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

Isolierung und Charakterisierung von Kinasen G Protein-gekoppelter Rezeptoren Typ 4, 5 und 6 des südafrikanischen Krallenfroschs Xenopus laevis

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
(Dr. med.)
der medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Jan Holger Lowak
geb. in Meersburg
Ulm 2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: PD Dr. Barbara Möpps
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Marienfeld
Tag der Promotion: 27.10.2011

Für meine Familie

Gehe nicht, wohin der Weg dich führen mag, sondern
dorthin, wo kein Weg ist, und hinterlasse eine Spur
Jean Paul

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

1.1 Allgemeine Einführung ... 1

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ... 1

1.2.1 Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ... 2

1.2.2 Heterotrimere G-Proteine ... 5

1.2.3 Regulation der Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ... 8

1.3 Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ... 10

1.4 Der Modellorganismus *Xenopus laevis* ... 16

1.5 Zielsetzung der Arbeit ... 16

2 Material und Methoden ... 18

2.1 Material ... 18

2.1.1 Chemikalien ... 18

2.1.2 Radioaktiv markierte Chemikalien ... 20

2.1.3 Enzyme, Kits und Nukleinsäuren ... 20

2.1.4 Verbrauchsmaterial ... 21

2.1.5 Säulen und Gele für die Chromatographie ... 21

2.1.6 Pro- und eukaryontische Zellstämme ... 22

2.1.7 Plasmide ... 22

2.1.8 Oligonukleotide ... 22

2.1.9 cDNA-Genbanken ... 24

2.1.10 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 24

2.1.11 Antikörper ... 25

2.1.12 Spezielle Geräte ... 25

2.1.13 Software ... 26

2.2 Methoden ... 26

2.2.1 Mikrobiologische Methoden ... 26

2.2.2 Molekularbiologische Methoden ... 28

2.2.3 Kultivierung v on eukaryontischen Zellen ... 46

2.2.4 Proteinexpression in Insektenzellen ... 47

2.2.5 Proteinbiochemie 49
2.2.6 Chromatographische Methoden 55
2.2.7 Methoden zur Untersuchung der Kinaseaktivität von GRKs 57
2.2.8 Arbeiten mit Xenopus laevis 58
3 Ergebnisse 64
3.1 Isolierung und Charakterisierung der cDNAs von Varianten der Kinasen G Protein gekoppelter Rezeptoren Typ 4, 5 und 6 von *Xenopus laevis* 64
3.1.1 Isolierung von für Kinasen G Protein-gekoppelter Rezeptoren kodierenden cDNAs aus cDNA-Banken von *Xenopus laevis* 64
3.1.2 Sequenzanalyse der xGRK4-cDNA 64
3.1.3 Sequenzanalyse der rekombinanten xGRK5-cDNA 66
3.1.4 Sequenzanalyse der rekombinanten xGRK6-cDNA 68
3.1.5 Aminosäuresequenzverwandschaft der Kinasen G Protein gekoppelter Rezeptoren Typ 4, 5 und 6 von *Xenopus laevis* 69
3.2 Analyse der mRNA-Expression von xGRK4, 5 und 6 in Embryonen und Geweben adulter Tieren von *Xenopus laevis* 70
3.2.1 Untersuchung zur Spezifität der in den RT-PCR-Analysen verwendeten Oligonukleotide 71
3.2.2 RT-PCR Analysen zur Untersuchung der xGRK-Expression in Embryonalstadien von *Xenopus laevis* 72
3.2.3 RT-PCR-Analysen zur Untersuchung der xGRK-Expression in Geweben von *Xenopus laevis* 76
3.2.4 *Whole-mount-in-situ*-Hybridisierung zur Analyse der xGRK4-mRNA-Expression in Embryonen von *Xenopus laevis* 79
3.2.5 Nachweis der Proteinexpression von xGRKs in verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis* 80
3.2.6 Expression von rekombinant hergestellter xGRK6 in Insektenzellen 82
3.2.7 Massenspektrometrische Untersuchung von xGRK6 94
4 Diskussion 96
5 Zusammenfassung 105
6 Literaturverzeichnis 107
Danksagung 124
Lebenslauf 126

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AcNPV	Autographa californica nuclear polyhedrosis virus
AGS	activators of G Protein signaling
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
Bpb	Bromphenolblau
Blotto	5% Magermilchpulver in TBS/Tween 20
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
CIP	Calf-Intestine-Phosphatase
cm	Zentimeter
CMF-PBS	Calcium- und magnesiumfreie, phosphatgepufferte Salzlösung
CXCR4	CXC-Motiv- Chemokinrezeptor 4
d	Tage
Da	Dalton, in der Biochemie und organischen Chemie verwendete Bezeichnung für die atomare Masseneinheit u
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH_2O	bi-destilliertes H_2O
ddNTPs	Didesoxynukleotide
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG-RNA	Digoxigenin-markierte *antisense*-RNA
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2‘-Desoxynukleotid-5‘-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FPLC	fast protein liquid chromatography
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
g	Gramm
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor/ GTP-Austauschfaktor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	kleine Proteine, die durch wechselnde Bindung von GDP und GTP als Stellglieder der Signaltransduktionskaskade dienen
Gα	α-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
Gβ	β-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
Gβγ	βγ-Dimer eines heterotrimeren G-Proteins
h	Stunde
H5-Zellen	Trichoplusia ni HighFive™ Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMW	high molecular weight
IgG	ImmunglobulinG
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

