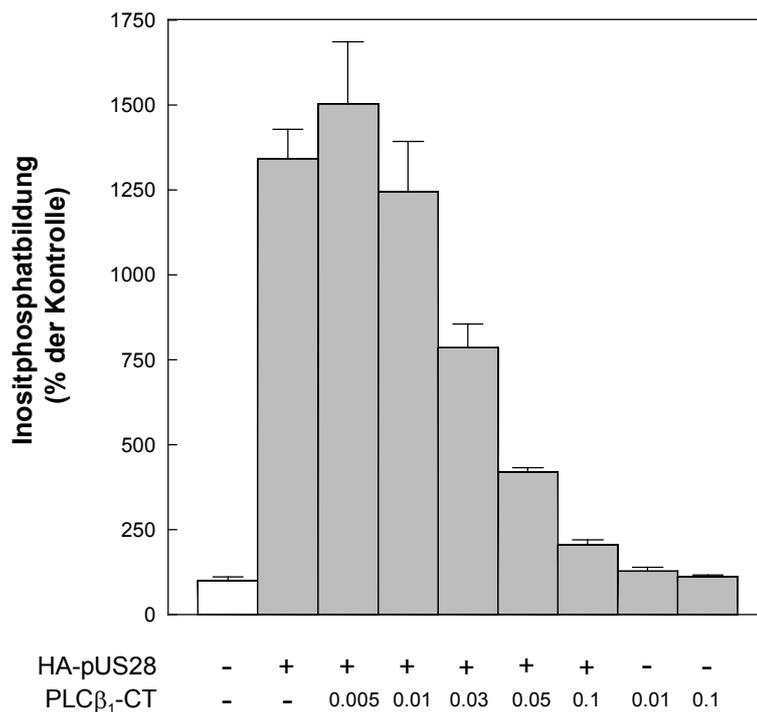


Abb. 36: Einfluss von PLC β_1 -CT auf die HA-pUS28-induzierte Inositphosphatbildung in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (2×10^5) wurden mit jeweils 0,25 μ g DNA des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder steigenden Mengen (0,005-0,1 μ g) des Expressionsplasmids PLC β_1 -CT-pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 17 Stunden in Inositol-freiem

DMEM-Medium mit 3 $\mu\text{Ci/ml}$ D-*myo*-[2- $^3\text{H(N)}$]-Inositol inkubiert. Danach wurden die Zellen für 1 Stunde mit 10 mM LiCl inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschossen und die Bildung der Inositphosphate gemessen.

Die in Abbildung 36 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass je größer die Menge des zur Transfektion eingesetzten Expressionsplasmids PLC β_1 -CT-pcDNA3.1(+) war, desto stärker wurde die HA-pUS28-stimulierte Inositphosphatproduktion gehemmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von PLC β_1 -CT nicht nur zur Inhibierung der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription, sondern auch zur Inhibierung der HA-pUS28-induzierten Inositphosphatbildung führte. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die PLC-Isoenzyme als *scavenger*-Proteine fungieren und über Bindung von G α_q -Untereinheiten die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription inhibieren.

4.8 Einfluss der Rho GTPasen RhoA, RhoAG14V und RhoAT19N auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription

Die Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe hatten erste Hinweise geliefert, dass die Aktivierung von Rho-GTPasen eine Rolle bei der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription spielt. So war gezeigt worden, dass es in Anwesenheit der aktivierten Rho-GTPase RhoAG14V zu einer synergistischen Stimulation der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription kommt (Tulone, Dissertation, 2004). Um den Einfluss von Rho-GTPasen auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription näher zu untersuchen, wurde HA-pUS28 mit wildtypischem RhoA (RhoAWT), aktiviertem RhoA (RhoAG14V) und einer dominant negativen Mutante von RhoA (RhoAT19N) in COS-7-Zellen koexprimiert und die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription bestimmt.

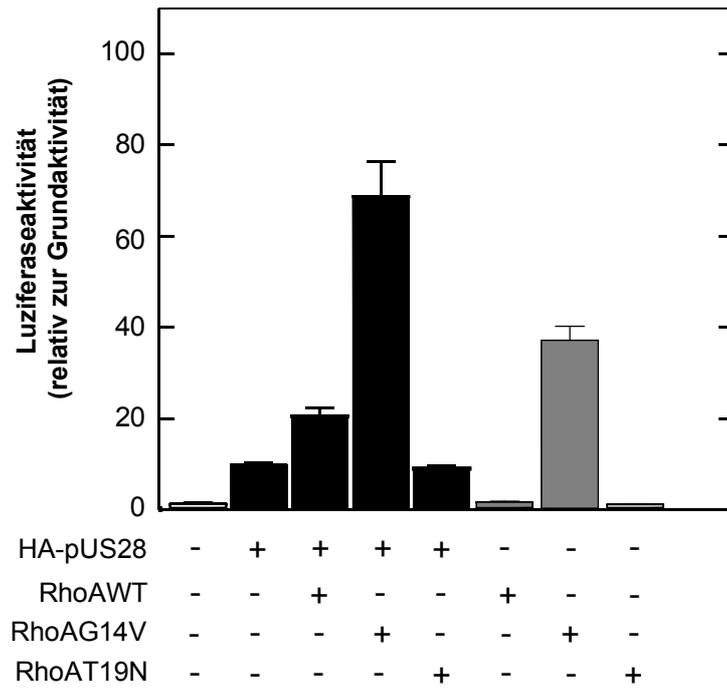


Abb. 37: Einfluss von RhoAWT, RhoAG14V, und RhoAT19N auf die HA-pUS28-induzierte Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils $0,06 \mu\text{g}$ DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit $0,2 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder $0,2 \mu\text{g}$ der Expressionsplasmide RhoAWT-pcDNA3.1(+), RhoAG14V-pcDNA3.1(+), RhoAT19N-pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 37 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass bereits die Expression von heterolog exprimierten wildtypischen RhoA in HA-pUS28-exprimierenden COS-7-Zellen eine Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription bewirkte. Die SRF-abhängige Gentranskription war dabei um den *ca.* 2-fachen Wert höher als die SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen, die HA-pUS28 allein exprimierten. Die Koexpression von RhoAG14V und HA-pUS28 hatte eine synergistische Steigerung der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription zur Folge. Im Gegensatz dazu rief die Expression der dominant negativen Mutante RhoAT19N keine Veränderung der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription hervor. Diese Ergebnisse bestätigen

somit die Vermutung, dass die Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription durch HA-pUS28 durch die Aktivierung der Rho-GTPase RhoA vermittelt wird.

4.9 Einfluss von p63RhoGEF auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription

Wie Untersuchungen zahlreicher Forschergruppen gezeigt haben, erfolgt die Aktivierung von Rho-GTPasen mit Hilfe von verschiedenen Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*Rho guanine nucleotide exchange factors*, RhoGEFs), welche den Austausch von GDP zu GTP katalysieren (Bishop & Hall, 2000). Während manche RhoGEFs mehrere GTPasen regulieren, wurde für andere RhoGEFs eine spezifische Interaktion mit nur einer Rho-GTPase ermittelt. So wurde für das RhoGEF p115RhoGEF beobachtet, dass dieses nur durch $G\alpha_{13}$ stimuliert wird und verschiedene Mitglieder der Rho-Subfamilie aktiviert (Hart *et al.*, 1996; Dutt *et al.*, 2004), während Vav1 und 2 die GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 aktivieren (Heo *et al.*, 2005). Erst kürzlich wurde mit p63RhoGEF ein $G\alpha_q$ -spezifisches RhoGEF identifiziert (Souchet *et al.*, 2002; Lutz *et al.*, 2004). Da die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine wichtige Rolle von $G\alpha_q$ und RhoA bei der HA-pUS28-induzierten Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription hinweisen, sollte im Folgenden geklärt werden, welchen Einfluss die Anwesenheit von p63RhoGEF auf die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription hat. Die p63RhoGEF-kodierende cDNA wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Thomas Wieland (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

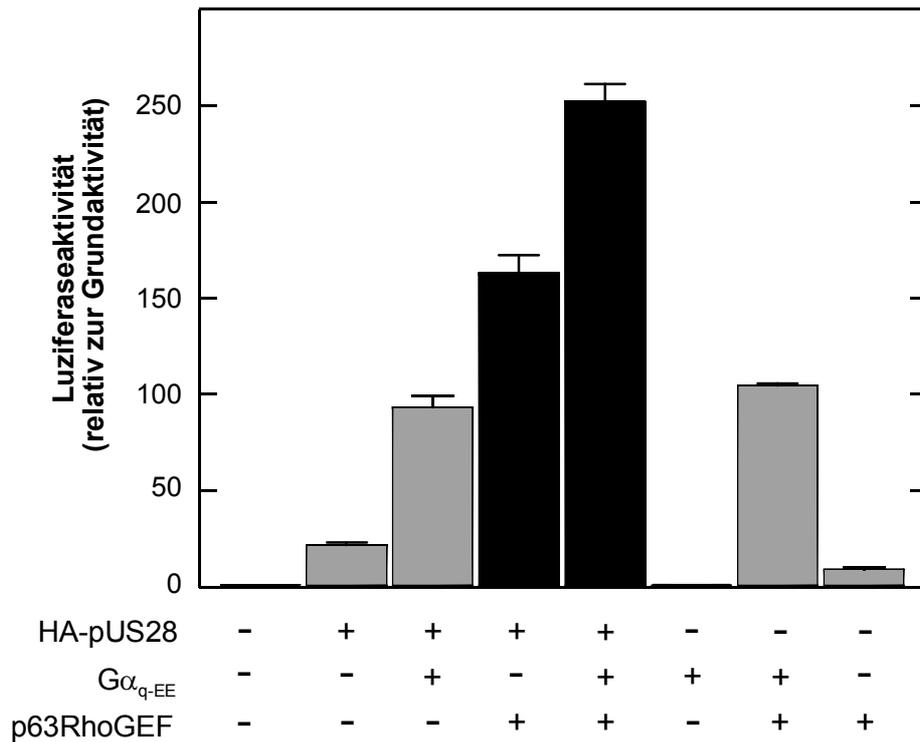


Abb. 38: Einfluss von p63RhoGEF und $G\alpha_{q-EE}$ auf die HA-pUS28-induzierte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils $0,06 \mu\text{g}$ DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit $0,2 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder $0,2 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids p63RhoGEF-pcDNA3.1(+) und/oder $0,05 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids $G\alpha_{q-EE}$ -pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 38 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es bei Koexpression von p63RhoGEF mit HA-pUS28 zu einer deutlichen Zunahme um das *ca.* 8-fache der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription kam. Der synergistische Anstieg der SRF-abhängigen Gentranskription bei Koexpression von HA-pUS28 und p63RhoGEF wurde durch Expression von $G\alpha_{q-EE}$ noch weiter erhöht, und stieg auf das 12-fache gegenüber den Zellen an, die HA-pUS28 allein exprimierten. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass an der HA-pUS28-induzierten $G\alpha_q$ -vermittelten SRF-abhängigen Gentranskription $G\alpha_q$ -spezifische RhoGEFs, wie das p63RhoGEF beteiligt sind.

Rho-GTPasen können durch bakterielle Toxine modifiziert werden. So wurde für die ADP-Ribosyltransferase C3 von *Clostridium botulinum* gezeigt, dass dieses Enzym spezifisch die Aktivität von Mitgliedern der Rho-Subfamilie, wie RhoA, RhoB, RhoC, nicht jedoch Cdc42 und Rac durch ADP-Ribosylierung inhibiert und dass diese Hemmung zu einer Blockade RhoA-abhängiger Signalwege in der Zelle führt. Um zu untersuchen, welche RhoGTPasen für die HA-pUS28-induzierte p63RhoGEF-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription von Bedeutung sind, wurde HA-pUS28 zusammen mit p63RhoGEF und der ADP Ribosyltransferase C3 in COS-7-Zellen exprimiert und die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription bestimmt.

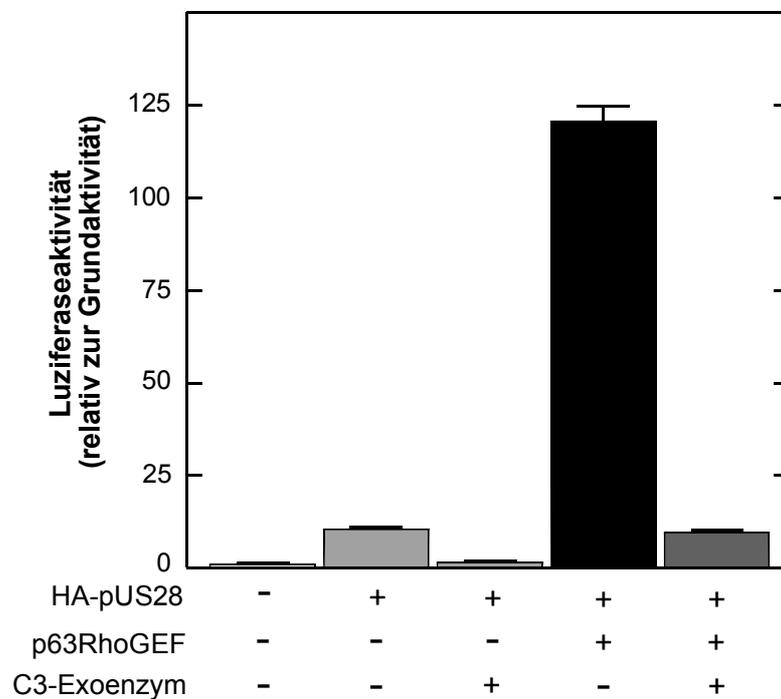


Abb. 39: Einfluss der ADP-Ribosyltransferase C3 auf die HA-pUS28-induzierte p63RhoGEF-vermittelte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils $0,06 \mu\text{g}$ DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit $0,2 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder $0,2 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids p63RhoGEF-pcDNA3.1(+) oder $0,01 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids C3-Exoenzym-pCis-2 oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 39 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die HA-pUS28-induzierte *ca.* 10-fache SRF-abhängige Gentranskription in Anwesenheit der ADP Ribosyltransferase C3 nahezu völlig inhibiert wurde. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass auch die bei Koexpression von HA-pUS28 und p63RhoGEF beobachtete synergistische Steigerung der SRF-abhängigen Gentranskription durch Expression der ADP Ribosyltransferase C3 fast vollständig inhibiert wurde. Die SRF-abhängige Gentranskription nahm dabei um *ca.* 90 % gegenüber der SRF-abhängigen Gentranskription von pUS28/p63RhoGEF-exprimierenden Zellen ab. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Mitglieder der Rho-Subfamilie eine wesentliche Rolle bei der HA-pUS28-induzierten, $G\alpha_{q-EE}$ - und p63RhoGEF-vermittelten Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription spielen.

