

Universität Ulm
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Prof. Dr. Peter Gierschik

**Funktionelle Bedeutung
des carboxylterminalen Abschnittes
der Kinase G-Protein-gekoppelter Rezeptoren
vom Typ GRK6-B**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Carolin Mathieu
geboren in Kaiserslautern

2008

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	PD Dr. Barbara Möpps
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaudia Giehl
Tag der Promotion:	20. Februar 2009

Für meine Eltern

Wichtig ist, dass
man nicht aufhört
zu fragen.

A. Einstein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Einführung.....	1
1.2	Signaltransduktion über Transmembran-Rezeptoren.....	1
1.3	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	4
1.4	Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	8
1.5	Kinasen G-Protein gekoppelter Rezeptoren.....	10
1.6	Ziele der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material.....	18
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	24
2.2.1.1	Herstellung von Luria-Bertani (LB)-Medium.....	24
2.2.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien.....	24
2.2.1.3	Transformation kompetenter Bakterien.....	25
2.2.1.4	Selektion von transformierten Bakterien.....	26
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	26
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	27
2.2.2.3	Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von DNA.....	27
2.2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.2.2.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	28
2.2.2.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	29
2.2.2.7	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	29
2.2.2.8	Auffüllreaktion.....	30
2.2.2.9	Ligation.....	30
2.2.2.10	Polymerasekettenreaktion.....	31
2.2.3	<i>Spodoptera frugiperda</i> -Insektenzellkultur.....	34
2.2.3.1	Medien.....	34
2.2.3.2	Kultivierung von <i>Sf9</i> -Insektenzellen.....	34
2.2.4	Proteinexpression in Insektenzellen.....	35
2.2.4.1	Transfektion von Insektenzellen.....	35
2.2.4.2	Amplifikation der Baculoviren.....	36
2.2.4.3	Infektion von Insektenzellen.....	36
2.2.4.4	Proteinpräparation aus <i>Sf9</i> -Insektenzellen.....	37
2.2.5	Proteinbiochemie.....	37
2.2.5.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	37
2.2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
2.2.5.3	Coomassie Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen.....	40
2.2.5.4	Immunoblotting von Proteinen (<i>Western blot</i>).....	41
2.2.6	Chromatographische Methoden.....	42
2.2.6.1	Kationenaustausch-Chromatographie.....	42
2.2.6.2	Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose.....	43
2.2.6.3	Gelfiltration.....	43
2.2.7	<i>In vitro</i> -Bestimmung der Kinaseaktivität von GRKs.....	44
2.2.7.1	Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Phosvitin als Substrat.....	44

2.2.7.2	Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Casein als Substrat.....	45
2.2.7.3	Lichtabhängige Phosphorylierung von Rhodopsin durch GRKs.....	45
2.2.8	Untersuchung von GRK-Lipid-Wechselwirkungen.....	48
2.2.8.1	Herstellung von Lipidvesikeln.....	48
2.2.8.2	Bindungsexperimente an Lipidvesikel.....	48
3	Ergebnisse	50
3.1	Varianten und Mutanten der murinen GRK6.....	50
3.2	Chromatographische Reinigung der wildtypischen mGRK6-B-Variante und der mGRK6-B-Mutanten Mut1, Mut2 und Mut3.....	55
3.3	Interaktion der chromatographisch gereinigten mGRK6-B-Proteine mit Phospholipiden.....	66
3.4	Funktionelle Analyse der chromatographisch gereinigten mGRK6-B- Proteine.....	68
3.5	Herstellung und Expression weiterer carboxylterminal veränderter Mutanten der mGRK6-B.....	77
3.6	Funktionelle Analyse der mGRK6-B-Mutanten Mut4, Mut5 und Mut6.....	81
3.7	Herstellung und Expression der mGRK6-B-Mutanten Mut7 und Mut8.....	83
3.8	Funktionelle Analyse der mGRK6-B-Mutanten Mut7 und Mut8.....	86
4	Diskussion	91
5	Zusammenfassung	104
6	Literaturverzeichnis	106
7	Danksagung	116
8	Lebenslauf	117

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AGS	<i>activators of G protein signaling</i>
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
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 magnesiumfreie phosphatgepufferte Salzlösung
d	Tage
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	50 % <i>effective concentration</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum (fötales Kälberserum)</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
G	Guanin
GABA	Gammaaminobuttersäure
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GIT	<i>G protein-coupled receptor kinase interactor</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
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
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMW	<i>high molecular weight</i>
hnRNA	<i>heterogeneous nuclear RNA</i>
IL	Interleukin
IP ₃	D- <i>myo</i> -Inosit-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
JAK	Janus Kinase
K	Kalium
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

konz.	konzentriert
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Mol pro Liter
m/V	Masse pro Volumen
mA	Milliampere
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	<i>messenger RNA</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Na	Natrium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI-3	Phosphatidylinosit-3
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtdCho	L-α-Phosphatidylcholin
PtdInsP ₂	Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat
RGS	<i>regulators of G protein signaling</i>
RH	<i>regulators of G protein signaling homology</i>
RE	Restriktionsendonuklease
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	<i>rod outer segment</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
SDF	<i>stromal cell-derived factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sf9</i> -Zellen	Ovarialzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>
SH-2-Domäne	Src-Homologie-2-Domäne
SOS	<i>son of sevenless</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	<i>tumor necrosis factor</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

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Die Fähigkeit äußere Reize aufzunehmen und adäquat auf diese zu reagieren, ist ein wesentliches Merkmal von Zellen lebender Organismen. Die Mechanismen der Signalübertragung nehmen hierbei eine Schlüsselposition im Verständnis komplexer zellulärer Funktionen ein. In diesem Zusammenhang wurde 1980 der Begriff *signal transduction* durch eine Publikation von Rodbell etabliert (Rodbell, 1980). Im Jahr 2000 verwendeten bereits 12 % aller wissenschaftlichen Publikationen, in denen das Stichwort *cell* enthalten war, auch den Begriff *signal transduction*. Von den verschiedenen extrazellulären Stimuli wie optischen, akustischen und olfaktorischen Reizen sowie Hormonen, Neurotransmittern oder Wachstumsfaktoren sind nur wenige in der Lage, die Zellmembranbarriere direkt zu durchdringen. Ein Beispiel hierfür sind Steroidhormone, die aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaft an intrazelluläre Rezeptorproteine binden können. Dagegen erfolgt die Bindung von hydrophilen Botenstoffen wie Peptidhormonen an membranständige Rezeptoren. Durch die Entwicklung der Oberflächenrezeptoren, die ihre Signale ins Zellinnere übertragen, wurde es möglich, die Aktivitäten einer Zelle auf verschiedenste Arten und mit hoher Spezifität und präziser Kontrolle in Bezug auf das Ausmaß und die Dauer der Reaktion zu beeinflussen.

1.2 Signaltransduktion über Transmembran-Rezeptoren

Die Weiterleitung extrazellulärer Signale in das Zellinnere kann über eine Vielzahl von Transmembran-Rezeptoren erfolgen. Aufgrund ihrer Wirkmechanismen und struktureller Merkmale lassen sich Transmembran-Rezeptoren in fünf Klassen einteilen. Dabei unterscheidet man Zytokinrezeptoren, Integrine, Rezeptor-Tyrosinkinasen, Ionenkanäle und G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren. Die Zytokine umfassen eine Gruppe kleiner Proteine mit einer molekularen Masse zwischen 8 und 40 kDa, die an zellulären Prozessen wie Apoptose, Zelldifferenzierung und -proliferation beteiligt sind (Uings *et al.*, 2000). Da die Zytokine mit ihren zugehörigen Zytokinrezeptoren eine wesentliche Rolle bei verschiedenen Erkrankungen, z. B. der rheumatoiden Arthritis, spielen, sind sie als

Angriffspunkt neuer Therapien in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses gerückt (Smeets *et al.*, 2003; Wijbrandts *et al.*, 2007). Die Rezeptoren für Zytokine werden in mehrere Gruppen unterteilt. Die Gruppe der Hämatopoetin-Rezeptoren (oder Klasse 1-Rezeptoren) werden von Liganden wie etwa Interleukin (IL)-2 und *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) aktiviert (Uings *et al.*, 2000). Die Zytokinrezeptoren dieser Gruppe sind aus jeweils einer einzelnen transmembranären sowie einer intrazellulären Domäne aufgebaut. Damit weisen sie strukturelle Ähnlichkeiten mit den Interferon-Rezeptoren (oder Klasse 2-Rezeptoren) auf. Letztere sind dadurch charakterisiert, dass Paare von Cysteinen in der extrazellulären Domäne angeordnet sind. In der extrazellulären Domäne der Gruppe des TNF (*tumor necrosis factor*)-Rezeptors und ähnlicher Zytokinrezeptoren befinden sich ebenfalls mehrere benachbarte Cysteinreste (Uings *et al.*, 2000). Ein Beispiel für eine weitere Klasse von Zytokinrezeptoren ist der IL-1-Rezeptor, dessen extrazelluläre Domäne drei immunglobulinähnliche Regionen enthält (Uings *et al.*, 2000). Bei den Integrinen handelt es sich um Transmembranproteine, die sowohl die Interaktion von Zellen untereinander als auch die Interaktion von Zellen mit dem Extrazellularraum vermitteln (Hynes, 2002). Integrine sind Heterodimere, die aus zwei Glykoprotein-Ketten, einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Aus den bisher bekannten 19 α - und 8 β -Untereinheiten entstehen beim Menschen 24 verschiedene Integrine (Hynes, 2002). Der extrazelluläre Anteil der Integrine ist in der Lage, mit Matrixproteinen wie z. B. Fibronectin, Kollagen und Laminin zu interagieren (Evans *et al.*, 2007). Zu den Liganden, die an die Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) binden, gehören u. a. die Wachstumsfaktoren EGF (*epidermal growth factor*) und PDGF (*platelet-derived growth factor*) sowie Insulin. Die Tyrosinkinase-Rezeptoren sind aus einer intrazellulären katalytischen Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität sowie einer einzelnen, die Membran durchspannenden Domäne aufgebaut. Der extrazelluläre, ligandenbindende Anteil der RTKs kann dagegen variieren (Gomperts (b) *et al.*, 2003). Wenn Wachstumsfaktoren an RTKs binden, kann es einer Dimerisierung der monomeren Rezeptoren und in der Folge zu einer Autophosphorylierung der intrazellulären Abschnitte kommen (Uings *et al.*, 2000). Der so phosphorylierte Rezeptorkomplex kann an verschiedene Proteine mit Src-Homologie (SH)-2-Domäne binden, deren Rekrutierung zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege führt. Die Proteine mit SH2-Domäne besitzen entweder selbst enzymatische Aktivität wie z. B. Phospholipase C- γ (PLC- γ) und Phosphatidylinosit-3-Kinasen (PI-3-Kinasen) oder fungieren als Interaktionspartner wie z. B. Grb2 und *son of sevenless* (SOS), deren

Bindung eine Aktivierung von Ras/Raf-Kinasen nach sich ziehen (Gomperts (c) *et al.*, 2003). Abweichend von dem beschriebenen Mechanismus liegt der Insulin-Rezeptor bereits als Dimer vor, hier kommt es durch die Bindung des Liganden zu einer Konformationsänderung, die ebenfalls zur Aktivierung von PLC- γ und PI-3-Kinasen führt (Gomperts (b) *et al.*, 2003). Zur Gruppe der Tyrosinkinasen zählen neben den Rezeptor-Tyrosinkinasen auch die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen. Diese liegen, teils membranassoziiert, teils als lösliche Proteine im Zytoplasma vor und koppeln an ligandenaktivierte membranständige Rezeptoren, z. B. an Zytokinrezeptoren oder an Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Zu der Gruppe der zytoplasmatischen Tyrosinkinasen zählen u. a. Mitglieder der Src-Familie, wie Janus Kinase (JAK) oder *focal adhesion kinase* (FAK). Die Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinasen kann ebenfalls zu einer Aktivierung von Proteinkinasen wie PLC- γ und PI-3-Kinasen führen oder über STAT-Proteine (*signal transducers and activators of transcription*) Einfluss auf die Expression von Genen nehmen (Gomperts (c) *et al.*, 2003). Die Ionenkanäle bilden eine weitere Gruppe von Transmembranproteinen. Man unterscheidet spannungsabhängige und ligandengesteuerte Ionenkanäle. Beispiele für ligandengesteuerte Ionenkanäle sind der nikotinische Acetylcholinrezeptor, der GABA_A-Rezeptor und der 5-HT₃-Rezeptor. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor, der als Prototyp dieser Rezeptorklasse angesehen wird, besteht aus fünf Untereinheiten (2 x α -, β -, γ -, δ -Untereinheit). Die Untereinheiten durchspannen jeweils viermal die Zellmembran und sind zylindrisch angeordnet (Gomperts (a) *et al.*, 2003). Die α -Untereinheiten besitzen jeweils eine Bindungsstelle für Acetylcholin. Durch die Bindung des Liganden an die Untereinheiten kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine Kanalpore eröffnet, durch die Ionen ins Zellinnere gelangen können (Uings *et al.*, 2000). Ligandenbesetzte Ionenkanäle können sich in einem offenen, geschlossenen oder inaktivierten Zustand befinden. Im inaktivierten Zustand ist die Kanalpore geschlossen und eine erneute Aktivierung des Rezeptors ist nicht möglich. Die zahlenmäßig größte Gruppe der Transmembran-Rezeptoren stellen die G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR) dar. Im Genom des Menschen wurden *ca.* 865 verschiedene DNA-Sequenzabschnitte nachgewiesen, die für diese, aufgrund ihrer Struktur auch als 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren bezeichneten, Proteine kodieren (Fredriksson *et al.*, 2003; Milligan *et al.*, 2006).

1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

1.3.1 Einteilung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) kommen in zahlreichen Lebewesen vor, darunter in Wirbeltieren und Wirbellosen sowie in Pilzen (z. B. in Hefen) und in Pflanzen (Fredriksson *et al.*, 2005). Es wurden mehrere Versuche unternommen, die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu klassifizieren. Eine systematische Einteilung mit dem Anspruch, alle GPCR zu erfassen, unterteilt die Rezeptoren in die Klassen A bis F (Kolakowski, 1994). Einige dieser Klassen kommen in Wirbeltieren nicht vor, z. B. die Klassen D und E, die u. a. die Pheromonrezeptoren von Hefen enthalten (Kolakowski, 1994). Ein neues System zur Klassifizierung der humanen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, das so genannte GRAFS-System, wurde 2003 von Fredriksson *et al.* vorgeschlagen (Fredriksson *et al.*, 2003). Das Akronym GRAFS steht für 5 Hauptfamilien unter den humanen GPCR: Die Glutamat- (15 Mitglieder), die Rhodopsin- (701 Mitglieder), die Adhäsions- (24 Mitglieder), die *Frizzeld/Taste2*- (24 Mitglieder) und die Sekretin-Familie (15 Mitglieder) (Fredriksson *et al.*, 2003). Rezeptoren, die sich basierend auf den phylogenetischen Untersuchungen nicht eindeutig einer der oben genannten Gruppen zuordnen ließen, wurden unter dem Begriff „andere 7-Transmembran-Rezeptoren“ zusammengefasst.

1.3.2 Struktur der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zeichnen sich durch einen gemeinsamen strukturellen Aufbau aus. So besitzen sie eine extrazellulär gelegene aminoterminal Domäne, sieben transmembranäre Domänen, welche die Plasmamembran in Form von α -Helices durchspannen sowie eine intrazellulär gelegene carboxylterminale Domäne (Ji *et al.*, 1998; Gether, 2000). Sowohl drei intra- als auch drei extrazellulär gelegene Schleifen verbinden die transmembranären Domänen. Während die extrazellulären Anteile des Rezeptors für die Bindung von Liganden von Bedeutung sind, vermitteln die intrazellulären Abschnitte die Interaktion mit G-Proteinen und Nicht-G-Protein-Interaktionspartnern. Eine vierte intrazelluläre Schleife, auch als Helix 8 bezeichnet, entsteht, wenn Cysteinreste im carboxylterminalen Abschnitt posttranslational palmitoyliert werden (Gether, 2000; Palczewski *et al.*, 2000). Diese bildet sich wahrscheinlich in Form einer amphiphilen α -Helix aus und spielt vermutlich ebenfalls bei der Interaktion mit G-Proteinen eine Rolle

(Palczewski *et al.*, 2000; Fritze *et al.*, 2003). Obwohl alle GPCRs die genannten strukturellen Elemente besitzen, können doch große Unterschiede in der Größe der einzelnen Abschnitte und Domänen bestehen. So kann das aminoterminal Segment 7-595 Aminosäuren, der carboxylterminale Abschnitt 12-359 Aminosäuren und können die Schleifen 5-230 Aminosäuren umfassen (Ji *et al.*, 1998). Im Jahr 2000 gelang es mit der Kristallisierung des bovinen Rhodopsins erstmals, die dreidimensionale Struktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptoren darzustellen (Palczewski *et al.*, 2000). Die Untersuchungen bestätigten die postulierte Anordnung des Rezeptors aus sieben transmembranären Domänen. Erst im Oktober 2007 wurde mit der Kristallisierung des humanen β_2 -Adrenozeptors die Struktur eines weiteren G-Protein-gekoppelten Rezeptors ermittelt (Rasmussen *et al.*, 2007).

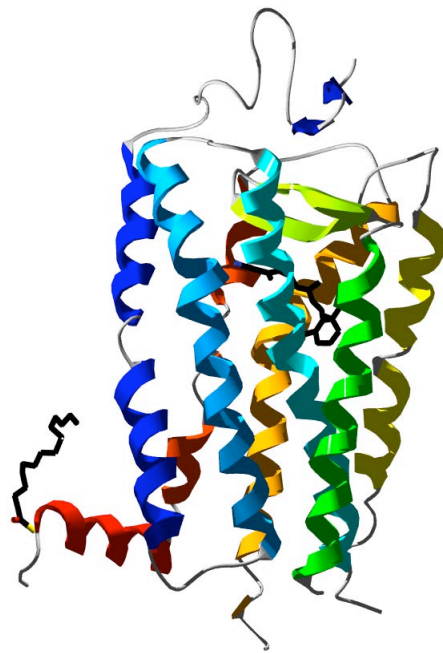


Abb. 1: Dreidimensionale Struktur des G-Protein-gekoppelten Rezeptors Rhodopsin. Das dreidimensionale computergenerierte Modell des bovinen Rhodopsins wurde nach den Röntgenstrukturanalysen des kristallisierten Rezeptors angefertigt (Palczewski *et al.*, 2000). Der aminoterminal Abschnitt des Rezeptors liegt im oberen Teil der Abbildung, der carboxylterminale Abschnitt liegt im unteren Teil der Abbildung. Blau: Transmembran-Domäne (TM)1, Hellblau: TM2, Türkis: TM3, Grün: TM4, Gelb: TM5, Orange: TM6, Hellrot: TM7, Dunkelrot: Helix 8. Erläuterungen zum strukturellen Aufbau siehe auch im Text (Abbildung von S. Jähnichen, Wikimedia Commons, 2007).

1.3.3 Signalübertragung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können durch Bindung ihrer Liganden aktiviert werden. Dabei kann die Lage der Ligandenbindungsstelle in den verschiedenen Rezeptoren variieren. So lagern sich z. B. biogene Amine und Eikosanoide direkt an eine von den transmembranären Domänen gebildete Bindungsstelle (*core*) an. Dagegen interagieren Peptide (≤ 40 Aminosäuren) sowohl mit dem *core* als auch mit den extrazellulären Schleifen der GPCRs. Polypeptide (≤ 90 Aminosäuren) interagieren darüber hinaus zusätzlich mit dem aminoterminalen Abschnitt der Rezeptoren. Die Bindungsstelle für Glykoproteine (≥ 30 kDa) befindet sich ebenfalls im aminoterminalen Abschnitt (Ji *et al.*, 1998). Eine Unterscheidung zwischen Bindung von Liganden an den Rezeptor und Aktivierung des Rezeptors ist notwendig, da nicht nur Agonisten, sondern auch Antagonisten an den Rezeptor binden können. Letztere können den Rezeptor jedoch nicht aktivieren. Durch die Bindung eines Agonisten wird der im Gleichgewicht zwischen aktiviertem und inaktiviertem Zustand befindliche GPCR in den vermehrt aktiven Zustand überführt. Dieser Zustand geht mit einer Konformationsänderung des Rezeptors einher, welche eine nachfolgende Rezeptor/G-Protein-Interaktion ermöglicht (Gether, 2000). Neben der dritten intrazellulären Schleife spielt die intrazellulär gelegene Helix 8 für diese G-Protein-Interaktion vermutlich eine wichtige Rolle (Palczewski *et al.*, 2000; Fritze *et al.*, 2003).

1.3.4 Heterotrimere G-Proteine

Durch Kopplung an aktivierte GPCRs übertragen die heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine) die extrazellulären Signale auf intrazelluläre Effektorproteine. Bei den G-Proteinen handelt es sich um membranständige Proteine, die sich aus den drei Untereinheiten, $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$ zusammensetzen. Im inaktiven Zustand liegen die Untereinheiten assoziiert vor und die $G\alpha$ -Untereinheit hat GDP gebunden. Die $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten bilden ein Dimer und liegen als funktionelle Einheit vor. Wird der Rezeptor aktiviert, kommt es zu einer Konformationsänderung und einer Interaktion mit dem G-Protein, wobei der Rezeptor als GTP-Austauschfaktor (*GEF*, *guanine nucleotide exchange factor*) fungiert. Bei Aktivierung des G-Proteins kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit und das G-Proteine dissoziiert in die $G\alpha$ -Untereinheit und in das $G\beta\gamma$ -Dimer. Beide G-Protein-Anteile können nun intrazelluläre Effektoren aktivieren und die Signaltransduktion beeinflussen. Durch die

intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit wird GTP zu GDP hydrolysiert und eine Reassoziations mit dem $G\beta\gamma$ -Dimer initialisiert, wodurch der Zyklus abgeschlossen ist und sich das System im Ausgangszustand befindet (Milligan *et al.*, 2006). Derzeit sind 17 $G\alpha$ -, 5 $G\beta$ - und 12 $G\gamma$ -Untereinheiten bekannt (Wettschurek *et al.*, 2005). Die Mitglieder der Gruppe der $G\alpha$ -Untereinheit werden in vier Familien eingeteilt, $G_s\alpha$, $G_{i/o}\alpha$, $G_{q/11}\alpha$ und $G_{12/13}\alpha$ (Milligan *et al.*, 2006). Sowohl die verschiedenen $G\alpha$ - als auch die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten weisen Unterschiede in ihrem Proteinexpressionsmuster und in der Regulation intrazellulärer Effektoren auf (Milligan *et al.*, 2006). So werden einige der Proteine ubiquitär, andere Zell-spezifisch z. B. in Seh- oder Nervenzellen exprimiert (Milligan *et al.*, 2006). Zu den Effektoren von G-Proteinen zählen u. a. Adenylylcyclasen, Phospholipasen, Tyrosinkinasen und Ionenkanäle. Die Regulation der Effektoren durch G-Proteine kann dabei teils entgegengesetzt erfolgen. So können $G_s\alpha$ -Proteine die Adenylylcyclase aktivieren, während die G-Proteine aus der $G_{i/o}\alpha$ -Familie das Enzym inhibieren (Milligan *et al.*, 2006). In den $G\alpha$ -Untereinheiten wurden verschiedene Domänen identifiziert, die für die Bindung und Hydrolyse von GTP sowie für die Interaktion mit Effektoren von Bedeutung sind. Zu diesen zählen neben der *ras-like* GTPase-Domäne und der an der GDP/GTP-Bindung beteiligten α -helikalen Domäne auch drei sogenannte *switch*-Regionen (Tesmer *et al.*, 2005). Durch die Bindung von GTP an die $G\alpha$ -Untereinheit findet eine Konformationsänderung im Bereich der *switch*-Region statt. Dies ermöglicht eine Interaktion der $G\alpha$ -Untereinheit mit Effektoren des Rezeptors sowie mit RGS-Proteinen (*regulators of G protein signaling*) (Tesmer *et al.*, 2005). RGS-Proteine beeinflussen die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit und damit die Geschwindigkeit, mit der ein Aktivierungszyklus abgeschlossen wird (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Milligan *et al.*, 2006.) Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die $G\alpha$ -Untereinheit durch posttranslationale Myristoylierung und/oder Palmitoylierung im aminoterminalen Abschnitt modifiziert werden kann und dass auf diese Weise die Interaktion mit der Plasmamembran und mit dem Rezeptor und der $G\beta\gamma$ -Untereinheit vermittelt wird (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Milligan *et al.*, 2006). Auch das $G\beta\gamma$ -Dimer interagiert mit der Zellmembran. Dies wird durch posttranslationale Isoprenylierung des im carboxylterminalen Abschnitt von $G\gamma$ gelegenen CAAX-Motiv (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure) ermöglicht (Milligan *et al.*, 2006). Unabhängig von der Aktivierung eines Rezeptors können heterotrimere G-Proteine auch durch so genannte AGS-Proteine (*activators of G protein signaling*) aktiviert werden. Diese stimulieren den GDP/GTP-Austausch an der $G\alpha$ -Untereinheit (Cismowski, 2006).

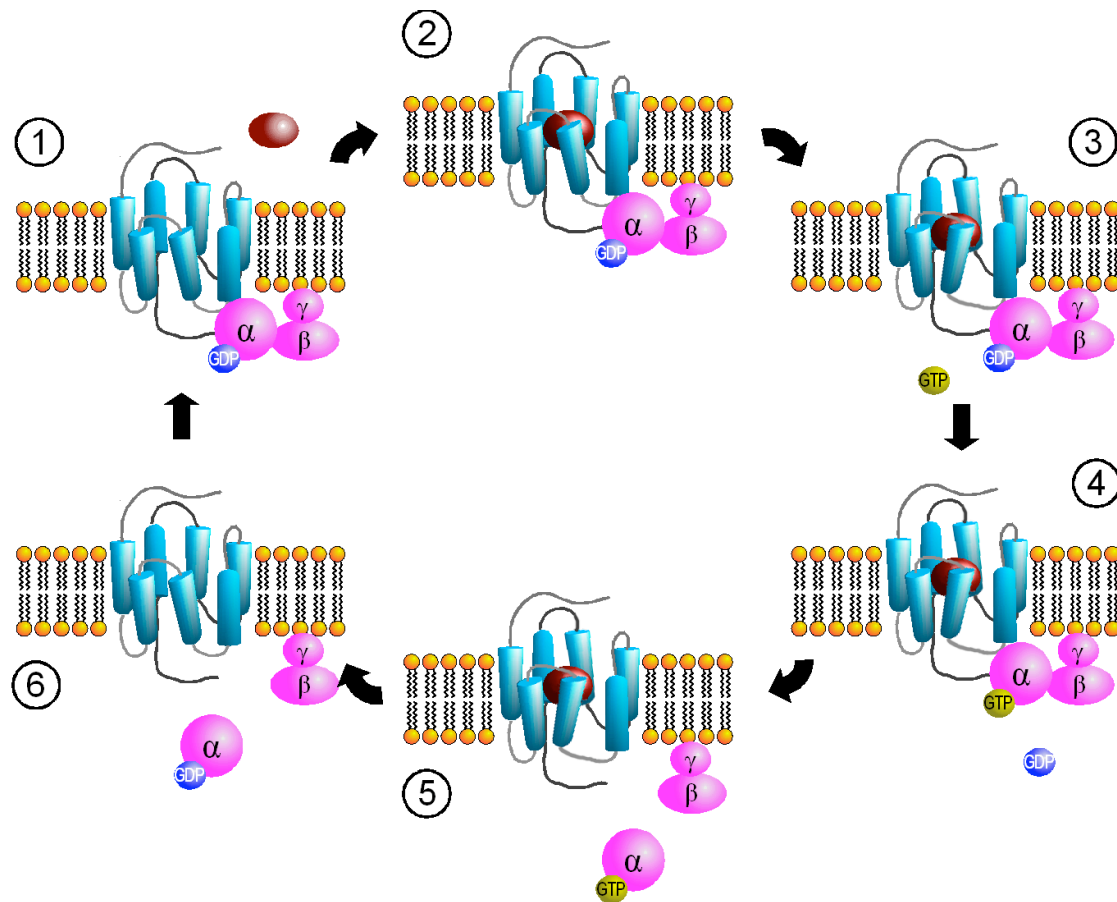


Abb. 2: Zyklus der Signalübertragung über G-Proteine nach Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Durch Bindung eines Agonisten (1) kommt es am Rezeptor zu einer Konformationsänderung (2). Der Rezeptor agiert nun am G-Protein als GTP-Austauschfaktor (*GEF, guanine nucleotide exchange factor*), wodurch GDP an der $G\alpha$ -Untereinheit durch GTP ersetzt wird (3,4). In der Folge dissoziiert $G\alpha_{GTP}$ vom $G\beta\gamma$ -Komplex und beide Untereinheiten können durch Effektorproteine die Signalübertragung regulieren (5). Nach Hydrolyse des GTPs durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit reassoziieren $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins und das System geht in den Ausgangszustand vor der Aktivierung über (6). (Abbildung von S. Jähnichen, *Activation cycle of G-proteins by G-protein-coupled receptors*, Wikimedia Commons, 2006).

1.4 Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren reagieren auf anhaltende Stimulation mit verminderter Aktivierbarkeit, ein Vorgang, der als Desensibilisierung bezeichnet wird (Gainetdinov *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2006). Diese verringerte Sensibilität kann sowohl über eine Entkoppelung des Rezeptors mit seinen nachfolgenden Effektoren, als auch über eine Abnahme der Rezeptordichte an der Zelloberfläche erreicht werden.

1.4.1 Homologe und heterologe Desensibilisierung

Für die Desensibilisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren spielt die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten in den carboxylterminalen Abschnitten der Rezeptoren eine entscheidende Rolle. An der Phosphorylierung sind zum einen Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs), zum anderen *second-messenger*-abhängige Proteinkinasen wie Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) beteiligt (Morris *et al.*, 1999; Ferguson, 2001). Dabei unterscheidet man zwischen homologer und heterologer Desensibilisierung (Lefkowitz, 1993; Luttrell *et al.*, 2002). Bei der homologen Desensibilisierung handelt es sich um einen Vorgang, der spezifisch an aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stattfindet und durch Phosphorylierung von GRKs vermittelt wird. Die heterologe Desensibilisierung, d. h. Phosphorylierung durch PKA und PKC kann dagegen unabhängig vom Aktivierungszustand des Rezeptors erfolgen.

Bei der homologen Desensibilisierung, d. h. der Phosphorylierung von Agonist-besetzten, aktivierten Rezeptor durch GRKs wird die Affinität des Rezeptors zu inhibitorischen Arrestin-Proteinen erhöht. Die Proteinfamilie der Arrestine umfasst vier Mitglieder, von denen zwei, das *cone arrestin* und das *visual arrestin*, ausschließlich in Retinazellen exprimiert werden (Yamaki *et al.*, 1987; Ferguson, 2001; Premont und Gainetdinov, 2007). Die β -Arrestine, β -Arrestin1 und β -Arrestin2, dagegen sind ubiquitär exprimierte Proteine, die sich in besonders hoher Konzentration im Gehirn und in der Milz nachweisen lassen (Ferguson, 2001; Luttrell *et al.*, 2002). Durch die Bindung von Arrestinen an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommt es zur sterischen Behinderung der G-Protein/Rezeptorinteraktion und damit zur Abnahme der Rezeptor-vermittelten G-Protein-Aktivierung (Luttrell *et al.*, 2002; Gainetdinov *et al.*, 2004). Zusätzlich fungieren β -Arrestine als Adapterproteine für die Bindung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren an Clathrin und sind auf diese Weise an der Internalisierung des Rezeptor-Arrestin-Komplexes im Rahmen der Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt (Luttrell *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2007). Der internalisierte Rezeptorkomplex kann anschließend nach Dephosphorylierung und Entfernung des Arrestins entweder in Lysosomen abgebaut (*downregulation*) oder zurück an die Zelloberfläche transportiert werden (*resensitization*) (Luttrell *et al.*, 2002; Mousavi *et al.*, 2004). Neuere Untersuchungen deuten darüber hinaus auf eine Rolle der Arrestine in der Signalübertragung hin. Arrestine können die Signaltransduktion vermutlich beeinflussen, indem sie an bestimmte Proteine,

beispielsweise an Mitglieder der Src-Familie und Komponenten aus dem MAP-Kinase-Weg, binden (Luttrell *et al.*, 2002; Gainetdinov *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2007).

Im Unterschied zu der homologen Desensibilisierung werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bei der heterologen Desensibilisierung von *second-messenger*-abhängigen Proteinkinasen, wie Proteinkinase A, Proteinkinase C und MAP-Kinasen phosphoryliert (Benovic *et al.*, 1985; Pitcher *et al.*, 1992; Gainetdinov *et al.*, 2004). Zu den *second-messenger*, die die Proteinkinase C aktivieren, zählen Diacylglycerol, Ca^{2+} und Phospholipide. Die Proteinkinase A sowie die MAP-Kinase werden dagegen über zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) stimuliert. Dabei beschränkt sich die Phosphorylierungsaktivität der genannten Proteinkinasen nicht wie bei den GRKs auf Serin- bzw. Threoninreste aktivierter Rezeptoren, sondern schließt auch nicht-aktivierte Rezeptoren mit ein (Gainetdinov *et al.*, 2004). Die phosphorylierten Aminosäuren finden sich dabei jedoch in anderen Abschnitten des Rezeptors als die der Phosphorylierung durch GRKs. Außerdem entsteht durch die Phosphorylierung durch *second-messenger*-abhängige Proteinkinasen keine erhöhte Affinität zu Arrestinen, weshalb letztere vermutlich in der heterologen Desensibilisierung keine Rolle spielen (Bünemann *et al.*, 1999). Auch bei der heterologen Desensibilisierung kommt es durch Phosphorylierung des Rezeptors zu einer Inhibierung der Interaktion der $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten mit dem Rezeptor (Freedman *et al.*, 1996; Pierce *et al.*, 2002). Darüber hinaus werden nicht nur die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch die Kinasen phosphoryliert, sondern auch eine Reihe der durch die Rezeptoren aktivierten intrazellulärer Effektorproteine, wie Adenylylcyclasen und Phospholipase C-Isoenzyme. Bei den genannten Formen der Desensibilisierung handelt es sich jedoch nicht um zwei unabhängige Regulationssysteme der Rezeptoraktivität. So können beispielsweise Arrestine und GRKs durch PKC und PKA phosphoryliert und in einem als *cross-talk* bezeichneten Vorgang in ihrer Aktivität reguliert werden (Chuang *et al.*, 1996; Penela *et al.*, 2003).

1.5 Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Derzeit sind sieben Mitglieder der Familie der Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, GRK1 bis GRK7, in Säugetieren bekannt. Die Aminosäuresequenzen von GRK1 bis GRK7 stimmen in 53-93 % der Aminosäuren überein (Pitcher *et al.*, 1998; Weiss *et al.*,

1998; Penela *et al.*, 2003). Aufgrund struktureller und funktioneller Gemeinsamkeiten werden die Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in drei Subfamilien unterteilt. Die erste Subfamilie umfasst GRK1 und GRK7, die in Retinazellen vorkommen und auch als „visuelle Kinasen“ bezeichnet werden. Die zweite Subfamilie umfasst GRK2 und GRK3 und die Mitglieder der dritten Subfamilie sind GRK4, GRK5 und GRK6. Bis auf GRK4, die hauptsächlich im Hodengewebe zu finden ist, werden die Mitglieder der letzten beiden Subfamilien ubiquitär exprimiert. Das bedeutet, dass der überwiegende Teil der Rezeptoren durch die vier GRKs 2, 3, 5 und 6 reguliert wird (Pitcher *et al.*, 1998; Premont und Gainetdinov, 2007). Für GRK4 und GRK6 der GRK4-Subfamilie wurden darüber hinaus Varianten beschrieben. So wurden für die humane GRK4 und GRK6 sowie für die murine GRK6 Spleißvarianten identifiziert, die jeweils aus einer gemeinsamen hnRNA hervorgehen und für vier Isoformen kodieren (Premont *et al.*, 1996; Moepps *et al.*, 1999; Premont *et al.*, 1999).