LacZ-Gen	Gen für das Enzym β-Galactosidase
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LMW	low molecular weight
m	Meter
M	Mol
m/V	Masse pro Volumen
mA	Milliampere
MALDI-TOF	Matrix –assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MAP	mitogen-activated protein, mitogenaktiviertes Protein
MBSH	Modified Barth's solution high salt
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PI	Phosphoinositol
PIP_2	Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat auch als PtdInsP_2 bezeichnet
PH-Domäne	pleckstrin homology domain
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pVL1392/1393	pVL1392, pVL1393 Baculovirus Transfer Vector Set
RE	Restriktionsendonuklease

RGS-Protein	regulators of G protein signaling Protein
RH-Domäne	regulators of G protein signaling homology-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNasen	Ribonukleasen
ROS	rod-outer-segment, das Außensegment von Stäbchen (rod cells) der Netzhaut
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion kombiniert die Nutzung der Reversen Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion in der Molekularbiologie, um die Expression spezifischer Gene nachzuweisen.
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
s	Sekunde
SSC	Standard Saline Citrate
SDF-1	stromal cell-derived factor 1 oder auch CXCL12 (CXC- Motiv-Chemokinrezeptorligand 12)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
*Sf*9-Zellen	Ovarialzellen von Spodoptera frugiperda
T	Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Buffered Saline, Tris gepufferte Kochsalzlösung
TEM	Tris-EDTA-$MgCl^2$
TFA	Trifluoroacetic acid/Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TWEEN	Polyoxyethylen-sorbitan-tristearat
u	Unified atomic mass unit, atomare Masseneinheit festgelegt auf 1/12 der Masse des Kohlenstoff-Isotops ^{12}C entsprechend $1.660538782\times10^{-27}$ kg
UPM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
VT	Volumenteil

W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Zellen lebender Organismen sind permanent Signalen chemischer und physikalischer Natur ausgesetzt und haben Mechanismen entwickelt, diese Reize zu erkennen und auf sie zu reagieren. Diese Fähigkeit ist eine Grundvoraussetzung für das Überleben der Zellen. Bei den Reizen, die auf die Zellen einwirken, kann es sich sowohl um Umweltreize wie Licht oder Geruch als auch um Signale anderer Zellen, z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter handeln [43]. Extrazelluläre Stimuli, welche die Zellmembran nicht überwinden können, werden über membranständige Rezeptoren wahrgenommen. Dabei handelt es sich um Proteine, die extrazelluläre Informationen in Form von physikalischen Reizen oder Signalmolekülen spezifisch erkennen und an intrazelluläre Effektorproteine weiterleiten. Als Resultat der Aktivierung eines spezifischen Rezeptors oder auch durch die Integration verschiedener durch Rezeptoren übermittelte Reize werden über Aktivierung intrazellulärer Effektorproteine die entsprechenden Reaktionen einer Zelle ausgelöst. Die Signaltransduktion über Transmembran-Rezeptoren kann über fünf verschiedene Wirkmechanismen erfolgen. Man unterteilt diese Rezeptoren nach den entsprechenden Wirkmechanismen in die folgenden fünf Klassen: Zytokinrezeptoren, Integrine, Rezeptortyrosinkinasen, Ionenkanäle und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Mit über 1000 Mitgliedern innerhalb der Säugetiere bildet die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) die größte Familie der Zelloberflächenmoleküle und damit eine der größten Proteinfamilien überhaupt. GPCRs finden sich nicht nur bei Säugetieren, sondern bei allen Wirbeltieren und Wirbellosen, in Pilzen (z.B. in Hefen) und in Pflanzen [31]. In Vertebraten kodieren 1-4 % des Genoms für GPCRs [6]. Im Genom des Menschen wurden bislang ca. 865 verschiedene, für GPCRs kodierende, DNA-Sequenzabschnitte nachgewiesen [30, 72]. Zu den spezifischen Liganden dieser Rezeptorklasse zählen Pheromone, Geruchs- oder Geschmacksstoffe, Nukleotide, Lipide, Peptide, Ionen und auch Photonen. Da in der modernen Medizin mehr als die Hälfte der neueren Medikamente G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Angriffspunkt nutzen und

mehrere Liganden für GPCRs in der „Hitliste“ der Top 100 weltweit meistverkauften Medikamente zu finden sind [30], stellen GPCRs einen zentralen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Medikamente dar. Trotz intensiver Forschungsbemühungen sind zahlreiche physiologische und pathophysiologische Funktionen der bekannten GPCRs noch unverstanden.