4.10 Einfluss der *pleckstrin-homology*-Domäne von p63RhoGEF auf HA-pUS28-induzierte zelluläre Funktionen

Alle Mitglieder der Dbl-Familie der RhoGEFs zeichnen sich in ihrer Sequenz durch zwei hintereinanderliegende Domänen aus, der *Dbl-homology* (DH)-Domäne und einer C-terminal davon gelegenen *pleckstrin-homology* (PH)-Domäne. Während die DH-Domäne der RhoGEFs für den Guaninnukleotid austausch der GTPase von Bedeutung ist, kommt der PH-Domäne eine wichtige Rolle bei Protein-Protein Bindungen bzw. Protein-Lipid Interaktionen zu. Um zu untersuchen, welche Rolle der PH-Domäne des p63RhoGEF bei der Vermittlung der HA-pUS28-induzierten, $G\alpha_q$ -regulierten zellulären Funktionen spielt, wurde HA-pUS28 zusammen mit der PH-Domäne von p63RhoGEF (p63RhoGEF-PH) und $G\alpha_{q-EE}$ in COS-7-Zellen exprimiert und die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription oder die pUS28-induzierte Inositphosphatproduktion bestimmt. Die p63RhoGEF-PH-kodierende cDNA wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Thomas Wieland (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

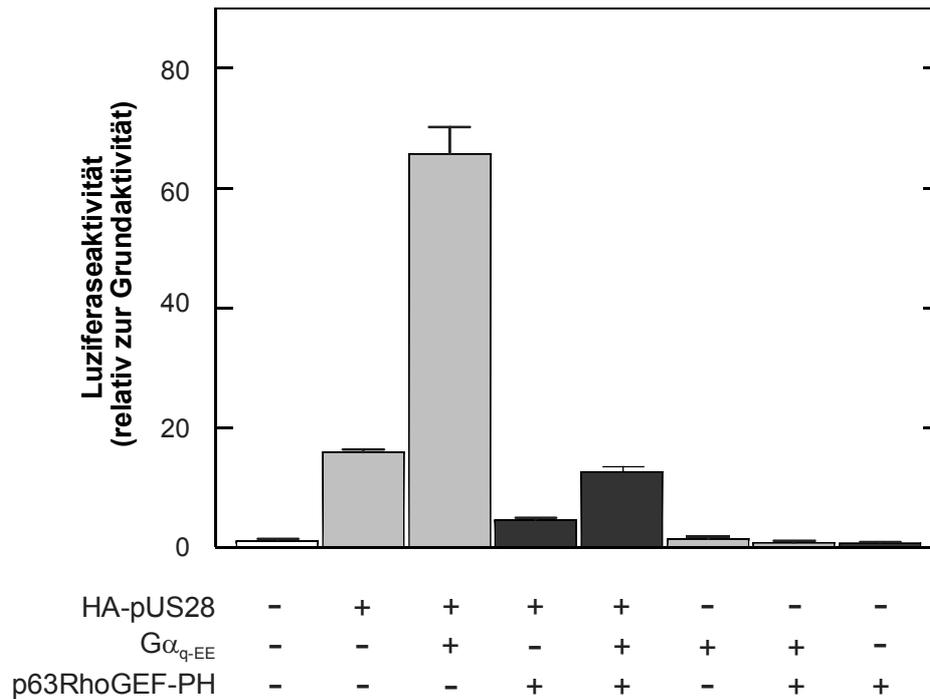


Abb. 40: Einfluss von p63RhoGEF-PH auf die pUS28-induzierte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von $G\alpha_{q-EE}$. COS-7-Zellen (8×10^4) wurden mit jeweils 0,06 μg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,2 μg des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder 0,2 μg des Expressionsplasmids p63RhoGEF-PH-pcDNA3.1(+) oder 0,05 μg des Expressionsplasmids $G\alpha_{q-EE}$ -pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 40 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass HA-pUS28-exprimierende Zellen eine Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription auf den *ca.* 15-fachen Wert gegenüber der basalen SRF-abhängigen Gentranskription von Kontrollzellen aufwiesen. Bei Koexpression von $G\alpha_{q-EE}$ kam es zu einer *ca.* 4-fachen synergistischen Zunahme der HA-pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription. Dagegen führte die Expression von p63RhoGEF-PH sowohl mit HA-pUS28 allein als auch mit HA-pUS28 und $G\alpha_{q-EE}$ in COS-7-Zellen zu einer *ca.* 70-80 %igen Inhibierung der HA-pUS28-stimulierten SRF-abhängigen Gentranskription.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es bei heterologer Expression von p63RhoGEF-PH zu einer Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription kommt.

Um zu klären, welchen Einfluss die PH-Domäne von p63RhoGEF auf die HA-pUS28-vermittelte Stimulation der Inositphosphatbildung hat, wurde HA-pUS28 mit p63RhoGEF und p63RhoGEF-PH in COS-7-Zellen koexprimiert und die Bildung der Inositphosphate bestimmt.

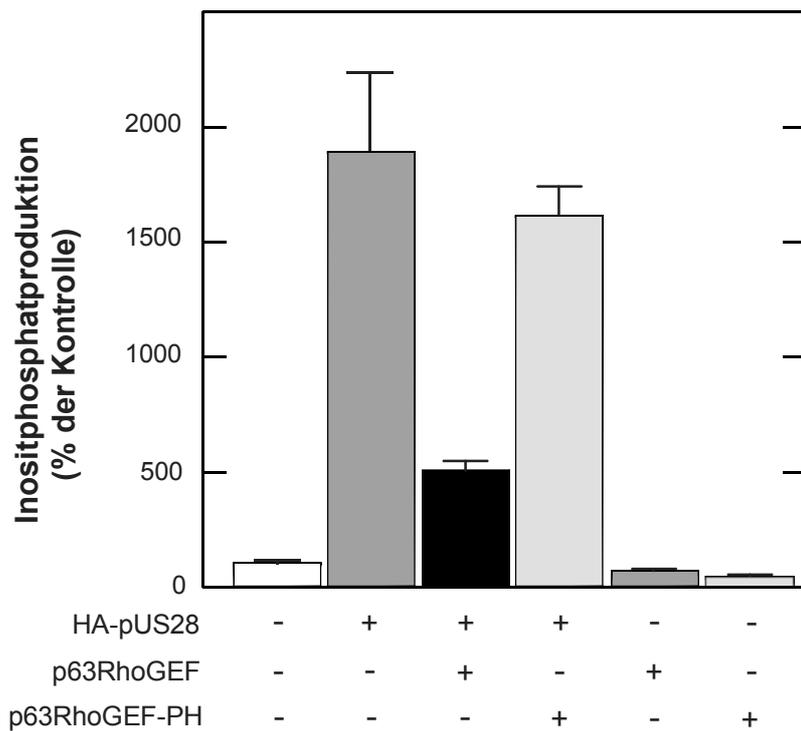


Abb. 41: Einfluss von p63RhoGEF-PH auf die pUS28-induzierte Inositphosphatbildung in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (2×10^5) wurden mit jeweils $0,5 \mu\text{g}$ DNA des Expressionsplasmids HA-pUS28-pTEJ-8 und/oder $0,5 \mu\text{g}$ des Expressionsplasmids p63RhoGEF-pcDNA3.1(+) oder p63RhoGEF-PH-pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids kotransfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 17 Stunden in Inositol-freiem DMEM-Medium mit $3 \mu\text{Ci/ml}$ D-*myo*-[2- ^3H (N)]-Inositol inkubiert. Danach wurden die Zellen für 1 Stunde mit 10 mM LiCl inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Bildung der Inositphosphate gemessen.

Die in Abbildung 41 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass HA-pUS28-exprimierende Zellen eine Zunahme der Inositphosphatbildung um den *ca.* 19-fachen Wert gegenüber der

Inositphosphatbildung von Kontrollzellen aufwiesen. Die Expression von p63RhoGEF-PH hatte nur einen geringen Einfluss auf die pUS28-induzierte Inositphosphatbildung. So wurde eine Abnahme von *ca.* 16 % gegenüber der pUS28-induzierten Inositphosphatbildung beobachtet. Dagegen bewirkte die Koexpression von p63RhoGEF und HA-pUS28 eine *ca.* 75 %ige Abnahme der pUS28-induzierten Inositphosphatbildung. Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von p63RhoGEF-PH auf die von HA-pUS28-vermittelte Aktivierung der PLC β -Isoenzyme kaum einen Einfluss hat. Dagegen scheint p63RhoGEF-PH die pUS28-induzierte Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription zu inhibieren, indem es vermutlich als „*scavenger*“ Protein eine Bindung mit RhoA eingeht, aber keine Aktivierung der RhoGTPase verursacht. Im Gegensatz dazu wird die HA-pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von p63RhoGEF aktiviert, während p63RhoGEF eine Stimulation der PLC β -vermittelten Inositphosphatbildung durch das Chemokinrezeptorhomolog inhibiert.

5. Diskussion

Bei anhaltendem oder wiederholtem Stimulus von Chemokinrezeptoren durch ihre Liganden kommt es zur Verringerung oder zum völligen Verlust der Aktivierbarkeit der Rezeptoren, ein Vorgang, der als Desensibilisierung bezeichnet wird. Bei der Regulierung der Aktivität der Chemokinrezeptoren, spielen Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) eine Schlüsselrolle. Bei den GRKs handelt es sich um Serin/Threonin Proteinkinasen, die durch Phosphorylierung die Desensibilisierung eines Agonisten-aktivierten Rezeptors einleiten. Von der Familie der GRKs sind in Säugetieren sieben Mitglieder (GRK1-7) bekannt, die aufgrund von Übereinstimmungen in ihren Aminosäuresequenzen in drei Subfamilien eingeteilt werden. GRK1 und GRK7 sind Mitglieder der ersten Subfamilie. GRK2 und 3 zählen zur zweiten Subfamilie und GRK4, GRK5 und GRK6 gehören zur dritten Hauptgruppe, der GRK4-Subfamilie. Die verschiedenen Mitglieder der GRKs weisen hohe strukturelle Übereinstimmung in den Abschnitten auf, die das katalytische Zentrum der Proteinkinasen bilden. Die amino- und carboxylterminalen Abschnitte der Proteine sind dagegen in ihrer Struktur variabel. Für die Phosphorylierung von aktivierten Rezeptoren durch GRKs ist die Membranassoziation der GRKs erforderlich. Die Membraninteraktion erfolgt über definierte Bereiche im carboxylterminalen Abschnitt der einzelnen Proteine. So besitzen GRK4 und GRK6-A Cysteinreste im carboxylterminalen Abschnitt, die posttranslational palmitoyliert werden können. GRK5 und GRK6-B weisen basische Aminosäuren im carboxylterminalen Abschnitt auf, die eine Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden erlauben. Vom aminoterminalen Abschnitt der GRKs wurde ursprünglich angenommen, dass er vor allem eine wichtige Rolle beim Erkennen des Rezeptorsubstrats spielt (Palczewski *et al.*, 1993). Neuere Untersuchungen an GRK5 konnten zeigen, dass der aminoterminal Abschnitt darüber hinaus an der Interaktion der Kinase mit der Zellmembran beteiligt ist (Pitcher *et al.*, 1996; Noble *et al.*, 2003).

In unserer Arbeitsgruppe wurden Spleißvarianten von GRK6 der Maus (mGRK6) isoliert, die für vier Isoformen kodieren. Drei der vier Isoformen, mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C, sind im Aufbau des aminoterminalen Abschnitts und des katalytischen Zentrums identisch, unterscheiden sich jedoch in der Länge und in der Struktur des carboxylterminalen Abschnitts. Die mGRK6-D entspricht zwar im Aufbau des

aminoterminalen Abschnitts den anderen Varianten, trägt aber eine unvollständige katalytische Domäne. Die Isoform mGRK6-A besitzt im carboxylterminalen Abschnitt Cysteinreste, die posttranslational palmitoyliert werden können. Der carboxylterminale Abschnitt von mGRK6-B weist basische Aminosäuren auf, die eine Interaktion mit der Zellmembran durch elektrostatische Wechselwirkungen ermöglichen. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte mGRK6-C zeichnet sich durch einen verkürzten carboxylterminalen Abschnitt aus. Dieser Kinase fehlen im Gegensatz zu den Isoformen A und B die bereits erwähnten und für die Membranassoziation wichtigen Interaktionsstellen im variablen carboxylterminalen Abschnitt. Um einen Einblick in die Tertiärstruktur von mGRK6-C zu erhalten, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit rekombinantes mGRK6-C-Protein produziert, gereinigt und kristallisiert werden. Durch sequenzielle Chromatographie an einer SP- und Heparin-Sepharose-Matrix, sowie zusätzlicher Reinigung durch Gelfiltration wurde aktives Protein von mGRK6-C mit hohem Reinheitsgrad (ca. 97 %) aus Zellextrakten von Baculovirus-infizierten Insektenzellen isoliert. Obwohl die Kristallisationsbedingungen variiert wurden, d. h. verschiedene Kristallisationsalze und Kristallisationshilfen eingesetzt und unter Einstellung verschiedener pH-Werte in den Versuchsansätzen getestet wurden, blieben die Versuche, das mGRK6-C-Protein zu kristallisieren, erfolglos. Erst vor kurzem gelang es Lodowski und seiner Arbeitsgruppe, die Rezeptorkinase GRK2 als Komplex mit der G-Protein Untereinheit $G\beta_1\gamma_2$ darzustellen (Lodowski *et al.*, 2003). Dazu wurden rekombinante Proteine von GRK2 und $G\beta_1\gamma_2$ ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit sequenziell aus *Sf9*-Zellextrakten gereinigt. Die Menge an gereinigtem GRK2-Protein, welches für die Kristallisierung eingesetzt wurde, war jedoch mindestens um den Faktor 10 höher als die Menge an mGRK6-C-Protein, die für die Kristallisierung in der vorliegenden Arbeit isoliert worden war. Somit könnte eine zu geringe Proteinmenge von mGRK6-C eine mögliche Ursache für das Scheitern der Kristallisation sein. Die Tatsache, dass GRK2 zusammen mit $G\beta_1\gamma_2$ kristallisiert worden ist, lässt aber auch den Schluß zu, dass die Kristallisierung von mGRK6-C fehlschlug, weil ein als Kristallisationskeim dienender Interaktionspartner fehlte.