Die Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zeichnen sich durch einen gemeinsamen strukturellen Aufbau aus. Die zentrale katalytische Domäne besteht aus 263-266 Aminosäuren und wird von einem *ca.* 185 Aminosäuren umfassenden aminoterminalen Abschnitt und einem in der Länge variablen carboxylterminalen Abschnitt flankiert (Pitcher *et al.*, 1998; Noble *et al.*, 2003; Penela *et al.*, 2003). Für den aminoterminalen Abschnitt wird angenommen, dass er maßgeblich an der Erkennung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors und an der Lipidinteraktion beteiligt ist. Für GRK5 wurde in diesem Abschnitt eine spezifische Bindungsstelle für Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (Aminosäuren 22-29) identifiziert, deren Aminosäuresequenz auch in den anderen Mitgliedern der GRK4-Subfamilie, GRK4 und GRK6, vorkommt (Pitcher *et al.*, 1996). Des weiteren besitzen darüber hinaus alle GRKs in ihrem aminoterminalen Abschnitt einen Bereich, der eine Homologie zu *RGS*-Proteinen aufweist (*regulators of G protein signaling (RGS) homology domain*, RH-Domäne) (Penela *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006). Der carboxylterminale Abschnitt, für den angenommen wird, dass er für die Membraninteraktion der Kinasen von Bedeutung ist, unterscheidet sich zwischen den einzelnen Mitgliedern der GRKs nicht nur in der Länge, sondern auch hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen. Bei GRK1 und GRK7 befindet sich im carboxylterminalen Abschnitt ein CAAX-Motiv, welches posttranslational isoprenyliert und carboxymethyliert werden kann. Dabei wird GRK1 farnesyliert, während GRK7 geranylgeranyliert wird (Inglese *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1998). GRK2 und GRK3 lassen

sich bei inaktivem Zustand des G-Protein-gekoppelten Rezeptors im Zytosol nachweisen und werden erst nach Aktivierung des Rezeptors an die Zellmembran transloziert (Penela *et al.*, 2003). Dabei wird die Membraninteraktion dieser Kinasen über die so genannte *pleckstrin homology domain* (PH-Domäne) vermittelt. Diese Domäne umfasst *ca.* 120 Aminosäuren im carboxylterminalen Abschnitt und ist auch in zahlreichen anderen Proteinen zu finden ist, z. B. in verschiedenen Serin/Threoninkinasen und in Isoformen der Phospholipase C (Pitcher *et al.*, 1995; Daaka *et al.*, 1997). Neben der PH-Domäne (Aminosäuren 553-656) enthält der carboxylterminale Abschnitt von GRK2 und GRK3 eine mit der PH-Domäne überlappende G β γ -Bindungsdomäne (Aminosäuren 546-670). Durch diese beiden Abschnitte ist GRK2 in der Lage, sowohl mit dem G β γ -Dimer, als auch mit dem negativ geladenen Phospholipid Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat zu interagieren (Pitcher *et al.*, 1995; DebBurman *et al.*, 1996; Pitcher *et al.*, 1998). Den Mitgliedern der GRK4-Subfamilie, GRK4, GRK5 und GRK6, fehlt ein CAAX-Motiv ebenso wie eine PH-Domäne. Auch besitzen diese GRKs keine G β γ -bindende Domäne. Trotzdem sind die Kinasen in der Lage, mit der Zellmembran in Wechselwirkung zu treten und an sie zu binden. So haben Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt, dass ein Teil der Proteine der murinen GRK6-Varianten mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C in intakten Zellen membranassoziiert vorliegt (Vatter *et al.*, 2005). Im carboxylterminalen Abschnitt der GRK4 und der humanen GRK6-A lassen sich Cysteinreste nachweisen, welche posttranslational palmitoyliert werden können (Stoffel *et al.*, 1997; Gainetdinov *et al.*, 2004). Bei der humanen GRK6-A fördert die Palmitoylierung dabei nicht nur die Membranassoziation, sondern auch die Phosphorylierungsaktivität der Kinase (Loudon und Benovic, 1997; Stoffel *et al.*, 1998). Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit mGRK6-A-Mutanten bestätigten die Bedeutung der Cysteinreste des carboxylterminalen Abschnittes. So kam es bei Austausch der Cysteine, für die eine posttranslationale Palmitoylierung angenommen wird, gegen neutrale Alanine zu einem deutlichen Aktivitätsverlust dieser Rezeptorkinase im Vergleich zum wildtypischen mGRK6-A-Protein (Dissertation Samel, 2007). Da auch GRK4 Cysteinreste in ähnlicher Position aufweist, wird für diese Kinase ein ähnlicher Mechanismus der posttranslationalen Modifikation angenommen (Loudon und Benovic, 1997). Für GRK5 liegt kein Hinweis für eine posttranslationale Lipidmodifikation vor, daher werden andere Mechanismen im Zusammenhang mit der nachgewiesenen Membranassoziation der Kinase diskutiert. So befindet sich im carboxylterminalen Abschnitt der GRK5 ein polybasischer Bereich (Aminosäuren 552-562), der eine Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden der

Zellmembran erlaubt (Pronin *et al.*, 1998). Wie verschiedene Untersuchungen gezeigt haben, führt das Fehlen dieser Region zu einer deutlichen Abnahme der Phosphorylierungsaktivität von GRK5 gegenüber membrangebundenen Substraten, während die Aktivität der Kinase gegenüber löslichen Substraten unverändert bleibt (Pronin *et al.*, 1998). Neuere Untersuchungen postulieren für GRK5 sowie für die GRK6-Varianten GRK6-A, GRK6-B und GRK6-C eine amphiphile α -Helix im Bereich der Aminosäuren 546-565, welche die Membranassoziation der Kinase vermittelt (Thiyagarajan *et al.*, 2004). Der hydrophobe Anteil der Helix wird dabei von den Aminosäuren L⁵⁵⁰, L⁵⁵¹, L⁵⁵⁴ und F⁵⁵⁵ (L= Leucin, F= Phenylalanin) gebildet, diese sind von mehreren basischen Aminosäuren umgeben, was zusätzlich die Membraninteraktion verbessert und eine Interaktion mit Phospholipiden erlaubt (Thiyagarajan *et al.*, 2004). Auch für GRK4 (Aminosäuren 552-562) und GRK6 (Aminosäuren 553-563) wurden basische Aminosäuren im carboxylterminalen Abschnitt identifiziert, die vermutlich eine spezifische Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden ermöglichen (Pronin *et al.*, 1998; Vatter *et al.*, 2005). Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit mGRK6-C-Mutanten konnten die Bedeutung dieser Region für die Membraninteraktion belegen. So zeigten mGRK6-C-Mutanten, in denen basische Aminosäuren im Bereich der amphiphilen Helix durch neutrale Aminosäuren ersetzt worden waren, einen beinahe vollständigen Verlust der Phosphorylierungsaktivität bezüglich membrangebundener Rezeptorsubstrate (Dissertation Kern, 2007).

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivität der GRKs ebenfalls der Kontrolle durch Kinasen, insbesondere durch Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) unterliegt (Penela *et al.*, 2003). Am Beispiel von GRK2 und GRK5 wird deutlich, wie unterschiedlich sich die Phosphorylierung durch PKC auswirken kann. Die Phosphorylierung von GRK2 durch PKC, die vermutlich im aminoterminalen Abschnitt im Bereich der Calmodulin-Bindungsstelle der GRK2 stattfindet, führt *in vitro* zu einer Zunahme der Phosphorylierungsaktivität gegenüber membrangebundenen Substraten (Penela *et al.*, 2003). Da die Aktivität der Rezeptorkinase gegenüber löslichen Substraten unverändert bleibt, wird als zugrunde liegender Mechanismus eine erleichterte Membraninteraktion der GRK2 durch die PKC-abhängige Phosphorylierung angenommen. Im Gegensatz dazu wird die Phosphorylierungsaktivität von GRK5 durch Phosphorylierung von PKC deutlich reduziert und zwar sowohl gegenüber löslichen als auch gegenüber membrangebundenen Substraten (Pronin *et al.*, 1998; Penela *et al.*, 2003).

Dieser Effekt, für den angenommen wird, dass er auf eine Inhibition der katalytischen Funktion der GRK5 zurückzuführen ist, wird durch PKC-abhängige Phosphorylierung im carboxylterminalen Abschnitt erzielt (Pronin *et al.*, 1998). Offen bleibt bei diesen Betrachtungen, welchen Stellenwert die Phosphorylierung von GRKs durch andere Proteinkinasen bei der Regulation der Rezeptorkinasen *in vivo* einnimmt.

Neben der Bedeutung der GRKs für die Desensibilisierung von Rezeptoren weisen zahlreiche Untersuchungen auf die Phosphorylierungs-unabhängigen Effekte der Rezeptorkinasen hin (Pitcher *et al.*, 1998; Ruiz-Gomez *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006). So können GRKs über die aminoterminalen RH (*regulators of G protein signaling (RGS) homology*)-Domäne mit G-Proteinen interagieren. Für GRK2 wurde gezeigt, dass die Bindung an $G\alpha_q$ die Signalübertragung inhibiert (Tesmer *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006). Untersuchungen konnten außerdem Interaktionen von GRKs nicht nur mit Rezeptoren, sondern auch mit anderen, an der zellulären Signaltransduktion beteiligten Proteinen wie PI-3-Kinasen, Clathrin, dem GTPase-aktivierenden Protein GIT und Caveolin nachweisen (Penela *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006).

Die meisten Arbeiten zur Funktion von GRKs basieren auf *in vitro*-Untersuchungen. Obwohl auf diese Weise zahlreiche Daten über die Eigenschaften der Kinasen und ihre Rolle in der zellulären Signaltransduktion erhoben werden konnten, brachten erst Untersuchungen an lebenden Organismen, u. a. mit transgenen und *knockout*-Mäusen, mehr Klarheit zur Bedeutung der GRKs *in vivo* (Premont und Gainetdinov, 2007). Interessanterweise weisen die Phänotypen der GRK *knockout*-Mäuse Unterschiede in den Auswirkungen auf Rezeptorfunktionen und bestimmte Organsysteme auf. Eine Ausnahme stellt hier nur die GRK2-defiziente Maus mit einem letalen Phänotyp dar (Premont und Gainetdinov, 2007). Für heterozygote GRK2-Mäuse, in denen nur ein GRK2-Gen aktiv ist, wurde etwa eine erhöhte kardiale Sensibilität auf adrenerge Stimulation nachgewiesen. Damit bestätigten die Untersuchungen die bis dahin postulierte Bedeutung der GRK2 für die Desensibilisierung β -adrenerger Rezeptoren (Rockman *et al.*, 1998). Eine erhöhte GRK2-Expression konnte darüber hinaus sowohl im Menschen als auch im Tiermodell mit arterieller Hypertonie in Verbindung gebracht werden (Premont und Gainetdinov, 2007). Neuere Untersuchungen beschreiben zudem Veränderungen der Immunantwort im ZNS bei experimenteller Autoimmunenzephalitis, einem Modell der Multiplen Sklerose, in heterozygoten GRK2-Mäusen (Vroon *et al.*, 2005). So war in GRK2 heterozygoten Tieren

ein früherer Krankheitsbeginn verbunden mit erhöhter Chemotaxis von T-Lymphozyten im Vergleich mit wildtypischen Mäusen nachzuweisen. Interessanterweise zeigten die GRK2 heterozygoten Mäuse dafür keine Rezidive, so dass die Veränderung zugleich negative wie positive Auswirkungen auf den Krankheitsprozess zeigte (Vroon *et al.*, 2005). Auch das Fehlen von GRK5 resultiert in organspezifischen Veränderungen. In GRK5 *knockout*-Mäusen wurden im Vergleich zu wildtypischen Mäusen zwar Unterschiede nach Stimulation muskarinischer M2-Acetylcholinrezeptoren in der Lunge, nicht jedoch nach Aktivierung des gleichen Rezeptortyps im Herzen beobachtet (Walker *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde im ZNS von Tieren, die als Modell einer frühen Alzheimer-Erkrankung dienen, eine Erniedrigung des membranassoziierten GRK5-Proteins beobachtet (Suo *et al.*, 2004). Für GRK6 bestätigten Untersuchungen eine bedeutende Rolle in Immunzellen. Lymphozyten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis zeigten zum Beispiel eine erniedrigte GRK6-Expression (Lombardi *et al.*, 1999). Akute Entzündungsreaktionen in GRK6 *knockout*-Mäusen gingen mit erhöhter Gewebsinfiltration durch neutrophile Granulozyten sowie mit verstärkter Schwellung einher (Kavelaars *et al.*, 2003). Wie unterschiedlich sich dabei das Fehlen von GRK6 auf verschiedene Zelltypen auswirken kann, zeigt der Vergleich des durch SDF-1 α aktivierten Chemokinrezeptors CXCR4 in T-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. So zeigten T-Lymphozyten aus GRK6-defizienten Mäusen eine verminderte und neutrophile Granulozyten eine erhöhte Chemotaxis im Vergleich zu den Zellen, die aus wildtypischen Tieren isoliert worden waren (Vroon *et al.*, 2004; Premont und Gainetdinov, 2007). Obwohl die den beobachteten Effekten zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht eindeutig verstanden werden, belegen diese Beispiele doch eindrücklich die Komplexität, mit der GRKs in die zelluläre Signalübertragung eingreifen (Premont und Gainetdinov, 2007).

Den sieben Mitgliedern der GRK-Familie stehen mehr als 800 bekannte GPCR gegenüber (Premont und Gainetdinov, 2007). Verschiedene Möglichkeiten, um Spezifität zwischen GRKs und bestimmten Rezeptoren zu generieren, sind denkbar. Neben den angesprochenen Unterschieden zwischen den GRKs bezüglich der Lokalisation in der Zelle sowie den verschiedenen Lipidinteraktionen, ist hierbei auch das Expressionsmuster zu berücksichtigen. Dabei sind nicht nur für die verschiedenen Mitglieder der GRK-Familie sondern auch für Spleißvarianten der Kinasen spezifische Expressionsmuster beschrieben worden. Für die Spleißvarianten mGRK6-A und mGRK6-B konnten in Untersuchungen der Arbeitsgruppe Unterschiede gezeigt werden. So ließ sich

beispielsweise in Leber- und Herzgewebe mGRK6-A-, nicht aber mGRK6-B-Protein nachweisen (Vatter *et al.*, 2005). In anderen Geweben, etwa aus Milz, mesenterialen Lymphknoten und Thymus waren dagegen sowohl mGRK6-A als auch mGRK6-B über spezifische Antikörper im Immunoblot zu detektieren (Vatter *et al.*, 2005). Zu berücksichtigen bleibt jedoch, dass die Bedeutung bzw. das Ausmaß der Spezifität in der Regulation von GPCR durch GRKs bisher nicht abschließend geklärt ist. Während Untersuchungen des muskarinischen M2-Rezeptors in GRK5 *knockout*-Mäusen darauf hindeuten, dass die Regulation eines Rezeptors in verschiedenen Organsystemen durch verschiedene GRKs erfolgen kann, gibt es auch Beispiele für Rezeptoren, die nur von einer GRK reguliert werden (Walker *et al.*, 2004; Premont und Gainetdinov, 2007). Für Dopamin-D2-Rezeptoren im Striatum, die eine wichtige Rolle bei der Parkinson-Erkrankung spielen, wurde beispielsweise eine spezifische Interaktion mit GRK6 nachgewiesen (Premont und Gainetdinov, 2007). Im Gegensatz zu anderen GRK *knockout*-Mäusen und wildtypischen Tieren war bei GRK6-defizienten Mäusen eine gesteigerte motorische Aktivität nach Gabe von stimulierenden Substanzen (u. a. Kokain, Amphetamine) und Dopaminrezeptoragonisten beobachtet worden (Gainetdinov *et al.*, 2003). Darüber hinaus ließ sich in den *knockout*-Tieren im Striatum eine erhöhte Dopamin-D2-Rezeptor/G-Proteinen-Interaktion nachweisen. Auch Untersuchungen am Tiermodell der Parkinson-Erkrankung, für das Affen mit MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) behandelt werden, um die dopaminergen Zellen zu zerstören, weisen auf die Bedeutung der GRK6 hin. So wurden bei den mit MPTP behandelten Affen in mehreren Hirnregionen, darunter im Striatum, erhöhte GRK6-Proteinkonzentrationen nachgewiesen (Premont und Gainetdinov, 2007). Es ist denkbar, dass die Beeinflussung der Funktion der GRK6 eine neue Option darstellt, Therapieansätze zur Behandlung der Parkinson-Erkrankung zu entwickeln. Unklar bleibt bei diesen Betrachtungen die etwaige Bedeutung von Spleißvarianten der GRK, wie sie für die humane und murine GRK6 nachgewiesen wurden. Ein tieferes Verständnis der molekularen Mechanismen der Signaltransduktion dieser Varianten ist die Voraussetzung, um die Rolle der GRK und ihrer Isoformen in Zukunft näher zu definieren.

1.6 Ziele der Arbeit

Für die murine GRK6 konnten in der Arbeitsgruppe drei Spleißvarianten, mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C, isoliert werden, die sich im Aufbau und in der Länge des carboxylterminalen Abschnittes unterscheiden (Moepps *et al.*, 1999). Sowohl für mGRK6-A als auch für mGRK6-C hatten Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt, dass der carboxylterminale Abschnitt für die Phosphorylierung membrangebundener Substrate durch die Kinasen nicht essentiell ist, sondern vielmehr eine autoregulatorische Funktion besitzt (Vatter *et al.*, 2005; Dissertation Samel, 2007).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu klären, (i) ob auch der carboxylterminale Abschnitt von mGRK6-B eine autoregulatorische Funktion besitzt, (ii) welche Rolle basische Aminosäuren im carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-B für die Membraninteraktion und die Regulation der Kinaseaktivität spielen und (iii) welche Bedeutung den Aminosäuren, die Substrate einer Phosphorylierung durch Proteinkinase C darstellen, bei der Regulation der Aktivität von mGRK6-B zukommt. Hierfür sollte die Aktivität von mGRK6-B-Mutanten verglichen werden, deren carboxylterminale Abschnitte sukzessive verkürzt worden waren. Darüber hinaus sollten mGRK6-B-Mutanten hergestellt werden, in denen basische Aminosäuren gegen neutrale Aminosäuren ausgetauscht wurden und/oder in denen putative Phosphorylierungsstellen entfernt bzw. durch Aminosäuren ersetzt wurden, welche die Ladungsverhältnisse nach einer Phosphorylierung imitieren. Die mGRK6-B-Mutanten sollten in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert und die Proteine gereinigt werden. Mit den gereinigten Proteinen sollten Experimente zur Lipidinteraktion der Rezeptorkinasen mit Phospholipidvesikeln durchgeführt werden. Um den Einfluss der Mutationen auf die Funktion der Kinasen zu untersuchen, sollte die Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-B-Mutanten gegenüber verschiedenen Substraten mit der Aktivität von rekombinantem mGRK6-B- und/oder mGRK6-C-Protein verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid-Lösung 30 % 4K Mix	AppliChem, Darmstadt
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Ampicillin, Natrium-Salz	Sigma, Deisenhofen
ATP, Dinatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Bacto Yeast Extract	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
Boviner IgG Proteinstandard	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Casein	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Dithiothreitol	Serva-Bioproducts, Heidelberg
DMEM	Life Technologies GmbH, Eggenstein
DMF	Roth, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
ECL™ Western Blotting Detection Reagent	Amersham Pharmacia, Freiburg
EDTA Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Fötale Kälberserum	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Fungizone®	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Gentamicin	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Grace's Insect Medium	Biowhittaker Bioproducts, Heidelberg
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, Deisenhofen
HEPES (für Zellkultur)	Life Technologies GmbH, Eggenstein

IPTG	Boehringer, Mannheim
Leupeptin	Serva-Bioproductions, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva-Bioproductions, Heidelberg
Pepstatin A	Serva-Bioproductions, Heidelberg
Phenol	Sigma, Deisenhofen
Phosphatidylcholin	Sigma, Deisenhofen
Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdInsP ₂)	Sigma, Deisenhofen
Phosvitin	Sigma, Deisenhofen
Pluronic F-68 [®]	Life Technologies GmbH, Eggenstein
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Polymax RT Entwickler/Fixierer	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S-Konzentrat	Sigma, Deisenhofen
Pyronin Y	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Serva-Bioproductions, Heidelberg
Thimerosal	Sigma, Deisenhofen
TNM-FH-Insect Medium	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom KG, Berlin
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	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.

2.1.2 Radioaktiv markierte Chemikalien

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (>5000 mCi/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
--	------------------------------

2.1.3 Enzyme, Kits und Nukleinsäuren

ABI PRISM[®] Ready Reaction Dye[®]

Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
BaculoGold™ Baculovirus DNA	Pharmingen, Hamburg
Desoxynukleosidtriphosphat-Set	Boehringer, Mannheim
Klenow Enzym	Roche Diagnostics, Mannheim
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker III	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Nucleobond™ AX PC-Kit-100	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin™-Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
<i>Pfu</i> -Turbopolymerase	Stratagene, Heidelberg
QuikChange Site™-Directed Mutagenesis 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
TransFast™ Transfektions Reagenz	Promega, Madison, USA

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Agfa Cronex5 Medical X-Ray Film	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Blotpapier GB002	Schleicher & Schuell, Dassel
Kanüle 25 GI 0,5 x 25 mm Nr. 18	Becton Dickinson, Heidelberg
Kodak X-OMAT™ AR X-ray film	Sigma, Deisenhofen
Nitrozellulosemembranfilter (0.45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Protran Nitrozellulose	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen, 75 cm ² und 150 cm ²	Renner, Dannstadt

2.1.5 Säulen und Gele für die Chromatographie

HiTrap® Heparin-Sepharose-Säule, 1 ml	Amersham Pharmacia, Freiburg
HiTrap® SP-Sepharose-Säule, 1 ml und 5 ml	Amersham Pharmacia, Freiburg
<i>Fast Desalting</i> ™ PC 3.2/10-Fertigsäule	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.1.6 Pro- und eukaryontische Zellstämme

<i>Escherichia coli</i> DH5α	Clontech/ITC Biotechnology, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF'	Stratagene, Heidelberg
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9)-Zellen	Invitrogen, Heidelberg

2.1.7 Plasmide

pCR [®] 2.1 (TA-Cloning Kit)	Invitrogen, Karlsruhe
pVL1393	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.7.1 Vorhandene Plasmid-DNA-Konstrukte

mGRK6-B Mut2-pVL1393	Dr. P. Vatter, Ulm
----------------------	--------------------

2.1.8 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Interactiva, Ulm bezogen.

2.1.8.1 Vektor-spezifische Oligonukleotide

pVL-sense	5' - CTG TTT TCG TAA CAG T - 3'
pVL-antisense	5' - TGA GTT TTT GGT TCT TGC CG - 3'
pCR 2.1-reverse	5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'
pCR 2.1-universe	5' - GTA AAA CGA CGG CCA G - 3'

2.1.8.2 GRK6-spezifische Oligonukleotide

GRK6-B mut4	5' - CTA CTT CCT CAC TGC CGC TGC AGT - 3'
GRK6-B mut5	5' - CTA CGC CGC CAC TGT CGC TGC AGT - 3'
GRK6-B mut6	5' - CTA CGC CGC CAC TGC CGC TGC AGT - 3'
GRK6-B mut7	5' - CTA CTT CCT CAC TTC CGC TGC AGT T - 3'
GRK6-B mut8	5' - CTA CGC CGC CAC TTC CGC TGC AGT T - 3'

2.1.9 Rekombinante Baculoviren

mGRK6-A	Dr. P. Vatter, Ulm
---------	--------------------

mGRK6-B	Dr. P. Vatter, Ulm
mGRK6-C	Dr. P. Vatter, Ulm
mGRK6-B Mut1	Susanne Zöllner, Ulm
mGRK6-B Mut2	Susanne Zöllner, Ulm
mGRK6-B Mut3	Susanne Zöllner, Ulm

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

Der *high molecular weight marker* (HMW) wurde von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen.

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

2.1.11 Antikörper

Primärer Antikörper gegen:

mGRK6 (Anti-Pep2)	Polyklonales Kaninchen-IgG	Eurogentec, Belgien
-------------------	----------------------------	---------------------

Sekundärer, Peroxidase-gekoppelter Antikörper:

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

2.1.12 Spezielle Geräte

ABI 310 PRISM™ Genetic Analyser	Perkin-Elmer, Weiterstadt
ÄKTA™ explorer 100	Amersham Pharmacia, Freiburg
Brutschrank Kelvitron®T	Heraeus Instruments, Felbach
Binokkular SZH 10	Olympus, Hamburg
CCD Kamera Olympus DP 10	Olympus, Hamburg
Certomat R (Schüttlereinheit)	Braun, Melsungen

Easy Breeze Air Gel Dryer	Amersham Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer groß (SDS-PAGE)	Hoefer-Amersham Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer klein (SDS-PAGE)	Sigma, Deisenhofen
Immunoblot Transferkammer	Renner GmbH, Darmstadt
Immunoblot Transferkammer	
Hoefer™ miniVE	Hoefer-Amersham Pharmacia, Freiburg
FPLC™ System	Amersham Pharmacia, Freiburg
J2-HS Zentrifuge	Beckman Instruments, München
Milli-Q ^{UF} _{PLUS}	Millipore, Eschborn
Minifuge GL	Heraeus Christ, Osterode
Optima™ TLX Ultrazentrifuge	Beckman Instruments, München
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
Ultra Turrax	Janke & Kunkel, Staufen i. Breisgau
Videodokumentationsystem CF8/1 DX	Kappa Meßtechnik GmbH, Gleichen

2.1.13 Software und Datenbanken

NeoOffice®	Copyright 2003-2008 Planamesa Inc., USA
Prosite Database	www.expasy.org , Swiss Institute of Bioinformatics, Genf

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung von Luria-Bertani (LB)-Medium

Die Kultivierung der *E.coli*-Stämme DH5 α und XL1-Blue MRF' erfolgte in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium). Das LB-Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert und anschließend bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Die Selektion der mit Plasmiden transformierten Bakterien erfolgte durch das Antibiotikum Ampicillin bzw. Kanamycin. Dieses wurden dem Medium in einer Konzentrationen von 50 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Für die Herstellung von LB-Agarplatten 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

Ampicillinlösung: 50 mg/ml in ddH₂O, durch einen Zelluloseacetatfilter (0.22 μm Porenweite) sterilfiltriert

2.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Unter Verwendung eines sterilen Zahnstochers wurde eine Einzelkolonie des Bakterienstammes *E. coli* DH5 α von einer Agarplatte abgenommen, in 2.5 ml LB-Medium überführt und über Nacht unter Standardbedingungen (37 °C und 200 Upm) inkubiert. Mit 1.5 ml dieser Vorkultur wurden 50 ml LB-Medium angeimpft und diese Bakterienkultur unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von 0.6 bei 600 nm (OD600) gezogen. 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 μl sterilem, kaltem 86%igem Glycerin (Endkonzentration 19 % (V/V)) versetzt. Die somit zur Aufnahme von DNA kompetenten Zellen wurden dann in 100 μl Aliquots portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Ein Aliquot (30 µl) kompetenter DH5α- oder XL1-Blue MRF'-Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, mit einem Ligationsansatz (siehe 3.2.9) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 30 s ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt, dieser führte zur Aufnahme der zur Transformation zugesetzten Plasmid-DNA. Die Bakterien wurden danach für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 200 Upm und 37 °C auf dem Bakterienschüttler inkubiert. Ein Aliquot der Bakterienkultur wurde schließlich auf einer zuvor getrockneten LB-Agar(+Antibiotikum)-Platte mit einem Drygalsky-Spatel ausplattiert.

Um kompetente Bakterien mit Plasmid-DNA aus einer Ligation zu transformieren, wurde ein Aliquot (30 µl) kompetenter DH5α- oder XL1-Blue MRF'-Bakterien auf Eis aufgetaut, mit einem Aliquot eines Ligationsansatzes (siehe 3.2.9) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der im Anschluss für 30 s durchgeführte Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad führte zur Aufnahme der zur Transformation zugesetzten Plasmid-DNA in die Bakterien. Die Bakterien wurden danach für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 200 Upm und 37 °C auf dem Bakterienschüttler inkubiert. Ein Aliquot der Bakterienkultur wurde schließlich auf einer zuvor getrockneten LB-Agar(+Antibiotikum)-Platte mit einem Drygalsky-Spatel ausplattiert.

SOC-Medium:

- 2% Tryptone
- 0.5% Hefeextrakt
- 10 mM NaCl
- 2.5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂·6H₂O
- 20 mM Glucose

(Nach der Herstellung autoklaviert und sterilfiltriert.)

Die Transformation in XL1-Blue MRF' *Supercompetent Cells* erfolgte nach Angaben des Herstellers (Stratagene). Das nach dem *heat-shock* den Bakterien zugesetzte NZY+-Nährmedium wurde wie folgt 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 MgCl_2 -Lösung, 12.5 ml einer sterilen 1 M MgSO_4 -Lösung und 20 ml einer 20%igen (m/V) sterilen Glucose-Lösung hinzugefügt.

2.2.1.4 Selektion von transformierten Bakterien

Die Selektion von Bakterien, welche die rekombinante Plasmid-DNA aufgenommen hatten, erfolgte in Anwesenheit des Antibiotikums Ampicillin. Bei Bakterien, die mit dem Vektor pCR2.1 transformiert worden waren, konnte zusätzlich eine blau/weiss-Selektion mit Hilfe der Substanzen Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) und 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal) durchgeführt werden. Blaue Bakterienkolonien enthielten dabei Plasmide ohne rekombinante DNA und konnten eine funktionsfähige β -Galaktosidase herstellen. In diesem Fall wird das inaktive Fragment der β -Galaktosidase (dem α -Akzeptor), das vom Bakterium produziert wird, mit einem kurzem Peptid (dem α -Donorfragment), das aus dem Klonierungsvektor stammt komplementiert, daher wird dieses Selektionssystem auch als α -Komplementierung bezeichnet. Nach Induktion durch den Induktor IPTG setzte die β -Galaktosidase das Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff um. Bei Bakterien mit rekombinanten Plasmiden verursachte die Insertion eines zu klonierenden Fragments zur Inaktivierung des α -Donorfragments und somit eine Inaktivierung des β -Galaktosidase-Gens (*lacZ*), es kann keine β -Galaktosidase hergestellt werden und die Kolonien bleiben weiss. Ein Aliquot des Transformationsansatzes (200 μl) wurde auf LB(+Antibiotikum)-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Im Falle der blau/weiss-Selektion wurden zuvor dem Aliquot jeweils 10 μl IPTG und 10 μl X-Gal zugesetzt.

IPTG-Lösung: 0.1 M in ddH₂O

X-Gal-Lösung: 10% (m/V) in DMF

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* DH5 α oder XL1-Blue MRF' wurden für die Minipräparationen aus 2.5 ml Kulturen Nucleospin®-Kits und für die

Medipräparationen aus 50 ml Kulturen Nucleobond® AX 100 nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Bakterien waren vorher über Nacht bei 37° C unter Schütteln (200 Upm) in LB(+Antibiotikum)-Medium kultiviert worden. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

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 µg/ml doppelsträngiger DNA. 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 Verunreinigung durch Phenol oder Proteine hin.

2.2.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von DNA

Um Proteine, die bei der Extraktion von DNA aus Zellen, aber auch bei der Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen anfielen, zu entfernen, wurden die wässrigen Nukleinsäurelösungen mit 1 Volumen Phenol versetzt und nach dem Durchmischen für 5 min mit 15.800 g bei RT zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt, um das restliche Phenol zu entfernen und anschließend bei 15.800 g 5 min bei RT erneut zentrifugiert. Die DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 2.5 Volumen 100 % Ethanol und 0.1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung pH 5.6 und einer Inkubation von min 30 min bei -80 °C bzw. durch Zusatz von 0.7 Volumen Isopropanol und einer Inkubation von 20 min bei RT ausgefällt. Nach der Zentrifugation des Fällungsansatzes für 10 min mit 15.800 g bei RT wurde das Pellet mit 70 % Ethanol (V/V) gewaschen und wie oben zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet im Heizblock (37 °C) oder im Exsikkator getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen wurde eine Horizontalgelapparatur eingesetzt. Die Konzentration der Agarose richtete sich 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)

Die Agarose wurde in Elektrophoresepuffer (1 x TAE) aufgekocht, nach Abkühlen auf *ca.* 60 °C mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um einen interkalierenden 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 5:1 (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. Das Gel wurde unter UV-Beleuchtung ($\lambda = 312$ nm) auf einem Transilluminator (Bachofer) ausgewertet und ein 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 ddH ₂ O, dunkel gelagert
5 x DNA-Probenpuffer:	25 mM TrisHCl pH 7.0, 150 mM EDTA, 0.05 % (m/V) Bromphenol Blau, 25 % (V/V) Glycerol

2.2.2.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA im Agarosegel wurde die gewünschte DNA-Bande auf dem Transilluminator unter UV-Beleuchtung mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein vorgewogenes Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA aus dem Gelstück wurde mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits (Quiagen) nach Herstellerangaben extrahiert.

2.2.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

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

Standardansatz:	1 µg	(Plasmid-)DNA
	0.5 µl	Restriktionsendonukleasen (10 U/µl)
	1.5 µl	10 x Restriktionspuffer
	<i>ad</i> 15 µl mit ddH ₂ O	

Dazu wurde der Restriktionsansatz bei der von den Herstellern empfohlenen Temperatur für mindestens 1 h inkubiert, anschließend mit 5 µl 5 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Spaltungsprodukte in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung der DNA wurde unter UV-Beleuchtung ausgewertet.

2.2.2.7 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um bei der Ligation (siehe 3.2.9) eine Rezirkularisierung zu verhindern, wurden die Vektoren nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdärmen (CIP) durch Inkubation für 1 h bei 37 °C an den 5'-Enden dephosphoryliert.

CIP-Ansatz:	2-3 µg	linearisierter Vektor (Plasmid-DNA)
	6 µl	50 mM Tris/HCl, pH 7.5
	1 µl	CIP (1 U/µl)
	<i>ad</i> 60 µl mit ddH ₂ O	

Im Anschluss wurde die CIP für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde phenolisiert und das linearisierte Plasmid mit Ethanol ausgefällt. Zur DNA-Mengenabschätzung wurde ein Aliquot in einem 1 % (m/V) Agarosegel zusammen mit einem DNA-Größenstandard bekannter Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Aliquot des linearisierten, dephosphorylierten Vektors wurde zur Kontrolle in einen Ligationsansatz (siehe 3.2.9) eingesetzt. Nach der Transformation und dem Ausstreichen der Bakterien auf LB(+Antibiotikum)-Platten gibt die Anzahl der Bakterienkolonien Aufschluss über die Qualität der CIP-Behandlung.

2.2.2.8 Auffüllreaktion

Mit dem Klenow-Fragment, der *E. coli*-DNA-Polymerase I ohne 3' 5'-Exonuklease-aktivität, können einzelsträngige, 5'-überhängende Enden von DNA-Fragmenten (*sticky ends*) partiell aufgefüllt werden. Es entsteht ein Doppelstrang mit glatten Enden (*blunt ends*), so dass eine Ligation zwischen zwei DNA-Strängen, die mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden, möglich ist.

Auffüllansatz:	<i>ca.</i> 0.5 µg	DNA-Fragment
	7 µl	10 mM dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
	2 µl	10 x <i>Buffer-for-Klenow</i>
	2 µl	Klenow-Fragment (2 U/µl)
	<i>ad</i> 20 µl mit ddH ₂ O	

Nach Inkubation bei 37 °C für 1 h wurde das Enzym für 10 min bei 68 °C hitzeinaktiviert, die Probe mit Phenol behandelt und das DNA-Fragment mit Ethanol ausgefällt.

2.2.2.9 Ligation

Um rekombinante Plasmide herzustellen und in kompetente Bakterien einzuschleusen wurden DNA-Fragmente (*inserts*) und der Plasmidvektor mit Hilfe einer Ligase über Phosphodiesterbindungen verknüpft.

Standard-Ligationsansatz:	1.5 µl	10 x Ligationspuffer
	1 µl	Vektor (<i>ca.</i> 20 ng)
	5 µl	DNA-Fragment (<i>ca.</i> 100 ng)
	1 µl	T4-Ligase (400 U/µl)
	<i>ad</i> 15 µl mit ddH ₂ O	

Die Inkubation erfolgte bei 16 °C für 16 h.

2.2.2.10 Polymerasekettenreaktion

Mit der *polymerase chain reaction* (PCR) kann enzymatisch *in vitro* ein bestimmter DNA-Abschnitt mit Hilfe zweier Oligonukleotide (*Primer*), die den zu amplifizierenden Bereich in 5'→3'-Richtung begrenzen, vervielfältigt werden. Das Prinzip der PCR 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 und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) oder anderen thermophilen Bakterien. Im Verlauf dieser Arbeit wurden mit Hilfe der PCR-Methode Mutationen in eine DNA-Sequenz eingebracht oder die PCR-Methode wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus vorhandenen cDNA-Vorlagen eingesetzt. Alle PCR-Versuche wurden in einem Thermocycler (PTC-200, MJ-Research) durchgeführt.