1.2.1 Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die cDNAs aller bereits bekannten GPCRs kodieren für Proteine, die aus etwa 350-500 Aminosäuren bestehen und die alle eine einheitliche Tertiärstruktur aufweisen [3, 122, 123]. Ein detailliert beschriebener Vertreter der GPCRs ist das Rhodopsin (Abb. 1 und Abb. 2). In der Vergangenheit konnte die Struktur des Rhodopsins nur mit geringer Auflösung ermittelt werden [136]. Aus diesem Grund basierte das Strukturmodell der GPCRs bislang auf der Röntgenkristallstruktur des funktionell verwandten Bakteriorhodopsins (Abb. 1)[87]. Nach diesem Modell bestehen die GPCRs aus einem extrazellulären aminoterminalen und einem intrazellulären carboxylterminalen Segment sowie sieben nahezu kreisförmig angeordneten α-helikalen Transmembrandomänen (25-30 Aminosäuren), die über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind [122](Abb. 3). Zwei Cysteinreste in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife können eine Disulfidbrücke bilden, welche möglicherweise die Konformation der sieben Transmembrandomänen stabilisiert [6]. Durch Palmitoylierung eines konservierten Cysteinrestes im intrazellulären Carboxylterminus vieler GPCRs kann eine vierte intrazelluläre Schleife ausgebildet werden [48]. Bei den meisten GPCRs handelt es sich um Glykoproteine mit mindestens einer Konsensussequenz für N-Glykosylierung (Arg-X-Ser/Thr) im extrazellulären Aminoterminus [122, 133]. Im Jahr 2000 konnte die Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins dokumentiert werden (Abb. 2)[86]. Das bovine Rhodopsin besitzt im Gegensatz zum Bakteriorhodopsin größere und besser organisierte extramembranäre Regionen. Neben den sieben transmembranären Helices besitzt das Rhodopsin am Carboxylterminus eine kurze achte zytoplasmatische Helix, die gemeinsam mit der zweiten intrazellulären Schleife, parallel zur zytoplasmatischen Membranoberfläche, eine Plattform ausbildet (Abb. 3). Diese Plattform ist groß genug, um eine Interaktion des Carboxylterminus des Rezeptors mit den G-Protein-Untereinheiten zuzulassen. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor verursacht eine Lageveränderung

einzelner transmembranärer Domänen zueinander, wodurch eine Konformationsänderung der intrazellulären Oberfläche des GPCRs induziert wird. Dadurch können zytoplasmatische Bereiche des GPCRs mit bestimmten Regionen des heterotrimeren G-Proteins interagieren [78, 36]. Welche G-Protein-Untereinheit für diese Interaktion von Bedeutung ist, muss noch ermittelt werden [86]. Die Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins zeigt, dass die bislang verwendeten Bakteriorhodopsin-Struktur-Modellsysteme der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sehr gut mit der tatsächlichen Struktur übereinstimmen, was für eine hohe Konservierung der dreidimensionalen Struktur innerhalb der GPCR-Familie spricht [86].

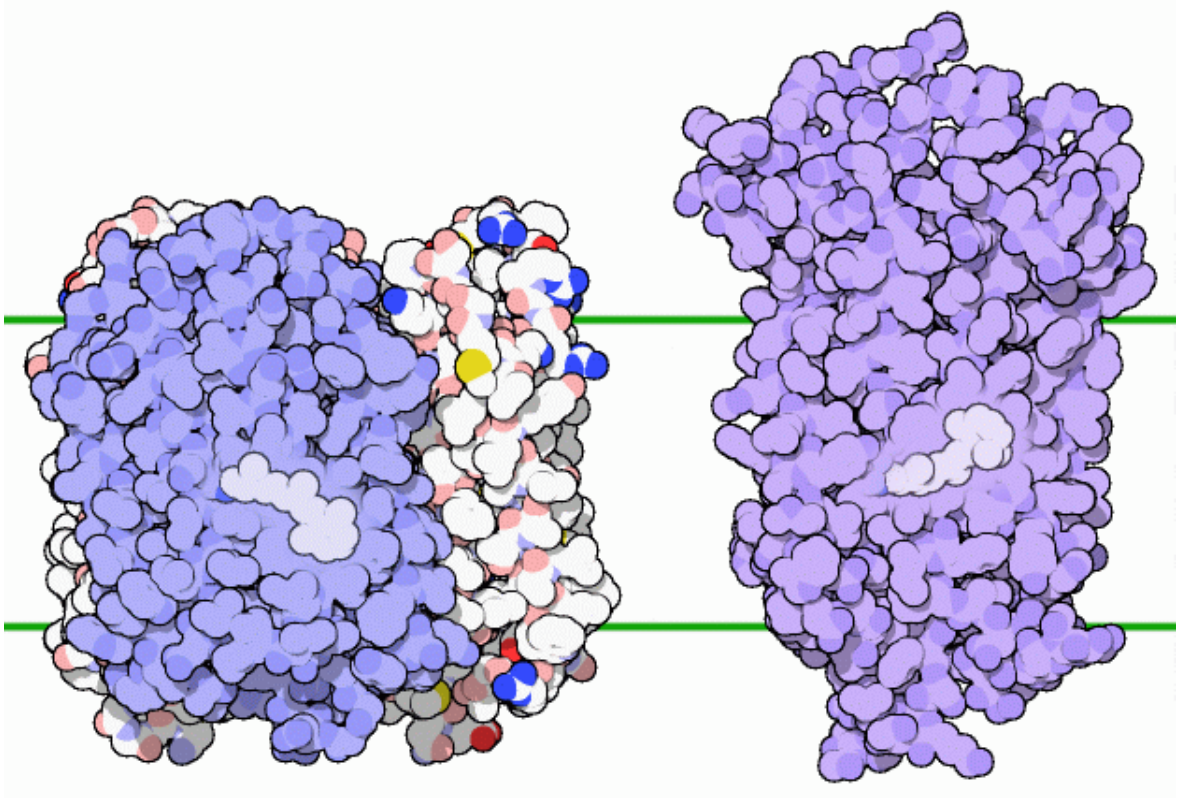


Abb. 1: Bakteriorhodopsin (links) und bovines Rhodopsin, schematische Gegenüberstellung der räumlichen Struktur. Schematische Darstellung der räumlichen Struktur von Bakteriorhodopsin und bovinem Rhodopsin jeweils mit Retinal (Abb. von David S. Goodsell vom The Scripps Research Institute, Wikipedia.de 2009)