Im Gegensatz zu der Variante mGRK6-A verfügt mGRK6-C nicht über den Cysteinreste tragenden variablen carboxylterminalen Abschnitt, der im Falle der mGRK6-A zur Interaktion der Kinase mit der Plasmamembran beiträgt. Dies legte die Vermutung nahe,

dass mGRK6-C nicht in der Lage sein würde, mit der Zellmembran zu interagieren und GPCRs zu phosphorylieren (Premont *et al.*, 1999). Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper hatten dagegen gezeigt, dass neben mGRK6-A und mGRK6-B auch mGRK6-C Membran-assoziiert vorliegt (Vatter, Dissertation, 2000; Vatter/Stoesser *et al.*, 2005). Des Weiteren war beobachtet worden, dass mGRK6-C membranäres Rhodopsin phosphorylierte (Vatter, Dissertation, 2000; Vatter/Stoesser *et al.*, 2005). Rekonstitutionsversuche mit mGRK6-C und verschiedenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin (PtdSer) und Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdInsP₂) in Lipidvesikeln belegten außerdem, dass mGRK6-C in der Lage war, PtdInsP₂ zu binden. Diese Ergebnisse hatten bereits darauf hingedeutet, dass mGRK6-C in der Lage ist, mit der Zellmembran bzw. mit bestimmten membranären Phospholipiden wie PtdInsP₂ zu interagieren (Vatter, Dissertation, 2000; Vatter/Stoesser *et al.*, 2005). Unklar war jedoch, welche Abschnitte des mGRK6-C-Proteins für diese Interaktion verantwortlich sein könnten. Erste Hinweise für Membraninteraktionsstellen in Proteinen der GRK4-Subfamilie ergaben Untersuchungen an GRK5. Pitcher *et al.* (1996) identifizierten ein Aminosäuresequenzmotiv mit basischen Aminosäuren K²²RKGKSKK im aminoterminalen Abschnitt der bovinen GRK5 als Interaktionsstellen für das negativ geladene Phospholipid PtdInsP₂. Eine weitere Phospholipidbindungsstelle mit den Aminosäuren Q⁵⁵²RLFQRQHNN konnte im carboxylterminalen Abschnitt der GRK5 des Menschen nachgewiesen werden (Pronin *et al.*, 1998). Ein Aminosäuresequenzvergleich der humanen GRK5 mit mGRK6-C ergab, dass sowohl das Aminosäuresequenzmotiv N²²RKGKSKK im aminoterminalen Abschnitt als auch Q⁵⁵³RLFSRQR im carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-C eine große Übereinstimmung mit den Aminosäuresequenzen der Phospholipidbindungsstellen von GRK5 aufwies. Dies führte zur Arbeitshypothese, dass auch die basischen Aminosäuren in den amino- und carboxylterminalen Abschnitten von mGRK6-C die Interaktion mit Phospholipiden der Plasmamembran vermitteln. Um den Einfluß dieser potentiellen Phospholipidinteraktionsstellen auf die Interaktion von mGRK6-C mit Phospholipiden zu untersuchen, wurden Mutanten von mGRK6-C hergestellt, bei welchen die basische Aminosäure Lysin an Position 26, 28 und 29 (mGRK6-C/N^{C+}) bzw. die basische Aminosäure Arginin an Position 554, 558 und 560 (mGRK6-C/N^{C+}) oder die Aminosäuren an beiden Positionen (mGRK6-C/N^C) durch die neutrale Aminosäure Alanin ersetzt wurden. Expressionsanalysen mit rekombinanten

mGRK6-C/N⁻C⁺-, mGRK6-C/N⁺C⁻- und mGRK6-C/N⁻C⁻-Proteinen ergaben, dass die rekombinanten Proteine der mGRK6-C-Mutanten im Vergleich zum wildtypischen mGRK6-C-Protein in ähnlichen Mengen exprimiert wurden. Jedoch kam es zu leichten Veränderungen in der subzellulären Lokalisation der Proteine in *Sf9*-Zellen. Vom wildtypischen mGRK6-C-Protein wurden noch *ca.* 70 % in der aus *Sf9*-Zelllysaten gewonnen partikulären Fraktion nachgewiesen. Im Gegensatz dazu lag der Anteil der rekombinanten Proteine der mGRK6-C-Mutanten in den partikulären Fraktionen bei *ca.* 50 %. Dies deutet auf eine leicht beeinträchtigte Membraninteraktion der Mutanten hin.

Für die Charakterisierung der Lipidinteraktionsstellen von mGRK6-C wurden Bindungsexperimente mit Phospholipidvesikeln (Phosphatidylcholin [PtdCho], PtdSer und PtdInsP₂) und gereinigten, rekombinanten Proteinen von mGRK6-C und den mGRK6-C-Mutanten durchgeführt. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass weder mGRK6-C noch die Mutanten mGRK6-C/N⁻C⁺, mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ mit dem positiv geladenen PtdCho interagieren konnten. Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen aus Bindungsexperimenten anderer Arbeitsgruppen. So war in Untersuchungen mit GRK2 und GRK5 nachgewiesen worden, dass weder GRK2, noch GRK5 das Phospholipid PtdCho binden (DeBurman *et al.*, 1996; Pitcher *et al.*, 1996; Pronin *et al.*, 1998). Für GRK5 war außerdem gezeigt worden, dass die Kinase mit dem Membranphospholipid PtdInsP₂ interagiert. Es war jedoch keine Interaktion von GRK5 mit PtdSer beobachtet worden (Pitcher *et al.*, 1996; Pronin *et al.*, 1998). Auch für mGRK6-C wurde im Rahmen dieser Arbeit in Bindungsexperimenten mit Phospholipidvesikeln beobachtet, dass das Protein zwar nicht mit PtdSer enthaltenden Vesikeln interagiert, jedoch mit Vesikeln, die das negativ geladene Membranphospholipid PtdInsP₂ enthielten. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Arbeitsgruppe Pitcher *et al.* (1996) hatten darauf hingewiesen, dass die Interaktion von GRK5 mit dem Phospholipid PtdInsP₂ über basische Aminosäuren des aminoterminalen Abschnitts der Kinase erfolgt. So war in Rekonstitutionsexperimenten mit artifiziellen Lipidvesikeln gezeigt worden, dass Mutanten von GRK5, deren basische Aminosäuren K²², R²³, K²⁴, K²⁶, K²⁸, K²⁹ im aminoterminalen Abschnitt durch die neutrale Aminosäure Alanin ersetzt worden waren, einen größeren Verlust der Bindung an PtdInsP₂ enthaltende Vesikel aufwiesen als GRK5-Mutanten, deren K⁵⁴⁷, K⁵⁴⁸, R⁵⁵³, K⁵⁵⁶, R⁵⁵⁷ im carboxyterminalen Abschnitt der Kinase gegen Alanine ausgetauscht worden waren. Im Gegensatz dazu zeigen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse für

mGRK6-C, dass vor allem Veränderungen in der carboxylterminal gelegenen Lipidinteraktionsstelle einen wesentlichen Einfluss auf die Interaktion der Kinase mit PtdIns P_2 -haltigen Vesikeln hatten. So war die im carboxylterminalen Abschnitt veränderte Mutante mGRK6-C/N $^+C^-$ nicht mehr in der Lage, mit PtdIns P_2 zu interagieren. Der Austausch der basischen Aminosäuren im aminoterminalen Abschnitt von mGRK6-C führte dagegen nur zu einer etwas schwächeren Bindung der Mutante mGRK6-C/N $^-C^+$ an PtdIns P_2 enthaltende Vesikel. Die Doppelmutante mGRK6-C/N $^-C^-$ wies dagegen keine Interaktion mit PtdIns P_2 enthaltenden Vesikeln auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion von mGRK6-C mit PtdIns P_2 vermutlich durch beide Phospholipidbindungsstellen vermittelt wird, wobei der Interaktion über die Phospholipidbindungsstelle im carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-C eine größere Bedeutung zukommt. Interessanterweise wurde darüber hinaus beobachtet, dass sowohl mGRK6-C/N $^-C^+$ als auch mGRK6-C/N $^+C^-$ im Gegensatz zur wildtypischen mGRK6-C und zur Doppelmutante mGRK6-C/N $^-C^-$ in der Lage waren, an Vesikel zu binden, die hohe Konzentrationen an neutralem PtdSer enthielten. Eine Erklärung für die Interaktion von mGRK6-C/N $^-C^+$ und mGRK6-C/N $^+C^-$ mit PtdSer könnte in veränderten Ladungsverhältnissen der Proteine nach Austausch der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin gegen die aliphatische Aminosäure Alanin zu suchen sein. Unklar bleibt, warum die Doppelmutante mGRK6-C/N $^-C^-$ nicht auch mit PtdSer interagiert.

Vorausgegangene Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass eine Interaktion von GRKs mit Phospholipiden nicht nur deren Membranassoziation beeinflusst, sondern auch einen wesentlichen Einfluss auf die katalytische Aktivität der Kinasen hat (DebBurman *et al.*, 1996, Pitcher *et al.*, 1998). So war für GRK5 berichtet worden, dass die Kinase bevorzugt mit Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdIns P_2) interagiert und dass die Anwesenheit von PtdIns P_2 die Phosphorylierung des β_2 -Adrenozeptors durch GRK5 entscheidend erhöht (Pitcher *et al.*, 1996). Auch war beobachtet worden, dass es in Anwesenheit von PtdSer zu einer vermehrten Phosphorylierung verschiedener Rezeptoren wie des β_2 -Adrenozeptors und des muskarinischen M2 Acetylcholinrezeptors durch GRK2 kommt (Onorato *et al.*, 1995; DebBurman *et al.*, 1995; DebBurman *et al.*, 1996). Neueste Untersuchungen von Pronin und seiner Arbeitsgruppe bestätigten, dass Phospholipide nicht nur bei der Phosphorylierung von GPCRs als Kofaktoren essentiell sind, sondern auch zur

Phosphorylierung von Nicht-Rezeptorsubstraten wie Synukleinen beitragen (Pronin *et al.*, 2000). Da für mGRK6-C im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Interaktion mit PtdInsP₂ nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob Veränderungen in den amino- und carboxylterminalen Phospholipidinteraktionsstellen von mGRK6-C nicht nur die Interaktion mit Phospholipiden beeinträchtigen, sondern auch die Phosphorylierungsaktivität der Kinase einschränken, bzw. im Fall von mGRK6-C/N⁻C⁻ ganz aufheben. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Phosphorylierung eines membranständigen Substrats wie Rhodopsin bzw. eines löslichen Substrats wie Phosvitin durch mGRK6-C, mGRK6-C/N⁻C⁺, mGRK6-C/N⁺C⁻ und mGRK6-C/N⁻C⁻ untersucht. Überraschenderweise waren die mGRK6-C-Mutanten ebenso wie die wildtypische Kinase in der Lage, Rhodopsin bzw. Phosvitin zu phosphorylieren. Jedoch zeigte sich, dass die Doppelmutante mGRK6-C/N⁻C⁻ das Substrat Rhodopsin deutlich schwächer phosphorylierte als die am carboxylterminalen Abschnitt veränderte mGRK6-C/N⁺C⁻. Somit schränkt der Austausch von basischen Aminosäuren gegen aliphatische Aminosäuren in den Phospholipidinteraktionsstellen im amino- und carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-C nicht nur die Interaktion mit Phospholipiden ein, sondern führt auch zu einer Verringerung der Phosphorylierung von membranären Substraten durch mGRK6-C. Ähnliche Ergebnisse liegen für GRK5 aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen vor, die gezeigt haben, dass der Austausch von basischen Aminosäuren gegen Alanine im GRK5-Protein nicht nur die Interaktion mit der Plasmamembran bzw. mit speziellen Phospholipiden wie PtdInsP₂ beeinträchtigt, sondern auch die Phosphorylierung des β₂-Adrenozeptors und des Rhodopsins durch diese veränderte Kinase einschränkt (Pitcher *et al.*, 1996; Thiyagarajan *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit mGRK6-C/N⁻C⁻ trotz der Veränderungen in den Phospholipidinteraktionsstellen in der Lage war Rhodopsin zu phosphorylieren, könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Substrat Rhodopsin in den zellfreien Untersuchungen in großen Mengen eingesetzt worden war. Unklar war zu diesem Zeitpunkt, ob die Doppelmutante mGRK6-C/N⁻C⁻ auch in intakten Zellen in der Lage sein würde, die Aktivität von GPCRs zu regulieren.

Der Vielzahl an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren steht nur eine begrenzte Anzahl an GRKs gegenüber. Daher ist es nicht verwunderlich, dass einzelne Mitglieder der GRK-Familie mehrere Rezeptorsubstrate phosphorylieren. Untersuchungen an intakten Zellen

haben gezeigt, dass die Aktivität der CXC-Chemokinrezeptoren CXCR1, CXCR2 und CXCR4 durch GRKs reguliert wird (Haribabu *et al.*, 1997; Pitcher *et al.*, 1998). Für die GRK6 des Menschen und der Maus wurde ermittelt, dass diese neben den muskarinischen m2- und m3-Acetylcholinrezeptoren, dem Dopaminrezeptor D2, dem Leukotrienrezeptor B4, dem Melanocortinrezeptor (MC1R) und den Endothelinrezeptoren A und B auch die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 und das vom Genom des humanen Zytomegalievirus-kodierte Chemokinrezeptorhomolog pUS28 phosphorylieren (Pitcher *et al.*, 1998; Willets *et al.*, 2003; Gainetdinov *et al.*, 2003; Kavelaars *et al.*, 2003; Sánchez-Más *et al.*, 2005; Hüttenrauch *et al.*, 2005). Neuere Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Fong *et al.* zeigten, dass die durch CXCL12 stimulierte Chemotaxis von T- und B-Lymphozyten in β -Arrestin2- und GRK6-defizienten Mäusen deutlich eingeschränkt ist (Fong *et al.*, 2002).