2.2.2.10.1 Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit zur Modifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von etwa 2000 bp angewendet.

Standard-PCR-Ansatz: 5 µl	10 x Taq-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 ddH ₂ O

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 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 und Brutlag, 1979).

PCR-Standardprogramm:

	Denaturierung	<i>annealing</i>	Extension
Start	94° C, 3 min		
Zyklen 1-36	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 Schlussexension (Ende) diente dazu, unvollständig synthetisierte Stränge aufzufüllen. Nach Beendigung der PCR wurde ein 10 µl-Aliquot des PCR-Ansatzes auf ein 1 % (m/V) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Beleuchtung analysiert.

2.2.2.10.2 QuikChange™-Site-Directed Mutagenesis Kit

Die Herstellung einiger in der vorliegenden Arbeit beschriebenen mGRK6-Mutanten kodierenden cDNAs erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *QuikChange™-Site-Directed Mutagenesis Kit*, Stratagene, Heidelberg. Dazu wurden nach den Angaben des Herstellers zu einem *supercoiled*, doppelsträngigen DNA-Vektor mit dem gewünschten *insert* Oligonukleotide hergestellt, welche die gewünschte Mutation enthielten. Diese Oligonukleotide sind komplementär zu den gegenteiligen Strängen des Vektors und werden während der Reaktion mit Hilfe der *PfuTurbo* DNA-Polymerase verlängert. So entsteht eine Kopie des DNA-Vektors, die nun ein mutiertes *insert* enthält. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Produkte mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA erkannt, behandelt. Da die Ausgangs-DNA nicht jedoch die in der PCR synthetisierten Produkte die genannten Modifizierungen tragen, kann die Ausgangs-DNA auf diese Weise selektiv entfernt werden. Die Vektor-DNA mit der gewünschten Mutation wurde anschließend durch Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen eingebracht.

Mutations-PCR-Ansatz:	5 µl	10 x Reaktions-Puffer
	1.25 µl	Primer 1 (100 ng/µl)
	1.25 µl	Primer 2 (100 ng/µl)
	1 µl	dNTP-Mix

1 µl Matrizen-DNA (50 ng/µl)
 1 µl *PfuTurbo* DNA-Polymerase (2.5 U/µl)
 ad 51 µl mit ddH₂O

Mutations-PCR-Standardprogramm:

	Denaturierung	<i>annealing</i>	Extension
Start	95 °C, 30 sec		
Zyklen 1-18	95 °C, 30 sec	55 °C, 1 min	68 °C, 2 min pro kb Plasmidlänge
Ende			4°C

Die Anzahl der Zyklen richtete sich nach der Art der Mutation:

Punktmutation:	12 Zyklen
Austausch einzelner Aminosäuren:	16 Zyklen
Deletion, Insertion mehrerer AS:	18 Zyklen

Nach Ablauf der Amplifikation wurde dem Reaktionsansatz 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (10 U/µl) zugesetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl des Ansatzes zu 50 µl kompetenten *E. coli* XL1-Blue gegeben, die Zellen 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s unterzogen. Dies führte zur Aufnahme der zur Transformation zugesetzten Plasmid-DNA. Die Bakterien wurden danach für 2 min auf Eis inkubiert, mit 500 µl NZY-Medium, in dem 12.5 mM MgSO₄, 12.5 mM MgCl₂ und 0.4 % (m/V) Glukose enthalten waren versetzt und die Bakterien schließlich für 60 min unter Standardbedingungen inkubiert. Ein Aliquot dieser Bakterienkultur wurde mit einem Drygalsky-Spatel auf zuvor getrockneten LB (+Antibiotikum)-Platten ausplattiert.

2.2.2.11 Automatisierte, nichtradioaktive DNA-Sequenzanalyse

Bei dem Verfahren der automatisierten, nichtradioaktiven DNA-Sequenzanalyse werden die lineare (*single primer*) PCR und die Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) kombiniert. Bei der *dye terminator*-Methode sind die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. 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 Sequenzer wurde die DNA-Sequenz ermittelt. Die DNA-Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Frau Gierschik, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, Ulm, durchgeführt.

2.2.3 *Spodoptera frugiperda*-Insektenzellkultur

2.2.3.1 Medien

Für die Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*)-Zellen wurden Medien verwendet, die von den Firmen Biowhittaker Bioproducts, Heidelberg und Sigma, Deisenhofen, bezogen wurde. Dem Medium mussten teilweise noch FCS und Antibiotika zugesetzt werden.

Medium für adhärente *Sf9*-Zellkultur:

- 500 ml TNM-FH-Insect-Medium
- 50 ml fötales Kälberserum (steril filtriert, hitzeinaktiviert)
- 500 µl Gentamicin (50 mg/ml)

Medium für *Sf9*-Suspensionskultur:

- Grace's Insect Medium (enthält bereits 10 % FCS und Gentamicin)
- 2 ml Pluronic F-68® (10 % m/V) auf 100 ml Medium
- 1 ml Fungizone® (250 µg/ml) auf 100 ml Medium

2.2.3.2 Kultivierung von *Sf9*-Insektenzellen

Adhärenente *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*)-Zellen wurden in 15 ml TNM-FH-Medium bei 27 °C in 75 cm²-Kulturflaschen (Renner, Dannstadt) kultiviert. Wenn die Zellen konfluent gewachsen waren (*ca.* 2 x 10⁷ Zellen/Flasche), wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen vom Boden der Kulturflaschen mit frischem Medium abgespült, 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. Um die Zellzahl pro ml der Zellsuspension zu ermitteln, wurde ein Aliquot mit Trypanblau-Lösung (0.5 % in 0.85%iger NaCl-Lösung) verdünnt und mittels Neubauer-Zählkammer die ausgezählt. Die Zellzahl betrug im günstigsten Fall 2×10^6 Zellen/ml (das entspricht 800×10^6 Zellen in 400 ml Medium) mindestens jedoch 0.5×10^6 und maximal 3.5×10^6 Zellen/ml. Die Zellsuspension wurde im Fernbachkolben bei 27 °C bei 80 Upm geschüttelt. Die Generationszeit der Zellen betrug unter diesen Umständen ungefähr 36 h.

2.2.4 Proteinexpression in Insektenzellen

Die Proteine wurden in Insektenzellen unter Verwendung des BaculoGold™ Baculovirus-Expressionssystems (Pharmingen, Hamburg) exprimiert. Im Gegensatz zur Expression in bakteriellen Systemen sind in diesem eukaryontischen Expressionssystem die meisten posttranslationalen Modifikationen der rekombinant exprimierten Proteine wie Acetylierungen, 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 und bei der durch homologe Rekombination mit einem entsprechenden Transfervektor (z.B. pVL1392 oder pVL1393) diese Deletion kompensiert werden kann. Des Weiteren findet sich in den Baculovirus-Transfervektoren ein starker Promotor für das viruseigene Polyhedringen. Dieser vorgeschaltete Polyhedrinpromotor kontrolliert nach erfolgreicher Rekombination der einklonierten cDNA in die Baculovirus-DNA die Expression der rekombinanten Proteine. In der modifizierten Baculovirus-DNA ist das Polyhedringen dagegen deletiert.

2.2.4.1 Transfektion von Insektenzellen

Die Insektenzellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode nach Graham und van der Eb (1973) transfiziert. Dazu wurde von frisch umgesetzten, zu 60 % konfluent gewachsenen Insektenzellen (ca. 4×10^6 Zellen pro 25 cm²-Kulturflasche) nach 30 min das Medium abgesaugt und durch 750 µl frisches Zellkultur-Medium ersetzt. Für den Transfektionsansatz wurden 10 µg rekombinanter Transfervektor-DNA und 0.5 µg Baculogold™ Baculovirus DNA gemischt und unter Zugabe von 750 µl Transfektionspuffer für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz erneut 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 der Insektenzellen für 4 h bei 27 °C wurde der Überstand abgenommen, durch neues Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen für 4 Tage bei 27 °C inkubiert. Im Folgenden wurde das Medium, das die rekombinanten Baculoviren enthielt abgenommen und ein Teil in einem Amplifikationsschritt zur Infektion neuer, frisch umgesetzter Insektenzellen eingesetzt. Die restlichen Baculoviren enthaltenen Überstände wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Vor einer Infektion von Insektenzellen zur Proteinexpression musste der Virustiter durch mindestens zwei Amplifikationen erhöht werden.

Transfektionspuffer: 25 mM HEPES/NaOH pH 7.1, 125 mM NaCl, 125 mM CaCl₂

2.2.4.2 Amplifikation der Baculoviren

Um die Viren zu amplifizieren, wurden 6.5×10^6 Sf9-Insektenzellen (das entspricht 60 % konfluente Zellen) in eine 60 cm² Petrischale (Renner, Dannstadt) ausgesät. Nachdem sich die Sf9-Zellen abgesetzt hatten (*ca.* 30 min) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Virusüberstand für 1 h bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurden 10-13 ml Medium zugegeben und die Sf9-Zellen für 3 Tage bei 27 °C kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, abgelöste Zellen durch Zentrifugation entfernt (250 g) und der Überstand (Viruslösung) bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.4.3 Infektion von Insektenzellen

Die Infektion wurde wie die Amplifikation durchgeführt. Die Virusmenge sowie die Dauer der Infektion für eine optimale Expression des rekombinanten Proteins wurden durch Nachweis der exprimierten rekombinanten Proteine im Immunoblot bestimmt. Das Volumen der eingesetzten Virussuspensionen lag zwischen 0.1 und 1 ml pro Petrischale, die Infektion erfolgte über 2 Tage. Um größere Proteinmengen zu produzieren, wurden Suspensionskulturen von Insektenzellen 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 sterilen 50 ml-Röhrchen resuspendiert. Nach Inkubation bei 27 °C für 1 h wurden die Zellen in einen sterilen Fernbachkolben überführt und mit 350 ml Medium auf eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml verdünnt.

2.2.4.4 Proteinpräparation aus *Sf9*-Insektenzellen

Um aus den infizierten *Sf9*-Insektenzellen Proteine zu gewinnen, wurden die Zellen von den Kulturschalen oder -flaschen abgespült. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml Röhrchen überführt und bei 250 g abzentrifugiert. Ebenso wurde mit den Zellen aus den Suspensionskulturen verfahren. Der Virus-Überstand wurde für weitere Infektionen steril abgenommen und bei 4 °C dunkel gelagert. Die Präparation der mGRK6-Proteine wurde im Wesentlichen nach den Angaben von Loudon und Benovic (1994) durchgeführt. Dazu wurde das Zellenpellet einmal mit kaltem CMF-PBS gewaschen, auf Eis überführt und in Extraktionspuffer, der 250 mM NaCl enthielt, resuspendiert (*ca.* 1 ml Puffer pro 2×10^7 Zellen). Die Zellsuspension wurde durch mindestens sechsmaliges auf- und abziehen durch eine 0.5 x 25 mm (18 gauge) Kanüle homogenisiert. Zelltrümmer und Zellorganellen wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 40.000 g und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals für 30 min bei 300.000 g und 4 °C zentrifugiert. Bei kleineren Ansätzen aus Kulturflaschen wurde dieser Überstand (lösliche Fraktion) nach der Proteinbestimmung (siehe 3.5.1) in 50 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Im Falle von Suspensionskulturen wurde von dem Überstand ein Aliquot für Proteinbestimmung, Aktivitätsuntersuchung und SDS-PAGE abgenommen, der weitaus größere Teil (*ca.* 35 ml) wurde 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, 200 µg/ml Benzamidin, 20 µg/ml Leupeptin

2.2.5 Proteinbiochemie

2.2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen der Proteinlösungen wurden durch Doppelbestimmung nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode 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 Proteinstandarlösung (0.34 mg/ml Rinder-IgG) eingesetzt. In die Messungen wurden jeweils 30 µl einer geeigneten Verdünnung (je nach Stärke der Proteinexpression 1:20 bis

1:50 verdünnt) der Proteinlösungen 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 eines Basic-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 wurden ein 1 l - Glasgefäß und ein Magnetührstab mit 85%iger H₃PO₄ gespült und mit ddH₂O gewaschen. Das Coomassie-Brillantblau 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.

2.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE wurde nach der von Laemmli (1970) beschriebenen Methode durchgeführt. Es wurden zwei Vertikalapparaturen eines Sigma-Systems (Sigma Aldrich, Deisenhofen) verwendet: eine Gelapparatur mit Glasplatten der Größe 12.5 x 13.8 cm, sowie eine kleinere Apparatur mit 8 x 10 cm großen Glasplatten. Die Dicke der Abstandshalter betrug jeweils 1 mm. Zur Herstellung der Gele wurden zunächst die Komponenten der Trenngellösung gemischt und zwischen die Glasplatten gegossen.

Trenngellösung:

Prozent (m/V)	10 %
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	
Monomerlösung	10 ml
Trenngelpuffer	7.5 ml
H ₂ O	12 ml
10% (m/V) SDS	0.3 ml
10% (m/V) APS	150 µl
TEMED	10 µl

Vor der Zugabe von SDS, APS und TEMED wurde die Lösung kurz entgast. Die angegebene Menge von 30 ml war für vier kleine Gele ausreichend, für die gleiche Anzahl größerer Gele wurde das 3-fache Volumen benötigt. Die Trenngellösung wurde mit H₂O überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Wasser abgekippt, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und der Kamm eingesetzt.

Sammelgellösung:

Prozent (m/V)	6 %
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	
Monomerlösung	2 ml
Sammelgelpuffer	2.5 ml
H ₂ O	5.3 ml
10% (m/V) SDS	100 µl
10% (m/V) APS	50 µl
TEMED	5 µl

Die angegebene Menge von *ca.* 10 ml war für vier kleine Gele ausreichend, für die größeren Gele waren etwa 25 ml nötig. Die Proteinproben sowie die Markerproteinlösung wurden mit gleichen Volumina 2 x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und in die mit 1 x Tankpuffer gespülten Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wurde in 1 x Tankpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA/Gel oder bei konstanter Spannung von 105 V für kleine Gele durchgeführt. Die Auftrennung wurde beendet, wenn der Farbstoffmarker 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 ddH ₂ O gelöst, der pH mit ca. 9 ml konz. HCl auf 6.8 eingestellt, mit ddH ₂ O auf 200 ml aufgefüllt und die Lösung über einen 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) Pyronin Y

2.2.5.3 Coomassie Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen

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

Färbelösung:	0.14 % (m/V) Coomassie Brilliantblau R 250, 50 % (V/V) Methanol, 10 % (V/V) Essigsäure
---------------------	---

Entfärbelösung:	10 % (V/V) Methanol, 10 % (V/V) Essigsäure
------------------------	--

2.2.5.3.1 Trocknen von gefärbten Gelen

Um Gele für längere Zeit aufbewahren zu können, wurden diese mit dem Easy Breeze-System (Hoefer-Amersham Pharmacia, Freiburg) getrocknet. Hierzu wurden die Gele über Nacht in 5 % (V/V) Glycerin eingelegt, danach luftblasenfrei zwischen zwei, in warmem Leitungswasser vorgequollene Cellulosefolien in einen Rahmen eingespannt und für etwa 4 h in dem *Gel Dryer* getrocknet.

2.2.5.4 Immunoblotting von Proteinen (*Western Blot*)

Um Proteine mit spezifisch gegen sie gerichteten Antikörpern nachzuweisen, wurden die Proteine bzw. das Proteingemische zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

2.2.5.4.1 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen

Nach der SDS-PAGE wurden das Gel und ein Stück Nitrocellulosemembran (Protran, Schleicher & Schuell, BioScience, Dassel) 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, Bioscience) in eine Plastikhalterung eingespannt und in die mit Transferpuffer I gefüllte Immunoblot-Transferkammer überführt. Damit die negativ geladenen Proteine aus dem Gel zur Membran hinwanderten, war das Gel war der Kathode, die Membran der Anode zugewandt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 125 mA und einer Leistung von 2 W für 12 h. Der Bereich der Membran, auf den die Markerproteine transferiert worden waren, wurde nach dem Transfer abgetrennt, kurz in ddH₂O gewaschen und die transferierten Markerproteine mit Ponceaurot (0.2 % (m/V)) oder blauer Tinte (0.1 % (V/V) in 0.3 % (V/V) Tween 20-Lösung) gefärbt und anschließend markiert.

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 (Hoefer™ miniVE) eingesetzt. Die eigentliche Blotkammer besteht aus zwei nach außen abgedichteten Graphitplatten (Anode und Kathode), zwischen denen das Sandwich aus Blotpapier, Gel, Nitrocellulosemembran 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 1.25 h auf die Membran transferiert.

Transferpuffer II: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (V/V) Methanol,
0.1 % (m/V) SDS pH 8.6

2.2.5.4.2 Immunchemischer Nachweis transferierter Proteine

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu blockieren, wurde die Membran nach dem Transfer für 1 h in Blotto inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem in Blotto 1:500 verdünnten ersten Gegen mGRK6-Proteine gerichteten Antikörper überführt und für 1 h schwenkend inkubiert. Der Antikörperlösung enthielt 0.05 % (m/V) Thimerosal als Konservierungsmittel. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBS/Tween wurde der zweite, in Blotto 1:2000 verdünnte Antikörper (Peroxidasegekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG) für 30-60 min auf den Blot gegeben. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS/Tween und einmal mit TBS (jeweils für 5 min) gewaschen. Sämtliche Inkubationen wurden bei Raumtemperatur auf einem Schwenker durchgeführt. Der Nachweis der Immunkomplexe erfolgte mit Hilfe des ECLTM-Systems durch Inkubation der Membran in einer 1:1-Mischung der Lösungen 1 und 2 für 1 min. Die Chemolumineszenzsignale wurden durch Schwärzung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

TBS:	10 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl
TBS/Tween:	0.05 % (V/V) Tween 20 in TBS
Blotto:	5 % (m/V) Magermilchpulver in TBS/Tween

2.2.6 Chromatographische Methoden

Alle säulenchromatographischen Auftrennungen wurden bei 4 °C durchgeführt.

2.2.6.1 Kationenaustausch-Chromatographie

Die Anreicherung der in *Sf9*-Insektenzellen rekombinant hergestellten Rezeptorkinasen wurde unter Verwendung einer Kationenaustausch-Chromatographie an einer SP-Sephrose-Matrix (Amersham Pharmacia) nach den Angaben von Loudon und Benovic (1994) durchgeführt. Die dafür verwendeten 1 ml bzw. 5 ml-HiTrap®-Säulen und das FPLC-System stammten von Amersham Pharmacia. Die Säulen wurden mit Extraktionspuffer mit 12.5 % (V/V) NaCl (für mGRK6-B und mGRK6-B-Varianten) äquilibriert. Die verdünnten Proben (bis 66 ml, je nach Säulenvolumen 40 bis 400 mg Gesamtprotein) wurden filtriert (0.45 µm) und auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate

betrug 0.5 ml/min für 1 ml-Säulen und 1 ml/min für 5 ml-Säulen, gesammelt wurden 1 ml-Fraktionen. Die Matrix wurde mit 8 (5 ml-Säule) bzw. 40 (1 ml-Säule) Säulenvolumina gewaschen und die Proteine mit einem linearen 50 ml-NaCl-Gradient von (x-y mM) eluiert. Die Analyse der in den Fraktionen enthaltenen Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und Immunoblotting sowie durch Coomassie-Brillantblau-Färbung.

HE-Puffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EDTA pH7.5, 1 mM DTT,
0.5 mM PMSF, 20 µg/ml Leupeptin, 200 µg/ml Benzamidin

HE-Puffer + 1 M NaCl

2.2.6.2 Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose

Zur weiteren Reinigung der über Kationenaustausch-Chromatographie angereicherten Proteine wurde eine Affinitätschromatographie an einer Heparin-Sepharose-Matrix (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Dazu wurde die Heparin-Sepharose-Matrix der 1 ml-HiTrap[®]-Säule mit Hilfe des FPLC- oder ÄKTA-Systems (Amersham Pharmacia) mit Extraktionspuffer mit der gewünschten NaCl-Konzentration äquilibriert (von 150 bis 200 mM NaCl). Um die Salzkonzentration der Proteinlösungen vor dem Auftrag auf die Säule zu reduzieren wurde gegebenenfalls Extraktionspuffer ohne NaCl eingesetzt. Nach dem Waschen der Matrix mit 40 Säulenvolumina Extraktionspuffer (Flussgeschwindigkeit 0.5 ml/min) wurde das Protein mit einem linearen Gradienten von NaCl in Extraktionspuffer (z. B. 0.2-1 M NaCl für mGRK6-B Mut2) eluiert. Die Analyse der in den Fraktionen (1 ml) enthaltenen Proteine erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Brillantblau-Färbung und Immunoblot, sowie durch den Nachweis der Phosphorylierung der löslichen Substrate Phosvitin und Casein und der lichtabhängigen Phosphorylierung von Rhodopsin.

2.2.6.3 Gelfiltration

Um die Salzkonzentration des sequentiell gereinigten, rekombinanten Proteins der mGRK6-B-Varianten und -Mutanten zu reduzieren, wurde im Anschluss an die Affinitätschromatographie eine Gelfiltration durchgeführt. Für das SMART-System wurde eine *Fast Desalting*TM PC 3.2/10-Fertigsäule von Amersham Pharmacia verwendet, die mit Sephadex G-25 SuperfineTM-Gel befüllt war. Die Flussgeschwindigkeit betrug 50 µl/min, es wurden 50 µl-Fraktionen 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 über SDS-Page und *Western blot* oder Coomassie-Brillantblau-Färbung kontrolliert.

Puffer S: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EDTA pH 7.5, 1 mM DTT, 100 mM NaCl

2.2.7 *In vitro*-Bestimmung der Kinaseaktivität von GRKs

Zur Ermittlung der Aktivität der Kinasen G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GRKs) verschiedener Substrate in eine Phosphorylierungsreaktion mit den Kinasen eingesetzt. Die Kinasen übertragen in Anwesenheit von [γ -³²P]ATP die radioaktiv markierte γ -Phosphatgruppe des Adenosintriphosphates auf das Substrat. Das auf diese Weise radioaktiv markierte, phosphorylierte Substrat kann nach Auftrennung über SDS-PAGE autoradiographisch nachgewiesen werden.

2.2.7.1 Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Phosvitin als Substrat

Die Aktivität der GRKs mit Phosvitin als Substrat wurde in Anlehnung an Loudon und Benovic (1994) bestimmt. Phosvitin ist ein 45 kD großes saures Protein, das als lösliches Substrat für die hGRK6 beschrieben wurde (Loudon und Benovic, 1994). Die zu untersuchende GRK (5-10 μ M) wurde in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM MgCl₂ zusammen mit 6.25 μ g Phosvitin (Sigma, Deisenhofen) und 1.3 μ l ATP-Mix (final 100 μ M ATP) für 1 h bei 30 °C in 15 μ l Gesamtvolumen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l 2 x Probenpuffer (siehe 3.5.2) gestoppt und die Proteine über SDS-PAGE auf einem 10 % Acrylamidgel bei konstanter Stromstärke (105 V) aufgetrennt. Die radioaktiven Proteine wurden durch Exposition des Coomassie-Brillantblau-gefärbten Gels mit einem Röntgenfilm nachgewiesen. Die Exposition des Gels mit dem Röntgenfilm wurde bei -80 °C in einer Filmkassette durchgeführt.

ATP-Mix (für 19 Ansätze):	19 μ l	1.5 mM ATP
	5 μ l	[γ - ³² P]ATP (10 mCi/ml, >5000 Ci/mmol)

2.2.7.2 Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Casein als Substrat

Als weiteres lösliches Substrat wurde Casein in eine Phosphorylierungsreaktion mit den GRKs eingesetzt (DeBurman *et al.*, 1996). Hierfür wurden GRKs (5-10 μM) in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM MgCl_2 zusammen mit 2.25 μg Casein (Sigma, Deisenhofen) und 1.3 μl ATP-Mix (final 100 μM ATP) für 10 min bei 37 °C in 15 μl Gesamtvolumen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl 2 x Probenpuffer (siehe 3.5.2) gestoppt und die Proteine über SDS-PAGE auf einem 10 % Acrylamidgel bei konstanter Stromstärke (105 V) aufgetrennt. Die radioaktiven Proteine wurden durch Exposition des Coomassie-Brilliantblau-gefärbten Gels mit einem Röntgenfilm nachgewiesen. Die Exposition des Gels mit dem Röntgenfilm wurde bei -80 °C in einer Filmkassette durchgeführt.

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)

2.2.7.3 Lichtabhängige Phosphorylierung von Rhodopsin durch GRKs

2.2.7.3.1 Präparation der äußeren Segmente von Stäbchenzellen der Rindernetzhaut und Inaktivierung der Rhodopsinkinase

Neben der Phosphorylierung der löslichen Substrate Phosvitin und Casein sollte auch der membranständige Lichtrezeptor Rhodopsin in eine Phosphorylierungsreaktion mit den GRKs eingesetzt werden. Das Rhodopsin wurde aus der Netzhaut von Rinderaugen isoliert. Die Membranen der äußeren Segmente von Stäbchenzellen (*rod outer segments*, ROS) der Rindernetzhaut enthalten 10^5 Moleküle Rhodopsin pro μm^2 (Alberts *et al.*, 1987). Die Präparation dieser rhodopsinreichen ROS-Membranen wurde nach Papermaster (1982) bei 4 °C unter Rotlicht durchgeführt. Vom Schlachthof wurden 25 an Dunkelheit adaptierte Rinderaugen frisch geschlachteter Tiere bezogen. Die vorderen Abschnitte und der Glaskörper der Rinderaugen wurden entfernt und die Retina durch Zugabe von Puffer A vom Augenhintergrund abgelöst und am optischen Nerv abgetrennt. Die 25 Retinas wurden in 15 ml Homogenisationspuffer mit einem Teflon-Homogenisator homogenisiert, indem der Pistill dreimal auf- und abgezogen wurde. Das Homogenat wurde 4 min bei 4000 Upm (JA 20-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Messzylinder

gesammelt, das Pellet nochmals in 15 ml Homogenisationspuffer homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Zu den vereinigten Überständen (*ca.* 40 ml) wurden unter Rühren langsam 2 Volumen 10 mM Tris/Acetate pH 7.4 gegeben und diese Lösung erneut bei 4000 Upm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen, das Pellet in 0.77 M Saccharose in 1 mM Tris/Acetate pH 7.4, 0.1 mM MgCl₂ resuspendiert, indem die Lösung dreimal durch eine Stahlkanüle (Nr. 18) gezogen und für 5 s mit dem Ultra-Turrax gemischt wurde. Das gesamte Volumen der Lösung von 4 ml wurde auf einen Saccharosedichtegradienten (Zentrifugenröhrchen gefüllt mit 15 ml 1.14 M, 15 ml 1.0 M und 12 ml 0.84 M Saccharose in 1 mM Tris/Acetate pH 7.4, 0.1 mM MgCl₂) aufgetragen und 30 min bei 24.000 Upm (SW25.2-Rotor) zentrifugiert. Mit Hilfe einer Kanüle wurde die rötlich scheinende Interphase zwischen 0.84 und 1.0 M Saccharose abgenommen (*ca.* 5 ml), mit 1 Volumen 10 mM Tris/Acetate pH 7.4 gemischt und bei 20.000 Upm (JA20-Rotor) für 20 min pelletiert. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Inaktivierung der Rhodopsinkinase erfolgte mit 5 M Harnstoff nach der von Shichi und Somers (1978) beschriebenen Methode. Alle Arbeiten wurden bei 4 °C unter Rotlicht durchgeführt. Das Rhodopsin-enthaltende Pellet aus der Präparation der Retinazellen (siehe 3.7.1.3.1) wurde aufgetaut, in 25 ml (1 ml/Retina) Puffer B resuspendiert und die Suspension für 3 min auf Eis mit Ultraschall behandelt. Die Suspension wurde mit 2 Volumen 50 mM Tris/HCl pH 7.4 verdünnt und 45 min mit 100.000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden vereinigt, viermal mit 50 mM Tris/HCl pH 7.4 gewaschen und am Ende in 500 µl 50 mM Tris/HCl pH 7.4 resuspendiert, indem die Probe sechsmal durch eine 0.5 x 25 mm Kanüle und dreimal durch eine 0.4 x 20 mm Kanüle auf- und abgezogen wurde. Nach der Proteinbestimmung (siehe 3.5.1) wurden die Rhodopsin enthaltenden ROS-Membranen aliquotiert (10 µl pro Aliquot), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C dunkel gelagert.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Präparationen wurden freundlicherweise von Frau Petra Vatter und Herrn Norbert Zanker, Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm, durchgeführt.

Puffer A: 100mM NaH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂
pH 6.5, 0.1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin, 1 µM

Pepstatin, 3 mM Benzamidin, 1 µg/ml
Trypsininhibitor

Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 5 M
Harnstoff

Homogenisationspuffer: 34 % (m/V) Saccharose, 65 mM NaCl, 0.2 mM
MgCl₂, 5 mM Tris/Acetat pH 7.4

2.2.7.3.2 Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Rhodopsin als Substrat

Die Aktivität der GRKs mit Rhodopsin als Substrat wurde ebenfalls in Anlehnung an Loudon und Benovic (1994) bestimmt. Dazu wurden Rhodopsin und der ATP-Mix 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 µl	GRK (5-10 µM)
	1 µl	ROS-Membranen (in unterschiedlichen Konzentrationen, z.B. 120 nM, d.h. 1:100 Verdünnung in 50 mM Tris/HCl pH 7.4)
	1.3 µl	ATP-Mix [1 µl 1.5 mM ATP, 0.3 µl [γ - ³² P]ATP (10 mCi/ml)]
	<i>ad</i> 15 µl mit ddH ₂ O	

Die Belichtung erfolgte für 10 min bei 30 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine auf einem 10 % Acrylamidgel bei einer konstanten Spannung von 105 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die radioaktiven Proteine wurden durch Exposition des Coomassie-Brilliantblau-gefärbten Gels mit einem Röntgenfilm nachgewiesen. Die Exposition des Gels über Nacht mit dem Röntgenfilm wurde bei -80 °C in einer Filmkassette durchgeführt.

10 x TEM-Puffer: 200 mM Tris/HCl pH 7.5, 20 mM EDTA und 37 mM MgCl₂

2.2.8 Untersuchung von GRK-Lipid-Wechselwirkungen

Die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen mGRK6-B-Varianten und -Mutanten mit Phospholipiden wurde mit Hilfe von künstlichen Lipidvesikeln nach der von Pronin *et al.* (1998) beschriebenen Methode durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden die säulenchromatographisch gereinigten mGRK6-B-Proteine (siehe 3.6) eingesetzt.

2.2.8.1 Herstellung von Lipidvesikeln

Die Phospholipidvesikel wurden mit Hilfe von L- α -Phosphatidylcholin (PtdCho) und Phosphatidylinosit-4,5,bisphosphat (PtdInsP₂) hergestellt. Dazu wurden PtdCho in einer Konzentration von 10 mg/ml und PtdInsP₂ in einer Konzentration von 5 mg/ml in Chloroform gelöst und bei 4 °C dunkel gelagert. Um die verschiedenen Vesikel herzustellen, wurden die in Chloroform gelösten Phospholipide in dem gewünschten Verhältnis in einem Glasröhrchen gemischt und unter Stickstoff-Atmosphäre eingedampft. Als Grundsubstanz für die Vesikel diente PtdCho, dem 5 % (m/V) PtdInsP₂ zugesetzt worden war. Das eingedampfte 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 M EDTA pH 8.0

2.2.8.2 Bindungsexperimente an Lipidvesikel

Die Bindung der verschiedenen mGRK6-B-Varianten und -Mutanten an Phospholipide wurde durch Inkubation von *ca.* 30 pmol der jeweiligen Kinase ohne und mit frisch hergestellten Phospholipidvesikeln (0.017, 0.17, 1.7 und 10 mg Phospholipid pro ml) in Inkubationspuffer untersucht. Dazu wurde das Reaktionsgemisch 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) getrennt. 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. Die Verteilung der

mGRK6-B-Proteine in den verschiedenen Fraktionen wurde mittels *Western blot*-Analysen (siehe 3.5.4) untersucht.

Inkubationspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl

3 Ergebnisse

3.1 Varianten und Mutanten der murinen GRK6

Die Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen. GRKs regulieren die Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs), indem sie diese an Serin- bzw. Threoninresten phosphorylieren und auf diese Weise inaktivieren. Von der Kinase G-Protein-gekoppelter Rezeptoren Typ 6 der Maus (mGRK6) wurden in der Arbeitsgruppe vier cDNAs isoliert, mGRK6-A, -B, -C und mGRK6-D, die für verschiedene Isoformen der Rezeptorkinase kodieren (Moepps *et al.*, 1999). Die Isoformen von mGRK6 gehen durch alternatives *Splicen* aus einer hnRNA hervor und die kodierten Proteine unterscheiden sich in der Anzahl ihrer Aminosäuren. So ist mGRK6-D mit 244 Aminosäuren die kürzeste der Varianten, gefolgt von mGRK6-C mit 560 Aminosäuren, mGRK6-A mit 576 Aminosäuren und mGRK6-B mit 589 Aminosäuren. Dabei sind die Varianten der mGRK6, mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C bis zu der Aminosäure 559 identisch und unterscheiden sich nur in ihren carboxylterminalen Abschnitten (siehe Abb. 3). Für diesen Abschnitt wird angenommen, dass er für die Interaktion der Kinasen mit der Plasmamembran von entscheidender Bedeutung ist. In Untersuchungen zur Bedeutung des carboxylterminalen Abschnittes wurden in diesem Aminosäuren identifiziert, die durch posttranslationale Veränderungen wie Lipidmodifikationen eine Interaktion mit der Plasmamembran ermöglichen (Moepps *et al.*, 1999; Krupnick und Benovic, 1998; Loudon und Benovic, 1994). So wurde für die drei Cysteine C⁵⁶¹, C⁵⁶², und C⁵⁶³ im carboxylterminalen Abschnitt der humanen GRK6-A beschrieben, dass diese posttranslational palmitoyliert werden. Sowohl die humane GRK6-B- als auch die murine mGRK6-B-Isoform weisen in ihren carboxylterminalen Abschnitten Aminosäuren auf, die möglicherweise einer Phosphorylierung durch die Proteinkinase C sowie durch cAMP- und cGMP-regulierte Kinasen unterliegen. Für die humane GRK5 war gezeigt worden, dass die Interaktion dieser Kinase mit der Plasmamembran über die Phosphorylierung von Aminosäuren im carboxylterminalen Abschnitt reguliert wird (Pronin *et al.*, 1998). Die mGRK6-C-Isoform wird wegen ihres verkürzten carboxylterminalen Abschnittes voraussichtlich weder palmitoyliert noch phosphoryliert.

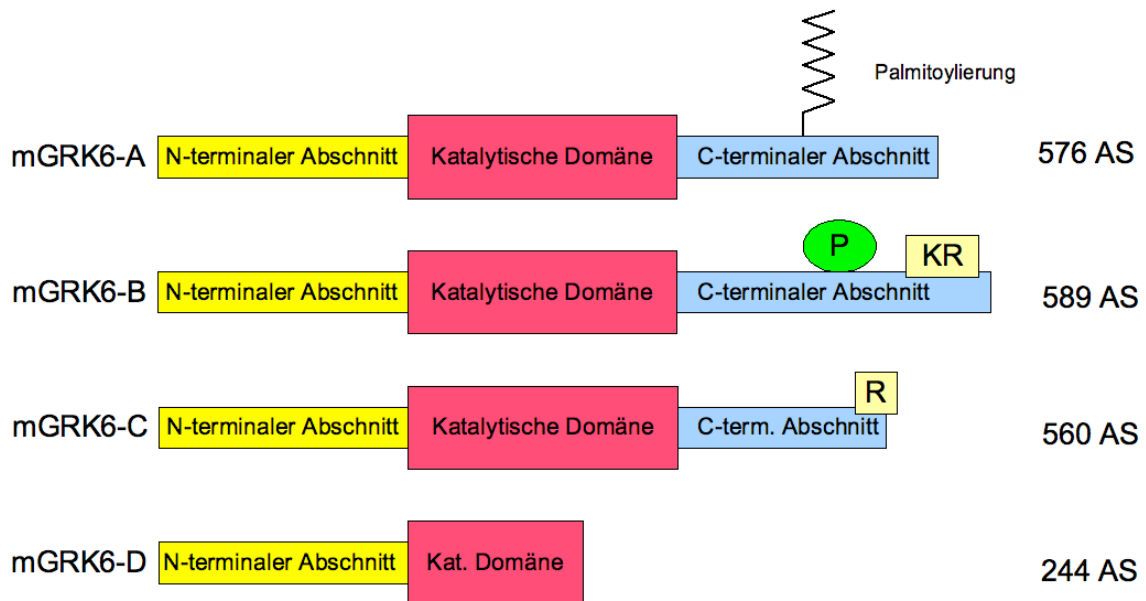


Abb. 3: Schematische Darstellung der Spleißvarianten der murinen GRK6. Die Isoformen der murinen GRK6 (mGRK6) sind schematisch dargestellt. Die Anzahl der Aminosäuren [AS] ist auf der rechten Seite angegeben. Im Bereich des carboxylterminalen (C-terminalen) Abschnittes sind neben basischen Aminosäuren (Lysin [K] und Arginin [R]) mögliche posttranslationale Modifikationen wie Palmitoylierung und Phosphorylierung [P] bezeichnet.

In weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die murinen GRK6-Varianten mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C in der Lage waren, den membranständigen G-Protein-gekoppelten Lichtrezeptor Rhodopsin zu phosphorylieren (Vatter *et al.*, 2005). Dabei war für die Isoform mGRK6-C eine höhere Phosphorylierungsaktivität beobachtet worden als für die Varianten mGRK6-A und mGRK6-B (Vatter *et al.*, 2005). Ausgehend von dieser Beobachtung war damit begonnen worden, sowohl den Einfluss des im Vergleich zu der Isoform mGRK6-C längeren carboxylterminalen Abschnittes von mGRK6-A als auch von mGRK6-B auf die Phosphorylierungsaktivität und auf die Interaktion der Kinasen mit der Plasmamembran näher zu untersuchen (Dissertation Vatter, 2000; Dissertation Samel, 2007). Im Falle der mGRK6-B waren im Rahmen einer Doktorarbeit durch sukzessive Verkürzung der cDNA der wildtypischen mGRK6-B um 39, 54 bzw. 66 Nukleotide drei Mutanten hergestellt worden (siehe Abb. 4), die mit mGRK6-B Mut1 bis Mut3 bezeichnet wurden und für Proteine mit 567 Aminosäuren (mGRK6-B Mut1), 571 Aminosäuren (mGRK6-B Mut 2) bzw. 567 Aminosäuren (mGRK6-B Mut3) kodieren (Dissertation Vatter, 2000).

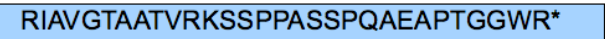
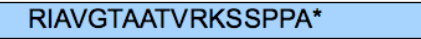
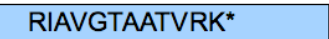
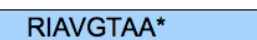
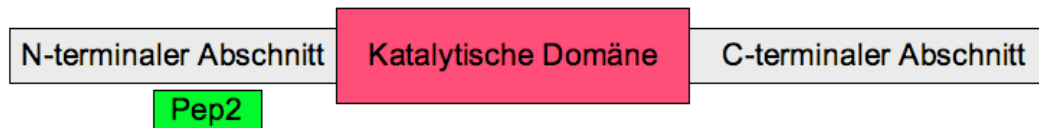
	Aminoterminaler Abschnitt		Carboxylterminaler Abschnitt	
mGRK6-B		...		589 AS
mGRK6-B Mut1		...		576 AS
mGRK6-B Mut2		...		571 AS
mGRK6-B Mut3		...		567 AS
mGRK6-C		...		560 AS

Abb. 4: Dargestellt sind die Primärstrukturen der carboxylterminalen Abschnitte der wildtypischen Varianten mGRK6-B und mGRK6-C sowie der Mutanten mGRK6-B Mut1, mGRK6-B Mut2 und mGRK6-B Mut3 der murinen mGRK6-B. Die Anzahl der Aminosäuren (AS) für die einzelnen Varianten und Mutanten ist auf der rechten Seite angegeben. Ausgehend von der wildtypischen Variante mGRK6-B waren folgende Verkürzungen vorgenommen worden: mGRK6-B Mut1 wurde um 13 AS, mGRK6-B Mut2 um 18 AS und mGRK6-B Mut3 um 22 AS verkürzt. Die Variante mGRK6-C ist 29 AS kürzer als die Variante mGRK6-B. Im dargestellten carboxylterminalen Abschnitt sind jeweils die letzten Aminosäuren angegeben. Das Ende der Aminosäuresequenz ist durch ein Sternchen (*) markiert.

A= Alanin, D= Asparaginsäure, E= Glutaminsäure, G= Glycin, I= Isoleucin, K= Lysin, L= Leucin, N= Asparagin, P= Prolin, Q= Glutamin, R= Arginin, S= Serin, T= Threonin, V= Valin, W= Tryptophan

Die trunkierten mGRK6-B-Mutanten waren in ihrer Aktivität untersucht worden, das membranständige Substrat Rhodopsin zu phosphorylieren. In diesen Untersuchungen war beobachtet worden, dass die Mutanten mGRK6-B Mut1 und mGRK6-B Mut2 gegenüber dem wildtypischen mGRK6-B-Protein eine gesteigerte Phosphorylierungsaktivität aufwiesen. Interessanterweise hatte die weitere Verkürzung der Aminosäuresequenz, wie sie in der Mutante mGRK6-B Mut3 vorgenommen worden war, eine Abnahme der Phosphorylierungsaktivität zur Folge (Dissertation Vatter, 2000). Aufgrund der unterschiedlichen Expression der rekombinanten Proteine in den *Sf9*-Insektenzellen war es in diesen vorausgegangenen Phosphorylierungsversuchen nötig gewesen unterschiedliche Mengen von Proteinlösungen einzusetzen, um ähnliche Mengen an GRK6-Proteinen im Reaktionsansatz zu erzielen. Dies hatte in den einzelnen Versuchsansätzen zu Unterschieden in den finalen NaCl-Salzkonzentrationen geführt. Im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst der Frage nachgegangen

werden, ob sich die Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-B-Mutanten auch unter standardisierten Bedingungen mit einer NaCl-Konzentration von 17 mmol in ihrer Phosphorylierungsaktivität unterscheiden. Die NaCl-Konzentration von 17 mmol wurde gewählt, da sie deutlich unter dem für die GRK6 beschriebenen IC₅₀ lag (Loudon und Benovic, 1994). Die Mengen der in die Phosphorylierungsassays eingesetzten mGRK6-Proteine wurden unter Verwendung des mGRK6 spezifischen Anti-Pep2-Antikörpers (Dissertation Vatter, 2000) über einen Immunoblot abgeglichen. Der dazu verwendete Antikörper ist gegen ein Epitop im aminoterminalen Abschnitt der mGRK6 gerichtet und ist damit in der Lage, alle mGRK6-Isoformen sowie die trunkierten Mutanten zu erkennen.



Pep2 = AS 87 – 101: H₂N - VSE YE V TPD EKR KAC - CONH₂

Abb. 5: Aminosäuresequenz des synthetischen Peptids zur Herstellung des polyklonalen Anti-Pep2-Antikörpers und Lokalisation innerhalb des mGRK6-Polypeptids. Die Aminosäuresequenz des für die Immunisierung von Kaninchen synthetisierten Peptids Pep2 ist dargestellt. Die Lage des Epitops innerhalb des mGRK6-Polypeptids, das durch den polyklonalen Anti-Pep2-Antikörper erkannt wird, ist gekennzeichnet.

A= Alanin, C= Cystein, D= Asparaginsäure, E= Glutaminsäure, K= Lysin, P= Prolin, R= Arginin, S= Serin, T= Threonin, V= Valin, Y= Tyrosin

Die in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die trunkierten mGRK6-B-Mutanten auch bei standardisierten Bedingungen mit einer NaCl-Konzentration von 17 mmol den Lichtrezeptor Rhodopsin phosphorylierten.

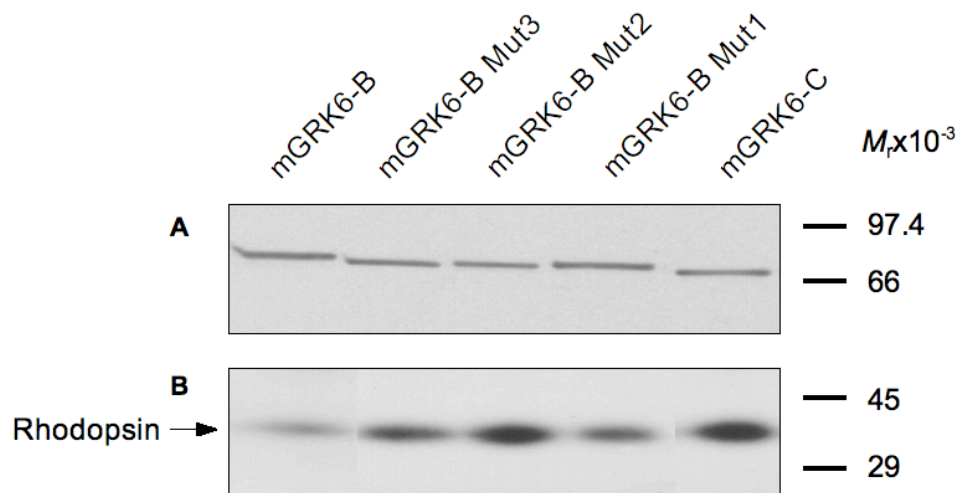


Abb. 6: Phosphorylierung von Licht-aktiviertem Rhodopsin durch mGRK6-Varianten und mGRK6-B-Mutanten. Die in den 300.000 g-Überständen infizierter *Sf9*-Zellen enthaltenen Proteine der mGRK6-Varianten und -Mutanten wurden über einen Immunoblot auf gleiche Proteinmengen eingestellt (A). Die rekombinanten mGRK6-Proteine wurden anschließend in 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM $MgCl_2$ mit 240 nM Rhodopsin in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ für 5 min bei 30 °C belichtet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Probenpuffer gestoppt. Die Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und fixiert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm mit dem getrockneten Gel exponiert (B). Die Positionen des Rhodopsins und der Molekulargewichtsstandards sind angegeben.

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass die Verkürzung des carboxylterminalen Abschnittes im Falle der mGRK6-B Mut1 und mGRK6-B Mut2 jeweils eine Steigerung der Phosphorylierungsaktivität der Mutanten gegenüber der wildtypischen mGRK6-B-Variante zur Folge hat. Eine weitere Verkürzung (mGRK6-B Mut3) führte zu einer Abnahme der Phosphorylierungsaktivität. Das stärkste Phosphorylierungssignal war der mGRK6-B Mut2-Mutante zuzuordnen, dieses lag auf einem ähnlichem Niveau wie das Phosphorylierungssignal der wildtypischen mGRK6-C-Variante. Die Ergebnisse der Phosphorylierungsversuche unter standardisierten Versuchsbedingung mit einheitlichen NaCl-Konzentrationen stimmten somit mit den zuvor gemachten Beobachtungen überein (Dissertation Vatter, 2000). Die dabei festgestellten Unterschiede in der Phosphorylierung des Substrates Rhodopsin waren jedoch zwischen den mGRK6-Varianten und -Mutanten weniger deutlich ausgeprägt.

3.2 Chromatographische Reinigung der wildtypischen mGRK6-B-Variante und der mGRK6-B-Mutanten Mut1, Mut2 und Mut3

In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe und anderer Arbeitsgruppen war gezeigt worden, dass der carboxylterminalen Abschnitt der GRK6-Proteine eine wichtige Rolle für die Interaktion der Kinasen mit Phospholipiden und damit für die Membraninteraktion spielt (Pitcher *et al.*, 1996; Pronin *et al.*, 1998; Vatter *et al.*, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich daher die Frage, ob die Verkürzungen des carboxylterminalen Abschnitt der mGRK6-B zu Änderungen in der Interaktion mit Phospholipiden führen und auf diese Weise die Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-B-Mutanten beeinflussen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Bindungsstudien mit gereinigten mGRK6-Proteinen an Phospholipidvesikeln durchgeführt. Hierfür wurden die wildtypische mGRK6-B-Variante und die mGRK6-B-Mutanten Mut1, Mut2 und Mut3 als rekombinante Baculoviren hergestellt, die rekombinanten Proteine in infizierten *Sf9*-Insektenzellen exprimiert und aus Insektenzelllysaten sequentiell unter Anwendung einer Kationenaustausch- und einer Heparin-Affinitätschromatographie gereinigt.

3.2.1 Chromatographische Reinigung der wildtypischen mGRK6-B-Variante

Um für die chromatographische Aufreinigung der wildtypischen mGRK6-B-Variante eine ausreichende Menge an rekombinantem Protein zu produzieren, wurden *Sf9*-Zellen in 400 ml Medium in Fernbachkolben kultiviert und mit mGRK6-B-kodierenden Baculoviren für 48 h inkubiert. Die Zellen wurden mit Extraktionspuffer in Anwesenheit von 250 mM NaCl aufgeschlossen und 300.000 g-Überstände gewonnen. Der anhand der Aminosäuresequenz berechnete pI-Wert (PHYSICHEM; PC/GENE-Programm) der wildtypischen Rezeptorkinase mGRK6-B beträgt pI 8.73. Dies bedeutet, dass das wildtypische mGRK6-B-Protein bei einem pH-Wert 7.5 an der SP-Sepharose-Matrix, einer Kationenaustauschermatrix, angereichert werden kann. Um die Salzkonzentration auf 125 mM NaCl in den 300.000 g-Überstände zu reduzieren, wurden diese mit NaCl-freiem Extraktionspuffer verdünnt. Im Anschluss wurden die in den 300.000 g-Überstände enthaltenen Proteine an der SP-Sepharose-Matrix chromatographiert. Die Proteine aus den Fraktionen 11 bis 23 (200 bis 295 mM NaCl), die im Bereich um den *peak* mit der höchsten Proteinmenge lagen, wurden mittels SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE, 10 %

(m/V)) elektrophoretisch aufgetrennt und zum einen mit Coomassie-Brillantblau gefärbt, zum anderen auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (Abb. 7). Im Coomassie-Brillantblau behandelten Gel wurde insbesondere in den Fraktionen 13 bis 17 ein angereichertes Protein mit einer molekularen Masse von ~ 67 kD angefärbt. Die immunchemische Analyse bestätigte, dass es sich hierbei um das rekombinante wildtypische mGRK6-B-Protein handelte. In dem im Vergleich zu der Coomassie-Brillantblau-Färbung sensitiveren *Western blot* wurde auch in den benachbarten Fraktionen (11, 19 bis 23) noch wildtypisches mGRK6-B-Protein detektiert. Der Immunoblot zeigte auch, dass das Protein der wildtypischen Rezeptorkinase mGRK6-B quantitativ an die Säulenmatrix gebunden hatte, da dieses im Durchfluss nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 7). Die Fraktionen 12 bis 18 (210 bis 260 mM NaCl), in denen sich der überwiegende Anteil an mGRK6-B-Protein befand, wurden vereinigt und die enthaltenen Proteine an einer Heparin-Sepharose-Affinitätsmatrix chromatographiert. Da das mGRK6-B-Protein in der vorausgegangenen Kationenaustauschchromatographie bereits bei einer Konzentration von 210 mM NaCl im Elutionspuffer von der Säule eluierte, wurde die NaCl-Konzentration im Puffer durch Zugabe von NaCl-freiem Extraktionspuffer auf nur 150 mM reduziert.

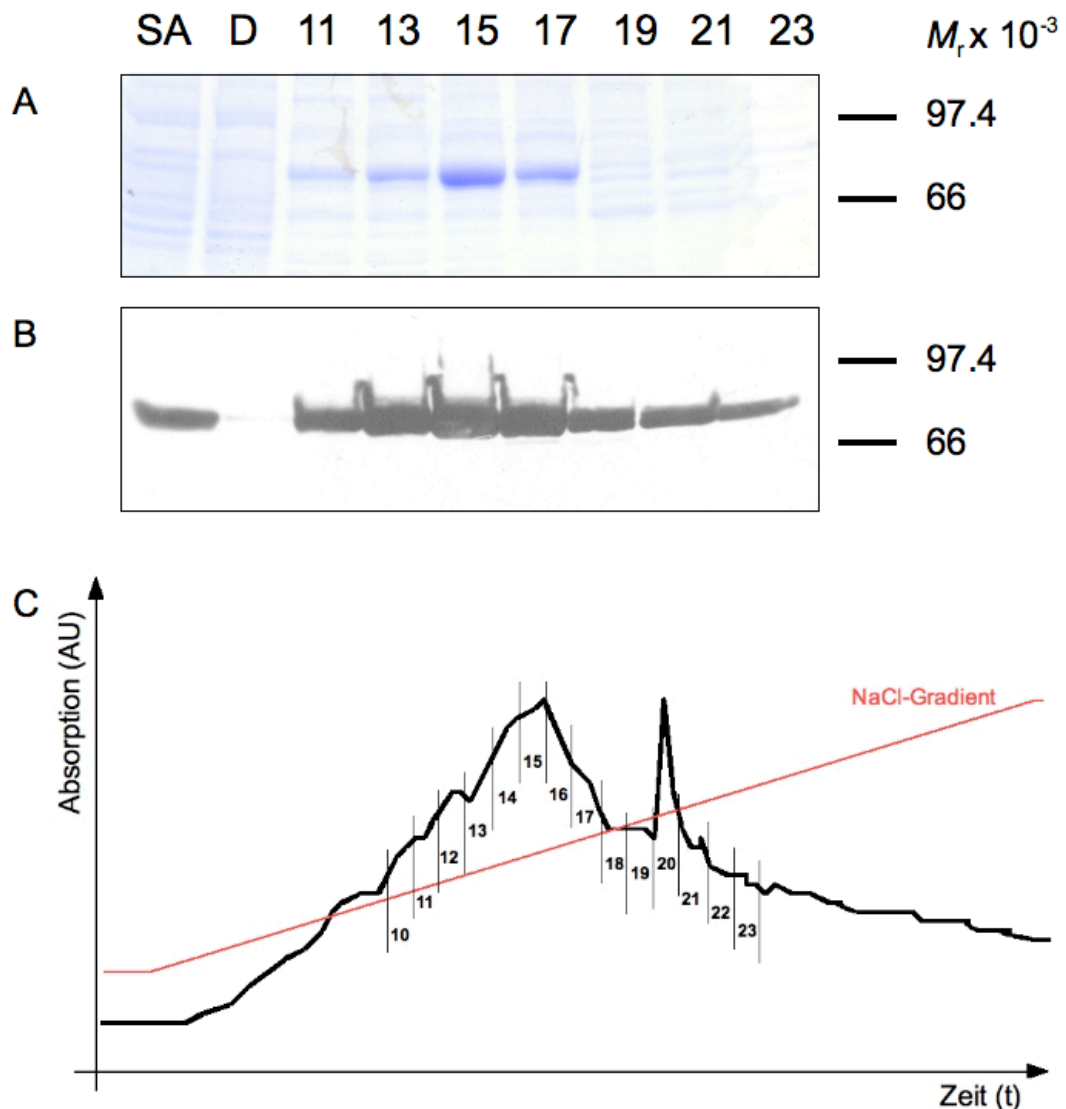


Abb. 7: Nachweis der nach Aufreinigung an der SP-Sepharose-Matrix in den Fraktionen enthaltenen mGRK6-B-Proteine. Insektenzellen wurden für 48 h mit mGRK6-B-kodierenden Baculoviren inkubiert, geerntet, aufgeschlossen und aus den Zelllysaten 300.000 g-Überstände gewonnen. Diese wurden mit NaCl-freiem Extraktionspuffer auf eine Endkonzentration von 125 mM NaCl im Puffer verdünnt und die enthaltenen Proteine an einer SP-Sepharose-Matrix (1 ml HiTrap-Säule, FPLC-System) chromatographiert (50 ml-Gradient von 125 bis 500 mM NaCl, Flussgeschwindigkeit 0.5 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die eluierten Proteine aus dem Durchfluss (D) und den Fraktionen 11, 13, 15, 17, 19, 21 und 23 (200 bis 295 mM NaCl) wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (10 % (m/V)) aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillantblau gefärbt (A) oder auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (B). Zum Vergleich wurden 15 µl der auf die Säule aufgetragenen Proteinlösung (SA) ebenfalls analysiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage des Molekulargewichtsstandards sind gekennzeichnet. (C) Schematische Darstellung des Chromatogramms. Die Fraktionsgrenzen sind markiert und durch Nummern bezeichnet. Die rote Linie zeigt den Verlauf des NaCl-Gradienten (von 125 bis 500 mM NaCl).

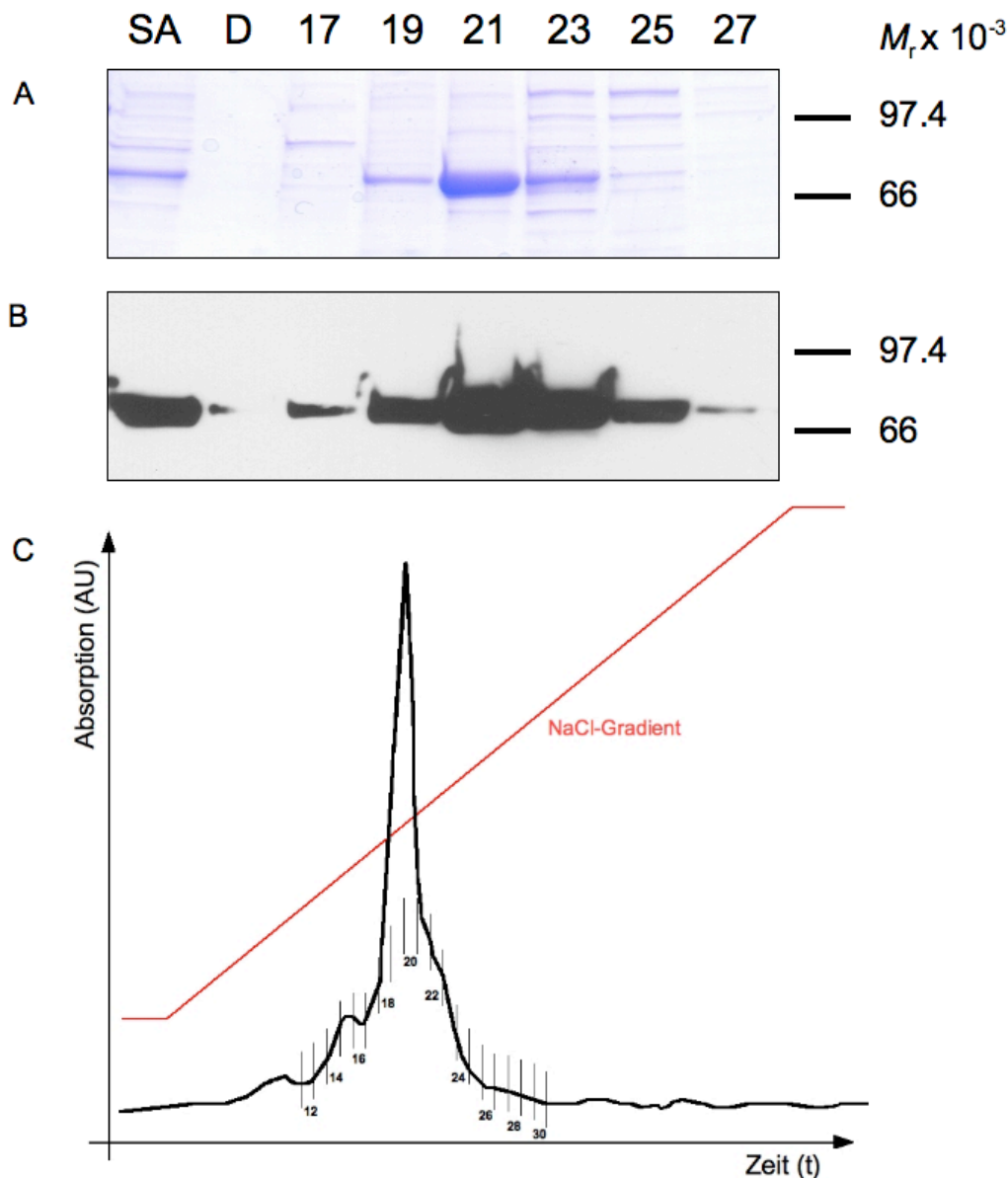


Abb. 8: Nachweis der nach Aufreinigung an der Heparin-Sepharose-Matrix in den Fraktionen enthaltenen mGRK6-B-Proteine. Nach der Kationenaustauschchromatographie an einer SP-Sepharose-Matrix wurden die Fraktionen 12 bis 18 (210 bis 260 mM NaCl), die die Hauptmengen des gereinigten rekombinanten mGRK6-B-Proteins enthielten, vereinigt und die Proteine an einer Heparin-Sepharose-Matrix chromatographiert (1 ml HiTrap-Säule, 50 ml-Gradient von 150 bis 1000 mM NaCl, Flussgeschwindigkeit: 0.5 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die NaCl-Konzentration war durch Zugabe von NaCl-freiem Extraktionspuffer auf 150 mM reduziert worden. Die eluierten Proteine im Durchfluss (D) und aus den Fraktionen 17, 19, 21, 23, 25 und 27 (~ 410 bis 620 mM NaCl) wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (10 % (m/V)) aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillantblau gefärbt (A) oder auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (B). Zum Vergleich wurden 15 µl der auf die Säule aufgetragenen Proteinlösung (SA) ebenfalls analysiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage des Molekulargewichtsstandards sind gekennzeichnet. (C) Schematische Darstellung des Chromatogramms. Die Fraktionsgrenzen sind markiert und durch Nummern bezeichnet. Die rote Linie zeigt den Verlauf des NaCl-Gradienten (von 150 bis 1000 mM NaCl).

Das in den Fraktionen 17 bis 27 (~ 410 bis 620 mM NaCl) um den *peak* mit der höchsten Proteinmenge der Affinitätschromatographie enthaltene wildtypische mGRK6-B-Protein wurde entweder mit Coomassie-Brillantblau gefärbt oder nach dem Transfer auf Nitrozellulose immunchemisch mit dem Anti-Pep2-Antikörper nachgewiesen (Abb. 8). Entsprechend dem deutlich abgegrenzten Elutions-*peak* im Chromatogramm zeigte sich auch in der Analyse der Proteine in der Coomassie-Brillantblau-Färbung bzw. im *Western blot* eine maximalen Anreicherung des mGRK6-B-Proteins in den Fraktionen 19 bis 23. Im Durchfluss ließ sich bei den Untersuchungen kaum mGRK6-B-Protein nachweisen, was dafür sprach, dass das Protein quantitativ an die Säulenmatrix gebunden hatte.

3.2.2 Chromatographische Reinigung der mGRK6-B Mut1-, der mGRK6-B Mut2- und der mGRK6-B Mut3-Proteine

Für die Reinigung der mGRK6-B Mut1-, -Mut2- und -Mut3-Proteine wurden wie unter 3.4.3 beschrieben *Sf9*-Insektenzellen mit den entsprechenden mGRK6-B Mut-kodierenden Baculoviren für 48 h inkubiert. Die Zellen wurden aufgeschlossen und 300.000 g-Überstände gewonnen. Die 300.000 g-Überstände wurden mit NaCl-freiem Extraktionspuffer auf eine Endkonzentration von 200 mM NaCl im Puffer verdünnt und anschließend die enthaltenen Proteine an einer SP-Sepharose-Matrix chromatographiert. Nach erfolgter Anreicherung an der SP-Sepharose-Matrix wurden die Proteine der Fraktionen um den *peak* mit der größten Proteinmenge mittels SDS-PAGE aufgetrennt, zum einen mit Coomassie-Brillantblau gefärbt und zum anderen nach dem Transfer auf Nitrozellulose immunchemisch mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert. Die Fraktionen, in denen der überwiegende Anteil des rekombinanten mGRK6-B Mut1- (Fraktionen 21-27, Abb. 9), mGRK6-B Mut2- (Fraktionen 24-29, Abb. 11) bzw. mGRK6-B Mut3-Proteins (Fraktionen 29-37, ohne Abbildung) enthalten war, wurden jeweils vereinigt, mit NaCl-freiem Extraktionspuffer auf eine Endkonzentration 200 mM NaCl im Puffer verdünnt und an der Heparin-Sepharose-Affinitätsmatrix chromatographiert. Wiederum wurden die Proteine der um den *peak* mit der größten Proteinmenge liegenden Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und zum einen mit Coomassie-Brillantblau gefärbt, zum anderen auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (mGRK6-B Mut1 Abb. 10, mGRK6-B Mut2 Abb. 12, mGRK6-B Mut3 Abb. 13). Die in den Abbildungen 10, 12 und 13 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass alle mGRK6-Proteine durch sequentielle Chromatographie an einer SP-Sepharose-Matrix und einer Heparin-

Sepharose-Matrix gereinigt werden konnten. Unter den Proteinen des Durchflusses der Kationenaustauschchromatographie und der Affinitätschromatographie war nur wenig rekombinantes mGRK6-B-Protein nachweisbar, was eine gute Bindung der mGRK6-B-Proteine an die Säulenmatrices bestätigte. Im Vergleich zum wildtypischen mGRK6-B-Protein, das bei einer NaCl-Konzentration von 410 bis 495 mM im Elutionspuffer von der Heparin-Sepharose eluierte, zeigten die mGRK6-B Mut1-, Mut2- und Mut3-Proteine ein anderes Elutionsprofil. So wurde für die Elution des mGRK6-B Mut1-Proteins von der Heparin-Sepharose Matrix eine NaCl-Konzentration von 520 bis 620 mM, für die Elution des mGRK6-B Mut2-Proteins eine Konzentration von 540 und 630 mM und für die Elution des mGRK6-B Mut3-Proteins eine Konzentration von 575 bis 685 mM NaCl im Puffer benötigt (Tab. 1). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verkürzung des carboxylterminalen Abschnittes von mGRK6-B zu veränderten physiko-chemischen Eigenschaften führen. Die im SDS-PAGE durch Coomassie-Brillantblau-Färbung nachgewiesenen Proteine besitzen molekulare Massen von ~ 65.8 kDa (mGRK6-B Mut1), ~ 65.4 kDa (mGRK6-B Mut2) und 64.9 kDa (mGRK6-B Mut3). Es waren neben den angereicherten gewünschten Proteinen nur geringe Verunreinigungen durch Proteine anderer molekularer Massen zu erkennen. Die immunchemischen Untersuchungen mit dem Pep-2-Antikörper bestätigten, dass es sich bei den gereinigten Proteinen um mGRK6-B-Proteine handelte. Während die Mengen an isolierten mGRK6-B-, mGRK6-B Mut1- und mGRK6-B Mut3-Protein ähnlich waren, war die Ausbeute an gereinigtem mGRK6-B Mut2-Protein deutlich geringer. Dies war jedoch nicht auf eine fehlende Interaktion mit der Säulenmatrix zurückzuführen, da bei der Analyse der Proteine des Durchflusses kein rekombinantes mGRK6-B Mut2-Protein nachzuweisen war. Bereits im Ausgangsmaterial nach Infektion der *Sf9*-Schüttelkulturen mit den entsprechenden Baculoviren war im Verhältnis zu der wildtypischen mGRK6-B-Variante und den anderen mGRK6-B-Mutanten weniger mGRK6-B Mut2-Protein nachweisbar gewesen.

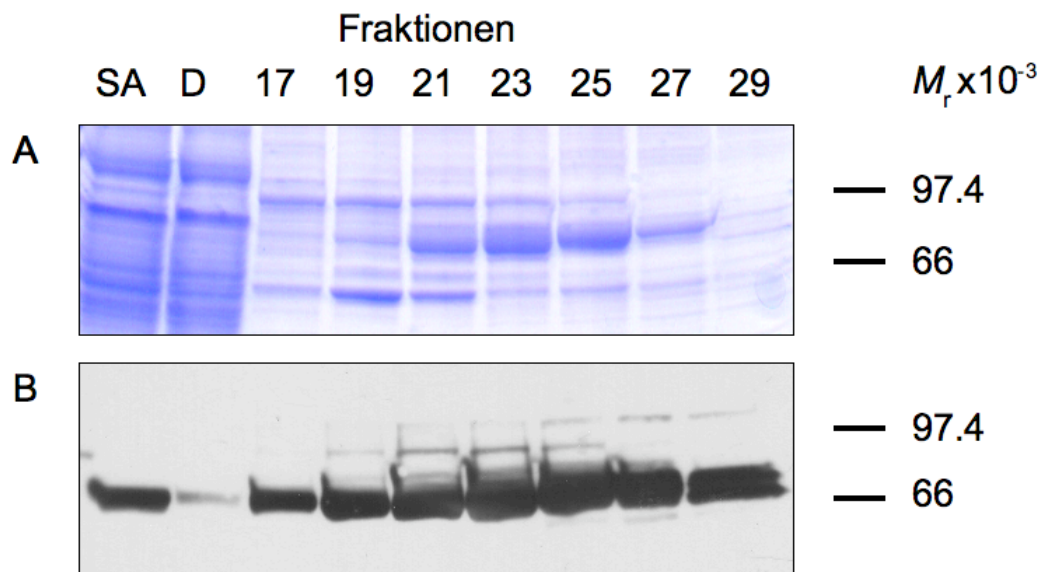


Abb. 9: Nachweis des nach Aufreinigung an der SP-Sepharose-Matrix in den Fraktionen enthaltenen mGRK6-B Mut1 Proteins. Insektenzellen wurden für 48 h mit mGRK6-B Mut1-kodierenden Baculoviren inkubiert, geerntet, aufgeschlossen und aus den Zelllysaten 300.000 g-Überstände gewonnen. Diese wurden mit NaCl-freiem Extraktionspuffer auf eine Endkonzentration von 125 mM NaCl im Puffer verdünnt und die enthaltenen Proteine an einer SP-Sepharose-Matrix (1 ml HiTrap-Säule, FPLC-System) chromatographiert (50 ml-Gradient von 125 bis 500 mM NaCl, Flussgeschwindigkeit 0.5 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die eluierten Proteine aus dem Durchfluss (D) und den Fraktionen 17, 19, 21, 23, 25, 27 und 29 (240 bis 340 mM NaCl) wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (10 % (m/V)) aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillantblau gefärbt (A) oder auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (B). Zum Vergleich wurden 15 µl der auf die Säule aufgetragenen Proteinlösung (SA) ebenfalls analysiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage der Molekulargewichtsstandards sind gekennzeichnet.

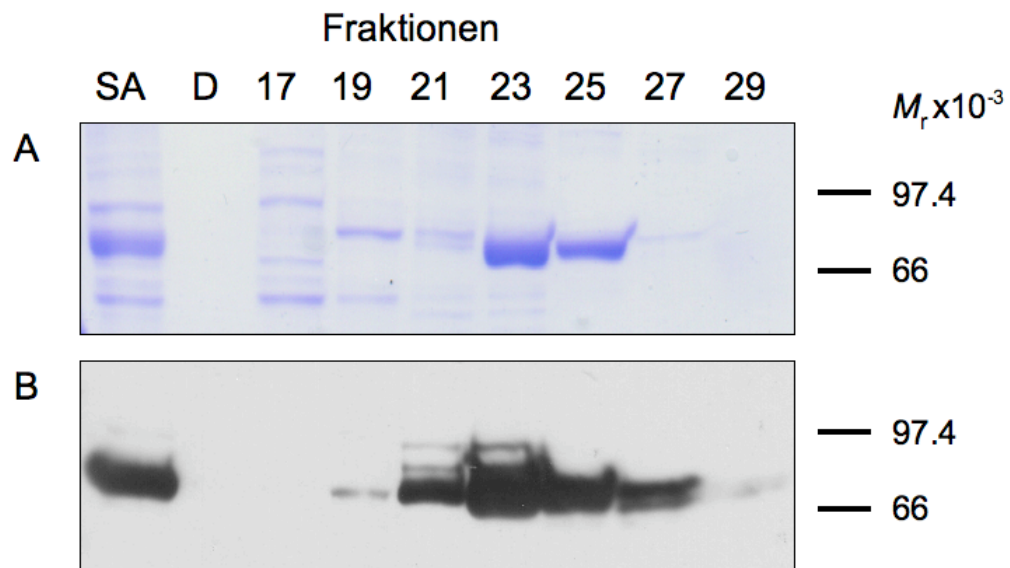


Abb. 10: Nachweis des nach Aufreinigung an der Heparin-Sephrose-Matrix in den Fraktionen enthaltenen mGRK6-B Mut1-Proteins. Nach der Kationenaustauschchromatographie an einer SP-Sephrose-Matrix wurden die Fraktionen 21 bis 27 (270 bis 325 mM NaCl), die die Hauptmengen des gereinigten rekombinanten mGRK6-B Mut1-Proteins enthielten, vereinigt und die Proteine an einer Heparin-Sephrose-Matrix chromatographiert (1 ml HiTrap-Säule, 50 ml-Gradient von 200 bis 1000 mM NaCl, Flussgeschwindigkeit: 0.5 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die NaCl-Konzentration war durch Zugabe von NaCl-freiem Extraktionspuffer auf 200 mM reduziert worden. Die eluierten Proteine im Durchfluss (D) und aus den Fraktionen 17, 19, 21, 23, 25 und 27 wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (10 % (m/V)) aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillantblau gefärbt (A) oder auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (B). Zum Vergleich wurden 15 μ l der auf die Säule aufgetragenen Proteinlösung (SA) ebenfalls analysiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage der Molekulargewichtsstandards sind gekennzeichnet.