Trotz der hohen Übereinstimmungen in ihrer molekularen Struktur zeigen GPCRs auf Ebene der Aminosäuresequenz charakteristische Unterschiede, die eine Einteilung der GPCRs in Subfamilien erlaubt. Basierend auf ihrer Aminosäuresequenzhomologie werden die GPCRs heute in vier Subfamilien eingeteilt [29]. Die erste Familie, der Rhodopsin als „Prototyp“ dient, bildet die größte Gruppe der GPCRs mit bislang 284 gelisteten

Mitgliedern (NC-IUPHAR, www.iuphar-db.org, Stand Oktober 2010) und wird je nach Interaktionsstelle zwischen Rezeptor und Ligand und nach der Größe der Liganden in drei weitere Untergruppen eingeteilt: (I) Rezeptoren für kleine Liganden wie Retinal oder Catecholamine. Bei diesen Rezeptoren befindet sich die Bindungsstelle für die Liganden im Kern, der durch die sieben transmembranären Domänen ausgebildet wird. (II) Rezeptoren für Peptide, z. B. Chemokine. Bei der Bindung der Liganden an die Rezeptoren dieser Untergruppe interagieren die Liganden mit dem Aminoterminus und den extrazellulären Schleifen des Rezeptors. (III) Rezeptoren für Glykoproteinhormone. Bei dieser Rezeptor-Untergruppe bestehen Wechselwirkungen der Liganden mit dem bei diesen Rezeptoren besonders langen Aminoterminus und den extrazellulären Schleifen des GPCRs. Über die Hälfte der Rezeptoren der ersten Familie wird der Wahrnehmung von Geruch, Geschmack oder Licht zugeordnet [1, 143, 82, 142], wobei diese Zuordnung zumeist nicht auf experimentellen Ergebnissen beruht, sondern aufgrund der großen Übereinstimmung ihrer Sequenz mit der Sequenz bekannter Rezeptoren der Wahrnehmung erfolgt. Gemeinsam ist den GPCRS dieser Familie das DRY Motiv im cytoplasmatischen Bereich der dritten transmembranären Domäne sowie Prolin-Reste an spezifischen Positionen in den α-Helices der 5., 6. und 7. transmembranären Domäne [29].

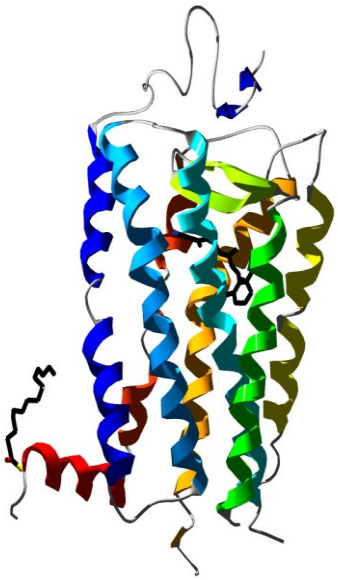


Abb. 2: Räumliche Struktur von bovinem Rhodopsin. Nach Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten bovinen Rhodopsins mit innenliegendem Retinal, computergeneriertes, 3D-Modell des ersten in seiner räumlichen Struktur analysierten GPCRs von Vertebraten nach Palczewski *et al.* [86]. Der aminoterminale Abschnitt des Rezeptors befindet sich im oberen Teil der Abbildung, der carboxyterminale Abschnitt im unteren Bereich der Abbildung. Die transmembranären Abschnitte wurden zur besseren Darstellbarkeit unterschiedlich gefärbt: TM1 Blau, TM2 Hellblau, TM3 Türkis, TM4 Grün, TM5 Gelb, TM6 Orange, TM7 Hellrot und die intrazellulär gelegene 8. Helix Dunkelrot.

Die Rezeptoren der zweiten Familie, mit dem Sekretin-Rezeptor als bekanntestem Mitglied, erkennen hochmolekulare Hormone wie Glukagon und umfassen bislang 56 Mitglieder (NC-IUPHAR, www.iuphar-db.org, Stand Oktober 2010). Die dritte Rezeptorfamilie beinhaltet beispielsweise den metabotrophen Glutamatrezeptor [6] und umfasst bislang 24 Mitglieder (NC-IUPHAR, www.iuphar-db.org, Stand Oktober 2010). Neben den drei Hauptfamilien der GPCRs wird als weitere Gruppe die Gruppe der *frizzled*-Rezeptoren geführt, welche die *frizzled*- und *smoothened*-Rezeptoren mit insgesamt 11 Mitgliedern (NC-IUPHAR, www.iuphar-db.org, Stand Oktober 2010) umfasst. Diese Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung [6]. Interessant ist, dass bislang nicht für alle *frizzled* Rezeptoren eine Interaktion mit G-Proteinen gezeigt werden konnte [138].