Zahlreiche Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen belegen, dass die Aktivierung von Chemokinrezeptoren durch ihre Liganden über Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen zur Stimulation verschiedener intrazellulärer Effektoren, darunter Phospholipase C-Isoenzyme, Tyrosinkinasen, MAP-Kinasen und RhoGTPasen führt (Baggiolini, 2001; Olson & Ley, 2002). Darüber hinaus wurde berichtet, dass auch die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie *cAMP response element binding protein* (CREB), *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) und *signal transducer and activator of transcription* (STAT) durch Chemokinrezeptoren reguliert wird (Kukreja *et al.*, 2005; Joo *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006). So gibt es Hinweise dafür, dass die von CXCR4-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermutlich eine Rolle bei der verstärkten Adhäsion und transendothelialen Migration von Krebszellen spielt (Kukreja *et al.*, 2005). Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen durch ein Zusammenspiel von CXCL12 mit verschiedenen Cytokinen gewährleistet wird und dass dabei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB eine wichtige Rolle zukommt (Joo *et al.*, 2004). Ein weiterer von membranständigen Rezeptoren regulierter Transkriptionsfaktor stellt der *serum response factor* (SRF) dar (Nordheim, 2004; Posern & Treisman, 2006). Bindungsstellen für SRF, so genannte *serum response elements*, finden sich in einer Vielzahl von Genpromotoren (Nordheim, 2004). Zu den Zielgenen von SRF zählen Gene, deren Produkte wie Aktin und Myosin Bestandteile des Zytoskeletts sind, wie Bcl-2 und Mcl1 antiapoptotisch wirken oder wie c-fos und Egr-1 die Zellproliferation

stimulieren (Chai & Tarnawski, 2002). Aufgrund der Funktionen der Zielgene hat SRF Einfluss auf die Struktur und Funktion des Aktinzytoskletts, das Überleben von Zellen, den Zellzyklus, den Aufbau und die Funktion von Muskelzellen und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Chai & Tarnawski, 2002). Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF durch Stimulation von CXC-Chemokinrezeptoren wie CXCR4 wurde bisher nicht beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde an intakten Zellen untersucht, ob es nach Ligandenstimulation des humanen Chemokinrezeptors CXCR4 (hCXCR4) zu einer Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription kommt und welchen Einfluss die wildtypische mGRK6-C bzw. die mGRK6-C-Mutanten auf diese hCXCR4-induzierte zelluläre Funktion haben. Es konnte gezeigt werden, dass es bei transienter Expression von hCXCR4 in COS-7-Zellen nach Zugabe eines spezifischen Agonisten zu den Zellen zur Aktivierung der Gentranskription eines SRF-abhängigen Reportergens kommt. Darüber hinaus wurde ermittelt, dass die Koexpression von hCXCR4 und mGRK6-C zu einer spezifischen *ca.* 50 %igen Inhibierung dieser von hCXCR4 induzierten SRF-abhängigen Gentranskription führt. Die Expression der mGRK6-C-Mutanten hatte dagegen unterschiedliche Auswirkungen auf die hCXCR4-induzierte Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription. So inhibierte mGRK6-C/N⁺C⁺ die hCXCR4-induzierte SRF-abhängige Gentranskription um *ca.* 13 %, während mGRK6-C/N⁺C⁻ die hCXCR4-induzierte SRF-abhängige Gentranskription um *ca.* 27 % reduzierte. Im Vergleich zum wildtypischen mGRK6-C-Protein war bei beiden Mutanten die Inhibierung der hCXCR4-induzierte SRF-abhängige Gentranskription somit deutlich schwächer. Im Gegensatz dazu hatte die Expression der an beiden Phospholipidinteraktionsstellen im amino- und carboxylterminalen Abschnitt veränderten Mutante mGRK6-C/N⁻C⁻ keinen Einfluss auf die hCXCR4-induzierte Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription. Die Unterschiede in der Inhibierung der hCXCR4-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription durch die mGRK6-C-Kinasen waren dabei nicht, wie *Western blot*-Analysen gezeigt haben, auf Unterschiede in der Expression der wildtypischen Kinase oder der Kinasemutanten zurückzuführen. Die Ergebnisse dieser an intakten Zellen durchgeführten Untersuchungen haben somit gezeigt, dass die Membraninteraktionsstellen im amino- und carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-C nicht nur für die Interaktion der Kinase mit Phospholipiden der Plasmamembran, sondern auch für die Regulation von

membranständigen Rezeptoren durch die Kinase von Bedeutung sind. Ähnliche Ergebnisse liegen aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen vor. So war gezeigt worden, dass eine Veränderung der Membraninteraktionsstellen von GRK5 sowohl die Interaktion der Kinase mit der Zellmembran als auch die effektive Regulierung des β -Adrenozeptors durch GRK5 beeinträchtigt (Pitcher *et al.*, 1996; Noble *et al.*, 2003). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahme der basalen SRF-abhängigen Gentranskription bei Expression der wildtypischen Kinase oder der Kinasemutanten in COS-7-Zellen lässt vermuten, dass in diesen Zellen vorhandene Rezeptorproteine wie LPA-Rezeptoren ebenfalls durch die Kinasen reguliert werden (van Leeuwen *et al.*, 2003; Anliker & Chun, 2004).

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass es bei Expression Virus-kodierter Chemokinrezeptorhomologa zu einer Aktivierung intrazellulärer Transkriptionsfaktoren kommt. So wurde für die von den Genomen des humanen Zytomegalievirus (HCMV) und des humanen Herpesvirus 8 (HHV-8/KSHV) kodierten Chemokinrezeptorhomologa pUS28 und KHSV-GPCR eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB, *nuclear factor of activated T cells* (NFAT), *activator protein-1* (AP-1) und NF- κ B nachgewiesen (Casarosa *et al.*, 2001; McLean *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005). In vorausgegangenen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe war gezeigt worden, dass die transiente Expression des HCMV-kodierten Chemokinrezeptorhomologs pUS28 in COS-7-Zellen sowohl zu einer Liganden-unabhängigen SRF-abhängigen Gentranskription, als auch zu einer konstitutiven Aktivierung von Phospholipase β -Isoenzymen führt (Tulone, Dissertation, 2004). Die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription wird dabei durch Kopplung an G-Proteine der $G\alpha_q$ -Familie vermittelt. So führte die Koexpression von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ zu einer synergistischen Steigerung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription (Tulone, Dissertation, 2004). Des Weiteren zeigten die Untersuchungen, dass die pUS28-induzierte SRF-abhängige Genaktivierung durch Koexpression von GRK2 und GRK6 inhibiert wird (Tulone, Dissertation, 2004). Ähnliche Befunde liegen von Casarosa *et al.* (2001) vor, die beobachteten, dass es bei Kotransfektion von pUS28 und GRK2 in transfizierten COS-7-Zellen zu einer Inhibierung der konstitutiven Aktivierung von NF- κ B kommt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass mGRK6-C sowohl die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription als auch die Aktivierung von Phospholipase β -Isoenzymen inhibiert. Die Inhibierung der pUS28-

induzierten SRF-abhängigen Gentranskription wurde auch bei Koexpression von pUS28 und $G\alpha_q$ beobachtet. Wie bereits bei der Liganden-stimulierten und von hCXCR4-induzierten SRF-abhängigen Genaktivierung ermittelt worden war, haben Veränderung in den beiden Phospholipidinteraktionsstellen von mGRK6-C unterschiedliche Auswirkungen auf die von pUS28-induzierten zellulären Funktionen. So inhibierte mGRK6-C/N⁺C⁺ sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von $G\alpha_q$ die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription etwas stärker als mGRK6-C/N⁺C⁻. Die Veränderungen in beiden Phospholipidinteraktionsstellen in mGRK6-C/N⁻C⁻ führte bei Koexpression dieser Kinase mit pUS28 zum Verlust der Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription. Stattdessen verursachte die Koexpression von mGRK6-C/N⁻C⁻ und pUS28 sogar eine leichte Zunahme der pUS28-induzierten zellulären Funktion. Ähnliche Ergebnisse wurden für die konstitutive Aktivierung der Phospholipase β -Isoenzyme durch pUS28 ermittelt. So führte die Koexpression von mGRK6-C/N⁻C⁻ und pUS28 zu einer leichten Zunahme der pUS28-stimulierten Aktivierung von Phospholipase β -Isoenzymen, während es bei Koexpression von wildtypischer mGRK6-C und pUS28 zu einer Abnahme der Aktivität der Phospholipase β -Isoenzyme kam. Wiederum waren die Unterschiede in der Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription nicht auf Unterschiede in der Expression der wildtypischen Kinase oder der Kinasemutanten zurückzuführen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Phospholipidinteraktionsstellen im amino- und carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-C nicht nur für die Regulation der Signaltransduktion des Liganden-stimulierten hCXCR4, sondern auch für die Regulation des konstitutiv aktiven Chemokinrezeptorhomologs pUS28 von entscheidender Bedeutung sind.

Neben GRK6 können die pUS28-stimulierten zellulären Funktionen auch von anderen Mitgliedern der GRK-Familie reguliert werden. So wurde berichtet, dass sowohl GRK2, als auch GRK5 pUS28 phosphorylieren und dass es infolgedessen zu einer vermehrten Translokation von β -Arrestin 2 an die Zellmembran kommt (Miller *et al.*, 2003). Letzteres deutet auf eine Desensibilisierung von pUS28 durch GRK2 hin. Jedoch zeigten Miller und andere Autoren, dass für die Inhibierung der von pUS28-regulierten Zellfunktionen durch GRK2 insbesondere die direkte Interaktion der GRK2 mit $G\alpha_q$ von Bedeutung ist und dass GRK2 dabei als *scavenger*-Protein fungiert (Casarosa *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2003). Die

Interaktion der GRK2 mit $G\alpha_q$ erfolgt über eine *regulator of G protein signaling* (RGS)-*homology domain* (RH), die im aminoterminalen Abschnitt der Kinase lokalisiert ist. Neuere Untersuchungen belegen, dass alle Mitglieder der GRK-Familie in ihren Aminosäuresequenzen der aminoterminalen Abschnitte eine hohe Übereinstimmung zu den Aminosäuresequenzen von RGS-Proteinen aufweisen (Day *et al.*, 2004). Für die humane GRK6 (hGRK6) wurde die RH-Domäne im Bereich der Aminosäuren D⁵² bis L¹⁷¹ lokalisiert (Sterne-Marr *et al.*, 2003). Ein Aminosäuresequenzvergleich im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass von den 119 Aminosäuren, welche die RH-Domäne von hGRK6 definieren, 110 mit den Aminosäuren von mGRK6-C identisch sind. Um zu klären, ob die spezifische Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription durch mGRK6-C auf die Interaktion von $G\alpha_q$ mit der RH-Domäne von mGRK6-C zurückzuführen ist, wurde eine verkürzte, nur für den Bereich der RH-Domäne kodierende Variante von mGRK6-C, mGRK6-C-N-term, hergestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in COS-7-Zellen ergaben, dass die Expression dieser trunkierten Variante nur einen minimalen inhibitorischen Einfluß auf die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription hatte. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass mGRK6-C nicht als *scavenger*-Protein fungiert und über Bindung von $G\alpha_q$ pUS28-induzierte zelluläre Funktionen beeinflusst, sondern dass mGRK6-C das virale Chemokinrezeptorhomolog pUS28 durch Phosphorylierung reguliert. Unterstützt wird diese Vermutung durch Untersuchungen einer Arbeitsgruppe, die gezeigt haben, dass GRK5 und GRK6 nicht in der Lage sind, verschiedene G-Proteine wie $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ oder $G\alpha_{12/13}$ über die RH-Domäne zu binden (Day *et al.*, 2004).

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben Hinweise dafür geliefert, dass die Bindung der CC-Chemokine RANTES (CCL5) und MCP-3 (CCL7) an pUS28 über Aktivierung von $G\alpha_i$ oder $G\alpha_{16}$ zur Stimulation der ERK1/2 MAP-Signalkaskade und, oder Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration führt (Gao & Murphy, 1994; Billstrom *et al.*, 1998). Neuere Untersuchungen deuten auf eine funktionelle, Liganden-abhängige Interaktion von pUS28 und $G\alpha_{12/13}$ hin, die eine Aktivierung der RhoGTPase RhoA in glatten Muskelzellen bewirkt (Melnychuk *et al.*, 2004). Jedoch war auch gezeigt worden, dass die transiente Expression von pUS28 in COS-7-Zellen sowohl zu einer Liganden-unabhängigen Inositphosphatbildung als auch zu einer Liganden-unabhängigen

NF- κ B-stimulierten Gentranskription führt (Casarosa *et al.*, 2001). Des Weiteren war aus Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe bekannt, dass die Infektion von humanen Fibroblastenzellen mit HCMV-Viren eine von der Anwesenheit von pUS28 abhängige Pertussistoxin-insensitive konstitutive Stimulation der Inositphosphatbildung hervorruft (Minisini *et al.*, 2003). Zusätzlich zeigten Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an transient transfizierten COS-7-Zellen, dass die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription durch Expression von $G\alpha_q$ synergistisch gesteigert wird (Tulone, Dissertation, 2004). Letztere Ergebnisse lassen vermuten, dass Mitglieder der $G\alpha_q$ -Familie sowohl die pUS28-induzierte Aktivierung von PLC- β -Isoenzymen als auch die Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription vermitteln. Jedoch war zunächst unklar, ob die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription auch durch Expression anderer Mitglieder der $G\alpha_q$ -Familie synergistisch gesteigert werden kann. Obwohl die $G\alpha$ -Untereinheiten der $G\alpha_q$ -Familie, $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ oder $G\alpha_{16}$, große Übereinstimmungen in ihren Aminosäuresequenzen aufweisen, wurde nur bei Koexpression von pUS28 und $G\alpha_q$ oder pUS28 und $G\alpha_{11}$ eine synergistische Zunahme der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription beobachtet. Die Expression von $G\alpha_{14}$ hatte keinen Einfluß auf die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription. Die Koexpression von $G\alpha_{16}$ und pUS28 führte sogar zu einer Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription.

Auch für andere GPCRs liegen Hinweise vor, dass es bei Kopplung der Rezeptoren an $G\alpha$ -Untereinheiten der $G\alpha_q$ -Proteinfamilie zu Unterschieden in der Aktivierung von zellulären Effektoren kommt. So zeigten die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Wu *et al.*, dass die Aktivierung der Phospholipase C- β_1 (PLC β_1) durch den α_{1B} -Adrenozeptor (AR) von allen vier Mitgliedern der $G\alpha_q$ -Familie vermittelt werden kann (Wu *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass die Aktivierung der PLC β_1 durch α_{1C} -AR mittels Kopplung an $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$ und $G\alpha_{14}$, nicht jedoch mittels Kopplung an $G\alpha_{16}$ erfolgt. Für den dritten Subtyp des α_1 -Adrenorezeptors, α_{1A} -AR, wurde ermittelt, dass dieser PLC β_1 nur durch $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$, nicht jedoch durch $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{16}$ aktiviert. Auch für den Ligandenstimulierten muskarinischen Acetylcholinrezeptor M1 wurde die Aktivierung von PLC β_1 in COS-7-Zellen durch spezifische Interaktion mit $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$, jedoch nicht durch Interaktion mit $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{16}$ nachgewiesen (Lee *et al.* 1998; Hubbard & Hepler, 2006).