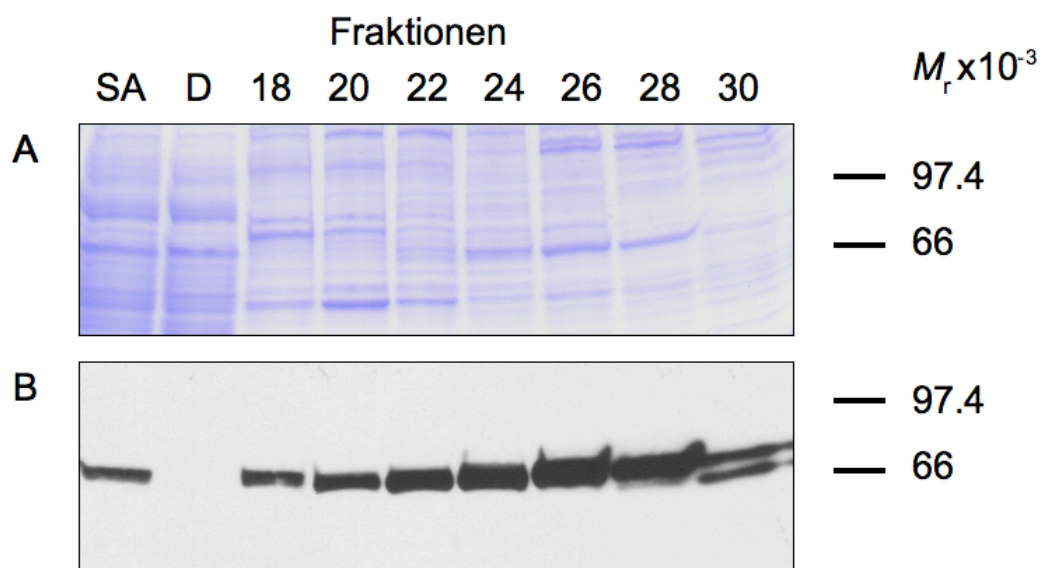


Abb. 11: Nachweis des nach Aufreinigung an der SP-Sepharose-Matrix in den Fraktionen enthaltenen mGRK6-B Mut2-Proteins. Insektenzellen wurden für 48 h mit mGRK6-B Mut2-kodierenden Baculoviren infiziert, geerntet, aufgeschlossen und aus den Zelllysaten 300.000 *g*-Überstände gewonnen. Diese wurden mit NaCl-freiem Extraktionspuffer auf eine Endkonzentration von 125 mM NaCl im Puffer verdünnt und die enthaltenen Proteine an einer SP-Sepharose-Matrix (1 ml HiTrap-Säule, FPLC-System) chromatographiert (50 ml-Gradient von 125 bis 500 mM NaCl, Flussgeschwindigkeit 0.5 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die eluierten Proteine aus dem Durchfluss (D) und den Fraktionen 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 (250 bis 350 mM NaCl) wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (10 % (m/V)) aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillantblau gefärbt (A) oder auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (B). Zum Vergleich wurden 15 μ l der auf die Säule aufgetragenen Proteinelösung (SA) ebenfalls analysiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage der Molekulargewichtsstandards sind gekennzeichnet.

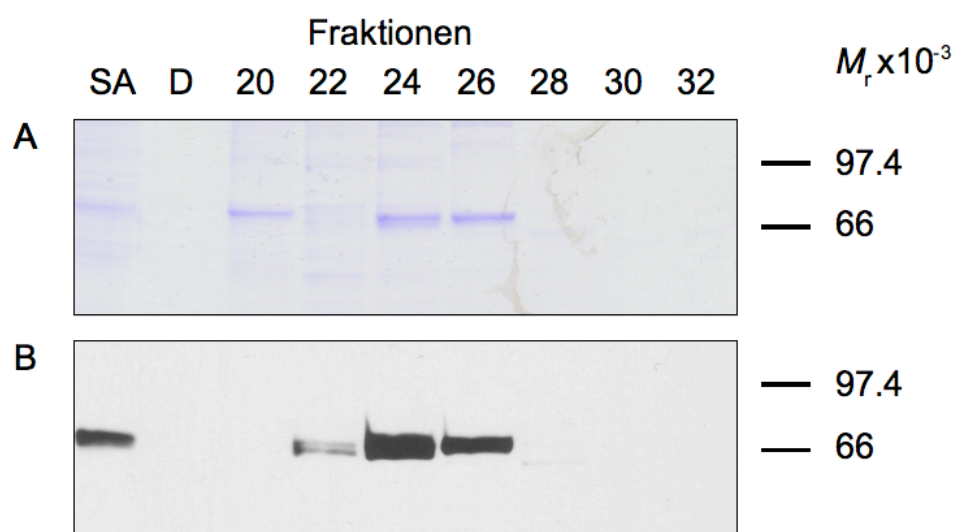


Abb. 12: Nachweis des nach Aufreinigung an der Heparin-Sephrose-Matrix in den Fraktionen enthaltenen mGRK6-B Mut2-Proteins. Nach der Kationenaustauschchromatographie an einer SP-Sephrose-Matrix wurden die Fraktionen 24 bis 29 (295 bis 335 mM NaCl), die die Hauptmengen des gereinigten rekombinanten mGRK6-B Mut2-Proteins enthielten, vereinigt und die enthaltenen Proteine an einer Heparin-Sephrose-Matrix chromatographiert (1 ml HiTrap-Säule, 50 ml-Gradient von 200 bis 1000 mM NaCl, Flussgeschwindigkeit: 0.5 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die NaCl-Konzentration der Proteinlösung war durch Zugabe von NaCl-freiem Extraktionspuffer auf 200 mM reduziert worden. Die eluierten Proteine im Durchfluss (D) und aus den Fraktionen 20, 22, 24, 26, 28, 30 und 32 wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (10 % (m/V)) aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillantblau gefärbt (**A**) oder auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (**B**). Zum Vergleich wurden 15 µl der auf die Säule aufgetragenen Proteinlösung (SA) ebenfalls analysiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage der Molekulargewichtsstandards sind gekennzeichnet.

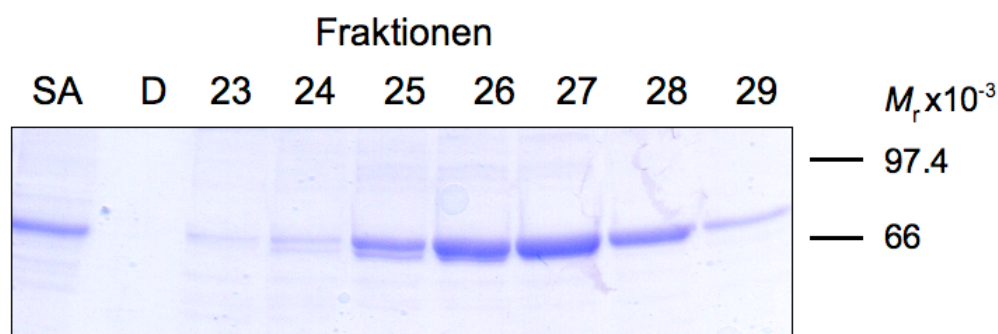


Abb. 13: Nachweis des nach Aufreinigung an der Heparin-Sepharose-Matrix in den Fraktionen enthaltenen mGRK6-B Mut3-Proteins. Nach der Kationenaustauschchromatographie an einer SP-Sepharose-Matrix wurden die Fraktionen 29 bis 37 (340 bis 410 mM NaCl), die die Hauptmengen des gereinigten rekombinanten mGRK6-B Mut3-Proteins enthielten, vereinigt und die enthaltenen Proteine an einer Heparin-Sepharose-Matrix chromatographiert (1 ml HiTrap-Säule, 50 ml-Gradient von 200 bis 1000 mM NaCl, Flussgeschwindigkeit: 0.5 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die NaCl-Konzentration der Proteinlösung war durch Zugabe von NaCl-freiem Extraktionspuffer auf 200 mM reduziert worden. Die eluierten Proteine im Durchfluss (D) und aus den Fraktionen 23 bis 29 wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (10 % (m/V)) aufgetrennt und mit Coomassie-Brillantblau gefärbt. Zum Vergleich wurden 15 µl der auf die Säule aufgetragenen Proteinlösung (SA) ebenfalls analysiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage des Molekulargewichtsstandards sind gekennzeichnet.

Tab. 1: Zur Elution der rekombinanten Proteine von der Heparin-Sepharose-Affinitätsmatrix notwendige NaCl-Konzentrationen. Aufgeführt sind die NaCl-Konzentrationen, die zur Elution der rekombinanten Proteine der wildtypischen mGRK6-B-Variante und der mGRK6-B-Mutanten von der Heparin-Sepharose-Affinitätsmatrix notwendig waren. Die angegebenen Bereiche beziehen sich auf diejenigen Fraktionen, in denen nach der Affinitätschromatographie der größte Anteil an mGRK6-B-Protein nachzuweisen war.

Bezeichnung der Varianten bzw. Mutanten der mGRK6-B	NaCl-Konzentration
mGRK6-B	410 bis 495 mM
mGRK6-B Mut1	520 bis 620 mM
mGRK6-B Mut2	540 bis 630 mM
mGRK6-B Mut3	575 bis 685 mM

3.3 Interaktion der chromatographisch gereinigten mGRK6-B-Proteine mit Phospholipiden

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die wildtypischen mGRK6-Isoformen mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C bei transienter Expression in COS-7-Zellen vorwiegend mit der Membran assoziiert vorliegen (Vatter *et al.*, 2005). Darüber hinaus haben Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen Hinweise darauf geliefert, dass der carboxylterminale Abschnitt der GRKs für die Interaktion der Kinasen mit der Plasmamembran und für die Aktivität der Kinasen von entscheidender Bedeutung ist. Um zu untersuchen, welchen Einfluss Veränderungen im carboxylterminalen Abschnitt der mGRK6-B auf die Interaktion mit Phospholipiden haben, wurden die zuvor chromatographisch gereinigten mGRK6-B-Proteine in Lipidbindungsstudien mit künstlichen Lipidvesikeln eingesetzt. Da Untersuchungen der Arbeitsgruppe Hinweise darauf geliefert hatten, dass steigende Mengen an NaCl die Interaktion der GRK6-Proteine mit Phospholipiden negativ beeinflussen, wurden die gereinigten mGRK6-B-Proteine zunächst durch Gelfiltration unter Verwendung einer *Fast Desalting*-Säule (SMART-System) entsalzt. Für die Bindungsstudien mit Phospholipidvesikeln wurden die gereinigten Proteine mGRK6-B, mGRK6-B Mut1 bzw. mGRK6-B Mut2 mit Lipidvesikelsuspensionen inkubiert, die steigende Mengen an Phospholipiden enthielten (0.017 mg/ml, 0.17mg/ml, 1.7 mg/ml und 10 mg/ml) und anschließend durch Zentrifugation bei 100 000 g in eine lipidfreie lösliche und eine lipidhaltige partikuläre Fraktion separiert. Die in den jeweiligen Fraktionen enthaltene mGRK6-B-Proteine wurde nach elektrophoretischer Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel (10 % (m/V)) auf Nitrozellulose transferiert und im *Western blot* mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (Abb. 14).

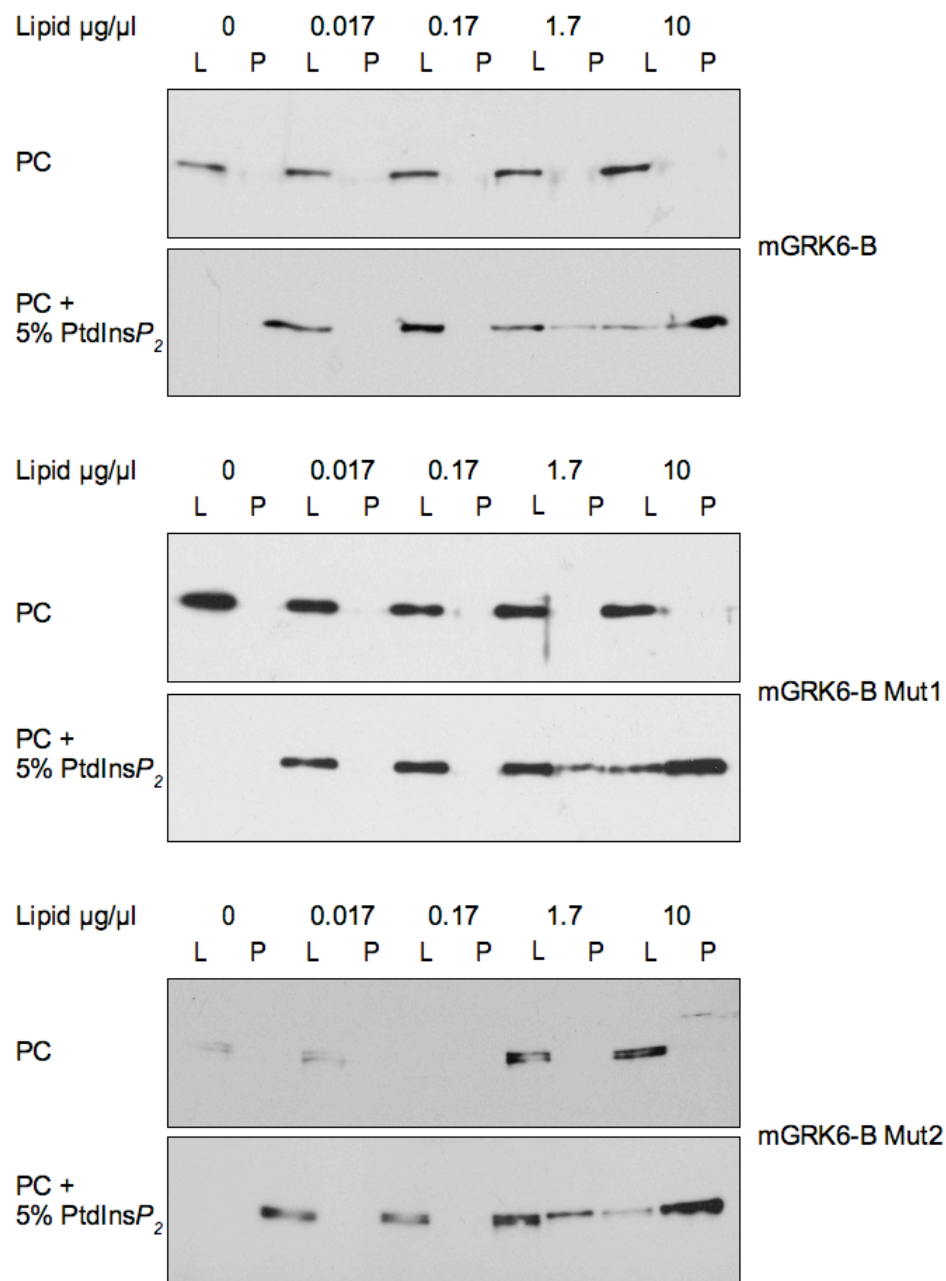


Abb. 14: Wechselwirkung von mGRK6-B, mGRK6-B Mut1 und mGRK6-B Mut2 mit Phospholipidvesikeln. Jeweils 1 µl (mGRK6-B und mGRK6-B Mut1) bzw. 5 µl (mGRK6-B Mut2) der sequentiell über SP- und Heparin-Sepharose-Matrix gereinigten, entsalzten Proteine wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von 0.017 mg/ml, 0.17mg/ml, 1.7 mg/ml und 10 mg/ml Phospholipidvesikeln aus reinem Phosphatidylcholin (PC) oder mit Vesikeln aus PC, denen 5 % Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdInsP₂) zugesetzt worden war, 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 (P) Fraktion separiert. Jeweils 15 µl der löslichen und partikulären Proteinfractionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (10 % (m/V)) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert.

Die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich die mGRK6-B-Proteine in Abwesenheit von Phospholipiden ausschließlich in der lipidfreien löslichen Fraktion befanden. Steigende Konzentrationen von Phosphatidylcholin (PC) hatten keinen signifikanten Effekt auf die Umverteilung der mGRK6-B-Proteine von der lipidfreien in die lipidhaltige partikuläre Fraktion, d. h. weder das wildtypische mGRK6-B-Protein noch die Proteine der trunkierten mGRK6-B-Mutanten Mut1 und Mut2 konnten mit dem positiv geladenen PC in Wechselwirkung treten. Im Gegensatz dazu wurde in Anwesenheit von Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdIns P_2) mit zunehmender Lipidkonzentration eine Verschiebung des Anteils der mGRK6-B-Proteine von der lipidfreien löslichen in die lipidhaltige partikuläre Fraktion beobachtet. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl das wildtypische mGRK6-B-Protein als auch die Proteine der mGRK6-B-Mutanten Mut1 und Mut2 mit PtdIns P_2 interagieren. Unterschiede zwischen der wildtypischen Variante und den untersuchten Mutanten ließen sich hierbei nicht feststellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der carboxylterminale Abschnitt (AS 572 bis 589) von mGRK6-B, der Abschnitt, der in mGRK6-B Mut1 und mGRK6-B Mut2 fehlt, keinen direkten Einfluss auf die Interaktion der Kinasen mit Phospholipiden der Plasmamembran hat. Die Tatsache, dass nur deutlich geringe Mengen des mGRK6-B Mut2-Proteins im Immunoblot nachzuweisen waren, ist auf die geringere eingesetzte Proteinmenge zurückzuführen.

3.4 Funktionelle Analyse der chromatographisch gereinigten mGRK6-B-Proteine

3.4.1 Funktionelle Analyse der sequentiell über SP- und Heparin-Sepharose-Matrix gereinigten rekombinanten mGRK6-B-Proteine

Da unklar war, ob es sich bei den rekombinanten gereinigten mGRK6-B-Proteinen um aktive Proteine handelte, wurde zunächst die Phosphorylierungsaktivität der Kinasen überprüft. Dazu wurde zum einen die Phosphorylierung des membranständigen G-Proteingekoppelten Lichtrezeptor Rhodopsins, zum anderen die Phosphorylierung von zwei löslichen sauren Proteinen, des Phosvitins (45 kD) und des Caseins (30 kD) untersucht. Sowohl vom Phosvitin, als auch vom Casein ist bekannt, dass sie unphysiologische Substrate der GRK6 darstellen (Loudon und Benovic, 1994). Die mGRK6-B-Proteine wurden in einem Reaktionsansatz mit 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM

MgCl₂ in Anwesenheit von [γ-³²P]ATP und entweder Rhodopsin (Endkonzentration 240 nM, Inkubation 10 min bei 30 °C unter Lichteinfluss), Phosvitin (12.5 µg Phosvitin, Inkubation für 1 h bei 30 °C) oder Casein (1.5 µg Casein, Inkubation für 10 min bei 37 °C) auf ihre Phosphorylierungsaktivität untersucht. Die phosphorylierten Substrate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie, d. h. durch Exposition des Gels mit einem Röntgenfilm, nachgewiesen. Zunächst wurde die Phosphorylierungsaktivität des wildtypischen mGRK6-B-Proteins (je 1 µl/Fraktion) wie unter Punkt 3.7 beschrieben überprüft. Parallel wurde die in den Versuchen eingesetzte Proteinmenge in einem *Western blot* unter Verwendung des Anti-Pep2-Antikörpers analysiert (Abb. 15).

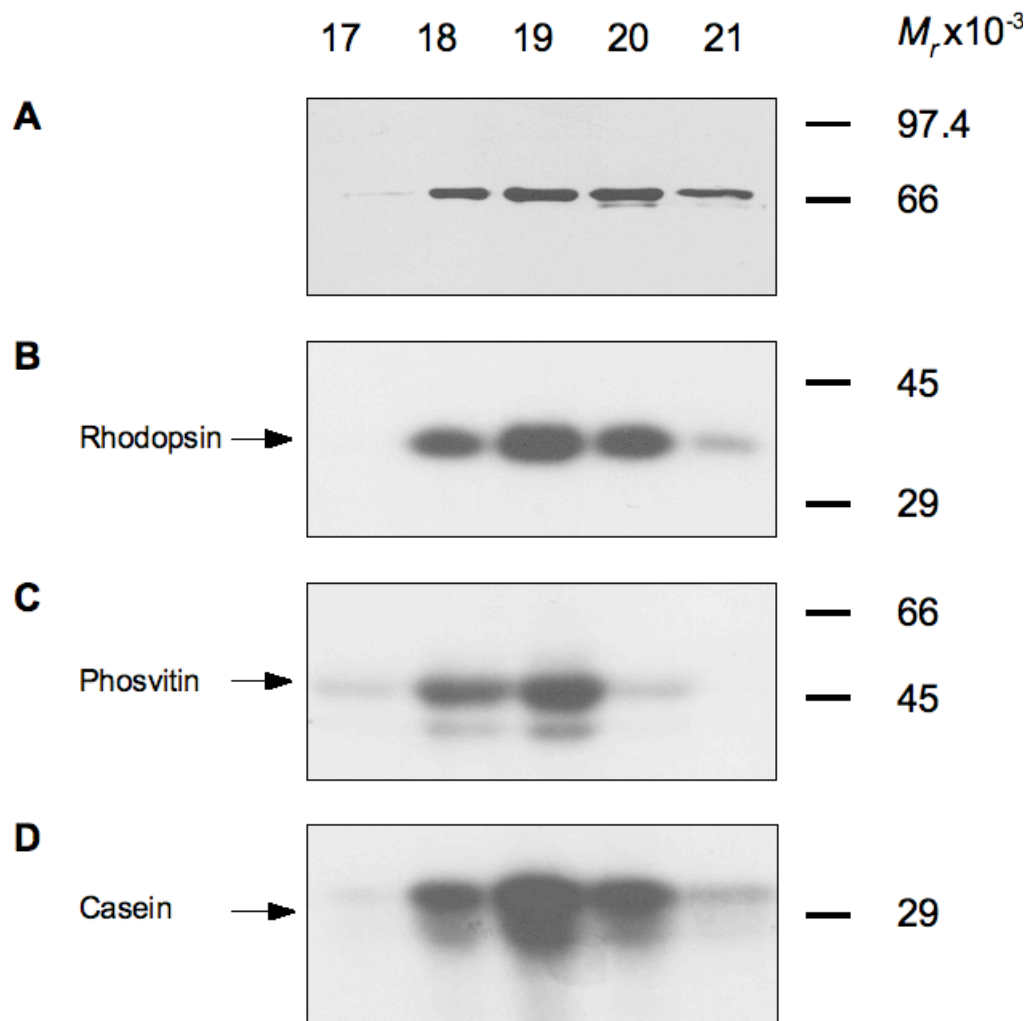


Abb. 15: Phosphorylierung von Rhodopsin, Phosvitin und Casein durch mGRK6-B. Die in den Fraktionen 17 bis 21 enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (A). Jeweils 1 μ l aus den von der Heparin-Sepharose-Matrix eluierten Fraktionen 17 bis 21, in denen das wildtypische mGRK6-B-Protein enthalten war, wurde mit 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM $MgCl_2$ in Anwesenheit von $[Y-^{32}P]ATP$ in die Phosphorylierungsversuche eingesetzt (B-D). Als Substrat wurde entweder der membranständige G-Protein-gekoppelte Lichtrezeptor Rhodopsin (B, Endkonzentration 240 nM, Inkubation für 10 min bei 30 °C unter Belichtung) oder eines der löslichen Substrate Phosvitin (C, 12.5 μ g Phosvitin, Inkubation für 1 h bei 30 °C) und Casein (D, 1.5 μ g Casein, Inkubation für 10 min bei 37 °C) verwendet. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert. Die Expositionszeit des Röntgenfilms mit den fixierten Gelen betrug bei Rhodopsin und Phosvitin 2.5 h und bei Casein 6 h. Die Art des Substrates und die Lage des Phosphorylierungssignals, die Positionen der Molekulargewichtsstandards sowie die Nummern der Fraktionen sind angegeben.

Die in Abb. 15 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das sequentiell über SP- und Heparin-Sepharose-Matrix gereinigte wildtypische mGRK6-B-Protein katalytisch aktiv war und alle getesteten Substrate in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ phosphorylierte. Die Phosphorylierungsaktivität korrelierte dabei mit der in den Fraktionen über die *Western blot*-Analyse nachgewiesenen Proteinmengen. So zeigten die in der Fraktion 19 enthaltenen mGRK6-B-Proteine für alle Substrate das stärkste Phosphorylierungssignal. Auch für die Proteine aus den benachbarten Fraktionen 18 und 20 waren deutliche Signale zu verzeichnen, lediglich das Phosphorylierungssignal der Proteine aus der Fraktion 20 für das Substrat Phosvitin war etwas schwächer ausgeprägt. Im Anschluss wurde die Phosphorylierungsaktivität der trunkierten Mutanten mGRK6-B Mut1, mGRK6-B Mut2 und mGRK6-B Mut3 untersucht. Die in Abb. 16 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mGRK6-B Mut1 sowohl den membranständigen G-Protein-gekoppelten Lichtrezeptor Rhodopsin, als auch die löslichen Substrate Phosvitin und Casein phosphorylierte. Dabei zeigten insbesondere die Proteine der Fraktion 23 bis 25 eine hohe Phosphorylierungsaktivität bezüglich Rhodopsin und Casein. Die Aktivität korrelierte dabei mit den in den *Western blot*-Analysen nachgewiesenen Proteinmengen. Im Autoradiogramm der Phosvitin-Phosphorylierung wurde darüber hinaus auch Phosphorylierungsaktivität der Proteine von den benachbarten Fraktionen 21 und 22 beobachtet.

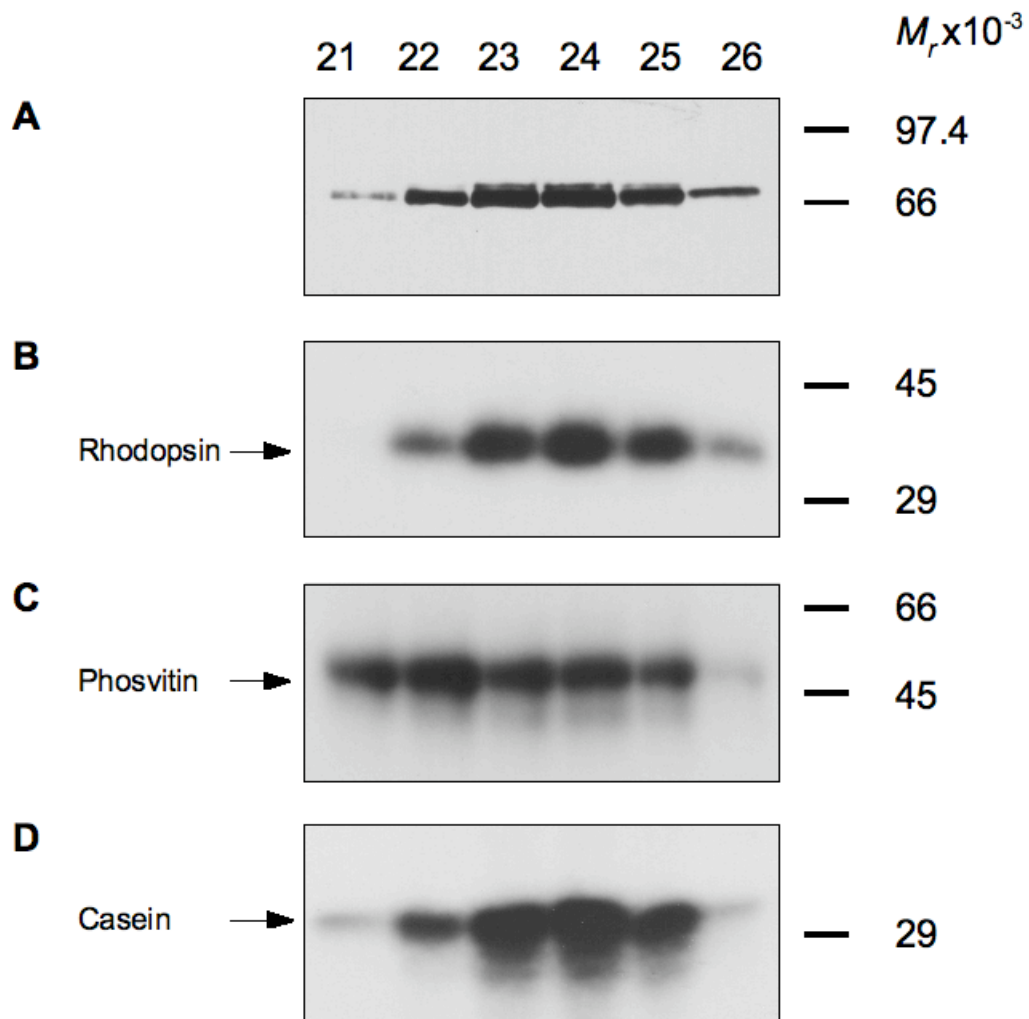


Abb. 16: Phosphorylierung von Rhodopsin, Phosvitin und Casein durch mGRK6-B Mut1. Die in den Fraktionen 21 bis 26 enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (A). Jeweils 1 μ l aus den von der Heparin-Sepharose-Matrix eluierten Fraktionen 21 bis 26, in denen das mGRK6-B Mut1-Protein enthalten war, wurde mit 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM $MgCl_2$ in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in die Phosphorylierungsversuche eingesetzt (B-D). Als Substrat wurde entweder der membranständige G-Protein-gekoppelte Lichtrezeptor Rhodopsin (B, Endkonzentration 240 nM, Inkubation für 10 min bei 30 °C unter Belichtung) oder eines der löslichen Substrate Phosvitin (C, 12.5 μ g Phosvitin, Inkubation für 1 h bei 30 °C) und Casein (D, 1.5 μ g Casein, Inkubation für 10 min bei 37 °C) verwendet. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert. Die Expositionszeit des Röntgenfilms mit den fixierten Gelen betrug bei Rhodopsin 5 h, bei Phosvitin 1 h und bei Casein 1.5 h. Die Art des Substrates und die Lage des Phosphorylierungssignals, die Positionen der Molekulargewichtsstandards sowie die Nummern der Fraktionen sind angegeben.

Auch das rekombinante sequentiell über SP- und Heparin-Sepharose-Matrix angereicherte und gereinigte Protein der trunkierten Mutante mGRK6-B Mut2 war nach der Aufreinigung katalytisch aktiv und somit in der Lage, die Substrate Rhodopsin, Casein und Phosvitin in Anwesenheit von [γ - 32 P]ATP zu phosphorylieren. Die in Abb. 17 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass obwohl in der *Western blot*-Analyse des gereinigten mGRK6-B Mut2-Proteins nur eine geringere Menge des Proteins nachzuweisen war, dieses eine deutliche Phosphorylierungsaktivität bezüglich aller Substrate aufwies. Die Phosphorylierungsaktivität für das Substrat Rhodopsin korrelierte mit der Verteilung der Proteine, wie sie in der *Western blot*-Analyse ermittelt wurde und zeigte das stärkste Signal für die Proteine der Fraktion 25. Auch für Proteine der benachbarten Fraktionen waren deutliche Signale festzustellen. Für die Phosphorylierung der löslichen Substrate Phosvitin und Casein waren uneinheitliche Phosphorylierungssignale zu beobachten. So zeigten im Falle des Caseins sowohl Proteine der Fraktion 22, als auch der Fraktion 25 eine hohe Phosphorylierungsaktivität. Erstaunlicherweise war in Fraktion 22 im Gegensatz zu Fraktion 25 jedoch kaum mGRK6-B Mut2-Protein nachzuweisen. Ähnliches wurde für die Phosphorylierung von Phosvitin beobachtet. Hier wurde neben der Phosphorylierungsaktivität der Proteine in Fraktion 23 bis 25 auch Aktivität von Proteinen der Fraktionen 26 und 27 ermittelt, obwohl in diesen Fraktionen mGRK6-B Mut-2 Protein nicht nachzuweisen waren. Dabei war die Phosphorylierung des Phosvitins durch Proteine der Fraktion 27 sogar am stärksten (Abb. 17). Unklar bleibt, ob diese Aktivität auf hochaktives mGRK6-B Mut2 Protein oder auf ein anderes aus den Insektenzelllysaten mitgereinigtes Protein zurückzuführen ist. Die zur Bestimmung der Aktivität der mGRK6-B Mut3-Mutante durchgeführten Phosphorylierungsexperimente zeigten, dass auch die kürzeste der trunkierten Mutanten, die Substrate Rhodopsin, Casein und Phosvitin phosphorylierte (Abb. 18). Im Gegensatz zum mGRK6-B Mut2-Protein korrelierte die Stärke der Phosphorylierung der Substrate mit den in *Western blot*-Analysen ermittelten Proteinmengen. Die stärkste Phosphorylierungsaktivität war bei allen untersuchten Substraten für Proteine der Fraktionen 25 und 26 zu beobachten.

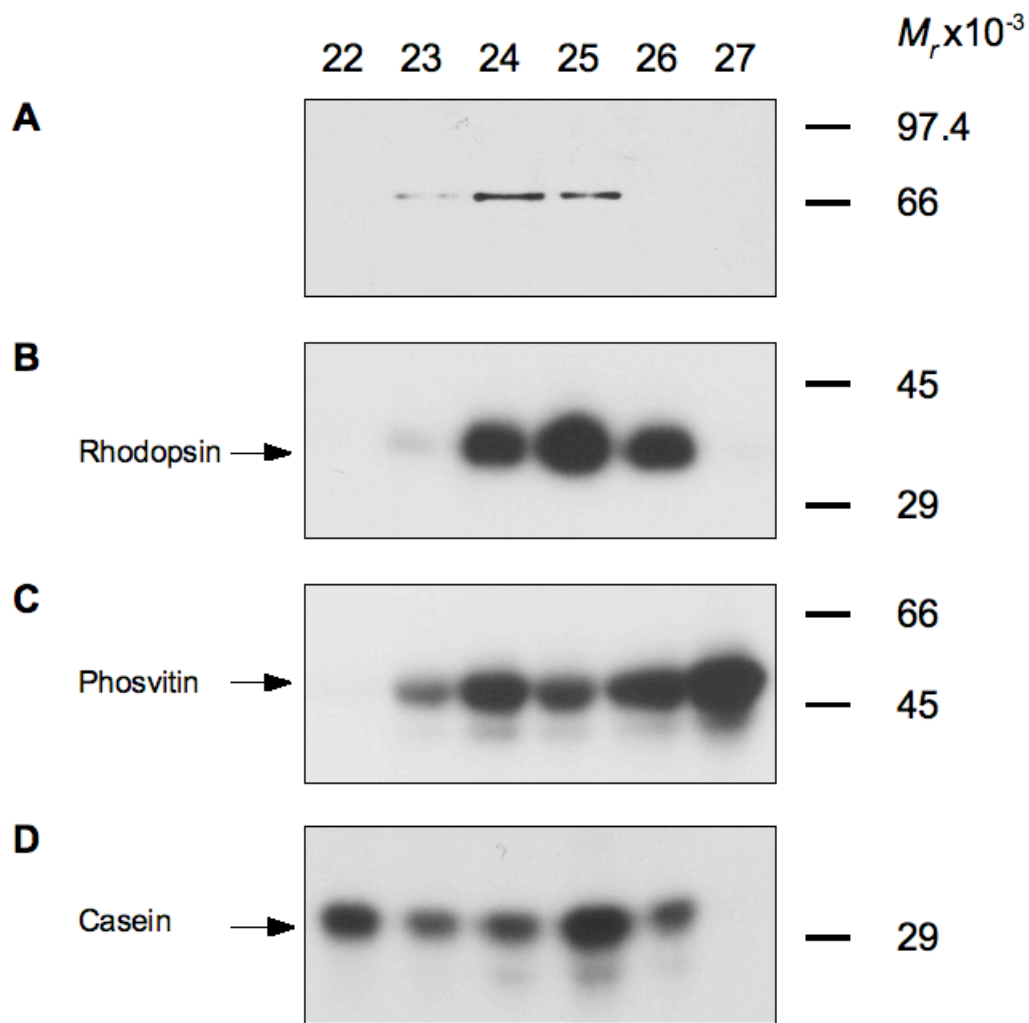


Abb. 17: Phosphorylierung von Rhodopsin, Phosvitin und Casein durch mGRK6-B Mut2. Die in den Fraktionen 22 bis 27 enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (A). Jeweils 1 μ l aus den von der Heparin-Sepharose-Matrix eluierten Fraktionen 22 bis 27, in denen das mGRK6-B Mut2-Protein enthalten war, wurde mit 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM $MgCl_2$ in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ in die Phosphorylierungsversuche eingesetzt (B-D). Als Substrat wurde entweder der membranständige G-Protein-gekoppelte Lichtrezeptor Rhodopsin (B, Endkonzentration 240 nM, Inkubation für 10 min bei 30 °C unter Belichtung) oder eines der löslichen Substrate Phosvitin (C, 12.5 μ g Phosvitin, Inkubation für 1 h bei 30 °C) und Casein (D, 1.5 μ g Casein, Inkubation für 10 min bei 37 °C) verwendet. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert. Die Expositionszeit des Röntgenfilms mit den fixierten Gelen betrug bei Rhodopsin, Phosvitin und Casein 2.5 h. Die Art des Substrates und die Lage des Phosphorylierungssignals, die Positionen der Molekulargewichtsstandards sowie die Nummern der Fraktionen sind angegeben.