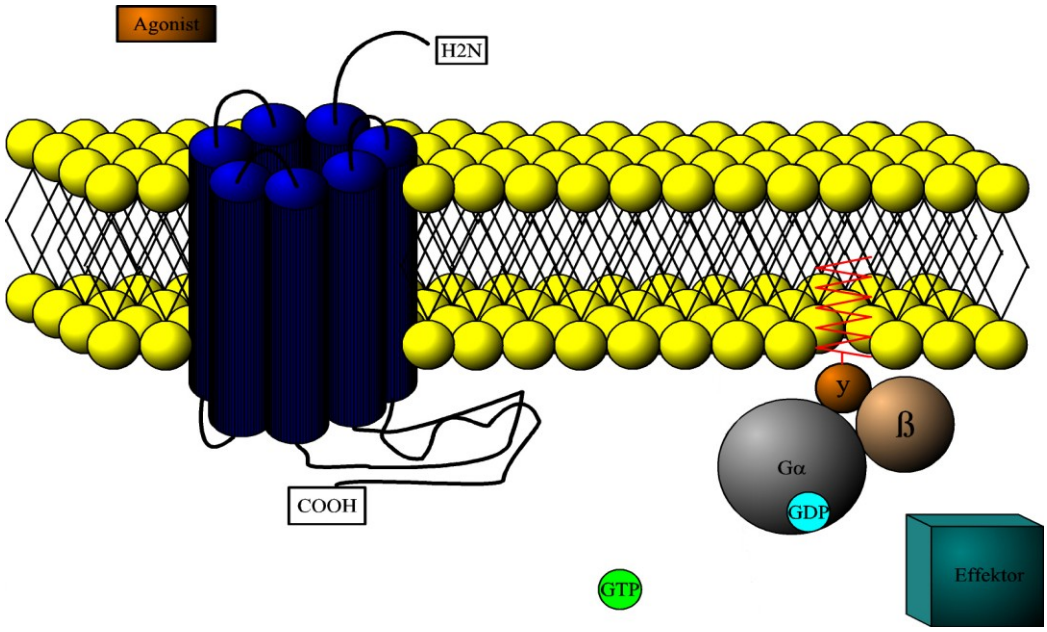


Abb. 3: Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Sichtbar sind der extrazellulär gelegene Aminoterminus, der intrazellulär gelegene Carboxylterminus und die sieben transmembranären Domänen. Neben dem Rezeptor sind schematisch dargestellt ein extrazellulär gelegener Agonist, ein heterotrimeres guaninnukleotidbindendes Protein (G-Protein) und ein möglicher Effektor. Der Aufbau und die Funktion des Rezeptors werden im Text näher beschrieben.

1.2.2 Heterotrimere G-Proteine

G-Protein gekoppelte Rezeptoren übertragen, wie ihr Name schon impliziert, ihre Signale über Kopplung an heterotrimeren Guaninnukleotidbindenden Proteine (G-Proteine) ins

Zellinnere. Die G-Proteine gehören zur Superfamilie der GTPasen und spielen eine zentrale Rolle bei der Signalübertragung von aktivierten GPCRs auf intrazelluläre Effektoren. Es handelt sich um membranständige Proteine die ubiquitär in allen eukaryontischen Zellen vorkommen [35, 115, 84]. Alle heterotrimeren G-Proteine setzen sich aus drei Untereinheiten Gα (39-46 kDa), Gβ (37 kDa) und Gγ (8 kDa) zusammen. Im Genom des Menschen wurden 35 Gene identifiziert, die für G-Protein Untereinheiten kodieren. Von diesen 35 Genen kodieren 17 für Gα-, 5 für Gβ- und 12 für Gγ-Untereinheiten [72]. Die Mitglieder der Gruppe der Gα-Untereinheiten werden aufgrund von Unterschieden in den Aminosäuresequenzen in vier Familien $G_s\alpha$, $G_{i/o}\alpha$, $G_{q/11}\alpha$ und $G_{12/13}\alpha$ eingeteilt [72]. Für Mitglieder der Familie der $G_s\alpha$-Proteine ist bekannt, dass sie Adenylylzyklasen aktivieren, während Vertreter der Klasse der $G_{i/o}\alpha$-Proteine die Adenylylzyklasen inhibieren. Mitglieder der $G_{q/11}\alpha$-Klasse regulieren die Aktivität von Phospholipase C-β-Isoenzymen und Vertreter der $G_{12/13}\alpha$-Familie regulieren über Stimulation von Guaninnukleotidaustauschfaktoren die Aktivität von RhoGTPasen [84]. Neben den Unterschieden in der Regulation intrazellulärer Effektoren zeigen sowohl die verschiedenen Gα- als auch die Gβγ-Untereinheiten Unterschiede in ihrem Proteinexpressionsmuster [72]. So werden einige der Proteine ubiquitär exprimiert, während andere zellspezifisch, z.B. in Seh- und/oder Nervenzellen exprimiert werden [72]. Zu den Effektoren der G-Proteine zählen neben den bereits erwähnten Adenylylzyklasen und Phospholipasen auch Tyrosinkinasen und Ionenkanäle. Die durch einen Liganden vermittelte Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors bewirkt eine Konformationsänderung des aktivierten Rezeptors, wodurch eine Interaktion zwischen dem heterotrimeren G-Protein und carboxylterminalen Abschnitten und Abschnitten der intrazellulären Schleifen des aktivierten GPCRs ermöglicht wird [78]. Hierbei fungiert der Rezeptor als GTP-Austauschfaktor (*GEF, guanine nucleotide exchange factor*), so dass es zum Austausch von GDP gegen GTP an der Gα-Untereinheit kommt. Das heterotrimere G-Protein dissoziiert im Anschluss in die Gα-Untereinheit und das Gβγ-Dimer. An der Gα-Untereinheit hat die Bindung von GTP eine Konformationsänderung im Bereich der *switch*-Region bewirkt, die jetzt eine Interaktion mit Effektoren und RGS-Proteinen (*regulators of G protein signaling*) ermöglicht [125]. Jede Untereinheit interagiert mit unterschiedlichen Effektoren [39] und kann so die Signaltransduktion beeinflussen. Der aktive Zustand der Gα-Untereinheit wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität und die