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten ebenfalls, dass alle Mitglieder der $G\alpha_q$ -Familie, $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{16}$, mit den PLC- β -Isoenzymen interagieren, diese jedoch mit unterschiedlicher Effizienz aktivieren (Zhu & Birnbaumer, 1996; Rhee, 2001; Hubbard & Hepler, 2006). Hinzu kommt, dass die einzelnen PLC- β -Isoenzyme unterschiedlich sensitiv gegenüber der Stimulation durch die G-Proteine sind. So haben Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass PLC β_3 und PLC β_2 im Gegensatz zu PLC β_1 deutlich schwächer von $G\alpha_q$ stimuliert werden (Illenberger *et al.*, 2003a). Die Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass $G\alpha_q$ und $G\alpha_{16}$ die pUS28-induzierte Aktivierung der PLC- β -Isoenzyme gleichermaßen vermitteln. Dieses Ergebnis steht im deutlichen Gegensatz zu der Beobachtung, dass sich beide $G\alpha$ -Proteine in ihrem Einfluss auf die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription unterscheiden. Während $G\alpha_q$ die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription stimulierte, bewirkte die Expression von $G\alpha_{16}$ eine Inhibierung dieser zellulären Funktion. Die Tatsache, dass $G\alpha_q$ sowohl die pUS28-induzierte Aktivierung von PLC- β -Isoenzymen als auch die SRF-abhängige Gentranskription vermittelt, ließ die Frage aufkommen, ob diese von pUS28-induzierten zellulären Funktionen miteinander verknüpft sind oder unabhängig voneinander aktiviert werden. Mögliche Hinweise dafür, dass die Aktivierung der PLC- β -Isoenzyme eine Voraussetzung für die Stimulierung der SRF-abhängigen Genaktivierung sein könnte, hatten die Untersuchungen von Sagi *et al.* (2001) geliefert. Diese Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass in COS-7-Zellen eine $G\alpha_q$ -induzierte Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription durch einen PLC- β -abhängigen Signalweg vermittelt wird. Dagegen sprechen jedoch Untersuchungsergebnisse von Vogt *et al.* (2003), die anhand von Untersuchungen an $G\alpha_{12/13}$ -defizienten Fibroblastenzellen zeigen konnten, dass die $G\alpha_{q/11}$ -vermittelte Aktivierung von intrazellulärem RhoA unabhängig von PLC- β -Isoenzymen erfolgt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse haben gezeigt, dass es bei Koexpression von pUS28 und PLC β_3 in COS-7-Zellen zu einer Steigerung der Inositphosphatbildung kommt und dass die Koexpression von PLC β_3 mit pUS28 zu einer Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription führt. Auch bei Koexpression von PLC β_1 mit pUS28 und PLC β_2 mit pUS28 kam es zur Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription, sodass alle PLC- β -Isoenzyme gleichermaßen die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription inhibierten. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Aktivierung von PLC- β -

Isoenzymen keine Voraussetzung für die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription ist, sondern dass es sich vielmehr um zwei voneinander unabhängige Signalwege handelt, bei denen intrazelluläre Effektorproteine um die Bindung an $G\alpha_q$ konkurrieren. Neueste Untersuchungen bestätigen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse. So zeigten Lutz *et al.* (2005), dass die vom muskarinischen Acetylcholinrezeptor M3 induzierte SRF-abhängige Gentranskription bei Koexpression von $PLC\beta_2$ inhibiert wird.

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die PLC- β -Isoenzyme $PLC\beta_1$ und $PLC\beta_2$ mit der GTP-gebundenen $G\alpha_q$ -Untereinheit des G-Proteins interagieren (Wang *et al.*, 1999a; Rhee, 2001). Die Interaktion wird dabei von der C2-Domäne des carboxylterminalen Abschnitts der PLC- β -Isoenzyme vermittelt und führt zur allosterischen Aktivierung der Enzyme. Da die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen gezeigt hatten, dass die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription in Anwesenheit der PLC- β -Isoenzyme inhibiert wird, stellte sich die Frage, ob diese Inhibierung auf eine direkte Interaktion der C2-Domäne der PLC- β -Isoenzyme mit $G\alpha_q$ zurückzuführen war. Um dieser Frage nachgehen zu können, wurde pUS28 zusammen mit dem, die C2-Domäne-tragenden carboxylterminalen Abschnitt der $PLC\beta_1$ koexprimiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expression des Carboxylterminus von $PLC\beta_1$, $PLC\beta_1$ -CT, die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription inhibierte. Diese Inhibierung wurde bei Expression von pUS28 allein, aber auch bei Expression von pUS28 mit $G\alpha_q$ beobachtet. Erstere muss demnach auf die Inhibierung von endogenem $G\alpha_q$ zurückzuführen sein. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen belegen, dass $PLC\beta_1$ gegenüber $G\alpha_q$ GAP-Aktivität aufweist und die Hydrolyse des an die $G\alpha$ -Untereinheit gebundenen GTPs stimuliert (Chidiac & Ross, 1999; Harden & Sondek, 2006). Diese GAP-Aktivität wird vermutlich durch die Aminosäuren 903-1042 des $PLC\beta_1$ -Proteins vermittelt (Paulssen *et al.*, 1996; Rhee, 2001). Da $PLC\beta_1$ -CT für den Aminosäuresequenzabschnitt 788-1220 von $PLC\beta_1$ kodiert, bleibt unklar, ob die Inhibierung der zellulären Funktionen von pUS28 durch $PLC\beta_1$ -CT auf die scavenger-Funktion von $PLC\beta_1$ -CT, auf die potentielle GAP-Aktivität von $PLC\beta_1$ -CT oder auf beides zurückzuführen ist.

Wie die Ergebnisse der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, kommt es bei Expression von pUS28 in COS-7-Zellen zu einer konstitutiven Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen belegen, dass die Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription häufig durch Mitglieder der Rho-GTPasen vermittelt wird (Hill *et al.*, 1995; Gineitis & Treisman, 2001; Miralles *et al.*, 2003). Außerdem wurde für zahlreiche $G\alpha_q$ -gekoppelte GPCRs nachgewiesen, dass ihre Aktivierung zu einer Stimulation von Rho-GTPasen führt (Sah *et al.*, 2000; Chikumi *et al.*, 2002). Eine Aktivierung von RhoA-vermittelten Signalwegen wurde auch für das vom Genom des KSHV-Virus kodierte konstitutiv aktiven Chemokinrezeptorhomologs KSHV-GPCR beschrieben (Shepard *et al.*, 2001). In Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe war gezeigt worden, dass die Koexpression von pUS28 und aktiviertem RhoA (RhoAG14V) eine synergistische Steigerung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription bewirkte (Tulone, Dissertation, 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen darüber hinaus, dass auch die Expression von wildtypischem RhoA und pUS28 zu einer synergistischen Steigerung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription führte. Dagegen hatte die Expression einer dominant negativen Mutante von RhoA (RhoAT19N) keinen Einfluss auf die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription. Eine mögliche Erklärung für die ausbleibende Inhibierung durch RhoAT19N könnte darin liegen, dass die in den Untersuchungen erzielten exprimierten Mengen von RhoAT19N nicht ausreichten, das endogen vorhandene RhoA zu inhibieren. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen über einen RhoA- und $G\alpha_{q/11}$ -abhängigen Signalweg erfolgt.

Erst kürzlich erbrachten die Untersuchungen von Melnychuk *et al.* (2004) Hinweise dafür, dass pUS28 eine Rolle bei der Migration glatter Muskelzellen spielen könnte und dass an diesen Vorgängen ein $G\alpha_{12/13}$ - und RhoA-abhängiger Signalweg beteiligt ist. In COS-7-Zellen konnte die Arbeitsgruppe von Melnychuk keine Aktivierung von RhoA durch pUS28 nachweisen. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse, die gezeigt haben, dass es sowohl bei Koexpression von pUS28 und $G\alpha_q$, als auch bei Koexpression von pUS28 und RhoA in COS-7-Zellen zu einer synergistischen Stimulation der SRF-abhängigen Gentranskription kam. Des Weiteren ergaben Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, dass bei

Koexpression von pUS28 und des *regulator of G-protein signaling 2* (RGS2) in COS-7-Zellen die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription fast vollständig inhibiert wurde. Dagegen führte die Expression von pUS28 mit der RGS-Domäne des RhoGEFs LscRGS, in COS-7-Zellen zu keiner Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription (Tulone, Dissertation, 2004). Da von RGS2 bekannt ist, dass es spezifisch die Funktion von $G\alpha_{q/11}$ hemmt und für LscRGS gezeigt wurde, dass es die Vermittlung von Rezeptorsignalen an $G\alpha_{12/13}$ inhibiert, sprechen diese Daten gegen eine $G\alpha_{12/13}$ -abhängige Aktivierung von RhoA durch pUS28. Ob die beobachteten Unterschiede in der Aktivierung von RhoA durch pUS28 darauf zurückzuführen sind, dass unterschiedliche Zellen verwendet wurden, oder ob sie möglicherweise auf Unterschieden in den Expressionsmengen des Chemokinrezeptorhomologs pUS28 beruhen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass für die pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription $G\alpha_{q/11}$ und RhoA essentiell sind. In zahlreichen Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen wurde belegt, dass Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEFs) eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Rho-GTPasen spielen (Bishop & Hall, 2000). Von den RhoGEFs p115 RhoGEF und PDZ-RhoGEF ist bekannt, dass sie die $G\alpha_{12/13}$ -vermittelten Signale auf diese Weise spezifisch auf die Rho-GTPase RhoA übertragen (Fukuhara *et al.*, 1999; Fukuhara *et al.*, 2000; Dutt *et al.*, 2004). Neueste Untersuchungen belegen, dass RhoA auch über das $G\alpha_q$ -spezifische RhoGEF, p63RhoGEF, aktiviert werden kann (Souchet *et al.*, 2002; Lutz *et al.*, 2004). Da die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hingedeutet hatten, dass die von pUS28-induzierte SRF-abhängige Gentranskription von $G\alpha_{q/11}$ - und RhoA vermittelt wird, stellte sich die Frage, ob und wenn ja, welchen Einfluß die Expression dieses $G\alpha_{q/11}$ -aktivierten p63RhoGEFs auf die zellulären Funktionen des Chemokinrezeptorhomologs hat. Tatsächlich wurde bei Koexpression von pUS28 und p63RhoGEF bzw. pUS28, $G\alpha_{q-EE}$ und p63RhoGEF in COS-7-Zellen eine synergistische Steigerung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription nachgewiesen. Dagegen wurde bei Koexpression von pUS28 und p63RhoGEF mit der ADP-Ribosyltransferase C3, welche spezifisch die Aktivität der Rho-Isoformen RhoA, Rho B und RhoC hemmt, eine nahezu komplette Hemmung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription beobachtet. Somit

konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription durch pUS28 von RhoA und $G\alpha_q$ vermittelt wird und dass RhoA-spezifische GEFs, wie p63RhoGEF, bei der Übertragung des vom Chemokinrezeptorhomolog generierten Signals auf die Rho-GTPase beteiligt sind. Einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung von p63RhoGEF durch einen $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptor und der Aktivierung von RhoA wurde erst kürzlich auch von Lutz *et al.* (2005) beschrieben.

Für die Funktionen von RhoGEFs sind verschiedene Strukturmerkmale innerhalb der GEF-Proteine verantwortlich. So weisen RhoGEFs eine hochkonservierte *Dbl-homology* (DH)-Domäne und eine carboxylterminal davon gelegene *pleckstrin-homology* (PH)-Domäne auf. In vivo Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die DH-Domäne sehr wahrscheinlich für die spezifische Interaktion mit der Rho-GTPase und den GDP/GTP Austausch verantwortlich ist. Eine direkte Aktivierung von Rho-GTPasen durch die PH-Domäne konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Dennoch deuten bisherige Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass für eine vollständige Aktivierung der RhoGTPasen die DH-Domäne allein nicht ausreichend ist (Rossman & Sondek, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, welcher Bereich des DH-PH-Tandem-Motivs von p63RhoGEF für die Aktivierung von RhoA verantwortlich ist. Dazu wurde eine Mutante von p63RhoGEF hergestellt, die nur den Sequenzabschnitt enthielt, der für die PH-Domäne im carboxylterminalen Abschnitt von p63RhoGEF kodierte (p63RhoGEF-PH). Die Koexpression von pUS28 und p63RhoGEF-PH bzw. pUS28, $G\alpha_{q-EE}$ und p63RhoGEF-PH in COS-7-Zellen resultierte in einer Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass für die Aktivierung von RhoA durch p63RhoGEF nicht die PH-Domäne, sondern sehr wahrscheinlich die DH-Domäne im aminoterminalen Sequenzabschnitt von p63RhoGEF von entscheidender Bedeutung ist. Die Inhibierung der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription durch p63RhoGEF-PH könnte zum einen auf eine Interaktion der p63RhoGEF-PH Domäne mit $G\alpha_q$ zum anderen auf eine Interaktion mit dem Effektorprotein RhoA zurückzuführen sein. Die Bindung von $G\alpha_q$ durch die p63RhoGEF-PH-Domäne würde die Übertragung des Signals auf endogene RhoGEFs und die Interaktion der p63RhoGEF-PH-Domäne mit RhoA würde die Aktivierung der GTPase unterbinden. Lutz *et al.* (2005) vermutete aufgrund von Protein-Protein-

Interaktionsstudien, dass die PH-Domäne von p63RhoGEF mit aktiviertem $G\alpha_q$ interagiert. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigten jedoch nur eine geringe Beeinflussung der pUS28-vermittelten Stimulation der Inositphosphatbildung bei Expression von p63RhoGEF-PH in COS-7-Zellen. Da COS-7-Zellen endogen $G\alpha_{q/11}$, nicht jedoch $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{15/16}$ aufweisen (Liu & Wu, 2004), muss die beobachtete Inositphosphatbildung auf $G\alpha_{q/11}$ zurückzuführen sein. Bei Koexpression des wildtypischen p63RhoGEF wurde dagegen die pUS28-induzierte Stimulation der Inositphosphatproduktion in COS-7-Zellen deutlich inhibiert. Dies deutet darauf hin, dass auch Abschnitte außerhalb der p63RhoGEF-PH-Domäne für die Bindung von $G\alpha_{q/11}$ von Bedeutung sind. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass p63RhoGEF über die PH-Domäne auch RhoA bindet und auf diese Weise die Aktivierung der GTPase und somit die pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription unterbindet. Unterstützt wird diese Vermutung durch Untersuchungen von Joseph und Norris (2005), die zeigten, dass beim Rac-spezifischen GEF P-Rex2 die PH-Domäne für das Erkennen und Binden des spezifischen Substrats verantwortlich ist. Ob diese Funktion der PH-Domäne allen Mitgliedern der *Dbl*-Familie zuzuordnen ist, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6. Zusammenfassung

Chemokine und ihre Rezeptoren sind als zentrale Regulatoren von Leukozytenfunktionen maßgeblich an der Kontrolle der Homöostase des Immunsystems und der Induktion der Immunantwort beteiligt. Nach Aktivierung durch ihren spezifischen Liganden interagieren die meisten der Chemokinrezeptoren mit Pertussistoxin-sensitiven heterotrimeren G_i -Proteinen. Darüber hinaus wurde auch eine Interaktion von Chemokinrezeptoren mit Pertussistoxin-insensitiven Mitgliedern der G_q -Familie, wie $G\alpha_q$ und $G\alpha_{16}$, beschrieben. Chemokinrezeptoren kontrollieren auf diese Weise die Aktivität einer Vielzahl von Effektoren, z. B. von Phospholipase C- β -Isoenzymen, Inositphospholipid-3-Kinasen, Rho-GTPasen, Mitogen-aktivierten Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren. Bei anhaltender oder wiederholter Aktivierung von Chemokinrezeptoren durch ihre Liganden kommt es zur Verringerung oder zum völligen Verlust der Rezeptoraktivität, ein Vorgang, der als homologe Desensibilisierung bezeichnet wird. An der Desensibilisierung der Chemokinrezeptoren sind Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) beteiligt. GRKs gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen, die durch Phosphorylierung der Liganden-gebundenen Chemokinrezeptoren deren Aktivität regulieren. Derzeit sind in Säugetieren sieben Mitglieder der GRK-Familie bekannt, GRK1-7. Die Mitglieder der GRK-Familie weisen große strukturelle Gemeinsamkeiten auf. So besitzen sie eine zentrale, hochkonservierte katalytische Domäne, die von variablen amino- und carboxylterminalen Abschnitten flankiert wird.