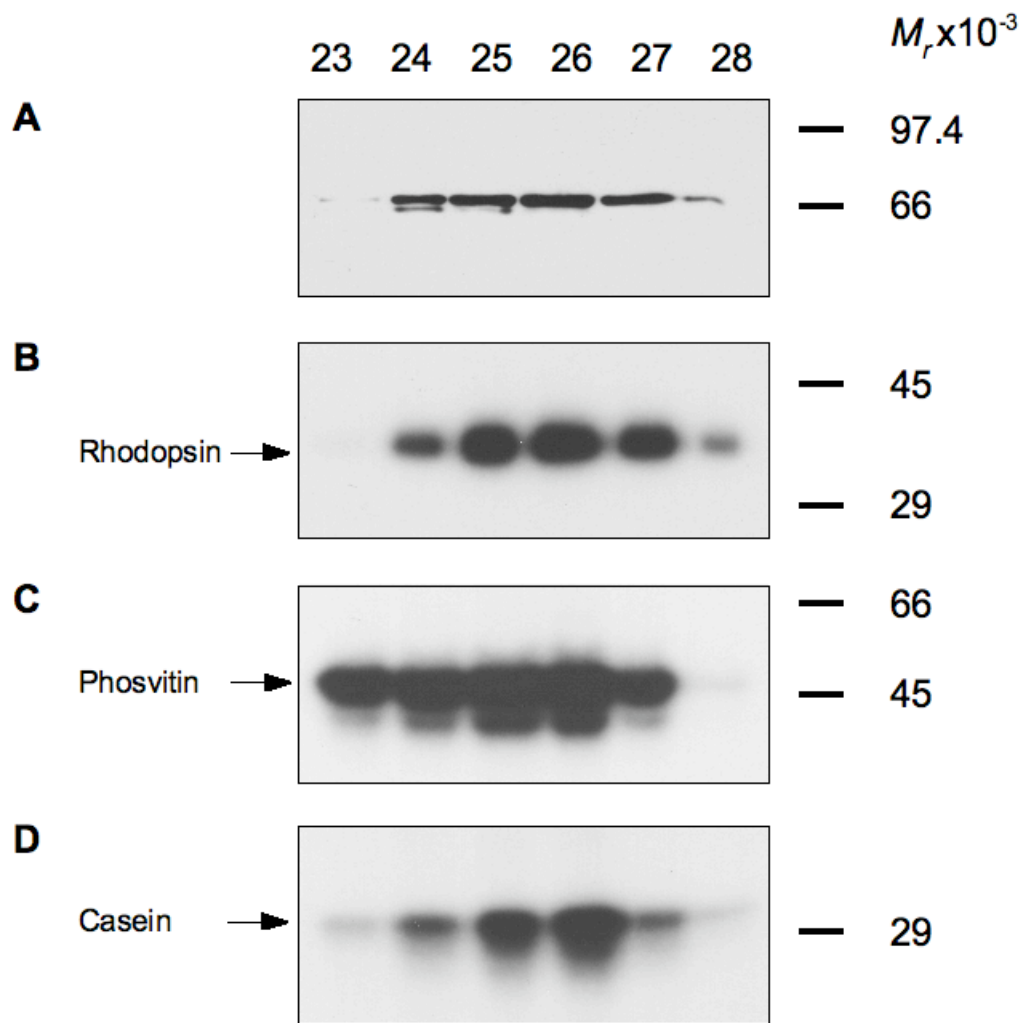


Abb. 18: Phosphorylierung von Rhodopsin, Phosvitin und Casein durch mGRK6-B Mut3. Die in den Fraktionen 22 bis 28 enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (A). Jeweils 1 μ l aus den von der Heparin-Sepharose-Matrix eluierten Fraktionen 22 bis 28, in denen das mGRK6-B Mut3-Protein enthalten war, wurde mit 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM $MgCl_2$ in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in die Phosphorylierungsversuche eingesetzt (B-D). Als Substrat wurde entweder der membranständige G-Protein-gekoppelte Lichtrezeptor Rhodopsin (B, Endkonzentration 240 nM, Inkubation für 10 min bei 30 °C unter Belichtung) oder eines der löslichen Substrate Phosvitin (C, 12.5 μ g Phosvitin, Inkubation für 1 h bei 30 °C) und Casein (D, 1.5 μ g Casein, Inkubation für 10 min bei 37 °C) verwendet. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert. Die Expositionszeit des Röntgenfilms mit den fixierten Gelen betrug bei Rhodopsin, Phosvitin und Casein 2 h. Die Art des Substrates und die Lage des Phosphorylierungssignals, die Positionen der Molekulargewichtsstandards sowie die Nummern der Fraktionen sind angegeben.

3.4.2 Funktionelle Analyse der chromatographisch gereinigten entsalzten mGRK6-B-Proteine

In den vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur Phosphorylierungsaktivität der verschiedenen mGRK6-B-Proteine waren Unterschiede in der Phosphorylierung durch die mGRK6-B Mutanten beobachtet worden (Dissertation Vatter, 2000). Des Weiteren hatten Untersuchungen ergeben, dass die Anwesenheit von hohen NaCl-Konzentrationen im Reaktionsansatz die Phosphorylierungsaktivität von mGRK6-Kinasen negativ beeinflusst (Loudon und Benovic, 1994). Um klären zu können, ob sich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gereinigten Proteine mGRK6-B, mGRK6-B Mut1, Mut2 und Mut 3 in ihrer Aktivität membranständiges bzw. lösliches Substrat zu phosphorylieren unterscheiden, sollten die Proteine zunächst wie unter 3.6.3 beschrieben durch Gelfiltration unter Verwendung einer *Fast Desalting*-Säule (SMART-System) entsalzt und anschließend in Anwesenheit von 10 mM NaCl im Reaktionsansatz zur Phosphorylierung von Rhodopsin, Phosvitin und Casein eingesetzt werden. Die Untersuchungen zeigten, dass keines der mGRK6-B-Proteine nach dem Entsalzen in der Lage war, die radioaktiv markierte γ -Phosphatgruppe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ auf eines der Substrate zu übertragen (nicht abgebildet). Es ließ sich somit für die chromatographisch gereinigten und angereicherten sowie anschließend entsalzten Proteine mGRK6-B, mGRK6-B Mut1, mGRK6-B Mut2 und mGRK6-B Mut 3 keine katalytische Aktivität nachweisen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die mGRK6-B-Proteine sehr sensibel gegenüber Änderungen des Ionenmilieus reagieren. Dabei bleibt zu klären, ob zusätzlich zu dem Verlust der katalytischen Aktivität auch weitere Effekte auf die Struktur und/oder Funktion der mGRK6-B-Proteine nachzuweisen sind. Im folgenden wurden daher in den vergleichenden Analysen zur Phosphorylierungsaktivität von verschiedenen mGRK6-B-Mutanten Proteine des 300 000 g-Überstandes eingesetzt und die maximalen NaCl-Konzentrationen durch Zugabe von entsprechenden Volumina NaCl-freiem Extraktionspuffer in den Reaktionsansätzen ausgeglichen.

3.5 Herstellung und Expression weiterer carboxylterminal veränderter Mutanten der mGRK6-B

Die vorausgegangenen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit den carboxylterminal verkürzten mGRK6-B Mutanten mGRK6-B Mut1, Mut2 und Mut3 hatten gezeigt, dass diese, obwohl sie keine Unterschiede in der Interaktion mit Phospholipiden aufweisen, sich in ihrer Aktivität Rhodopsin zu phosphorylieren unterscheiden. Unklar war, worauf die ermittelten Unterschiede in der Phosphorylierungsaktivität zurückzuführen sind. Vergleicht man die carboxylterminalen Abschnitte der aktivsten (mGRK6-B Mut2) und der kürzesten (mGRK6-B Mut3), aber weniger aktiven mGRK6-B-Mutante, so fallen zwei Bereiche auf, die für die funktionellen Unterschiede bedeutsam sein könnten. Zum einen sind dies zwei benachbarte basische Aminosäuren, ein Arginin an Position 570 (R^{570}) und ein Lysin an Position 571 (K^{571}), die eine Interaktion mit der Plasmamembran und/oder dem Rezeptorsubstrat begünstigen könnten, zum anderen eine putative Phosphorylierungsstelle in Form eines Threoninrestes (T^{568}). Für die humane GRK5 war in Untersuchungen von Pronin *et al.* ein Einfluss sowohl basischer Aminosäuren als auch putativer Phosphorylierungsstellen im carboxylterminalen Abschnitt auf die Interaktion mit Phospholipiden bzw. die Phosphorylierung membrangebundener Substrate nachgewiesen worden (Pronin *et al.*, 1998). Um die Bedeutung dieser Aminosäuren des carboxylterminalen Abschnittes für die Phosphorylierungsaktivität von mGRK6-B näher zu untersuchen, wurden von der mGRK6-B Mut2-Mutante ausgehend weitere mGRK6-B-Mutanten hergestellt, in denen die genannten Aminosäuren jeweils durch neutrale Alaninreste ersetzt wurden. So wurde bei der mGRK6-B Mut4-Mutante die putative Phosphorylierungsstelle an der Aminosäure 568 entfernt, indem das Threonin⁵⁶⁸ gegen Alanin ausgetauscht ($T^{568} \rightarrow A^{568}$) wurde. Bei der mGRK6-B Mut5-Mutante wurden die basischen Aminosäuren Arginin⁵⁷⁰ und Lysin⁵⁷¹ ($R^{570} \rightarrow A^{570}$; $K^{571} \rightarrow A^{571}$) durch Alanine ersetzt. Bei der mGRK6-B Mut6-Mutante wurden beide Modifikationen durchgeführt (Abb. 19).

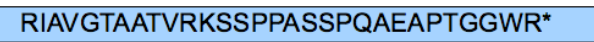
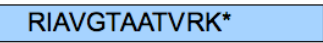
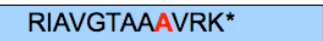
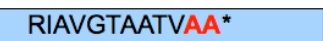
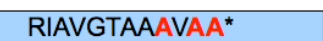
	Aminoterminaler Abschnitt		Carboxylterminaler Abschnitt	
mGRK6-B		...		589 AS
mGRK6-B Mut2		...		571 AS
mGRK6-B Mut4		...		571 AS
mGRK6-B Mut5		...		571 AS
mGRK6-B Mut6		...		571 AS
mGRK6-C		...		560 AS

Abb. 19: Die mGRK6-Varianten mGRK6-B und mGRK6-C und mGRK6-B-Mutanten. Dargestellt sind die Primärstrukturen der carboxylterminalen Abschnitte der wildtypischen Proteine mGRK6-B und mGRK6-C sowie der mGRK6-B-Mutanten Mut2, Mut4, Mut5 und Mut6. Die mGRK6-B Mut4-Mutante enthält statt eines Threoninrestes als putativer Phosphorylierungsstelle ein neutrales Alanin ($T^{568} \rightarrow A^{568}$). Die basischen Aminosäuren im carboxylterminalen Abschnitt der mGRK6-B Mut5-Mutante wurden gegen zwei Alaninreste ausgetauscht ($R^{570} \rightarrow A^{570}$; $K^{571} \rightarrow A^{571}$). Die mGRK6-B Mut6-Mutante enthält beide Veränderungen in der Primärsequenz. Die ausgetauschten Aminosäuren sind rot hervorgehoben. Die Anzahl der Aminosäuren für die einzelnen Varianten und Mutanten ist auf der rechten Seite angegeben. Das Ende der Aminosäuresequenz ist durch ein Sternchen (*) markiert.

A= Alanin, E= Glutaminsäure, G= Glycin, I= Isoleucin, K= Lysin, P= Prolin, Q= Glutamin, R= Arginin, S= Serin, T= Threonin, V= Valin, W= Tryptophan

Die Herstellung der mGRK6-B Mut4-, Mut5- und Mut6-kodierenden cDNAs erfolgte mit Hilfe der *polymerase chain reaction* (PCR) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (siehe Abb. 20). Als Ausgangs-DNA diente die mGRK6-B Mut2-kodierende cDNA. Nach der PCR wurde die etwa 2 kb großen und für die jeweilige mGRK6-B-Mutante kodierende cDNA-Fragmente in einem 1 % (m/V) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und aus diesem extrahiert. Die cDNA wurde anschließend in den Vektor pCR2.1 ligiert und mit dem Plasmid *E. coli* Dh5 transformiert. Aus den Bakterienkolonien wurde die Plasmid-DNA präpariert und die Nukleotidsequenz der mGRK6-B Mut4- Mut5- und Mut6-kodierenden cDNAs durch DNA-Sequenzierung kontrolliert.

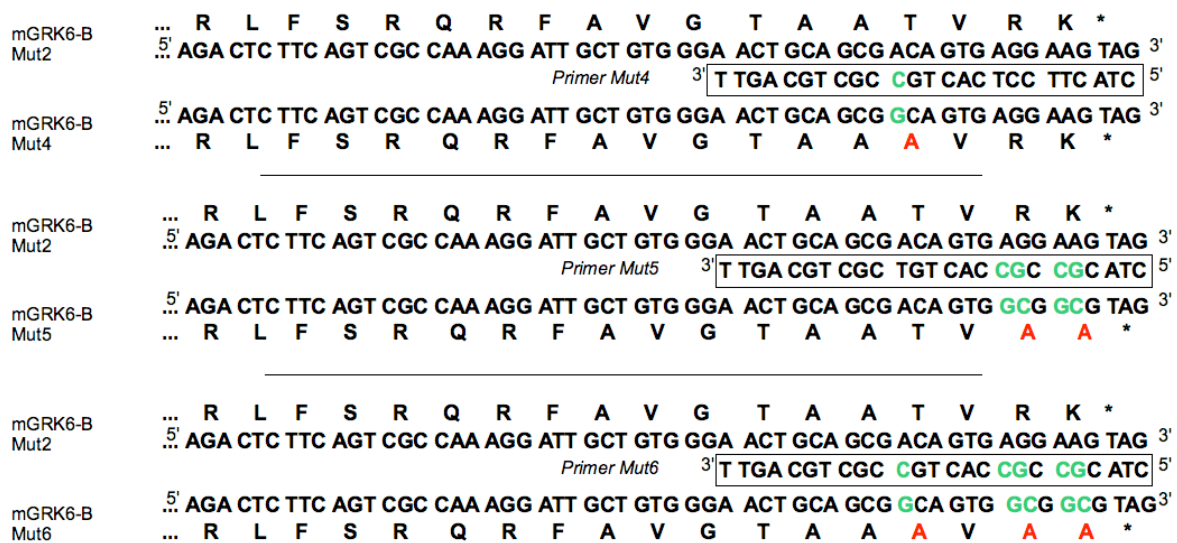


Abb. 20: Schematische Darstellung zur Herstellung der mGRK6-B Mut4-, Mut5- und Mut6-kodierenden cDNAs. In der Abbildung sind die zur Herstellung der jeweiligen mGRK6-B-Mutanten-kodierenden cDNAs verwendeten Oligonukleotide (*Primer Mut4*, *Primer Mut5* und *Primer Mut6*) dargestellt. Die Nukleotidabfolge der Ausgangs-cDNA mGRK6-B Mut2 und der mutierten Ziel-cDNAs mGRK6-B Mut4, Mut5 und Mut6 sowie die von diesen cDNAs kodierte Aminosäuresequenz sind oberhalb und unterhalb der Oligonukleotidprimer eingezeichnet. Die veränderten Basen, die zu den gewünschten Mutationen in der cDNA führten, sind in grün, die veränderten Aminosäuren sind rot dargestellt. Das jeweilige Ende der Aminosäuresequenz ist durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet.

Aminosäuren: A= Alanin, G= Glycin, K= Lysin, L= Leucin, F= Phenylalanin, Q= Glutamin, R= Arginin, S= Serin, T= Threonin, V= Valin

DNA: A= Adenin, G= Guanin, C= Cytosin, T= Thymin

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die vorgenommen Veränderungen in der Aminosäuresequenz auf die Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-B-Mutanten haben, wurden diese mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems in *Sf9*-Zellen exprimiert. Die mGRK6-B Mut4-, Mut5- und Mut6-kodierenden cDNAs wurden dafür aus dem pCR2.1-Vektor mit Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten, in den linearisierten und dephosphorylierten Baculovirus-Transfervektor pVL1393 ligiert und mit diesem Plasmid kompetente *E. coli* Dh5α transformiert. Aus den Bakterienkolonien wurde die Plasmid-DNA präpariert und die Nukleotidsequenz der mGRK6-B Mut4- Mut5- und Mut6-kodierenden cDNAs über DNA-Sequenzierung kontrolliert. Zur Herstellung der Baculoviren wurden *Sf9*-Zellen mit dem die cDNAs-tragenden Baculovirus-Transfervektor pVL1393 in Anwesenheit von Baculovirus-DNA transfiziert und die Baculoviren bis zu einem geeigneten Titer amplifiziert. Für die rekombinanten Polypeptide mGRK6-B Mut4, mGRK6-B Mut5 und mGRK6-B Mut6 konnte 48 h nach Infektion mit den entsprechenden

Baculoviren eine optimale Expression in infizierten Insektenzellen beobachtet werden. Die *Sf9*-Zellen wurden nach Zugabe von Extraktionspuffer in Anwesenheit von 250 mM NaCl aufgeschlossen und 300 000 g-Überstände gewonnen. Bei dieser Salzkonzentration war es möglich, den Teil der über hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran haftenden überexprimierten Rezeptorkinasen abzulösen. Die in den 300.000 g-Überständen der infizierten Zellen enthaltenen mGRK6-B-Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 10 % (m/V) SDS-Polyacrylamidgel auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert.

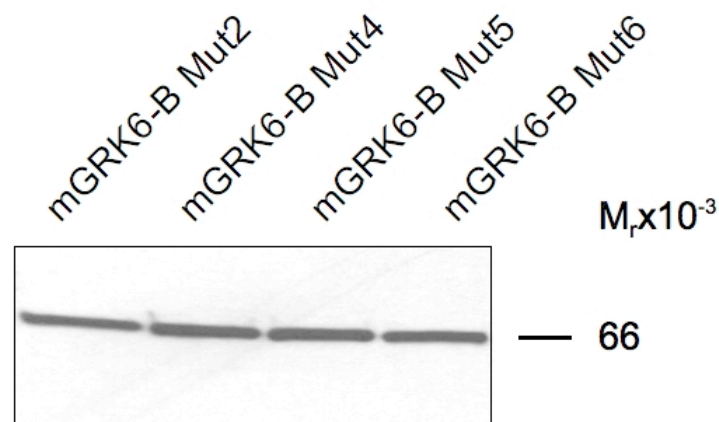


Abb. 21: Expression der mGRK6-B Mutanten mGRK6-B Mut2, mGRK6-B Mut4, mGRK6-B Mut5 und mGRK6-B Mut6 in Baculovirus-infizierten *Sf9*-Insektenzellen. *Sf9*-Zellen wurden mit mGRK6-B Mut2-, mGRK6-B Mut4-, mGRK6-B Mut5- und mGRK6-B Mut6-kodierenden Baculoviren infiziert und für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem 250 mM NaCl enthaltenden Extraktionspuffer aufgeschlossen und die Zelllysate bei 300 000 g zentrifugiert. Die in den 300.000 g-Überständen der *Sf9*-Zellen enthaltenen mGRK6-B Mut4-, mGRK6-B Mut5- und mGRK6-B-Mut6-Proteine wurden mittels Elektrophorese in einem 10 % (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards sind gekennzeichnet.

Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Proteine der mGRK6-B-Mutanten in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert worden waren. Unter Verwendung des Anti-Pep2-Antikörpers konnten die exprimierten rekombinanten Proteine mGRK6-B Mut2, mGRK6-B Mut4, mGRK6-B Mut5 und mGRK6-B Mut6 nachgewiesen werden. Die molekulare Masse der exprimierten Proteine lag bei ~ 65 kDa.

3.6 Funktionelle Analyse der mGRK6-B-Mutanten Mut4, Mut5 und Mut6

Um die Aktivität der mGRK6-B-Mutanten Mut4, Mut5 und Mut6 zu ermitteln und mit der von mGRK6-B Mut2 zu vergleichen, wurden die rekombinanten Proteine wie unter 3.7 beschrieben in einer Phosphorylierungsreaktion mit den Substraten Phosvitin und Rhodopsin in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ eingesetzt. Die in die Reaktion eingesetzten Mengen der mGRK6-B-Proteine wurden hierfür über einen *Western blot* unter Einsatz des Anti-Pep2-Antikörpers angeglichen.

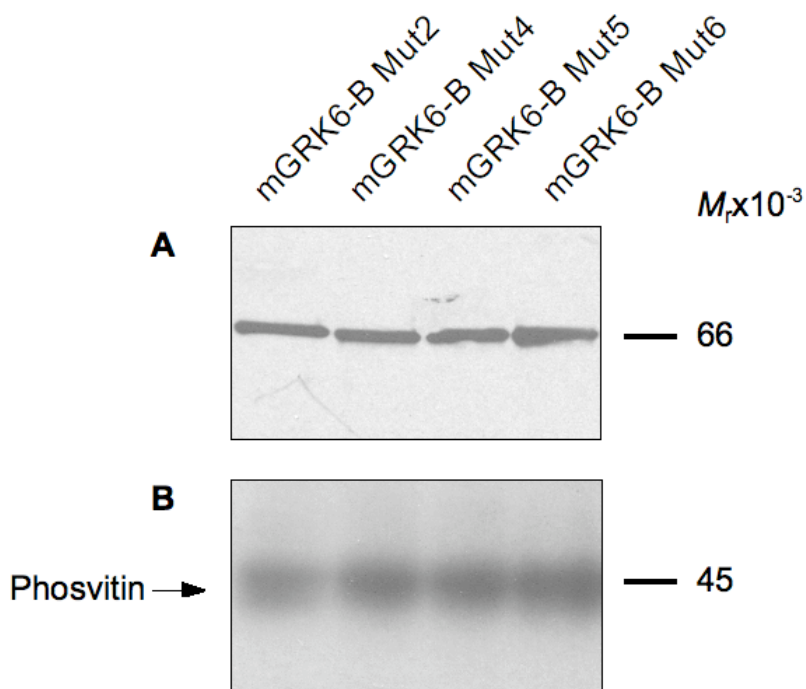


Abb. 22: Phosphorylierung von Phosvitin durch die rekombinanten mGRK6-B-Proteine mGRK6-B Mut2, mGRK6-B Mut4, mGRK6-B Mut5 und mGRK6-B Mut6. Die in den 300.000 g-Überständen infizierter *Sf9*-Zellen enthaltenen mGRK6-B-Proteinmengen, die in die Phosphorylierung eingesetzt werden sollten, wurden mittels *Western blot* auf gleiche Mengen eingestellt (A). Anschließend wurden die entsprechenden Mengen der 300 000 g-Überstände in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM MgCl_2 mit 12.5 μg Phosvitin in Anwesenheit von 100 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ für 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Röntgenfilm wurde für 1 h mit dem Gel exponiert (B). Die Positionen des Phosvitins und der Molekulargewichtsstandards sind angegeben.

Im Autoradiogramm nach der Phosphorylierung von Phosvitin waren für die mGRK6-B-Mutanten keine Unterschiede in der Phosphorylierung von Phosvitin durch die mGRK6-B-

Mutanten mGRK6-B Mut2, mGRK6-B Mut4, Mut5 und Mut6 festzustellen (Abb. 22). Nachdem die Mutanten katalytische Aktivität bei der Phosphorylierung des löslichen Substrates Phosvitin gezeigt hatten, wurden Versuche mit dem membranständigen Licht-aktivierten G-Protein gekoppelten Rezeptor Rhodopsin als Substrat durchgeführt. Das Substrat wurde hierbei in zwei unterschiedlichen Konzentrationen, 120 bzw. 240 nM, eingesetzt. Die Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-B-Mutanten wurde mit der des wildtypische mGRK6-C-Proteins verglichen. Die in die Untersuchungen eingesetzten Mengen der mGRK6-B-Proteine wurden hierfür wiederum über einen *Western blot* unter Einsatz des Anti-Pep2-Antikörpers angeglichen (Abb. 23).

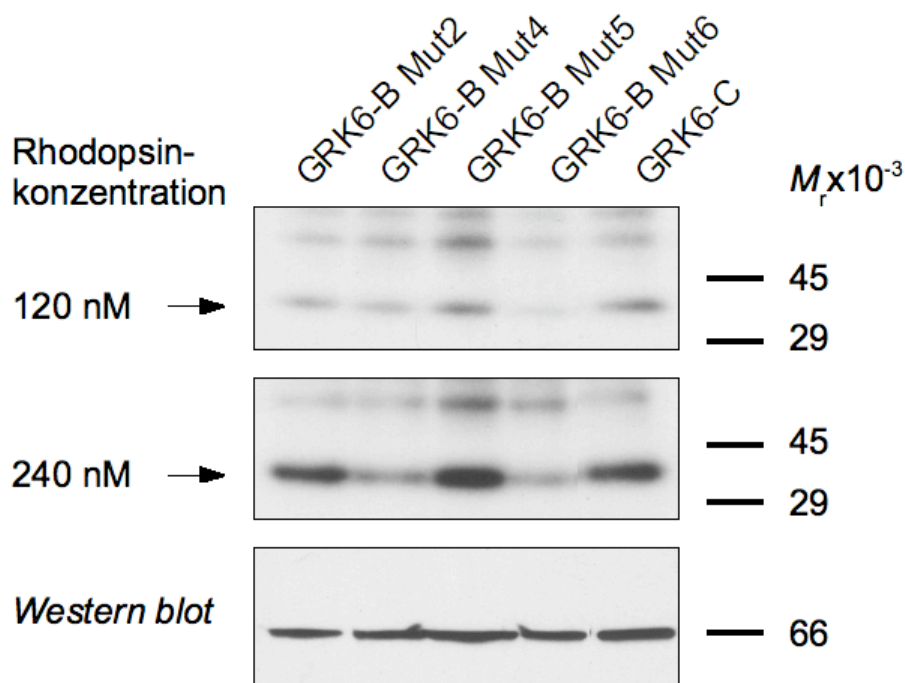


Abb. 23: Phosphorylierung von Licht-aktiviertem Rhodopsin durch mGRK6-C und mGRK6-B-Mutanten. Die in den 300.000 g-Überständen infizierter *Sf9*-Zellen enthaltenen mGRK6-B-Proteinmengen, die in die Phosphorylierung eingesetzt werden sollten, wurden mittels *Western blot* auf gleiche Mengen eingestellt (A). Anschließend wurden die entsprechenden Mengen der 300 000 g-Überstände in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA und 3,7 mM MgCl₂ mit 120 nM bzw. 240 nM Rhodopsin in Anwesenheit von 100 µM [γ -³²P]ATP für 10 min bei 30 °C belichtet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Röntgenfilm wurde für 22 h mit dem fixierten Gel exponiert (B). Die Positionen des Phosvitins und der Molekulargewichtsstandards sind angegeben.

Die in Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen mGRK6-B-Mutanten das Licht-aktivierte Rhodopsin unterschiedlich phosphorylierten. Ähnlich wie bereits in den vorausgegangenen Untersuchungen beobachtet, phosphorylierten das wildtypische mGRK6-C-Protein und die mGRK6-B Mut2-Mutanten das Rhodopsin gleich stark. Interessanterweise zeigte die mGRK6-B Mut5-Mutante ein ähnlich hohes Aktivitätsniveau. Bei dieser Mutante waren die basischen Aminosäuren durch Alanine ersetzt worden. Im Gegensatz zur Mutante mGRK6-B Mut5 wiesen die Mutanten mGRK6-B Mut4 und mGRK6-B Mut6 eine deutlich geringere Phosphorylierungsaktivität im Vergleich zu mGRK6-C und mGRK6-B Mut2 auf. Bei diesen beiden mGRK6-B-Mutanten handelte es sich um jene, bei denen durch Austausch des Threonins gegen Alanin ($T^{568} \rightarrow A^{568}$) die putative Phosphorylierungsstelle entfernt worden war. Für die geringere Rhodopsinkonzentration (120 nM) waren allgemein schwächere Signale festzustellen, das Muster der Signalstärken entsprach jedoch in beiden Versuchsreihen den oben genannten Beobachtungen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die basischen Aminosäuren Arginin⁵⁷⁰ und Lysin⁵⁷¹ im carboxylterminalen Abschnitt (AS 567 bis 571) von mGRK6-B keinen direkten Einfluss auf die Phosphorylierungsaktivität von mGRK6-B haben. Die Ergebnisse lassen darüber hinaus den Schluss zu, dass dem Threonin an Position 568 im carboxylterminalen Abschnitt der mGRK6-B eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivität dieses Proteins zukommt.

3.7 Herstellung und Expression der mGRK6-B-Mutanten Mut7 und Mut8

Die Beobachtung, dass der Austausch des Threonins gegen Alanin zu einem deutlichen Verlust der Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-B Mutanten Mut4 und Mut6 geführt hatte, könnte ein Indiz dafür darstellen, dass die Phosphorylierung dieses Threonins eine Bedeutung bei der Regulation der mGRK6-B Kinaseaktivität z. B. über Beeinflussung der Interaktion der Kinase mit der Plasmamembran spielt. Um die funktionelle Bedeutung dieser möglichen Phosphorylierung näher zu untersuchen, sollte daher die mögliche Phosphorylierung des Proteins an der Position 568 der Aminosäuresequenz durch Austausch des Threonins gegen Glutaminsäure ($T^{568} \rightarrow E^{568}$) nachgeahmt werden (Maciejewski *et al.*, 1995; Pronin und Benovic, 1997). Auf diese Weise liegt an der Position 568 der Aminosäuresequenz auch ohne Phosphorylierung negative Ladung vor. Es

wurden zwei mGRK6-B-Mutanten hergestellt, indem das Threonin an Position 568 durch Glutaminsäure im Falle von mGRK6-B Mut7 ausgehend von der mGRK6-B Mut2-Mutante und im Falle von mGRK6-B Mut8 ausgehend von der mGRK6-B Mut5-Mutante ersetzt wurde. Die mGRK6-B Mut8-Mutante unterscheidet sich von der mGRK6-B Mut7 durch den zusätzlichen Austausch der basischen Aminosäuren Arginin⁵⁷⁰ und Lysin⁵⁷¹ gegen Alanine (Abb. 24).

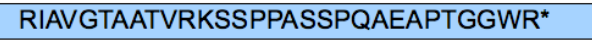
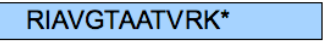
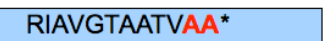
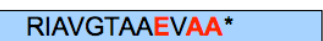
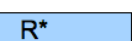
	Aminoterminaler Abschnitt		Carboxylterminaler Abschnitt	
mGRK6-B		...		589 AS
mGRK6-B Mut2		...		571 AS
mGRK6-B Mut7		...		571 AS
mGRK6-B Mut5		...		571 AS
mGRK6-B Mut8		...		571 AS
mGRK6-C		...		560 AS

Abb. 24: Die mGRK6-B-Varianten mGRK6-B und mGRK6-C und die mGRK6-B-Mutanten Mut7 und Mut8. Dargestellt sind die Primärstrukturen der carboxylterminalen Abschnitte der wildtypischen Proteine mGRK6-B und mGRK6-C sowie der mGRK6-B-Mutanten Mut2, Mut5, Mut7 und Mut8. Ausgehend von der mGRK6-B Mut2- bzw. der mGRK6-B Mut5-Mutante wurde ein Threonin- durch einen Glutaminsäurerest ($T^{568} \rightarrow E^{568}$) ersetzt. Dadurch entstanden die Mutanten mGRK6-B Mut7 ($T^{568} \rightarrow E^{568}$) und mGRK6-B Mut8 ($T^{568} \rightarrow E^{568}$, $R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$). Die ausgetauschten Aminosäuren sind rot hervorgehoben. Die Anzahl der Aminosäuren für die einzelnen Varianten und Mutanten ist auf der rechten Seite angegeben. Das Ende der Aminosäuresequenz ist durch ein Sternchen (*) markiert.

A= Alanin, E= Glutaminsäure, G= Glycin, I= Isoleucin, K= Lysin, P= Prolin, Q= Glutamin, R= Arginin, S= Serin, T= Threonin, V= Valin, W= Tryptophan

Die Herstellung der mGRK6-B Mut7- und Mut8-kodierenden cDNAs erfolgte mit Hilfe der *polymerase chain reaction* (PCR) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (siehe Abb. 25). Als Ausgangs-DNAs dienten die mGRK6-B Mut2- bzw. mGRK6-B Mut5-kodierende cDNAs (Abb. 25). Nach der PCR wurde die etwa 2 kb großen und für die jeweilige mGRK6-B-Mutante kodierende cDNA-Fragmente in einem Agarosegel (1 % (m/V)) elektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Die cDNAs wurden in den Vektor pCR2.1 ligiert und mit dem Plasmid *E.coli* Dh5 α transformiert. Aus den Bakterien wurde die Plasmid-DNA präpariert und die

Nukleotidsequenz der mGRK6-B Mut7- und Mut8-kodierenden cDNAs durch DNA-Sequenzierung kontrolliert.

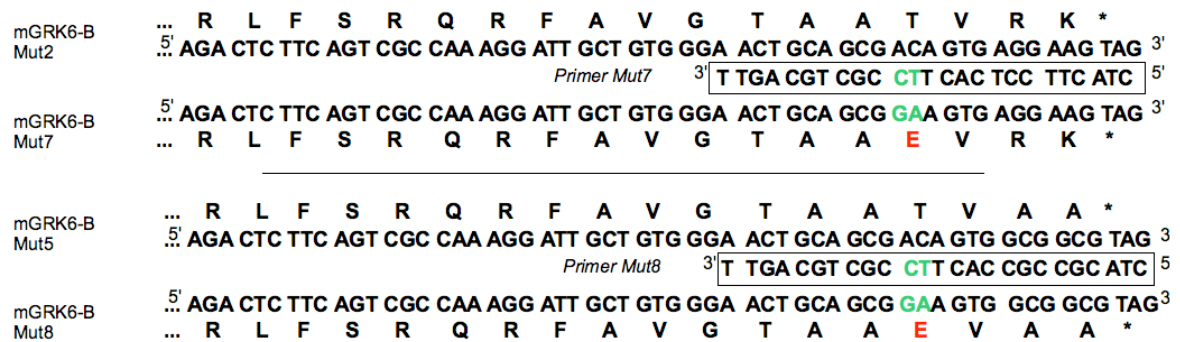


Abb. 25: Herstellung der mGRK6-B Mut7- und Mut8-kodierenden cDNAs. In der Abbildung sind die zur Herstellung der jeweiligen mGRK6-B-Mutanten-kodierenden cDNAs verwendeten Oligonukleotide (*Primer Mut7* und *Primer Mut8*) dargestellt. Die Nukleotidabfolge der Ausgangs-cDNA mGRK6-B Mut2 und mGRK6-B Mut5 und der mutierten Ziel-cDNAs mGRK6-B Mut7 und Mut8 sowie die von diesen cDNAs kodierte Aminosäuresequenz sind oberhalb und unterhalb der Oligonukleotidprimer eingezeichnet. Die veränderten Basen, die zu den gewünschten Mutationen in der cDNA führten, sind in grün, die veränderten Aminosäuren sind rot dargestellt. Das jeweilige Ende der Aminosäuresequenz ist durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet.