damit verbundene Hydrolyse des gebundenen GTPs zu GDP beendet [14]. Die intrinsische GTPase-Aktivität wird dabei durch RGS-Proteine beeinflusst, die damit die Geschwindigkeit der Hydrolyse bis zum 100 fachen beschleunigen können [12, 72]. Durch die jetzt erfolgte Bindung von GDP kann die Gα-Untereinheit wieder mit dem Gβγ-Dimer reassoziieren, so dass der Zyklus abgeschlossen ist und das heterotrimere G-Protein für eine erneute Aktivierung zur Verfügung steht [72]. Unabhängig von der Aktivierung durch GPCRs können *non-receptor activators of G Protein signaling* (AGS)-Proteine heterotrimere G-Proteine durch die Stimulierung des GDP/GTP-Austausch aktivieren [17].

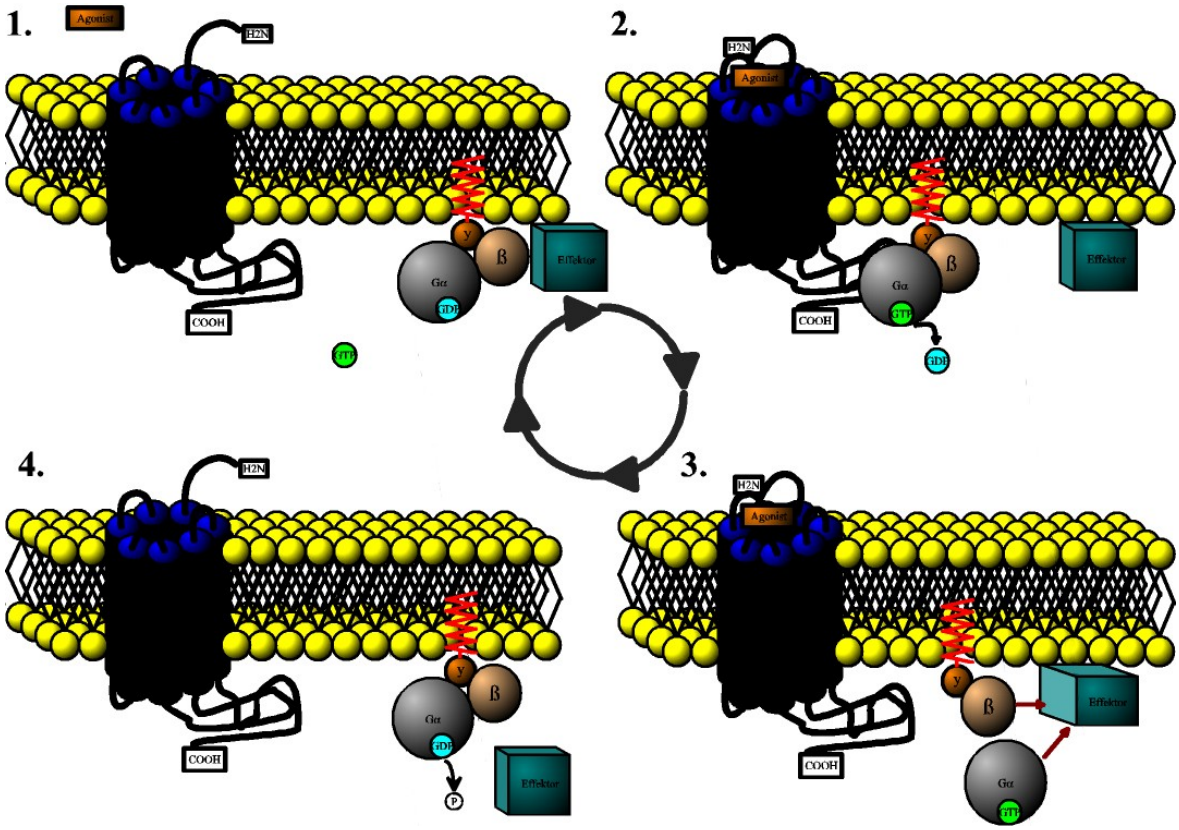


Abb. 4: Schematische Darstellung des Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine. Bei der Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch einen Liganden erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors wodurch eine Interaktion zwischen dem Carboxylterminus des Rezeptors und einem heterotrimeren G-Protein möglich wird. Hierbei fungiert der Rezeptor als *guanin nucleotide exchange factor* (GEF) und bewirkt den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) an der Gα-Untereinheit, wonach dieses von der Gβγ-Untereinheit dissoziiert. Beide Untereinheiten können jetzt mit unterschiedlichen Effektoren interagieren. Durch die Abspaltung eines Phosphatrestes verbindet sich die, jetzt wieder mit einem GDP beladene, Gα-Untereinheit mit der Gβγ-Untereinheit zum heterotrimeren G-Protein.

Die Gβγ-Untereinheit stellt durch die oben beschriebene Verbindung ein funktionelles Monomer dar, welches nur durch Denaturierung dissoziierbar ist. Das Gβγ-Dimer beeinflusst neben der Verstärkung der Wechselwirkung zwischen GPCR und Gα-Untereinheit eine Vielzahl von Effektorproteinen wie Ionenkanäle, Phospholipasen C-β, Adenylylzyklasen, Phosphoinositol (PI)-3-Kinasen und die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen GRK2 und GRK3 [18, 39]. Zusätzlich wird der Gβγ-Untereinheit eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des mitogenaktivierten Protein (MAP)-Kinase-Signalweges nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zugeschrieben [38, 66]. In Abb. 4 erfolgt eine schematische Darstellung des Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine.

1.2.3 Regulation der Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Bei kontinuierlicher oder wiederholter Stimulation des G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCRs) reagieren diese mit verminderter Aktivierbarkeit auf ihre Liganden. Dieses Verhalten wird als Desensibilisierung bezeichnet [28, 34, 139]. Die Abnahme der Sensibilität wird durch zwei unterschiedliche Vorgänge verursacht. Zum einen erfolgt sie durch eine Entkopplung des Rezeptors von den nachfolgenden Effektoren durch Blockierung der Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen, zum anderen kann bei anhaltenden Stimuli eine Abnahme der Rezeptorendichte an der Zelloberfläche beobachtet werden. Die Abnahme der Rezeptorendichte selbst erfolgt zum einen durch verminderte Protein-, also GPCR-Synthese, zum anderen aber durch die Endozytose von Rezeptorproteinen [28].