In unserer Arbeitsgruppe waren die cDNAs von drei Isoformen der GRK6 der Maus (mGRK6), mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C isoliert worden, die in den Aminosäuresequenzen ihrer aminoterminalen Bereiche und ihrer katalytischen Domänen übereinstimmen, sich jedoch in der Länge und im Aufbau ihrer carboxylterminalen Abschnitte unterscheiden. Für letzteren Abschnitt wird angenommen, dass er für die Interaktion der Kinasen mit der Plasmamembran und/oder mit dem aktivierten Rezeptorprotein verantwortlich ist und/oder die Aktivität der Kinase reguliert. Interessanterweise fehlt der mGRK6-C dieser carboxylterminale Abschnitt. Dennoch hatten die Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass mGRK6-C in intakten Zellen mit der Plasmamembran assoziiert vorliegt und in der Lage ist, den membranständigen Lichtrezeptor Rhodopsin im zellfreien System zu phosphorylieren. Des

Weiteren war von der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt worden, dass es bei Expression des CXC-Chemokinrezeptors CXCR4 und des durch das Genom des humanen Zytomegalievirus kodierten Chemokinrezeptorhomologs pUS28 in COS-7-Zellen nicht nur zu einer $G\alpha_q$ -vermittelten Aktivierung von Phospholipase C- β -Isoenzymen sondern auch zur vermehrten Transkription von *serum response factor* (SRF)-regulierten Genen kommt. Die durch den Liganden-aktivierten CXCR4-Rezeptor und das konstitutiv aktive Rezeptorhomolog pUS28 beeinflussten zellulären Funktionen werden durch GRKs reguliert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu klären, (i) welchen Einfluss die mGRK6-C auf die vom aktivierten humanen CXCR4 (hCXCR4) und von pUS28 regulierten Zellfunktionen hat, (ii) welche funktionelle Bedeutung die Interaktion von mGRK6-C mit der Plasmamembran für diesen Einfluss hat und (iii) welche strukturellen Voraussetzungen der mGRK6-C für die Interaktion des Enzyms mit der Plasmamembran entscheidend sind. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, welche Signaltransduktionskomponenten an der durch pUS28 ausgelösten Steigerung der Transkription SRF-regulierter Gene beteiligt sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden durch eine vergleichende Aminosäuresequenzanalyse potentielle Phospholipidinteraktionsstellen im amino- (N) und im carboxylterminalen (C) Abschnitt des mGRK6-C-Proteins identifiziert. Davon ausgehend wurden mGRK6-C-Mutanten hergestellt, bei denen die basischen Aminosäuren innerhalb dieser Interaktionsstellen gegen Alanine ausgetauscht wurden, und zwar entweder im aminoterminalen Abschnitt (mGRK6-C-N⁺C⁺), im carboxylterminalen Abschnitt (mGRK6-C-N⁺C⁻) oder in beiden Abschnitten (mGRK6-C-N⁻C⁻). Die Ergebnisse der mit diesen Mutanten an künstlichen Vesikeln durchgeführten Lipidbindungsstudien zeigten, dass die genannten strukturellen Veränderungen einen wesentlichen Einfluss auf die Bindung der Proteine an Membranphospholipide haben. So führten Veränderungen in der carboxylterminal gelegenen Interaktionsstelle zu einem Verlust der Interaktion mit Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdInsP₂). Im Vergleich zum wildtypischen mGRK6-C-Protein zeigte die Mutante mGRK6-C-N⁻C⁻ im zellfreien System eine deutlich geringere Aktivität bezüglich der Phosphorylierung membranständiger Substrate. In intakten Zellen bewirkte die mGRK6-C eine Hemmung sowohl von hCXCR4 als auch von pUS28 beeinflussten Zellfunktionen. Für diese Effekte waren beide Phospholipidinteraktionsstellen von mGRK6-C von Bedeutung.

Zu Beginn der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen war bekannt, dass sowohl an der durch pUS28 vermittelten Aktivierung von Phospholipase C- β -Isoenzymen als auch an der durch pUS28 induzierten Steigerung der SRF-abhängigen Gentranskription Mitglieder der $G\alpha_q$ -Familie beteiligt sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die letztere Funktion von pUS28 durch $G\alpha_q$ oder $G\alpha_{11}$, nicht jedoch durch $G\alpha_{14}$ oder $G\alpha_{16}$ vermittelt wird und nicht auf einer Aktivierung von Phospholipase C- β -Isoenzymen beruht. Es handelt sich hier also um zwei voneinander unabhängige Signalwege, bei denen intrazelluläre Effektorproteine um die Bindung an aktiviertes $G\alpha_q$ und/oder $G\alpha_{11}$ konkurrieren. Für die Steigerung der Transkription SRF-regulierter Gene durch pUS28 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Rolle des Effektorproteins von Rho-GTPase-aktivierenden Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEFs) wie dem p63RhoGEF übernommen wird und dass die *pleckstrin homology* (PH)-Domänen dieser Proteine eine wichtige Rolle bei dieser Interaktion spielen.

7 Literaturverzeichnis

Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P and Luster AD (2000) The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques *Circ Res* **86**, 131-138

Abramow-Newerly M, Roy AA, Nunn C, and Chidiac P (2006) RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins *Cell Signal* **18**, 579-591

Adamski FM, Timms KM, and Shieh BH (1999) A unique isoform of phospholipase C β_4 highly expressed in the cerebellum and eye *Biochim Biophys Acta* **1444**, 55-60

Aktories K, and Barbieri JT (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches *Nat Rev Microbiol* **3**, 397-410

Alcami A (2003) Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors *Nat Rev Immunol* **3**, 36-50

Anliker B, and Chun J (2004) Lysophospholipid G protein-coupled receptors *J Biol Chem* **279**, 20555-20558

Aspenström P, Fransson A, and Saras J (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system *Biochem J* **377**, 327-337

Baggiolini M (2001) Chemokines in pathology and medicine *J Intern Med* **250**, 91-104

Beisser PS, Goh CS, Cohen FE, and Michelson S (2002) Viral chemokine receptors and chemokines in human cytomegalovirus trafficking and interaction with the immune system. CMV chemokine receptors *Curr Top Microbiol Immunol* **269**, 203-234

Berkhout TA, Blaney FE, Bridges AM, Cooper DG, Forbes IT, Gribble AD, Groot PH, Hardy A, Ife RJ, Kaur R, Moores KE, Shillito H, Willetts J, and Witherington J (2003) CCR2: characterization of the antagonist binding site from a combined receptor modeling/mutagenesis approach *J Med Chem* **46**, 4070-4086

Bernards A (2003) GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila* *Biochim Biophys Acta* **1603**, 47-82

Bershadsky AD, Balaban NQ, and Geiger B (2003) Adhesion-dependent cell mechanosensitivity *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 677-695

Billstrom MA, Johnson GL, Avdi NJ, and Worthen GS (1998) Intracellular signaling by the chemokine receptor US28 during human cytomegalovirus infection *J Virol* **72**, 5535-5544

Bishop AL, and Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins *Biochem J* **348** (Pt 2), 241-255

Bodaghi B, Jones TR, Zipeto D, Vita C, Sun L, Laurent L, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, and Michelson S (1998) Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells *J Exp Med* **188**, 855-866

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem* **72**, 248-254

Bünemann M, and Hosey MM (1999) G protein-coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling *J Physiol* **517**, 5-23

Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR and Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation *Endocr Rev* **24**, 765-781

Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ, and Gierschik P (1992) Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β_2 by G protein $\beta\gamma$ -subunits *Nature* **360**, 684-686

Casarosa P, Bakker RA, Verzijl D, Navis M, Timmerman H, Leurs R, and Smit MJ (2001) Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 *J Biol Chem* **276**, 1133-1137

Casarosa P, Waldhoer M, LiWang PJ, Vischer HF, Kledal T, Timmerman H, Schwartz TW, Smit MJ, and Leurs R (2005) CC and CX3C chemokines differentially interact with the N terminus of the human cytomegalovirus-encoded US28 receptor *J Biol Chem* **280**, 3275-3285

Chai J, and Tarnawski AS (2002) Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing *J Physiol Pharmacol* **53**, 147-157

Chan YJ, Chiou CJ, Huang Q, and Hayward GS (1996) Synergistic interactions between overlapping binding sites for the serum response factor and ELK-1 proteins mediate both basal enhancement and phorbol ester responsiveness of primate cytomegalovirus major immediate-early promoters in monocyte and T-lymphocyte cell types *J Virol* **70**, 8590-8605

Charo IF, and Ransohoff RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation *N Engl J Med* **354**, 610-621

Chidiac P, and Ross EM (1999) Phospholipase C- β_1 directly accelerates GTP hydrolysis by $G\alpha_q$ and acceleration is inhibited by $G\beta\gamma$ subunits *J Biol Chem* **274**, 19639-19643

Chikumi H, Fukuhara S, and Gutkind JS (2002) Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase *J Biol Chem* **277**, 12463-12473

Chikumi H, Vázquez-Prado J, Servitja JM, Miyazaki H, and Gutkind JS (2002) Potent activation of RhoA by $G\alpha_q$ and G_q -coupled receptors *J Biol Chem* **277**, 27130-27134

Chuang TT, Iacovelli L, Sallese M, De Blasi A (1996) G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications *Trends Pharmacol Sci* **17**, 416-421

Cismowski MJ (2006) Non-receptor activators of heterotrimeric G-protein signaling (AGS proteins) *Semin Cell Dev Biol* **17**, 334-344

Cockcroft S (2006) The latest phospholipase C, PLC η , is implicated in neuronal function *Trends Biochem Sci* **31**, 4-7

Compton SJ, and Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay *Anal Biochem* **151**, 369-374

Daaka Y, Pitcher JA, Richardson M, Stoffel RH, Robishaw JD, and Lefkowitz RJ (1997) Receptor and G $\beta\gamma$ isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 2180-2185

Day PW, Wedegaertner PB, and Benovic JL (2004) Analysis of G-protein-coupled receptor kinase RGS homology domains *Methods Enzymol* **390**, 295-310

DeBurman SK, Ptasienski J, Benovic JL, and Hosey MM (1996) G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein $\beta\gamma$ subunits *J Biol Chem* **271**, 22552-22562

DeBurman SK, Ptasienski J, Boetticher E, Lomasney JW, Benovic JL, and Hosey MM (1995) Lipid-mediated regulation of G protein-coupled receptor kinases 2 and 3 *J Biol Chem* **270**, 5742-5747

DeMeritt IB, Milford LE, and Yurochko AD (2004) Activation of the NF- κ B pathway in human cytomegalovirus-infected cells is necessary for efficient transactivation of the major immediate-early promoter *J Virol* **78**, 4498-4507

Dutt P, Nguyen N, and Tokosz D (2004) Role of Lbc RhoGEF in G $\alpha_{12/13}$ -induced signals to Rho GTPase *Cell Signal* **16**, 201-209

Eckhart AD, Ozaki T, Tevæarai H, Rockman HA, and Koch WJ (2002) Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in transgenic mice attenuates β -adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure *Mol Pharmacol* **61**, 749-758

Etienne-Manneville S, and Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology *Nature* **420**, 629-635

Eva A, and Aaronson SA (1985) Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma *Nature* **316**, 273-275

Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling *Pharmacol Rev* **53**, 1-24

- Fong AM, Premont RT, Richardson RM, Yu YR, Lefkowitz RJ, and Patel DD (2002) Defective lymphocyte chemotaxis in β -arrestin2- and GRK6-deficient mice *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7478-7483
- Fredriksson R, and Schiöth HB (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes *Mol Pharmacol* **67**, 1414-1425
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, and Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints *Mol Pharmacol* **63**, 1256-1272
- Freedman NJ, and Lefkowitz RJ (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors *Recent Prog Horm Res* **51**, 319-353
- Fritze O, Filipek S, Kuksa V, Palczewski K, Hofmann KP, and Ernst OP (2003) Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation *Proc Natl Acad Sci* **100**, 2290-2295
- Fukuhara S, Chikumi H, and Gutkind JS (2000) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G₁₂ family to Rho *FEBS Lett* **485**, 183-188
- Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T, and Gutkind JS (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho *J Biol Chem* **274**, 5868-5879
- Gainetdinov RR, Bohn LM, Sotnikova TD, Cyr M, Laasko A, Macrea AD, Torres GE, Kim KM, Lefkowitz RJ, Caron MG, and Premont RT (2003) Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice *Neuron* **38**, 291-303
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, and Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions *Annu Rev Neurosci* **27**, 107-144
- Gallagher ED, Gutowski S, Sternweis PC, and Cobb MH (2004) RhoA binds to the amino terminus of MEKK1 and regulates its kinase activity *J Biol Chem* **279**, 1872-1877
- Gao JL, and Murphy PM (1994) Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional β chemokine receptor *J Biol Chem* **269**, 28539-28542
- Garzón J, Rodríguez-Munoz M, López-Fando A, Sánchez-Blázquez P (2005) Activation of μ -opioid receptors transfers control of G α subunits to the regulator of G-protein signaling RGS9-2: role in receptor desensitization *J Biol Chem* **280**, 8951-8960
- Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors *Endocr Rev* **21**, 90-113
- Gineitis D, and Treisman R (2001) Differential usage of signal transduction pathways defines two types of serum response factor target gene *J Biol Chem* **276**, 24531-24539