Aminosäuren: A= Alanin, E= Glutaminsäure, G= Glycin, K= Lysin, L= Leucin, F= Phenylalanin, Q= Glutamin, R= Arginin, S= Serin, T= Threonin, V= Valin

DNA: A= Adenin, G= Guanin, C= Cytosin, T= Thymin

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die vorgenommen Veränderungen in der Aminosäuresequenz auf die Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-B-Mutanten haben, wurden diese mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems in *Sf9*-Zellen exprimiert. Dazu wurde die für die mGRK6-B-Mutanten Mut7 und Mut8 kodierende cDNA zunächst in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 ligiert und mit diesem Plasmid kompetente *E.coli* Dh5α transformiert. Aus den Bakterien wurde die Plasmid-DNA präpariert und die Nukleotidsequenz der mGRK6-B Mut7 und Mut8-kodierenden cDNAs durch DNA-Sequenzierung kontrolliert. Zur Herstellung der rekombinanten mGRK6-B-Proteine wurden *Sf9*-Zellen mit dem die entsprechen cDNAs tragenden Baculovirus-Transfervektor pVL1393 in Anwesenheit von Baculovirus-DNA transfiziert und die Viren bis zu einem geeigneten Titer amplifiziert. Für die rekombinanten Proteine mGRK6-B Mut7 und Mut8 konnte 48 h nach Infektion mit den entsprechenden Baculoviren eine optimale Expression

in den infizierten Insektenzellen beobachtet werden. Die infizierten Insektenzellen wurden wie unter 3.4.4 beschrieben aufgearbeitet und 300 000 g-Überstände gewonnen. Die in den 300.000 g-Überständen enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (siehe Abb. 26).

3.8 Funktionelle Analyse der mGRK6-B-Mutanten Mut7 und Mut8

Um die Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-B-Mutanten Mut7 und Mut8 zu ermitteln und mit der von den bisher generierten Mutanten und der wildtypischen mGRK6-C zu vergleichen, wurden die rekombinanten Proteine, wie unter 3.7 beschrieben in eine Phosphorylierungsreaktion mit den Substraten Phosvitin und Rhodopsin in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ eingesetzt. Die in die Reaktion verwendeten Mengen der mGRK6-B-Proteine wurden hierfür über einen *Western blot* unter Einsatz des Anti-Pep2-Antikörpers angeglichen.

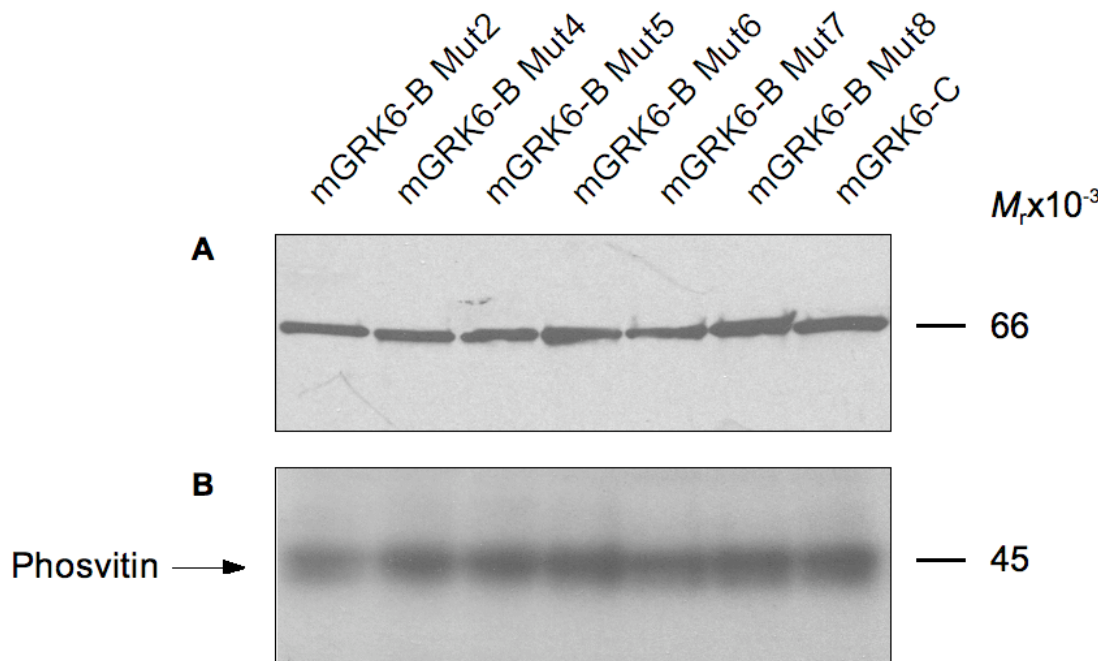


Abb. 26: Phosphorylierung von Phosvitin durch die mGRK6-B-Mutanten und durch das wildtypische mGRK6-C-Protein. Die in den 300.000 g-Überständen infizierter *Sf9*-Zellen enthaltenen mGRK6-B-Proteinmengen, die in die Phosphorylierung eingesetzt werden sollten, wurden mittels *Western blot* auf gleiche Mengen eingestellt (A). Anschließend wurden die entsprechenden Mengen der 300 000 g-Überstände in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM $MgCl_2$ mit 12.5 μ g Phosvitin in Anwesenheit von 100 μ M [γ - ^{32}P]ATP für 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Röntgenfilm wurde für 1 h mit dem Gel exponiert (B). Die Positionen des Phosvitins und der Molekulargewichtsstandards sind angegeben

Die in Abbildung 26 gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die beiden mGRK6-B-Mutanten Mut7 und Mut8 katalytisch aktiv waren und sich nicht in ihrer Aktivität das lösliche Substrat Phosvitin zu phosphorylieren von den anderen mGRK6-B-Mutanten und vom wildtypischen mGRK6-C-Protein unterschieden. Als nächstes wurde die Phosphorylierung des Licht-aktivierten Substrats Rhodopsin durch die mGRK6-B-Mutanten untersucht. Da sich in den Vorversuchen gezeigt hatte, dass höhere Konzentrationen von Rhodopsin zu deutlicheren Signalen im Autoradiogramm führten, ohne die Verteilung der Signalstärken zu beeinflussen, wurde das Substrat Rhodopsin in den folgenden Untersuchungen in einer Endkonzentration von 1.2 μ M eingesetzt. Die in Abbildung 27 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorausgegangenen Untersuchungen, das wildtypische mGRK6-C-Protein Rhodopsin ähnlich stark phosphorylierte wie mGRK6-B Mut2 und mGRK6-B Mut5. Die Phosphorylierungsaktivität von mGRK6-B Mut4 und Mut6 war dagegen deutlich geringer.

Interessanterweise phosphorylierte mGRK6-B Mut7 Rhodopsin deutlich stärker als die Mutanten mGRK6-B Mut4 und Mut6. Der Unterschied zwischen diesen Mutanten liegt im Alanin an Position 568, das gegen die die Phosphorylierung nachahmende Glutaminsäure ausgetauscht worden war. Dieses Ergebnis unterstützt die zuvor gemachte Annahme, dass die Phosphorylierung des Threonins an dieser Position im wildtypischen mGRK6-B-Protein für die Aktivität der Kinase von Bedeutung ist. Obwohl der Austausch der basischen Aminosäuren gegen Alanine in mGRK6-B Mut5 keinen Einfluss auf die Phosphorylierungsaktivität des Proteins zeigte, scheint dies bei Anwesenheit einer die Phosphorylierung nachahmenden negativ geladenen Aminosäure von Bedeutung zu sein. So phosphorylierte mGRK6-B Mut8 Rhodopsin deutlich schwächer als mGRK6-B Mut7.

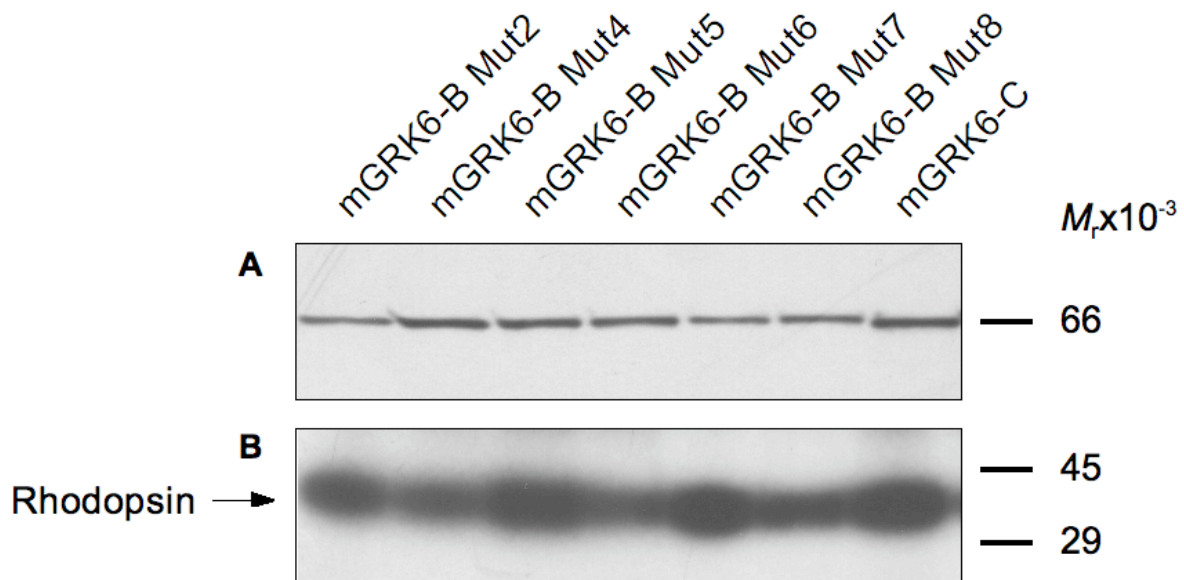


Abb. 27: Phosphorylierung von Licht-aktiviertem Rhodopsin durch die mGRK6-B-Mutanten und das wildtypische mGRK6-C-Protein. Die in den 300.000 g-Überständen infizierter *Sf9*-Zellen enthaltenen mGRK6-B-Proteinmengen, die in die Phosphorylierung eingesetzt werden sollten, wurden mittels *Western blot* auf gleiche Mengen eingestellt (A). Anschließend wurden die entsprechenden Mengen der 300 000 g-Überstände in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM MgCl₂ mit 1.2 µM Rhodopsin in Anwesenheit von 100 µM [γ -³²P]ATP für 10 min bei 30 °C belichtet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Röntgenfilm wurde für 16 h mit dem fixierten Gel exponiert (B). Die Positionen des Rhodopsins und der Molekulargewichtsstandards sind angegeben.

Auch die mGRK6-B-Mutanten Mut7 und Mut8 waren in der Lage, den membranständigen G-Protein gekoppelten Lichtrezeptor Rhodopsin zu phosphorylieren. Im Autoradiogramm war für die mGRK6-B Mut7-Mutante ein deutlich stärkeres Signal auszumachen als für die mGRK6-B Mut8-Mutante. Die Signalstärke für mGRK6-B Mut7 ($T^{568} \rightarrow E^{568}$) lag dabei auf einem vergleichbar hohen Niveau wie für die mGRK6-B Mut2- und Mut5 ($R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$)-Mutante sowie die wildtypische mGRK6-C-Variante. Die mGRK6-B Mut8-Mutante ($T^{568} \rightarrow E^{568}$, $R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$) dagegen korrespondierte in ihrer schwächeren Phosphorylierungsaktivität mit den Mutanten mGRK6-B Mut4 ($T^{568} \rightarrow A^{568}$) und Mut6 ($T^{568} \rightarrow A^{568}$, $R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die trunkierte mGRK6-B Mut2-Mutante (-18 AS) auch unter standardisierten Bedingungen mit einer NaCl-Konzentration von ~ 17 mmol im Vergleich mit der wildtypischen mGRK6-B-Variante und den trunkierten Mutanten mGRK6-B Mut1 (-13 AS) und Mut3 (-22 AS) die höchste Aktivität bei der Phosphorylierung von Rhodopsin zeigte. Bei der Interaktion mit Phospholipiden waren keine Unterschiede zwischen der wildtypischen mGRK6-B-Variante und den trunkierten Mutanten beobachtet worden, zu berücksichtigen ist hierbei, dass für die verwendeten chromatographisch gereinigten mGRK6-B-Proteine nach der durchgeführten Entsalzung keine katalytische Aktivität nachweisbar war. Der Austausch der putativen Phosphorylierungsstelle (T^{568}) im carboxylterminalen Abschnitt der trunkierten mGRK6-B Mut2-Mutante gegen einen Alaninrest (mGRK6-B Mut4; $T^{568} \rightarrow A^{568}$) führte sowohl alleine, als auch in Kombination mit dem Austausch zweier basischer Aminosäuren (mGRK6-B Mut6; $T^{568} \rightarrow A^{568}$, $R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$) zu einer verminderten Aktivität bei der Phosphorylierung von Rhodopsin. Ein eindeutiger Einfluss auf die Phosphorylierung des membranständigen Substrates durch den alleinigen Austausch der basischen Aminosäuren gegen Alaninreste (mGRK6-B Mut5; $R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$) ließ sich dagegen nicht nachweisen. Die Mutation der putativen Phosphorylierungsstelle Threonin zu Glutaminsäure, wodurch eine Nachahmung des phosphorylierten Zustandes der Rezeptorkinase erzeugt wird, resultierte für die mGRK6-B Mut7-Mutante ($T^{568} \rightarrow E^{568}$) in einer vergleichbar hohen Phosphorylierungsaktivität, eine zusätzliche Steigerung gegenüber der mGRK6-B Mut2-Mutante und der wildtypischen mGRK6-C-Variante war nicht zu beobachten. Die Kombination dieser Mutation mit dem Ersatz der basischen Aminosäuren durch Alaninreste (mGRK6-B Mut8; $T^{568} \rightarrow E^{568}$, $R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$) führte hingegen zu einer Abnahme der Aktivität bei der Phosphorylierung von Rhodopsin,

die mit den Signalstärken der Mutanten mGRK6-B Mut4 und Mut6 korrespondierte. Für die Phosphorylierung des löslichen Substrates Phosvitin konnte für alle untersuchten Varianten und Mutanten bei gleichen Proteinmengen eine vergleichbare Aktivität beobachtet werden.

4 Diskussion

Die Kinasen G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren (GRKs) spielen bei der Desensibilisierung Liganden-aktivierter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) eine entscheidende Rolle. Die Familie umfasst derzeit sieben Mitglieder, GRK1 bis GRK7. Von einzelnen Mitgliedern, wie GRK4 und GRK6, sind darüber hinaus verschiedene Varianten bekannt. In unserer Arbeitsgruppe wurden von der GRK6 der Maus (mGRK6) Spleißvarianten isoliert, die für vier Isoformen der Rezeptorkinase, mGRK6-A, -B, -C und -D kodieren (Moepps *et al.*, 1999). Die Isoformen mGRK6-A mit 576 Aminosäuren, mGRK6-B mit 589 Aminosäuren und mGRK6-C mit 560 Aminosäuren sind bis zur Aminosäure 559 identisch und unterscheiden sich nur in der Länge und im Aufbau ihres carboxylterminalen Abschnittes. Die vierte Isoform, mGRK6-D ist mit 244 Aminosäuren kürzer als die übrigen Isoformen und besitzt eine unvollständige katalytische Domäne (Moepps *et al.*, 1999). Im verlängerten carboxylterminalen Abschnitt der mGRK6-A-Isoform finden sich Cysteine (C^{561} , C^{562} und C^{565}), die sehr wahrscheinlich durch posttranslationale Palmitoylierung zur Interaktion der Kinase mit der Plasmamembran beitragen. Der carboxylterminale Abschnitt der mGRK6-B-Isoform enthält Proline und eine Reihe Hydroxylgruppen tragender Aminosäuren und ähnelt mit dieser Zusammensetzung dem entsprechenden Abschnitt der GRK5 des Menschen (Pronin *et al.*, 1998, Moepps *et al.*, 1999). Für den carboxylterminalen Abschnitt der GRK5 wird eine konstitutive Interaktion mit Phospholipiden der Plasmamembran durch basische Aminosäuren angenommen (Pronin *et al.*, 1998). Darüber hinaus liegen Hinweise vor, dass die Aktivität von GRK5 über Phosphorylierung von im carboxylterminalen Abschnitt gelegenen Serin- und Threoninresten durch Proteinkinasen reguliert wird (Pronin *et al.*, 1998). Auch der carboxylterminale Abschnitt von mGRK6-B enthält Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch Proteinkinasen. Die mGRK6-C-Isoform endet mit einem Arginin in Position 560 (R^{560}) und bietet in ihrem verkürzten carboxylterminalen Abschnitt keine Konsensussequenzen für posttranslationale Modifikation.

Für die Phosphorylierung von membranständigen Rezeptoren durch GRKs spielt die Interaktion der Kinasen mit der Plasmamembran eine entscheidende Rolle. Alle Eigenschaften oder Strukturen, die diese Interaktion der Kinasen mit der Plasmamembran kontrollieren, können daher auch Einfluss auf die Aktivität der Kinasen haben. Bisher wurde angenommen, dass der carboxylterminale Abschnitt bzw. dessen posttranslationale

Modifikationen in den Proteinen der GRK4-Familie von entscheidender Bedeutung für die Lokalisation der Kinasen an der Plasmamembran ist (Inglese *et al.*, 1993, Stoffel *et al.*, 1997). Interessanterweise hatten vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt, dass mGRK6-C trotz des fehlenden carboxylterminalen Abschnittes im zellfreien System mit Phospholipiden interagiert, in Zellen an der Plasmamembran lokalisiert ist und membranständige GPCRs sogar deutlich besser phosphoryliert als die Varianten mGRK6-A und mGRK6-B (Dissertation Vatter, 2000; Vatter *et al.*, 2005). Diese Befunde führten zur Hypothese, dass der carboxylterminale Abschnitt der mGRK6-Varianten für die Interaktion der Kinasen mit der Plasmamembran nicht essentiell ist, aber eine autoregulatorische Funktion in der Vermittlung der Membraninteraktion und der Rezeptorkinaseaktivität übernimmt (Dissertation Vatter, 2000; Vatter *et al.*, 2005). So waren unter Verwendung von carboxylterminal trunkierten mGRK6-A-Varianten zwei autoinhibitorische und ein dazwischen gelegener stimulatorischer Bereich im carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-A identifiziert worden (Vatter *et al.*, 2005; Dissertation Samel, 2007). Sowohl im zellfreien System als auch an intakten Zellen war gezeigt worden, dass die Verkürzung des carboxylterminalen Abschnittes der mGRK6-A um neun Aminosäuren (D⁵⁶⁷) zu einer Zunahme der Phosphorylierungsaktivität und eine weitere Verkürzung um sieben Aminosäuren (D⁵⁶⁰) zu einer Abnahme der Phosphorylierung von Rezeptorsubstraten durch die veränderten Kinasen führte (Dissertation Samel, 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob dem carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-B eine ähnliche autoregulatorische Bedeutung zukommt wie dem carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-A (Vatter *et al.*, 2005; Dissertation Samel, 2007). Hierfür sollte die Aktivität von mGRK6-B-Mutanten verglichen werden, deren carboxylterminale Abschnitte sukzessive verkürzt worden waren. Des weiteren sollten mGRK6-B-Mutanten hergestellt werden, in denen basische Aminosäuren gegen neutrale Aminosäuren ausgetauscht wurden und/oder in denen putative Phosphorylierungsstellen entfernt bzw. durch Aminosäuren ersetzt wurden, die die durch Phosphorylierung bedingte negative Ladung imitieren. Die mGRK6-B-Mutanten sollten in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert und die Proteine gereinigt werden. Um zu klären, welche Auswirkungen die Veränderungen im carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-B auf die Funktionen der Kinasen haben, sollte die Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-B-

Mutanten gegenüber verschiedenen Substraten mit der Aktivität von rekombinantem wildtypischen mGRK6-B- und/oder mGRK6-C-Protein verglichen werden.

Im Rahmen von vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe waren bereits mGRK6-B-Mutanten hergestellt worden, bei denen der carboxylterminale Abschnitt sukzessive verkürzt worden war (siehe Abb. 4) (Dissertation Vatter, 2000). Die Verkürzung um 13 Aminosäuren führte in der mGRK6-B Mut1-Mutante zu dem Verlust des endständigen basischen Arginins (R⁵⁸⁹) sowie der sauren Aminosäure Glutamat (E⁵⁸²). Durch die weitere Verkürzung um fünf Aminosäuren in mGRK6-B Mut2 wurde der Serine-enthaltender Aminosäuresequenzabschnitt S⁵⁷²-S⁵⁷³-P⁵⁷⁴-P⁵⁷⁵-A⁵⁷⁶ deletiert, der Bestandteil einer ermittelten Konsensussequenz für die cAMP-abhängige Phosphorylierung ist (R-K-S-S, die zu phosphorylierende Aminosäure ist unterstrichen, bestimmt mit Prosite Database). Die Entfernung von vier weiteren Aminosäuren in mGRK6-B Mut3 resultierte im Verlust der ermittelten Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch Proteinkinase C: T⁵⁶⁸-V⁵⁶⁹-R⁵⁷⁰-K⁵⁷¹ (Prosite Database) (Dissertation Vatter, 2000). Die trunkierten mGRK6-B-Proteine waren in Versuchen mit dem membranständigen G-Protein-gekoppelten Lichtrezeptor Rhodopsin auf ihre Phosphorylierungsaktivität untersucht worden. Diese Analysen hatten gezeigt, dass die Verkürzung von mGRK6-B um 13 Aminosäuren (mGRK6-B Mut1) und insbesondere um 18 Aminosäuren (mGRK6-B Mut2) zu einer Zunahme der Phosphorylierung von Rhodopsin durch die Kinasen führte (Dissertation Vatter, 2000). Dabei erreichte mGRK6-B Mut2 eine der mGRK6-C-Variante entsprechende Phosphorylierungsaktivität. Interessanterweise hatte eine weitere Verkürzung des carboxylterminalen Abschnittes um vier Aminosäuren (mGRK6-B Mut3) eine Abnahme der Phosphorylierungsaktivität zur Folge gehabt (Dissertation Vatter, 2000).

In den vorausgegangenen Versuchen mit den mGRK6-B-Mutanten waren aufgrund der unterschiedlichen Expression der rekombinanten mGRK6-B-Proteine in Insektenzellen unterschiedliche Mengen an Proteinlösung in die Phosphorylierungsreaktion eingesetzt worden. Dies hatte dazu geführt, dass die Phosphorylierungen in Anwesenheit unterschiedlicher Salzkonzentrationen in den Reaktionsansätzen durchgeführt worden waren. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass die Phosphorylierungsaktivität der GRKs durch steigende NaCl-Konzentrationen inhibiert wird (Loudon und Benovic, 1994). So wurde für die humane GRK6 (hGRK6) ein IC₅₀-

Wert von 50 mM NaCl (Loudon und Benovic, 1994) und für die humane GRK5 (hGRK5) ein IC₅₀ von 60 mM NaCl ermittelt (Kunapuli *et al.*, 1994). Um zu klären, ob und wenn ja, welchen Anteil die unterschiedliche Salzkonzentrationen in den Reaktionsansätzen an den beobachteten Unterschieden in der Phosphorylierung der Substrate durch die mGRK6-B-Mutanten hatten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst die Phosphorylierungsaktivität der trunkierten mGRK6-B-Mutanten Mut1 bis Mut3 und der wildtypischen mGRK6-B unter standardisierten Bedingungen mit einer NaCl-Konzentration von 17 mM im Reaktionsansatz verglichen. Mit 17 mM liegt die NaCl-Konzentration deutlich unterhalb des für die humane GRK6 beschriebenen IC₅₀-Wertes von 50 mM NaCl (Loudon und Benovic, 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass bei einheitlichen NaCl-Konzentrationen in den Reaktionsansätzen deutlich geringere Unterschiede in der Phosphorylierung des membranständigen Substrats Rhodopsin durch das wildtypische mGRK6-B-Protein und die mGRK6-B-Mutanten zu beobachten sind, als in den vorangegangenen Untersuchungen ermittelt worden war (Dissertation Vatter, 2000). Jedoch wurde ebenfalls beobachtet, dass es bei Verkürzung von mGRK6-B um 13 bzw. 18 Aminosäuren zu einer Steigerung und bei der Verkürzung um weitere 4 Aminosäuren (mGRK6-B Mut3) zu einer Abnahme der Phosphorylierungsaktivität kommt. Die Reihenfolge der Aktivität mGRK6-C = mGRK6-B Mut2 >> mGRK6-B Mut3 = mGRK6-B Mut1 > mGRK6-B WT entsprach dabei der von Frau Vatter im Rahmen ihrer Dissertation gemachten Beobachtungen (Dissertation Vatter, 2000). Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur autoinhibitorischen Rolle des carboxylterminalen Abschnittes von mGRK6-A hatten gezeigt, dass den neun letzten Aminosäuren mit der Aminosäuresequenzabfolge S⁵⁶⁸EEELPTRL⁵⁷⁶ eine inhibitorische Funktion zukommt. Dabei wird angenommen, dass die in diesem Abschnitt enthaltenen sauren Aminosäuren E⁵⁶⁹-E⁵⁷⁰-E⁵⁷¹ mit der Membraninteraktion der Kinase interferieren (Vatter *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2007). Ob die Aktivitätszunahme der mGRK6-B-Mutante Mut1 bei Deletion der 13 letzten Aminosäuren ebenfalls auf den Verlust der in diesem Abschnitt gelegenen sauren Aminosäure E⁵⁸² zurückgeführt werden kann, muss noch untersucht werden. Die Deletion von 5 weiteren Aminosäuren in mGRK6-B Mut2 hatte zu einer starken Zunahme der Phosphorylierungsaktivität der Kinase geführt. Interessanterweise umfasst der deletierte Abschnitt Teile der ermittelten Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinasen: R⁵⁷⁰-K⁵⁷¹-S⁵⁷²-S⁵⁷³) (die zu phosphorylierende Aminosäure ist unterstrichen). Zahlreiche Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass für die Desensibilisierung von GPCRs neben

GRKs auch andere Proteinkinasen wie Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A (PKA) von Bedeutung sind (Kelly *et al.*, 2008). Hinzu kommt, dass für Proteinkinase A und Proteinkinase C auch eine Modulation der GRK-Funktion beschrieben wurde. So ist seit längerem bekannt, dass PKC die Aktivität von GRK2 durch Phosphorylierung positiv und die Aktivität von GRK5 negativ reguliert (Chuang *et al.*, 1995; Pronin und Benovic, 1997; Pronin *et al.*, 1998; Krasel *et al.*, 2001). Für GRK2 wurde beschrieben, dass die Phosphorylierung der Kinase durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A zu einer Zunahme der Aktivität von GRK2 durch verstärkte Translokation des Enzyms an die Plasmamembran führt (Cong *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006). Ob die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Zunahme der Aktivität von mGRK6-B Mut2 auf den Verlust der zu phosphorylierenden Aminosäure S⁵⁷³ und womöglich auf den Verlust der negativen Regulation der Aktivität durch cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinasen zurückzuführen ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Für GRK5 wurde gezeigt, dass der carboxylterminale Abschnitt sowohl eine Calmodulin-Bindungsstelle (Aminosäuren 552-562), als auch eine Autophosphorylierungsstelle enthält (Aminosäuren 578-585) (Pronin *et al.*, 1997; Levay *et al.*, 1998; Pronin *et al.*, 1998). Calmodulin inhibiert die Aktivität der humanen GRK5 und auch mit geringerer Effektivität die Aktivität der humanen GRK6-A (Pronin *et al.*, 1997). Eine potentielle Calmodulin-Bindungsstelle findet sich auch in der mGRK6-B. Für die GRK5 wurde ermittelt, dass die Calmodulin-stimulierte Autophosphorylierung im carboxylterminalen Abschnitt die autoinhibitorische Funktion des carboxylterminalen Abschnittes verstärkt (Pronin *et al.*, 1998). Ob ähnliche Mechanismen auch für die Regulation der Aktivität von mGRK6-B von Bedeutung sind, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen. Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse erste Hinweise darauf, dass dem carboxylterminalen Abschnitt der mGRK6-B in der Tat eine autoregulatorische Funktion zukommt und dass sich im carboxylterminalen Abschnitt ähnlich wie für die humane GRK5 postuliert, unterschiedliche regulatorische Elemente finden.

In der humanen GRK5 (hGRK5) führt die sukzessive Verkürzung des carboxylterminalen Abschnittes des hGRK5-Proteins um 5 bis 28 Aminosäuren im Vergleich zu dem wildtypischen Protein zu einer Steigerung, die weitere Verkürzung um 11 bzw. 22 Aminosäuren zu einer Abnahme der Aktivität der Kinase, d. h. der Phosphorylierung des membranständigen G-Protein gekoppelten Lichtrezeptors Rhodopsin (Pronin *et al.*, 1998). Interessanterweise hatten die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe darüber hinaus

Hinweise darauf geliefert, dass der carboxylterminale Abschnitt zwar an der Regulation der Kinaseaktivität der hGRK5 bezüglich membranären Substrats beteiligt ist, jedoch keinen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion der Kinase mit Phospholipiden hat. Vielmehr wurde in diesen Untersuchungen im Aminosäuresequenzabschnitt D⁵⁵² bis N⁵⁶² eine PtdInsP₂-Bindungsstelle identifiziert, die nicht im carboxylterminalen Abschnitt sondern unmittelbar vor diesem liegt (Pronin *et al.*, 1998). Ein Fehlen dieser Bindungsstelle in den trunkierten hGRK5-Mutanten oder eine Blockade dieser Region durch Peptide resultierte in einer Inhibition der Phosphorylierung von Rhodopsin durch die Kinasen (Pronin *et al.*, 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher als nächstes der Frage nachgegangen, ob die beobachteten Unterschiede in der Phosphorylierungsaktivität der trunkierten mGRK6-B-Mutanten auf Veränderungen in der Phospholipidinteraktion zurückzuführen waren. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, wurden die wildtypische mGRK6-B-Isoform und die trunkierten mGRK6-B-Mutanten Mut1 bis Mut3 als rekombinantes Protein in Insektenzellen exprimiert, über sequentielle Kationenaustausch- und Affinitätschromatographie gereinigt und die gereinigten Proteine im Anschluss in Phospholipidbindungsstudien eingesetzt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch überprüft, ob sich die verschiedenen mGRK6-B-Mutanten nach der Reinigung als katalytisch aktive Proteine verhielten. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass sowohl das wildtypische mGRK6-B-Protein als auch die rekombinanten Proteine der mGRK6-B-Mutanten über sequentielle Chromatographie an einer SP- und Heparin-Sepharose-Matrix gereinigt und mit hohem Reinheitsgrad erhalten werden konnten. Auffällig war, dass es mit zunehmender Verkürzung der wildtypischen mGRK6-B-Isoform zu einer Verschiebung der zur Elution notwendigen NaCl-Konzentrationen im Elutionspuffer von einer Konzentration von 410-495 zu 575-685 mM kam. Eine Erklärung für diese gemachte Beobachtung könnte darin liegen, dass die trunkierten mGRK6-B-Proteine durch ihre veränderte Struktur eine stabilere Bindung an die Säulenmatrix erreichten als das wildtypische mGRK6-B-Protein. Interessanterweise entsprach die NaCl-Konzentration, bei der die trunkierten Mutanten von der SP-Heparin-Matrix eluierten der, die für die Elution der carboxylterminal verkürzten wildtypischen mGRK6-C-Isoform (~ 600 mM NaCl) notwendig gewesen war (Vatter *et al.*, 2005). Die Phosphorylierungsaktivität des wildtypischen mGRK6-B-Proteins wurde mit der der mGRK6-Mutanten unter Verwendung verschiedener Substrate, wie membranständigem Rhodopsin und löslichem Phosvitin und Casein verglichen. Für die sauren löslichen Proteine Phosvitin und Casein ist bekannt, dass sie als Substrate sowohl der GRK5 als

auch der GRK6 dienen (Loudon und Benovic, 1994; Kunapuli *et al.*, 1994; DebBurman *et al.*, 1996) und dass die Substrate ähnlich stark durch die GRKs phosphoryliert werden. Die Ergebnisse der vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass das wildtypische mGRK6-C-Protein nach der chromatographischen Reinigung keinen Verlust der katalytischen Aktivität aufweist (Vatter *et al.*, 2005). Die mGRK6-A-Isoform war dagegen nur unter Verlust eines Teils der katalytischen Aktivität chromatographisch gereinigt worden (Dissertation Vatter, 2000; Dissertation Samel, 2007). Für die hGRK5 war von anderen Arbeitsgruppen ermittelt worden, dass nach dem zweiten chromatographischen Reinigungsschritt nur *ca.* 25 % der katalytischen Aktivität der Rezeptorkinase erhalten geblieben waren (Kunapuli *et al.*, 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die chromatographisch gereinigten mGRK6-B-Proteine als katalytisch aktive Rezeptorkinasen vorlagen. Jedoch wurden bei der Phosphorylierung von Casein und Phosvitin durch die wildtypische mGRK6-B und durch die mGRK6-B-Mutanten Unterschiede in der Aktivität beobachtet. So war die Phosphorylierung des Phosvitins meist stärker als die des Caseins. In Untersuchungen zur Phosphorylierung von Casein und Phosvitin durch hGRK5 war dagegen eine verstärkte Phosphorylierung von Casein gegenüber Phosvitin ermittelt worden (Kunapuli *et al.*, 1994). Der Grund für das unterschiedliche Phosphorylierungsverhalten der Kinasen bezüglich der löslichen Substrate ist nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung könnte die längere Inkubationszeit der Kinasen mit Phosvitin (1 h) im Vergleich zum Casein (10 min) sein.

Die Untersuchungen zur Interaktion der rekombinant hergestellten mGRK6-B-Proteine mit Phospholipiden haben gezeigt, dass trotz der unterschiedlichen Phosphorylierungsaktivitäten des wildtypischen mGRK6-B-Proteins und der mGRK6-B-Mutanten keine Unterschiede in der Interaktion der einzelnen Proteine mit Phospholipidvesikeln bestehen. So interagierten weder mGRK6-B noch die mGRK6-B-Mutanten mit Phosphatidylcholin (PC)-Vesikeln. Der Zusatz von Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PtdInsP_2) zu den PC-Vesikeln führte in allen Fällen zu einer Umverteilung der GRK-Proteine aus der löslichen lipidfreien in die partikuläre lipidhaltige Fraktion. Diese Befunde entsprechen damit Ergebnissen unserer sowie anderer Arbeitsgruppen, in denen weder für die Varianten mGRK6-A und mGRK6-C noch für die humane GRK5 eine Interaktion mit PC-Vesikeln nachgewiesen und in denen ebenfalls eine Umverteilung der Kinasen bei Zusatz von PtdInsP_2 zu den PC-Vesikeln beobachtet worden war (Vatter *et al.*, 2005; Pitcher *et al.*, 1996). Die für die mGRK6-B-Proteine erzielten Ergebnisse stützen die

Vermutung, dass der carboxylterminale Abschnitt von mGRK6-B nicht essentiell für die Interaktion der Kinase mit der Plasmamembran ist. Die Beobachtungen lassen sich auch in das Konzept von Thiagarajan *et al.* über die Bedeutung der vor dem carboxylterminalen Ende gelegenen amphiphilen α -Helix der GRK5 integrieren (Thiagarajan *et al.*, 2004). Ausgehend von früheren Arbeiten u. a. von Pronin *et al.*, die den Einfluss einer im entsprechenden Abschnitt gelegenen PtdIns P_2 -Bindungsstelle für die Phosphorylierungsaktivität von GRK5 betont hatten, war in den Untersuchungen von Thiagarajan *et al.* eine amphiphile Helix im Bereich der Aminosäuren 546 bis 565 der GRK5 als entscheidende Region für die Membraninteraktion identifiziert worden (Pronin *et al.*, 1998; Thiagarajan *et al.*, 2004). Die Konsensussequenz der amphiphilen Helix, LLQRLF, die aus einem hydrophoben Anteil und mehreren umgebenden basischen Aminosäuren besteht, ist außer in GRK5 auch in den GRK6-Isoformen GRK6-A, GRK6-B und GRK6-C zu finden (Thiagarajan *et al.*, 2004). Diese Region unmittelbar vor dem carboxylterminalen Abschnitt ist sowohl für die wildtypische mGRK6-B als auch für ihre trunkierten mGRK6-B-Mutanten vollständig erhalten und spielt für die Interaktion der Rezeptorkinasen mit den Phospholipiden sehr wahrscheinlich eine entscheidende Rolle. Diese Annahme war in Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit mGRK6-C-Mutanten bestätigt worden. So zeigten Mutanten, in denen die basischen Aminosäuren der amphiphilen Helix gegen Alanine ausgetauscht worden waren, sowohl im zellfreien, als auch im zellulären System einen fast vollständigen Verlust der Phosphorylierungsaktivität bezüglich membranärer Rezeptorsubstrate (Dissertation Kern, 2007).