An der Desensibilisierung von GPCRs sind Proteinkinasen von entscheidender Bedeutung, die Serin- und/oder Threoninreste im carboxylterminalen Bereich und/oder in der dritten zytoplasmatischen Schleife phosphorylieren und dadurch die Interaktion des Rezeptorproteins mit dem heterotrimeren G-Protein behindern. An dieser Phosphorylierung beteiligen sich sowohl Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) als auch *second-messenger*-abhängige Proteinkinasen, wie Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) [75, 28]. Die Desensibilisierung von GPCRs wird in eine homologe und eine heterologe Form der Desensibilisierung unterschieden [58, 67]. Die homologe Desensibilisierung findet spezifisch an aktivierten GPCRs statt, wobei die

Phosphorylierung hierbei durch GRKs erfolgt. Bei der heterologen Desensibilisierung wird die Phosphorylierung durch Proteinkinase A (PKA) oder Proteinkinase C (PKC) unabhängig vom Aktivierungszustand des Rezeptors vermittelt.

Im Rahmen der homologen Desensibilisierung bewirkt die Phosphorylierung von aktivierten GPCRs durch GRKs die Erhöhung der Affinität gegenüber β-Arrestinen, die inhibitorisch auf den Rezeptor wirken. In der Familie der β-Arrestine sind bislang vier unterschiedliche Mitglieder beschrieben worden, von denen das *cone arrestin* und das *visual arrestin* in ihrer Expression auf Zellen der Retina beschränkt sind [28, 101]. Die anderen beiden Mitglieder, β-Arrestin 1 und β-Arrestin 2 genannt, werden dagegen ubiquitär exprimiert, wobei eine Betonung der Expression im Gehirn und in der Milz beobachtet werden kann. Durch die Bindung der β-Arrestine an den phosphorylierten GPCR kommt es zu einer sterischen Behinderung der Interaktion zwischen dem heterotrimeren G-Protein und dem Rezeptor, wodurch die G-Protein vermittelte Aktivierungskaskade unterbunden wird. Gleichzeitig schaffen zwei Proteinmotive im carboxylterminalen Abschnitt der β-Arrestine eine Verbindung zur Clathrin-abhängigen Endozytose, wodurch die Internalisierung des aktivierten GPCR erfolgen kann [67, 74]. Im folgenden Schritt wird der internalisierte Rezeptorkomplex dephosphoryliert, der möglicherweise noch vorhandene Ligand abgetrennt und, nach Entfernung des β-Arrestins, entweder erneut an der Zellmembran verankert (*Resensitization*) oder in Lysosomen abgebaut (*Downregulation*) [67, 76]. Für β-Arrestin 2 und den β-Adrenorezeptor konnte gezeigt werden, dass die Bindung von β-Arrestin 2 an den β-Adrenorezeptor ligandenabhängig erfolgt und die anhaltende Bindung des Liganden an den β-Adrenorezeptor eine Grundvoraussetzung für die Stabilität des Rezeptor-β-Arrestin 2 Komplexes ist. So wurde nach Auswaschen des Liganden eine rasche Dissoziation des β-Arrestin 2 vom β-Adrenorezeptor beobachtet und die Endozytose des Rezeptors unterblieb [52]. Neben der Bindung an GPCRs können β-Arrestine darüber hinaus mit Tyrosinkinasen der Src-Familie und über die ERK1/2 (Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2) bzw. JNK3 (c-Jun N-terminale Kinase) mit der MAP-Kinase-Kaskade interagieren und damit weitere Signalkaskaden beeinflussen [67].