- Graham FL, and van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA *Virology* **52**, 456-467
- Hall A (2005) Rho GTPases and the control of cell behaviour *Biochem Soc Trans* **33(Pt 5)**, 891-895
- Hamm HE (1998) The many faces of G protein signaling *J Biol Chem* **273**, 669-672
- Hanks SK, and Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification *FASEB J* **9**, 576-596
- Harden TK, and Sondek J (2006) Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**, 355-379
- Haribabu B, Richardson RM, Fisher I, Sozzani S, Peiper SC, Horuk R, Ali H, and Snyderman R (1997) Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization *J Biol Chem* **272**, 28726-28731
- Hart MJ, Eva A, Evans T, Aaronson SA, and Cerione RA (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product *Nature* **354**, 311-314
- Hart MJ, Eva A, Zangrilli D, Aaronson SA, Evans T, Cerione RA, and Zheng Y (1994) Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product *J Biol Chem* **269**, 62-65
- Hart MJ, Sharma S, elMasry N, Qiu RG, McCabe P, Polakis P, and Bollag G (1996) Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase *J Biol Chem* **271**, 25452-25458
- Haskell CA, Cleary MD, and Charo IF (2000) Unique role of the chemokine domain of fractalkine in cell capture. Kinetics of receptor dissociation correlate with cell adhesion *J Biol Chem* **275**, 34183-34189
- Heo J, Thapar R, and Campbell SL (2005) Recognition and activation of Rho GTPases by Vav1 and Vav2 guanine nucleotide exchange factors *Biochemistry* **44**, 6573-6585
- Hepler JR (2005) R7BP: a surprising new link between G proteins, RGS proteins, and nuclear signaling in the brain *Sci STKE* **294**, pe38
- Hill CA, Fox AN, Pitts RJ, Kent LB, Tan PL, Chrystal MA, Cravchik A, Collins FH, Robertson HM, and Zwiebel LJ (2002) G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae* *Science* **298**, 176-178
- Hill CS, Wynne J, and Treisman R (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF *Cell* **81**, 1159-1170
- Holmes WE, Lee J, Kuang W-J, Rice GC, and Wood WI (1991) Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor *Science* **253**, 1278-1280

- Horuk R (1999) Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields *Immunol Today* **20**, 89-94
- Hubbard KB, and Hepler JR (2006) Cell signalling of the G_qα family of heterotrimeric G proteins *Cell Signal* **18**, 135-150
- Hüttenrauch F, Pollok-Kopp B, and Oppermann M (2005) G protein-coupled receptor kinases promote phosphorylation and β-arrestin-mediated internalization of CCR5 homo- and hetero-oligomers *J Biol Chem* **280**, 37503-37515
- Illenberger D, Walliser C, Nürnberg B, Lorente MD, and Gierschik P (2003a) Specificity and structural requirements of phospholipase C-β stimulation by Rho GTPases versus G protein βγ dimers *J Biol Chem* **278**, 3006-3014
- Illenberger D, Walliser C, Strobel J, Gutman O, Niv H, Gaidzik V, Kloog Y, Gierschik P, and Henis YI (2003b) Rac2 regulation of phospholipase C-β₂ activity and mode of membrane interactions in intact cells *J Biol Chem* **278**, 8645-8652
- Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, and Lefkowitz RJ (1993) Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases *J Biol Chem* **268**, 23735-23738
- Inglese J, Koch WJ, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases *Nature* **359**, 147-150
- Jaffe AB, and Hall A (2005) RhoGTPases: biochemistry and biology *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269
- Jiang H, Kuang Y, Wu Y, Xie W, Simon MI, and Wu D (1997) Roles of phospholipase C β₂ in chemoattractant-elicited responses *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 7971-7975
- Joo EK, Broxmeyer HE, Kwon HJ, Kang HB, Kim JS, Lim JS, Choe YK, Choe IS, Myung PK, and Lee Y (2004) Enhancement of cell survival by stromal cell-derived factor-1/CXCL12 involves activation of CREB and induction of Mcl-1 and c-Fos in factor-dependent human cell line MO7e *Stem Cells Dev* **13**, 563-570
- Josefsson LG (1999) Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors *Gene* **239**, 333-340
- Joseph RE, and Norris FA (2005) Substrate specificity and recognition is conferred by the pleckstrin homology domain of the Dbl family guanine nucleotide exchange factor P-Rex2 *J Biol Chem* **280**, 27508-27512
- Kalatskaya I, Schüssler S, Blaukat A, Müller-Esterl W, Jochum M, Proud D, and Faussner A (2004) Mutation of tyrosine in the conserved NPXXY sequence leads to constitutive phosphorylation and internalization, but not signaling, of the human B2 bradykinin receptor *J Biol Chem* **279**, 31268-31276

- Kavelaars A, Vroon A, Raatgever RP, Fong AM, Premont RT, Patel DD, Lefkowitz RJ, and Heijnen CJ (2003) Increased acute inflammation, leukotriene B₄-induced chemotaxis, and signaling in mice deficient for G protein-coupled receptor kinase 6 *J Immunol* **171**, 6128-6134
- Kim SH, Gunst KV, and Sarvetnick N (2006) STAT4/6-dependent differential regulation of chemokine receptors *Clin Immunol* **118**, 250-257
- Kim YJ, Sekiya F, Poulin B, Bae YS, Rhee SG (2004) Mechanism of B-cell receptor-induced phosphorylation and activation of phospholipase C- γ 2 *Mol Cell Biol* **24**, 9968-9999
- Klabunde T, and Hessler G (2002) Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors *Chembiochem* **3**, 928-944
- Kledal TN, Rosenkilde MM, and Schwartz TW (1998) Selective recognition of the membrane-bound CX₃C chemokine, fractalkine, by the human cytomegalovirus-encoded broad-spectrum receptor US28 *FEBS Lett* **441**, 209-214
- Kohout TA, and Lefkowitz RJ (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization *Mol Pharmacol* **63**, 9-18
- Kolakowski LF Jr (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database *Receptors Channels* **2**, 1-7
- Kukreja P, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Liu K, and Agrawal KC (2005) Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1 α (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF- κ B activation *Cancer Res* **65**, 9891-9898
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**, 680-685
- Landolfo S, Gariglio M, Griboaldo G, and Lembo D (2003) The human cytomegalovirus *Pharmacol Ther* **98**, 269-297
- Le Y, Zhou Y, Iribarren P, and Wang J (2004) Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease *Cell Mol Immunol* **1**, 95-104
- Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, and Simon MI (1992) Members of the G α subunit gene family activate phospholipase C β isozymes *J Biol Chem* **267**, 16044-16047
- Lee CH, Shin IC, Kang JS, Koh HC, Ha JH, and Min CK (1998) Differential coupling of G α_q family of G-protein to muscarinic M1 receptor and neurokinin-2 receptor *Arch Pharm Res* **21**, 423-428
- Lefkowitz RJ, and Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by β -arrestins *Science* **308**, 512-517
- Lin K, Wang D, and Sadée W (2002) Serum response factor activation by muscarinic receptors via RhoA. Novel pathway specific to M1 subtype involving calmodulin, calcineurin, and Pyk2 *J Biol Chem* **277**, 40789-40798

Lindow M, Lüttichau HR, and Schwartz TW (2003) Viral leads for chemokine-modulatory drugs *Trends Pharmacol Sci* **24**, 126-130

Litosch I (2002) Novel mechanisms for feedback regulation of phospholipase C- β activity *IUBMB Life* **54**, 253-260

Liu B, and Wu D (2004) Analysis of G protein-mediated activation of phospholipase C in cultered cells *Methods Mol Biol* **237**, 99-102

Lodowski DT, Barnhill JF, Pitcher JA, Capel WD, Lefkowitz RJ, and Tesmer JJ (2003) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and G $\beta_1\gamma_2$ *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59(Pt 5)**, 936-939

Loudon RP, and Benovic JL (1994) Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK6 *J Biol Chem* **269**, 22691-22697

Loudon RP, and Benovic JL (1997) Altered activity of palmitoylation-deficient and isoprenylated forms of the G protein-coupled receptor kinase GRK6 *J Biol Chem* **272**, 27422-27427

Lundstrom K (2005) Structural genomics of GPCRs *Trends Biotechnol* **23**, 103-108

Lutz S, Freichel-Blomquist A, Rügenapp U, Schmidt M, Jakobs KH, and Wieland T (2004) p63RhoGEF and GEFT are Rho-specific guanine nucleotide exchange factors encoded by the same gene *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**, 540-546

Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rügenapp U, Jakobs KH, Schmidt M, and Wieland T (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between G $_{q/11}$ -coupled receptor signaling and RhoA *J Biol Chem* **280**, 11134-11139

Maksay G (2005) Activation of ionotropic receptors and thermodynamics of binding *Neurochem Int* **46**, 281-291

Mao J, Yuan H, Xie W, Simon MI, and Wu D (1998) Specific involvement of G proteins in regulation of serum response factor-mediated gene transcription by different receptors *J Biol Chem* **273**, 27118-27123

Marinissen MJ, and Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms *Trends Pharmacol Sci* 2001 **22**, 368-376

McLean KA, Holst PJ, Martini L, Schwartz TW, and Rosenkilde MM (2004) Similar activation of signal transduction pathways by the herpesvirus-encoded chemokine receptors US28 and ORF74 *Virology* **325**, 241-251

Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Manes S, and Martinez-A C (2001) Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation *Annu Rev Immunol* **19**, 397-421

- Melnychuk RM, Streblow DN, Smith PP, Hirsch AJ, Pancheva D, and Nelson JA (2004) Human cytomegalovirus-encoded G protein-coupled receptor US28 mediates smooth muscle cell migration through $G\alpha_{12}$ *J Virol* **78**, 8382-8391
- Miller WE, Houtz DA, Nelson CD, Kolattukudy PE, and Lefkowitz RJ (2003) G-protein-coupled receptor (GPCR) kinase phosphorylation and β -arrestin recruitment regulate the constitutive signaling activity of the human cytomegalovirus US28 GPCR *J Biol Chem* **278**, 21663-21671
- Milligan G, and Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history *Br J Pharmacol* **147**, S46-S55
- Minisini R, Tulone C, Lüske A, Michel D, Mertens T, Gierschik P, and Moepps B (2003) Constitutive inositol phosphate formation in cytomegalovirus-infected human fibroblasts is due to expression of the chemokine receptor homologue pUS28 *J Virol* **77**, 4489-4501
- Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, and Treisman R (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL *Cell* **113**, 329-342
- Mirzadegan T, Benko G, Filipek S, and Palczewski K (2003) Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin *Biochemistry* **42**, 2759-2767
- Moepps B, and Gierschik P (2005) Virally encoded constitutively active chemokine receptors (p. 243-264) in *G protein-coupled receptor as drug targets Vol 24* (2005) edited by Seifert R and Wieland T; Wiley-VCH Verlag GmbH & CoKGoA
- Moepps B, Vatter P, Frodl R, Waechter F, Dixkens C, Hameister H, and Gierschik P (1999) Alternative splicing produces transcripts encoding four variants of mouse G-protein-coupled receptor kinase 6 *Genomics* **60**, 199-209
- Mousavi SA, Malerod L, Berg T, and Kjeken R (2004) Clathrin-dependent endocytosis *Biochem J* **377**, 1-16
- Mullis KB, and Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction *Methods Enzymol* **155**, 335-350
- Murphy PM, and Tiffany HL (1991) Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor *Science* **253**, 1280-1283
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, and Power CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors *Pharmacol Rev* **52**, 145-176
- Murthy KS, Coy DH, and Makhoulf GM (1996) Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C- β_3 by $G_{\beta\gamma}$ and inhibition of adenylyl cyclase by $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_o$ *J Biol Chem* **271**, 23458-23463
- Nelson T, and Brutlag D (1979) Addition of homopolymers to the 3'-ends of duplex DNA with terminal transferase *Methods Enzymol* **68**, 41-50

- Neubig RR, and Siderovski DP (2002) Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets *Nat Rev Drug Discov* **1**, 187-197
- Noble B, Kallal LA, Pausch MH, and Benovic JL (2003) Development of a yeast bioassay to characterize G protein-coupled receptor kinases. Identification of an NH₂-terminal region essential for receptor phosphorylation *J Biol Chem* **278**, 47466-47476
- Nordheim A (2004) SRF, ein multi-talentierte Transkriptionsfaktor GfG-Nachrichten *BIOspektrum* **5**, 666-667
- Offermanns S (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling *Prog Biophys Mol Biol* **83**, 101-130
- Offermanns S, and Simon MI (1995) G α_{15} and G α_{16} couple a wide variety of receptors to phospholipase C *J Biol Chem* **270**, 15175-15180
- Ogilvie P, Thelen S, Moepps B, Gierschik P, da Silva Campos AC, Baggiolini M, and Thelen M (2004) Unusual chemokine receptor antagonism involving a mitogen-activated protein kinase pathway *J Immunol* **172**, 6715-6722
- Ohtaki T, Ogi K, Masuda Y, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Kitada C, Sawada H, Onda H, and Fujino M (1998) Expression, purification, and reconstitution of receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. large-scale purification of a functionally active G protein-coupled receptor produced in Sf9 insect cells *J Biol Chem* **273**, 15464-15473
- Olson MF, Pasteris NG, Gorski JL, and Hall A (1996) Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav two related proteins required for normal embryonic development are upstream regulators of Rho GTPases *Curr Biol* **6**, 1628-1633
- Olson TS, and Ley K (2002) Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, R7-28
- Onorato JJ, Gillis ME, Liu Y, Benovic JL, and Ruoho AE (1995) The β -adrenergic receptor kinase (GRK2) is regulated by phospholipids *J Biol Chem* **270**, 21346-21353
- Palczewski K, Buczylo J, Lebioda L, Crabb JW, Polans AS (1993) Identification of the N-terminal region in rhodopsin kinase involved in its interaction with rhodopsin *J Biol Chem* **268**, 6004-6013
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor *Science* **289**, 739-745
- Parrish JC, Braden MR, Gundy E, and Nichols DE (2005) Differential phospholipase C activation by phenylalkylamine serotonin 5-HT 2A receptor agonists *J Neurochem* **95**, 1575-1584
- Parsons JT, and Parsons SJ (1997) Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways *Curr Opin Cell Biol* **9**, 187-192

Parsons SJ, and Parsons TJ (2004) Src family kinases, key regulators of signal transduction *Oncogene* **23**,7906-7909