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen war in Phosphorylierungs-Experimenten mit membranständigem Rhodopsin für die Mutante mGRK6-B Mut2 die höchste Phosphorylierungsaktivität ermittelt worden. Diese Mutante unterscheidet sich von der kürzesten und weniger aktiven Mutante mGRK6-B Mut3 durch die Anwesenheit des Aminosäuresequenzmotivs T⁵⁶⁸-V⁵⁶⁹-R⁵⁷⁰-K⁵⁷¹, das eine ermittelte Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC) darstellt (siehe Abb. 28). In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte im carboxylterminalen Abschnitt von GRK5 ein durch PKC-Phosphorylierung kontrolliertes regulatorisches Element identifiziert werden (Pronin *et al.*, 1998). Die für die PKC-Phosphorylierung ermittelte Konsensussequenz S⁵⁶⁶-P⁵⁶⁷-S⁵⁶⁸-S⁵⁶⁹ im carboxylterminalen Abschnitt der GRK5 (Pronin und Benovic, 1997) unterscheidet sich dabei von der für mGRK6-B ermittelten Konsensussequenz T⁵⁶⁸-V⁵⁶⁹-R⁵⁷⁰-K⁵⁷¹. Da das Fehlen dieser Konsensussequenz in der

mGRK6-B-Mutante Mut3 zu einer deutlichen Abnahme der Phosphorylierung des membranständigen Substrats Rhodopsins geführt hatte, wurde im folgenden die Bedeutung dieser vier Aminosäuren für die Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-B näher untersucht. Dazu wurde ausgehend von der mGRK6-B Mut2-Mutante in mGRK6-B Mut4 das Threonin an Position 568 gegen ein Alanin ausgetauscht ($T^{568} \rightarrow A^{568}$) und so die putative Phosphorylierungsstelle entfernt (Bairoch *et al.*, 1997). In mGRK6-B Mut5 wurden die basischen Aminosäuren durch die neutrale Aminosäure Alanin ersetzt ($R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$) und für mGRK6-B Mut6 wurden die beiden genannten Veränderungen kombiniert ($T^{568} \rightarrow A^{568}$, $R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$). Wie die Ergebnisse zeigen ließen sich die rekombinanten Proteine mGRK6-B Mut4, Mut5 und Mut6 in Baculovirus-infizierten Insektenzellen in ähnlichen Mengen wie die wildtypischen Isoformen mGRK6-B und mGRK6-C bzw. die bisher untersuchten mGRK6-B-Mutanten exprimieren und zeigten hinsichtlich der Phosphorylierung von Phosvitin katalytische Aktivität. Die Mutanten Mut4 bis Mut6 unterschieden sich bei der Phosphorylierung des löslichen Substrates dabei nicht von der mGRK6-B Mut2-Mutante. Im Gegensatz dazu wurden in Phosphorylierungs-Experimenten mit dem membranständigen Lichtrezeptor Rhodopsin deutliche Unterschiede zwischen den mGRK6-B-Mutanten beobachtet. So wurde die höchste Phosphorylierungsaktivität für die mGRK6-B Mut5-Mutante ($R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$) ermittelt. Die Aktivität dieser Mutante entsprach dabei der wildtypischen mGRK6-C-Isoform sowie der mGRK6-B Mut2-Mutante. Dagegen zeichnete sich die mGRK6-B Mut4-Mutante ($T^{568} \rightarrow A^{568}$), bei der die putative Phosphorylierungsstelle am Threonin 568 durch Austausch der Aminosäure gegen ein Alanin entfernt worden war, im Vergleich zu mGRK6-B Mut2 und Mut5 durch eine deutlich verminderte Phosphorylierungsaktivität aus. Ähnliches wurde auch für die mGRK6-B Mut6-Mutante ($T^{568} \rightarrow A^{568}$, $R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$) beobachtet. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Phosphorylierungsaktivität von mGRK6-B Mut4 und Mut6 wurde nicht ermittelt. Somit ergab sich folgende Reihenfolge der Aktivität für die Phosphorylierung von Rhodopsin: mGRK6C = mGRK6-B Mut2 = mGRK6 Mut5 >> mGRK6 Mut4 = mGRK6 Mut6 > mGRK6-B WT. Entsprechende Befunde in Bezug auf die Bedeutung basischer Aminosäuren im carboxylterminalen Abschnitt wurden von anderen Arbeitsgruppen auch für die humane GRK5 beschrieben. Hier waren in Phosphorylierungs-Experimenten mit GRK5-Mutanten, bei denen mehrere basische Aminosäuren im carboxylterminalen Abschnitt (K^{547} , K^{548} , R^{553} , K^{556} und R^{557}) durch Alaninreste ersetzt worden waren, ebenfalls keine signifikanten Unterschiede nachzuweisen zwischen dem wildtypischen GRK5-

Protein und den GRK5-Mutanten bezüglich der Fähigkeit, in Anwesenheit des Phospholipids PtdInsP_2 den membranständigen β -Adrenorezeptor zu phosphorylieren (Pitcher *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse zeigen, dass die basischen Aminosäuren im carboxylterminalen Abschnitt keinen wesentlichen Einfluss auf die Fähigkeit der GRKs haben, membranständige Substrate zu phosphorylieren.

In den Untersuchungen zur Bedeutung der Phosphorylierung der humanen GRK5 durch PKC hatte sich gezeigt, dass die Aktivität der GRK5 sowohl membranständige Rezeptorsubstrate, als auch lösliche Substrate zu phosphorylieren durch die PKC negativ reguliert wird (Pronin und Benovic, 1997). So wurde gezeigt, dass PKC-phosphoryliertes GRK5-Protein eine um *ca.* 90 % reduzierte Phosphorylierung von Rhodopsin aufwies (Pronin und Benovic, 1997). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigten, dass im Falle der mGRK6-B die Anwesenheit der Konsensussequenz für die PKC-Phosphorylierung einen positiven Effekt auf die Aktivität der mGRK6-B-Mutanten hatte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich mGRK6-B und GRK5 in ihrer Regulation durch PKC-Phosphorylierung unterscheiden. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass das Fehlen der putativen Phosphorylierungsstelle in mGRK6-B Mut3 nur in Phosphorylierungsreaktionen mit dem membranständigen Lichtrezeptor Rhodopsin, nicht aber in Reaktionen mit Phosvitin zu einer verringerten Phosphorylierung führte. Jedoch muss in diese Überlegungen einbezogen werden, dass in die Untersuchungen nicht das wildtypische mGRK6-B-Protein, sondern die carboxylterminal trunkierten Mutanten eingesetzt wurden. Da für den carboxylterminalen Abschnitt sowohl für GRK5 und, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, für mGRK6-B eine autoinhibitorische Funktion beobachtet wurde (Pronin *et al.*, 1998; Dissertation Vatter, 2000; Vatter *et al.*, 2005), bleibt zu untersuchen, ob dieser fehlende Abschnitt in den mGRK6-B-Mutanten die Erklärung für die beobachteten Unterschiede in der Regulation von GRK5 und mGRK6-B liefert. So wäre denkbar, dass dieser längere carboxylterminale Abschnitt an der Vermittlung der Interaktion zwischen der GRK und ihrem Substrat beteiligt ist. Diese Annahme wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass in Bindungsstudien mit Phospholipiden die PKC-abhängige Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Phospholipidinteraktion der GRK5 hatte (Pronin und Benovic, 1997). Für die mGRK6-B könnte dies bedeuten, dass die Veränderung der Phosphorylierungsstelle T⁵⁶⁸ nur unter der zusätzlichen Bedingung, dass der carboxylterminale Abschnitt verkürzt wurde, Einfluss auf die Phosphorylierungsaktivität ausübt. In weitergehenden Untersuchungen muss daher

überprüft werden, welchen Effekt die PKC-Phosphorylierung auf die Phosphorylierung von Rhodopsin durch das wildtypische mGRK6-B-Protein hat. Auch die Herstellung einer mGRK6-B-Mutante, bei der die Phosphorylierungsstelle entfernt werden würde ohne eine Verkürzung der Rezeptorkinase vorzunehmen, könnte zur Klärung dieser Fragen beitragen.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Phosphorylierungs-Experimente hatten einen deutlichen Einfluss der putativen Phosphorylierungsstelle auf die Funktion der mGRK6-B gezeigt. Um weitere Einblicke in die Bedeutung einer möglichen Phosphorylierung an dieser Position und der damit verbundenen negativen Ladungsverteilung zu gewinnen, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Mutanten von mGRK6-B hergestellt, bei denen durch Austausch der Aminosäure Threonin gegen die negativ geladene Aminosäure Glutamat der Effekt einer Phosphorylierung imitiert wird (siehe Abb. 28). Der Austausch der Aminosäuren wurde sowohl in mGRK6-B Mut2 als auch in mGRK6-B Mut5 durchgeführt und lieferte die Mutanten mGRK6-B Mut7 ($T^{568} \rightarrow E^{568}$) bzw. mGRK6-B Mut8 ($T^{568} \rightarrow E^{568}$, $R^{570} \rightarrow A^{570}$, $K^{571} \rightarrow A^{571}$). Aus anderen Arbeitsgruppen liegen für verschiedene Proteine, darunter auch für GRK5 bereits Daten vor, dass durch Austausch von potentiell als Phosphorylierungsstellen geltenden Aminosäuren gegen Glutamin- bzw. Asparaginsäure ein Phosphorylierungseffekt imitiert werden kann (Maciejewski *et al.*, 1995; Pronin und Benovic, 1997). Auch die Mutanten mGRK6-B Mut7 und mGRK6-B Mut8 ließen sich in der wildtypischen mGRK6-B-Isoform entsprechenden Proteinmengen in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimieren und zeigten eine den restlichen Mutanten entsprechende katalytische Aktivität bezüglich des löslichen Substrats Phosvitin. Diese Ergebnisse belegen, dass die katalytische Aktivität der mGRK6-B-Mutanten durch die Veränderungen im Protein nicht beeinflusst wird. Bei der Phosphorylierung des membrangebundenen Substrat Rhodopsins durch mGRK6-B Mut7 und mGRK6 Mut8 zeigten sich dagegen deutliche Unterschiede in der Aktivität der Kinasen. So wies mGRK6-B Mut7 eine ähnlich hohe Phosphorylierungsaktivität auf wie die mGRK6-B Mut2-Mutante, die mGRK6-B Mut5-Mutante und das wildtypische mGRK6-C-Protein. Die mGRK6 Mut8-Mutante war dagegen in die Reihe der mGRK6-B-Mutanten mit geringerer Phosphorylierungsaktivität, wie mGRK6-B Mut4 und mGRK6-B Mut6, einzuordnen. Daraus ergab sich die Reihenfolge der Aktivität mGRK6-C = mGRK6-B Mut2 = mGRK6 Mut5 = mGRK6 Mut7 >> mGRK6 Mut4 = mGRK6 Mut6 = mGRK6 Mut8 > mGRK6-B WT.

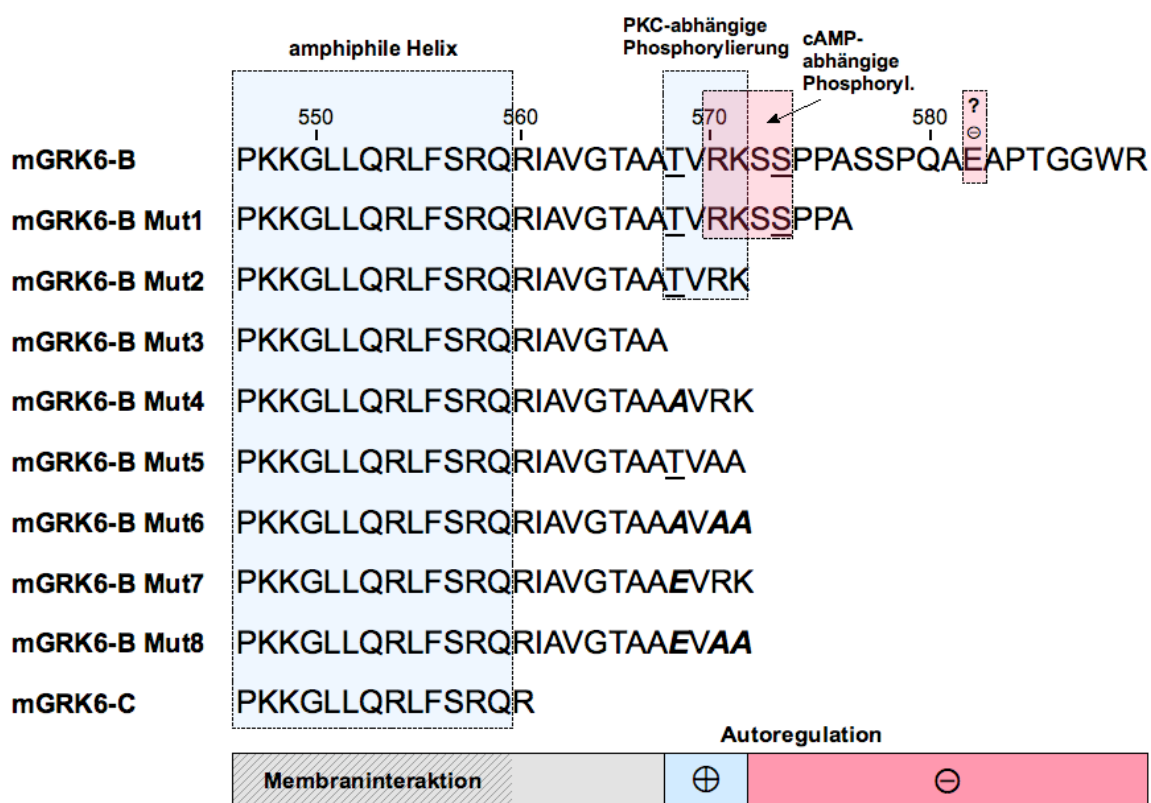


Abb. 28: Dargestellt sind die Primärstrukturen der carboxylterminalen Abschnitte der wildtypischen Varianten mGRK6-B und mGRK6-C sowie der Mutanten mGRK6-B Mut1 bis Mut8 der murinen mGRK6-B. Aminosäuren, die putative Phosphorylierungsstellen darstellen, sind unterstrichen. Änderungen innerhalb der Aminosäuresequenz durch Mutation sind durch Fett/Kursivdruck hervorgehoben. Hellblau unterlegt wurde zum einen der vor dem carboxylterminalen Ende gelegene Abschnitt der Kinasen, für den eine amphiphile Helix postuliert wird, zum anderen die Konsensussequenz für die die Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC) im carboxylterminalen Abschnitt der mGRK6-B angenommen wird. Hellrot unterlegt wurden die ermittelte Konsensussequenz für die cAMP-abhängige Phosphorylierung und die Aminosäure E⁵⁸². Unterhalb der Aminosäuresequenzen sind die Bereiche, für die eine positive (eingekreistes Pluszeichen) bzw. eine negative (eingekreistes Minuszeichen) autoregulatorische Funktion angenommen wird, markiert. Die Position der Aminosäuren ist oberhalb der Sequenzen angegeben.

A = Alanin, D = Asparaginsäure, E = Glutaminsäure, F = Phenylalanin, G = Glycin, I = Isoleucin, K = Lysin, L = Leucin, N = Asparagin, P = Prolin, Q = Glutamin, R = Arginin, S = Serin, T = Threonin, V = Valin, W = Tryptophan

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete geringe Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-B Mut8-Mutante war überraschend, da diese sich von mGRK6-B Mut7 nur durch den Austausch basischer Aminosäuren unterscheidet. In den vorausgegangenen Untersuchungen mit mGRK6-B Mut5 hatte dieser Austausch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Rhodopsin durch die Kinase. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte in veränderten Ladungsverhältnissen innerhalb des carboxylterminalen

Abschnittes durch die vorgenommenen Aminosäureaustausche liegen. Durch Glutaminsäure E⁵⁶⁸ wird eine negativ geladene Aminosäure eingebracht, damit wäre dieser Bereich beispielsweise nicht in der Lage, mit negativ geladenen Phospholipiden der Plasmamembran zu interagieren. Dieser Effekt könnte in mGRK6-B Mut7 durch die Nachbarschaft mit den beiden basischen Aminosäuren Arginin R⁵⁷⁰ und Lysin K⁵⁷¹ eher ausgeglichen werden als durch die beiden neutralen Alanine in mGRK6-B Mut8. Auf der Grundlage dieser Annahme könnte sowohl die unverändert hohe Aktivität der mGRK6-B Mut5, als auch die verminderte Aktivität der mGRK6-B Mut8 erklärt werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass dem carboxylterminalen Abschnitt der mGRK6-B eine autoregulatorische Funktion zukommt. So stellt der endständige carboxylterminale Abschnitt ein negativ regulatorisches Element und der eine PKC-Konsensussequenz-enthaltende Abschnitt ein positiv regulatorisches Element der mGRK6-B-Aktivität dar. Diese Ergebnisse unterstützen die bereits aus den Untersuchungen zur autoregulatorischen Funktion der mGRK6-A aufgestellte Hypothese, dass (i) die Variante mGRK6-C einen Prototyp der mGRK6-Kinasen darstellt, dem aufgrund des trunkeierten carboxylterminalen Abschnittes Aktivitäts-regulierende Elemente fehlen und dass (ii) mGRK6-A und mGRK6-B in ihrer Aktivität durch die Präsenz des carboxylterminalen Abschnittes und posttranslationale Modifikationen wie Palmitoylierung und Phosphorylierung einer Regulation unterliegen.

5 Zusammenfassung

Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) regulieren die Aktivität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), indem sie durch Phosphorylierung die Desensibilisierung und somit die Inaktivierung der Rezeptorproteine initiieren. 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 waren drei Isoformen der GRK6 der Maus (mGRK6), mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C isoliert worden, die in ihren Aminosäuresequenzen des aminoterminalen Bereichs und der katalytischen Domäne übereinstimmen, sich jedoch in der Länge und im Aufbau des carboxylterminalen Abschnittes unterscheiden. So enthält der carboxylterminale Abschnitt der mGRK6-A drei Cysteine, die in der humanen GRK6-A-Variante posttranslational palmitoyliert werden. Im carboxylterminalen Abschnitt der mGRK6-B finden sich dagegen neben basischen Aminosäuren auch Aminosäuren, die, wie für die humane GRK5 beschrieben, als Substrate einer Phosphorylierung durch Proteinkinase C dienen und auf diese Weise zur Interaktion der Kinase mit der Plasmamembran beitragen, bzw. die Aktivität der Kinase regulieren. Erstaunlicherweise hatten die Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt, dass mGRK6-C, eine Variante welcher der carboxylterminale Abschnitt fehlt, in intakten Zellen mit der Plasmamembran assoziiert vorliegt und membranständige GPCRs sogar deutlich besser phosphoryliert als die Varianten mGRK6-A und mGRK6-B. In weitergehenden Untersuchungen mit trunkierten mGRK6-A-Varianten konnte ermittelt werden, dass der carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-A in der Tat für die Membraninteraktion nicht essentiell ist, sondern dass diesem Abschnitt vielmehr eine autoregulatorische Funktion bei der Vermittlung der Membraninteraktion und der Aktivität der Rezeptorkinase zukommt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu klären, (i) ob der carboxylterminale Abschnitt von mGRK6-B eine autoregulatorische Funktion besitzt, (ii) welche Rolle basische Aminosäuren im carboxylterminalen Abschnitt von mGRK6-B für die Interaktion und Regulation der Aktivität der Kinase spielen und (iii) welche Bedeutung den Aminosäuren, die Substrate einer Phosphorylierung durch Proteinkinase C darstellen, bei der Regulation der Aktivität von mGRK6-B zukommt. Um diese Fragen zu klären, wurde (i) die Aktivität

von mGRK6-B-Mutanten verglichen, deren carboxylterminale Abschnitte schrittweise verkürzt worden waren und wurden (ii) mGRK6-B-Mutanten hergestellt in denen basischen Aminosäuren gegen neutrale Aminosäuren ausgetauscht wurden und/oder in denen potentielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C entfernt bzw. durch Aminosäuren ersetzt wurden, welche die durch Phosphorylierung generierte Ladung imitieren. Die mGRK6-B-Mutanten wurden in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert und die Proteine gereinigt. Um zu klären, welche Auswirkungen die vorgenommen Änderungen in der Primärstruktur auf die Funktionen der mGRK6-B-Proteine haben, wurde die Phosphorylierungsaktivität der rekombinanten mGRK6-B-Mutanten mit der Aktivität von rekombinanten wildtypischen mGRK6-B- und/oder mGRK6-C-Protein verglichen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit carboxylterminal trunkierten mGRK6-B-Mutanten haben gezeigt, dass die schrittweise Verkürzung zunächst zu einer Zunahme, dann zu einer Abnahme der Aktivität der Kinasen bezüglich Phosphorylierung des membranären Rezeptorsubstrats Rhodopsin führt. Die verschiedenen mGRK6-B-Mutanten wiesen dabei keine Unterschiede in der Interaktion mit Membranphospholipiden auf, wie die Ergebnisse der an künstlichen Vesikeln durchgeführten Lipidbindungsexperimente ergaben. Diese Ergebnisse belegen, dass die Unterschiede in der Aktivität der mGRK6-B-Mutanten nicht auf Unterschiede in der Interaktion mit der Plasmamembran zurückzuführen sind, sondern dass Teile des carboxylterminalen Abschnitts autoinhibitorisch wirken. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass weitere Elemente des carboxylterminalen Abschnitts für die Regulation der Aktivität von mGRK6-B von Bedeutung sind. Tatsächlich wiesen mGRK6-B-Mutanten, bei denen das Threonin des Aminosäuresequenzmotivs Threonin⁵⁶⁸-Valin⁵⁶⁹-Arginin⁵⁷⁰-Lysin⁵⁷¹, das eine Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch Proteinkinase C darstellt, durch Alanin ersetzt wurde, eine deutlich verringerte Phosphorylierung von Rhodopsin auf. Im Gegensatz dazu phosphorylierte eine Phosphorylierung-imitierende mGRK6-B-Mutante Rhodopsin ähnlich stark wie die verkürzte mGRK6-B-Mutante. Beide Ergebnisse zeigen, dass die Phosphorylierung am Threonin⁵⁶⁸ im carboxylterminalen Abschnitt für die Regulation der Aktivität von mGRK6-B von Bedeutung ist. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der carboxylterminale Abschnitt eine autoinhibitorische Funktion besitzt, die durch posttranslationale Modifikation, z. B. durch Phosphorylierung des Threonins an Position 568, aufgehoben werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- 1: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1987) Sensorischer Input: 1189-1190. In: Jaenicke, L (Hrsg.) Molekularbiologie der Zelle. 1. Nachdruck der 1. Auflage, VCH Weinheim
- 2: Bairoch A, Bucher P, Hofmann K (1997) The PROSITE database, in status in 1997. *Nucleic Acids Res.* **17**:217-221
- 3: Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1985) Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem.* **260**:7094-7101
- 4: Bradford MM (1976) A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgramm quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-254
- 5: Bünemann M, Hosey MM (1999) G-Protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol.* **517**:5-23
- 6: Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev.* **24**:765-781
- 7: Chuang TT, LeVine H 3rd, De Blasi A (1995) Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem.* **270**:18660-18665
- 8: 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

- 9: Cismowski MJ (2006) Non-receptor activators of heterotrimeric G-protein signaling (AGS proteins). *Semin Cell Dev Biol.* **17**:334-344
- 10: Cong M, Perry SJ, Lin FT, Fraser ID, Hu LA, Chen W, Pitcher JA, Scott JD, Lefkowitz RJ (2001) Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J Biol Chem.* **276**:15192-15199
- 11: Daaka Y, Pitcher JA, Richardson M, Stoffel RH, Robishaw JD, Lefkowitz RJ (1997) Receptor and G isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**:2180-2185
- 12: DebBurman SK, Ptasienski J, Benovic JL, Hosey MM (1996) G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be differentially activated by G-protein betagamma subunits. *J Biol Chem.* **37**:22552-22562
- 13: Evans EA, Calderwood DA (2007) Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science.* **316**:1148-1153
- 14: Ferguson SS (2001) Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Desensitization and Signaling. *Pharmacol Rev.* **53**:1-24
- 15: Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, 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
- 16: Fredriksson R, Schiöth HB (2005) The Repertoire of G-Protein-Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes. *Mol Pharmacol.* **67**:1414-1425
- 17: Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res.* **51**:319-351
- 18: Fritze O, Filipek S, Kuska V, Palczewski K, Hofman KP, Ernst OP (2003) Role of the conserved Np_{xx}Y(x)_{5,6}F motif in the rhodopsin ground state and during activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**:2290-2295

- 19: Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci.* **27**:107-144
- 20: Gether U (2000) Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocr Rev.* **21**:90-113
- 21: Gomperts BD (a), Kramer IM, Tatham PER (2003) Receptors: 38-41. In: Signal transduction, 3. Auflage, Elsevier Academic Press, San Diego, USA
- 22: Gomperts BD (b), Kramer IM, Tatham PER (2003) Signalling pathways operated by receptor protein tyrosine kinases: 257-79. In: Signal transduction, 3. Auflage, Elsevier Academic Press, San Diego, USA
- 23: Gomperts BD (c), Kramer IM, Tatham PER (2003) Phosphoinositide 3-kinases, protein kinase B and signalling through the insulin receptor: 299-309. In: Signal transduction, 3. Auflage, Elsevier Academic Press, San Diego, USA
- 24: Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* **52**:456-467
- 25: Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* **110**:673-687
- 26: Inglese J, Koch WJ, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled kinases. *Nature.* **359**:147-150
- 27: Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, Lefkowitz RJ (1993) Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem.* **268**:23735-23738
- 28: Iwata K, Luo J, Penn RB, Benovic JL (2005) Bimodal Regulation of the Human H Histamine Receptor by G Protein-coupled Receptor Kinase 2. *J Biol Chem.* **280**:2197-2204
- 29: Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998) G-protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interaction. *J Biol Chem.* **273**:17299-17302

- 30: Jiang X, Benovic JL, Wedegaertner PB (2007) Plasma membrane and nuclear localization of G protein coupled receptor kinase 6A. *Mol Biol Cell*. **18**:2960-2969
- 31: Kavelaars A, Vroon A, Raatgever RP, Fong AM, Premont RT, Patel DD, Lefkowitz RJ, 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
- 32: Kelly E, Bailey CP, Henderson G (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol*. **153**:379-388
- 33: Kern C (2007) 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, Medizinische Fakultät, Universität Ulm
- 34: Kolakowski LF (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*. **2**:1-7
- 35: Krasel C, Dammeier S, Winstel R, Brockmann J, Mischak H, Lohse MJ (2001) Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J Biol Chem*. **276**:1911-1915
- 36: Krupnick JG, Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **38**:289-319
- 37: Kunapuli P, Onorato JJ, Hosey MM, Benovic JL (1994) Expression, Purification, and Characterization of the G Protein-coupled Receptor Kinase GRK5. *J Biol Chem*. **269**:1099-1105
- 38: Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **98**:680-685
- 39: Lefkowitz RJ (1993) G protein-coupled receptor kinases. *Cell*. **74**:409-412

- 40: Levay, K, Satpaev, DK, Pronin, AN, Benovic, JL, Slepak, VZ (1998) Localization of the sites for Ca²⁺-binding proteins on G protein-coupled receptor kinases. *Biochemistry* **37**:13650-13659
- 41: Li X, Huston E, Lynch MJ, Houslay MD, Baillie GS (2006) Phosphodiesterase-4 influences the PKA phosphorylation status and membrane translocation of G-protein receptor kinase 2 (GRK2) in HEK-293beta2 cells and cardiac myocytes. *Biochem J.* **394**:427-435
- 42: Lombardi MS, Kavelaars A, Schedlowski M, Bijlsma JW, Okihara KL, Van den Pol M, Ochsmann S, Pawlak C, Schmidt RE, Heijnen CJ (1999) Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* **13**:715-725
- 43: Loudon RP, Benovic JL (1994) Expression, purification and characterization of the G-protein-coupled kinase GRK6. *J Biol Chem.* **269**:22691-22697
- 44: Loudon RP, 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
- 45: Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* **115**:455-465
- 46: Maciejewski PM, Peterson FC, Andersen PJ, Brooks CL (1995) Mutation of serine 90 to glutamic acid mimics phosphorylation of bovine prolactin. *J Biol Chem.* **270**:27661-27665
- 47: Milligan G, Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol.* **147**:46-55
- 48: Moepps B, Vatter P, Frodl R, Waechter F, Dixkens C, Hameister H, Gierschik P (1999) Alternative splicing produces transcripts encoding four variants of mouse G. *Genomics.* **60**:199-209

- 49: Moore CA, Milano SK, Benovic JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Pharmacol.* **69**:451-482
- 50: Morris AJ, Malbon CC (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev.* **79**:1373-1430
- 51: Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekens R (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J.* **377**:1-16
- 52: Mullis, KB, Faloona, FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350
- 53: Nelson T, Brutlag D (1979) Addition of homopolymers to the 3'-ends of duplex DNA with terminal transferase. *Methods Enzymol.* **68**:41-50
- 54: Noble B, Kallal LA, Pausch MG, 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
- 55: Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science.* **289**:739-745
- 56: Penela P, Ribas C, Mayor F Jr (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of g protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal.* **15**:973-981
- 57: Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cel Biol.* **3**:639-650
- 58: Pitcher J, Lohse MJ, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry.* **31**:3193-3197

- 59: Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ (1995) Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the β -adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G subunits and lipid. *J Biol Chem.* **270**:117007-11710
- 60: Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled. *J Biol Chem.* **271**:24907-24913
- 61: Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem.* **67**:653-692
- 62: Premont RT, Macrae AD, Stoffel RH, Chung N, Pitcher JA, Ambrose C, Inglese J, MacDonald ME, Lefkowitz RJ (1996) Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J Biol Chem.* **271**:6403-6410
- 63: Premont RT (1999) The GRK4 subfamily of G protein-coupled receptor kinases. Alternative splicing, gene organization, and sequence conservation. *J Biol Chem.* **274**:29381-29389
- 64: Premont RT, Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Pharmacol.* **69**:511-539
- 65: Pronin AN, Benovic JL (1997) Regulation of the G Protein-coupled Receptor Kinase GRK5 by Protein Kinase C. *J Biol Chem.* **272**:3806-3812
- 66: Pronin AN, Satpaev DK, Slepak VZ, Benovic JL (1997) Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain. *J Biol Chem.* **272**:18273-18280
- 67: Pronin AN, Carman CV, 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

- 68: Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein coupled receptor. *Nature*. **450**:383-387
- 69: Rockman HA, Choi DJ, Akhter SA, Jaber M, Giros B, Lefkowitz RJ, Caron MG, Koch WJ (1998) Control of myocardial contractile function by the level of beta-adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice. *J Biol Chem*. **273**:18180-18184
- 70: Rodbell M (1980) The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature*. **284**:17-22
- 71: Ruiz-Gomez A, Humrich J, Murga C, Quitterer U, Lohse MJ, Mayor F Jr (2000) Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem*. **275**:29724-29730
- 72: Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**:487-491
- 73: Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- 74: Samel I (2007) Regulation leukozytärer Chemokinrezeptoren durch Kinasen G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie, Medizinische Fakultät, Universität Ulm
- 75: Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. **74**:5463-5467
- 76: Shichi H, Somers RL (1978) Light-dependent phosphorylation of rhodopsin. *J Biol Chem*. **253**:7040-7046

- 77: Smeets TJ, Barg EC, Kraan MC, Smith MD, Breedveld FC, Tak PP (2003) Analysis of the cell infiltrate and expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in arthroscopic synovial biopsies: comparison with synovial samples from patients with end stage, destructive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **62**:635-638
- 78: Stoffel RH 3rd, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1997) Targeting G protein-copuled receptor kinases to their receptor substrates. *J Membr Biol.* **157**:1-8
- 79: Stoffel RH, Inglese J, Macrae AD, Lefkowitz RJ, Premont RT (1998) Palmitoylation increases the kinase activity of the G protein-coupled receptor kinase, GRK6. *Biochemistry.* **37**:16053-16059
- 80: Suo Z, Wu M, Citron BA, Wong GT, Festoff BW (2004) Abnormality of G-Protein-Coupled Receptor Kinases at Prodromal and Early Stages of Alzheimer's Disease: An Association with Early β -Amyloid Accumulation. *J Neurosci.* **24**:3444-3452
- 81: Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, Tesmer JJG (2005) Snapshot of Activated G Proteins at the Membrane: The $G\alpha_q$ -GRK2- $G\beta\gamma$ Complex. *Science.* **310**:1686-1690
- 82: Thiagarajan MM, Stracquatano RP, Pronin AN, Evanko DS, Benovic JL, Wedegaertner PB (2004) A predicted amphipathic helix mediates plasma membrane localization of GRK5. *J Biol Chem.* **279**:17989-17995
- 83: Uings IJ, Farrow SN (2000) Cell receptors and cell signaling. *Mol Pathol.* **53**:295-299
- 84: 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
- 85: Vatter P, Stoesser C, Samel I, Gierschik P und 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

- 86: Vroon A, Heijnen CJ, Raatgever R, Touw IP, Ploemacher RE, Premont RT, Kavelaars A (2004) GRK6 deficiency is associated with enhanced CXCR4-mediated neutrophil chemotaxis in vitro and impaired responsiveness to G-CSF in vivo. *J Leukoc Biol.* **75**:698-704
- 87: Vroon A, Kavelaars A, Limmroth V, Lombardi MS, Goebel MU, Van Dam AM, Caron MG, Schedlowski M, Heijnen CJ (2005) G protein-coupled receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **174**:4400-4406
- 88: Walker JK, Gainetdinov RR, Feldman DS, McFawn PK, Caron MG, Lefkowitz RJ, Premont RT, Fisher JT (2004) G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **286**:L312-319
- 89: Weiss ER, Raman D, Shirakawa S, Ducceschi MH, Bertram PT, Wong F, Kraft TW, Osawa S (1998) The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. *Mol Vis.* **4**:4-27
- 90: Wettschurek N, Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* **296**:1159-1204
- 91: Wijbrandts CA, Dijkgraaf MG, Kraan MC, Vinkenoog M, Smeets TJ, Dinat H, Vos K, Lems WF, Wolbink GJ, Sijpkens DE, Dijmans BA, Tak P (2007) The clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis is in part dependent on pre-treatment TNF α expression in the synovium. *Ann Rheum Dis.* **67**:1139-1144
- 92: Yamaki K, Takashi Y, Sakuragi S, Matsubara K (1987) Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina. *Biochem Biophys Res Commun.* **142**:904-910
- 93: Yang W, Xia SH (2006) Mechanisms of regulation and function of G-protein coupled receptor kinases. *World J Gastroenterol.* **12**:7753-7757

7 Danksagung

Viele Personen haben auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, dafür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. P. Gierschik für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, die freundliche Aufnahme in die Abteilung und die guten Arbeitsbedingungen.

Frau Prof. Dr. K. Giehl für die Bereitschaft zur Übernahme des Koreferats. Bei meinen Wahlprüfern Herrn Prof. Dr. J. Torzewski und Herrn Prof. Dr. F. Kirchhoff möchte ich mich für das Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. B. Möpps. Mit ihrem außergewöhnlichen Engagement und ihrer fachlichen wie persönlichen Unterstützung war sie am Fortgang meiner Arbeit maßgeblich beteiligt.

Dem Laborteam „4202“ mit allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern, besonders Elke, Ines, Karin, Ingrid, Jan, Mike, Petra und Claudia, für die spannende, lehrreiche und auch schöne Zeit.

Den Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und ihre Kollegialität.

Meiner Familie und meinem Mann für den Rückhalt und die Unterstützung, gerade in Phasen der Stagnation. Außerdem meiner kleinen Tochter für ein paar ruhige Stunden, die die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben.

8 Lebenslauf

Carolin Mathieu, geb. Klement

geboren am 15.07.1977 in Kaiserslautern

1984-1988	Pestalozzi-Grundschule in Kaiserslautern
1988-1997	Albert-Schweitzer-Gymnasium in Kaiserslautern
1994/1995	Millbrook School, New York, USA
1997	Abitur am Albert-Schweitzer-Gymnasium in Kaiserslautern
10/1997 bis 06/2004	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
2001	Chirurgie, Gynäkologie und Traditionelle Chinesische Medizin am Klinikum der Universität Nanjing, China (Famulatur)
2003/2004	Praktisches Jahr: Innere Medizin, Chirurgie und Neurologie am Universitätsklinikum Ulm
2004 bis 2006	Assistenzärztin in der Onkologischen Fach- und Rehabilitations- klinik Märkische Schweiz in Buckow (24 Monate Weiterbildung Innere Medizin)
seit 04/2007	Assistenzärztin in der Abteilung Neurologie des Westpfalz- klinikums in Kaiserslautern