Pass RF (2001) *Fields Virology* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa

Passarge FF (2006) Herstellung von TPD52-Mutanten mit induzierbarer transientser und permanenter Membranverankerung und Analyse der Interaktion dieser Mutanten mit CCR2-Rezeptoren. Diplomarbeit, Medizinische Fakultät, Universität Ulm

Paulssen RH, Woodson J, Liu Z, and Ross EM (1996) Carboxyl-terminal fragments of phospholipase C- β_1 with intrinsic G_q GTPase-activating protein (GAP) activity *J Biol Chem* **271**, 26622-26629

Pawson T (2002) Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* **38**, S3-10

Petito CK, Roberts B, Cantando JD, Rabinstein A, and Duncan R (2001) Hippocampal injury and alterations in neuronal chemokine co-receptor expression in patients with AIDS *Neuropathol Exp Neurol* **60**, 377-385

Pierce KL, Premont RT, and Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639-650

Pistoia V, Corcione A, Dallegri F, and Ottonello L (2006) Lymphoproliferative disorders and chemokines *Curr Drug Targets* **7**, 81-90

Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ, and Lefkowitz RJ (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP_2 binding site distinguishes the GRK subfamilies *J Biol Chem* **271**, 24907-24913

Pitcher JA, Freedman NJ, and Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases *Annu Rev Biochem* **67**, 653-692

Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, and Lefkowitz RJ (1995) Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the β -adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with $G_{\beta\gamma}$ subunits and lipid *J Biol Chem* **270**, 11707-11710

Posern G, and Treisman R (2006) Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction *Trends Cell Biol* **16**, 588-596

Premont RT (2005) Once and future signaling: G protein-coupled receptor kinase control of neuronal sensitivity *Neuromolecular Med* **7**, 129-147

Premont RT, Inglese J, and Lefkowitz RJ (1995) Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors *FASEB J* **9**, 175-182

Premont RT, Macrae AD, Aparicio SA, Kendall HE, Welch JE, and Lefkowitz RJ (1999) The GRK4 subfamily of G protein-coupled receptor kinases. Alternative splicing, gene organization, and sequence conservation *J Biol Chem* **274**, 29381-29389

- Premont RT, Macrae AD, Stoffel RH, Chung N, Pitcher JA, Ambrose C, Inglese J, MacDonald ME, and Lefkowitz RJ (1996) Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants *J Biol Chem* **271**, 6403-6410
- Pronin AN, Carman CV, and Benovic JL (1998) Structure-function analysis of G protein-coupled receptor kinase 5. Role of the carboxyl terminus in kinase regulation *J Biol Chem* **273**, 31510-31518
- Pronin AN, Morris AJ, Surguchov A, and Benovic JL (2000) Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases *J Biol Chem* **275**, 26515-26522
- Puls A, Eliopoulos AG, Nobes CD, Bridges T, Young LS, and Hall A (1999) Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF α and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 *J Cell Sci* **112** (Pt 17), 2983-2992
- Rebecchi MJ, and Pentylala SN (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C *Physiol Rev* **80**, 1291-1335
- Rens-Domiano S, and Hamm HE (1995) Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins *FASEB J* **9**, 1059-66
- Revello MG, and Gerna G (2002) Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant *Clin Microbiol Rev* **15**, 680-715
- Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C *Annu Rev Biochem* **70**, 281-312
- Rhee SG, and Bae YS (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes *J Biol Chem* **272**, 15045-15048
- Ridley AJ (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses *Trends Cell Biol* **11**, 471-477
- Rinken A, Kameyama K, Haga T, and Engstrom L (1994) Solubilization of muscarinic receptor subtypes from baculovirus infected Sf9 insect cells *Biochem Pharmacol* **48**, 1245-1251
- Rodems SM, and Spector DH (1998) Extracellular signal-regulated kinase activity is sustained early during human cytomegalovirus infection *J Virol* **72**, 9173-9180
- Ross SA, Fowler KB, Ashrith G, Stagno S, Britt WJ, Pass RF, and Boppana SB (2006) Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity *J Pediatr* **148**, 332-336
- Rossmann KL, and Sondek J (2005) Larger than Dbl: new structural insights into RhoA activation *Trends Biochem Sci* **30**, 163-165
- Sagi SA, Seasholtz TM, Kobiashvili M, Wilson BA, Tokosz D, and Brown JH (2001) Physical and functional interactions of G α_q with Rho and its exchange factors *J Biol Chem* **276**, 15445-15452

- Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, and Brown JH (2000) The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 459-489
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, and Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science* **239**, 487-491
- Sakmar TP, Menon ST, Martin EP, Awad ES (2002) Rhodopsin: insights from recent structural studies *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**, 443-484
- Sánchez-Más J, Guillo LA, Zanna P, Jiménez-Cervantes C, and García-Borrón JC (2005) Role of G protein-coupled receptor kinases in the homologous desensitization of the human and mouse melanocortin 1 receptors *Mol Endocrinol* **19**, 1035-1048
- Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, and Lai FA (2002) PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development *Development* **129**, 3533-3544
- Schmidt A, and Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch *Genes Dev* **16**, 1587-1609
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, and Lefkowitz RJ (2006) β -arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the β_2 adrenergic receptor *J Biol Chem* **281**, 1261-1273
- Shepard LW, Yang M, Xie P, Browning DD, Voyno-Yasenetskaya T, Kozasa T, and Ye RD (2001) Constitutive activation of NF- κ B and secretion of interleukin-8 induced by the G protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus involve G α_{13} and RhoA *J Biol Chem* **276**, 45979-45987
- Siderovski DP, and Willard FS (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein α subunits *Int J Biol Sci* **1**, 51-66
- Simpson RJ (2004) A laboratory manual: Purifying proteins for proteomics *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York
- Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw ASH, The TH, and Jahn G (1995) Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues *J Gen Virol* **76**, 741-750
- Smrcka AV, and Sternweis PC (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C β by G protein α and $\beta\gamma$ subunits *J Biol Chem* **268**, 9667-9674

- Souchet M, Portales-Casamar E, Mazurais D, Schmidt S, Léger I, Javré JL, Robert P, Berrebi-Bertrand I, Bril A, Gout B, Debant A, and Calmels TP (2002) Human p63RhoGEF, a novel RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor, is localized in cardiac sarcomere *J Cell Sci* **115**(Pt 3), 629-640
- Sprang SR (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis *Annu Rev Biochem* **66**,639-678
- Stenkamp RE, Teller DC, and Palczewski K (2002) Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor *ChemBiochem* **3**, 963-967
- Sterne-Marr R, Tesmer JJ, Day PW, Stracquatano RP, Cilente JA, O'Connor KE, Pronin AN, Benovic JL, and Wedegaertner PB (2003) G protein-coupled receptor Kinase 2/G $\alpha_{q/11}$ interaction. A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding G α subunits *J Biol Chem* **278**, 6050-6058
- Stoffel RH, Inglese J, Macrae AD, Lefkowitz RJ, and Premont RT (1998) Palmitoylation increases the kinase activity of the G protein-coupled receptor kinase, GRK6 *Biochemistry* **37**, 16053-16059
- Streblov DN, Orloff SL, and Nelson JA (2001) Do pathogens accelerate atherosclerosis? *J Nutr* **131**, 2798S-2804S
- Takai Y, Sasaki T, and Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins *Physiol Rev* **81**, 153-208
- Thiyagarajan MM, Stracquatano RP, Pronin AN, Evanko DS, Benovic JL, and Wedegaertner PB (2004) A predicted amphipathic helix mediates plasma membrane localization of GRK5 *J Biol Chem* **279**, 17989-17995
- Tulone C (2004) Characterization of signaling pathways activated by the HCMV encoded GPCR homolog pUS28. Thesis to obtain the degree of a doctor on human biology, faculty of medicine, university of Ulm
- Uings IJ, and Farrow SN (2000) Cell receptors and cell signalling *Mol Pathol* **53**, 295-299
- van Leeuwen FN, Giepmans BN, van Meeteren LA, and Moolenaar WH (2003) Lysophosphatidic acid: mitogen and motility factor *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 6), 1209-1212
- Vatter P (2000) Funktionelle Charakterisierung von vier Varianten der murinen Kinase G-Protein-gekoppelter Rezeptoren GRK6. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie, Medizinische Fakultät, Universität Ulm
- Vatter P, Stoesser C, Samel I, Gierschik P and Moepps B (2005) The variable C-terminal extension of G-protein-coupled receptor kinase 6 constitutes an accessorial autoregulatory domain *FEBS J* **272**, 6039-6051
- Vogt S, Grosse R, Schultz G, and Offermanns S (2003) Receptor-dependent RhoA activation in G $_{12}$ /G $_{13}$ -deficient cells: genetic evidence for an involvement of G $_q$ /G $_{11}$ *J Biol Chem* **278**, 28743-28749

Voth DE, and Ballard JD (2005) Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease *Clin Microbiol Rev* **18**, 247-263

Waldhoer M, Casarosa P, Rosenkilde MM, Smit MJ, Leurs R, Whistler JL, and Schwartz TW (2003) The carboxyl terminus of human cytomegalovirus-encoded 7 transmembrane receptor US28 camouflages agonism by mediating constitutive endocytosis *J Biol Chem* **278**, 19473-19482

Wang T, Pentylala S, Elliott JT, Dowal L, Gupta E, Rebecchi MJ, and Scarlata S (1999a) Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C- β_1 and - β_2 with activated $G\alpha_q$ subunits: an alternative function for C2-signaling modules *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7843-7846.

Wang T, Pentylala S, Rebecchi MJ, and Scarlata S (1999b) Differential association of the pleckstrin homology domains of phospholipases C- β_1 , C- β_2 , and C- δ_1 with lipid bilayers and the $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins *Biochemistry* **38**, 1517-24

Wen R, Chen Y, Schuman J, Fu G, Yang S, Zhang W, Newman DK, and Wang D (2004) An important role of phospholipase C γ_1 in pre-B-cell development and allelic exclusion *EMBO J* **23**, 4007-4017

Willets JM, Mistry R, Nahorski SR, and Challiss RA (2003) Specificity of g protein-coupled receptor kinase 6-mediated phosphorylation and regulation of single-cell m3 muscarinic acetylcholine receptor signaling *Mol Pharmacol* **64**, 1059-1068

Wong SK (2003) G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs *Neurosignals* **12**, 1-12

Wu D, Katz A, Lee CH, and Simon MI (1992) Activation of phospholipase C by α_1 -adrenergic receptors is mediated by the α subunits of Gq family *J Biol Chem* **267**, 25798-25802

Xie J, Pan H, Yoo S, and Gao SJ (2005) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induction of AP-1 and interleukin 6 during primary infection mediated by multiple mitogen-activated protein kinase pathways *J Virol* **79**, 15027-15037

Zheng Y, Fischer DJ, Santos MF, Tigyi G, Pasteris NG, Gorski JL, and Xu Y (1996) The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor *J Biol Chem* **271**, 33169-33172

Zhong H, and Neubig RR (2001) Regulator of G protein signaling proteins: novel multifunctional drug targets *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 837-845

Zhu X, and Birnbaumer L (1996) G protein subunits and the stimulation of phospholipase C by G_s - and G_i -coupled receptors: Lack of receptor selectivity of $G\alpha_{16}$ and evidence for a synergic interaction between $G\beta\gamma$ and the α subunit of a receptor activated G protein *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2827-2831

Zlotnik A (2006) Chemokines and cancer *Int J Cancer* **119**, 2026-2029

8. Publikationen

Originalarbeiten

Reinscheid DJ, **Stoesser C**, Ehlert K, Jack RW, Moeller K, Eikmanns BJ and Chhatwal GS (2002) Influence of proteins Bsp and FemH on cell shape and peptidoglycan composition in group B streptococcus *Microbiology* **148**(Pt 10), 3245-3254

Stoesser C/Vatter P, Samel I, Gierschik P, and Moepps B (2005) The variable C-terminal extension of G-protein-coupled receptor kinase 6 constitutes an accessorial autoregulatory domain *FEBS J* **272**, 6039-6051

Moepps B, Tulone C, **Stoesser C**, Minisini R, Wieland T, and Gierschik P (2006) Identification and characterization of intracellular signaling pathways activated by the human cytomegalovirus-encoded constitutively active chemokine receptor homolog pUS28. Specificity in G protein coupling and effector activation. Running title: PLC β -independent activation of Rho GTPases. Publikation in Vorbereitung.

Abstracts

Moepps B, Vatter P, Zöllner S, **Stoesser C**, Samel I, Klement C, and Gierschik P (2001) Membrane localization and potential substrates of murine G protein-coupled receptor kinase 6-C *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **363**(Suppl.) #252

Samel I, Vatter P, Klement C, **Stoesser C**, Gierschik P, and Moepps B (2003) The variable carboxyl-terminal extension of G protein-coupled receptor kinase 6 constitutes an accessorial autoregulatory domain: structure-function-analysis using GRK6-A mutants *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **367**(Suppl.) #228

Ruennenburger K, Braun M, **Stoesser C**, Gierschik P, and Moepps B (2004) Identification of proteins interacting with the carboxyl terminus of the CC-chemokine receptor CCR2b XXIXth European Symposium on Hormones and Cell Regulation, Functional Genomics of Signal Transduction, Mont Sainte-Odile, Alsace, France

Stoesser C, Vatter P, Michels G, Gierschik P, and Moepps B (2006) Interaction of G protein-coupled receptor kinase 6-C with the plasma membrane: identification of residues mediating lipid binding *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **369**(Suppl.) #84

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. P. Gierschik für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, die wissenschaftliche Betreuung, das Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seinem Verständnis für berufliche und persönliche Angelegenheiten.

Herrn Prof. Dr. D. Fischer für seine Bereitschaft zur Übernahme des Korreferates.

Frau PD Dr. Barbara Möpps für ihre Unterstützung und Betreuung, ihrem Engagement, vor allem aber für ihr Vertrauen.

den Kollegen vom Team „4202“, Gudrun, Elke, Karin, Ines, Ingrid, Claudia und allen „Ehemaligen“ für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre Unterstützung und so manch angeregter Diskussion.

Frau S. Gierschik für die DNA-Sequenzierungen.

allen Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfe und ihre Kollegialität, im Besonderen Frau Dr. Petra Vatter und Frau PD Dr. Klaudia Giehl.

den Mitarbeitern der Abteilung Isotopenanwendung.

C. Walliser für ihre stetige Hilfsbereitschaft, ihre zahlreichen Tipps und Ratschläge.

Zum Schluß möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meinen Eltern und meinem Mann für alles bedanken, insbesondere für ihre Unterstützung und den Rückhalt in manch schwierigen Situationen.