Anders als bei der homologen Desensibilisierung werden GPCRs im Verlauf der heterologen Desensibilisierung von *second-messenger*-abhängigen Proteinkinasen, wie der PKA und PKC sowie MAP-Kinasen, phosphoryliert [5, 93]. Über diesen Weg kann durch die bereits erfolgte Aktivierung von Signalkaskaden der Zelle in einem Nebenschluss eine weitere Aktivierung der Zelle über noch nicht aktivierte GPCRs vermieden werden. Als *second-messenger*, welche die Proteinkinase C aktivieren, kommen z.B. Diacylglycerol, Ca^{2+} und Phospholipide in Frage, während MAP-Kinasen und PKA von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) stimuliert werden [34]. Die Phosphorylierung der GPCRs erfolgt nicht an den gleichen Serin/Threonin-Resten wie bei der Desensibilisierung durch GRKs. Jedoch kommt es wie bei der homologen Desensibilisierung durch eine sterische Veränderung intrazellulärer Rezeptoranteile zu einer Hemmung der Interaktion mit den Gα-Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine [32, 92]. Eine erhöhte Affinität zu β-Arrestinen konnte für die heterologe Desensibilisierung bislang nicht nachgewiesen werden [11]. PKA, PKC und MAP-Kinasen tragen nicht nur zur heterologen Desensibilisierung bei, sie können auch die Effektorproteine der GPCR aktivierten Signalkaskade phosphorylieren und damit regulierend auf diese einwirken. Darüber hinaus phosphorylieren PKA und PKC in einem als „cross-talk“ bezeichneten Prozess β-Arrestine und GRKs, so dass auch deren Aktivität beeinflusst wird. Heterologe und homologe Desensibilisierung sollten daher nicht als isoliert stehende Prozesse zur Regulation von GPCRs betrachtet werden [15, 88].

1.3 Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Zur Familie der Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zählen bei Säugetieren zurzeit sieben Mitglieder, die GRK 1 bis 7 genannt werden. Zwischen den Mitgliedern der GRK-Familie zeigen sich Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen zwischen 53-93 %, wobei der größte Unterschied in den Aminosäuresequenzen zwischen GRK1 und GRK2 zu beobachten ist [96, 135, 88]. Aufgrund funktioneller und struktureller Übereinstimmung erfolgt die Unterteilung der GRK-Familie in drei Subfamilien. Wegen der alleinigen Expression ihrer Vertreter in Retinazellen wird die erste Subfamilie auch als Familie der „visuellen“ Kinasen bezeichnet. Diese Subfamilie umfasst GRK1 und GRK7. Die zweite Subfamilie enthält GRK2 und GRK3, für die bislang vor allem eine Interaktion mit den β-adrenergen Rezeptoren beschrieben wurde. Für GRK2 konnte aber auch eine wichtige

Funktion in der Chemokin-vermittelten Chemotaxis und in der epithelialen Zell-Migration gezeigt werden [89]. Die dritte Subfamilie umfasst GRK4, GRK5 und GRK6 und wird als GRK4 Unterfamilie bezeichnet. GRK5 und GRK6 werden im Menschen ubiquitär exprimiert, GRK4 jedoch hauptsächlich im Hoden und deutlich weniger ausgeprägt im Gehirn und in den Nieren [99]. Aus den Expressionsmustern der bekannten GRKs kann geschlossen werden, dass die Mehrzahl der GPCRs durch die GRKs 2, 3, 5 und 6 phosphoryliert werden. Von der GRK4 und GRK6 sind unterschiedliche, aus einer Präkursor-mRNA hervorgehende, Spleißvarianten beschrieben worden, wobei Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies bezüglich der generierten Varianten beobachtet wurden. So sind für die GRK 4 in Mensch und Ratte vier verschiedene Varianten identifiziert worden, wohingegen für die Maus keine Varianten der GRK4 gezeigt werden konnten. Für die GRK6 sind 4 Varianten aus Maus und Mensch bekannt, wohingegen in der Ratte bislang nur 2 Varianten beschrieben wurden [99, 73, 100].

Die GRKs zeichnen sich durch einen gemeinsamen strukturellen Aufbau aus. In ihrem Zentrum steht die aus etwa 263-266 Aminosäuren bestehende, relativ stark konservierte, katalytische Domäne, die von einem etwa 185 Aminosäuren umfassenden, schwächer konservierten, aminoterminalen Abschnitt und einem zwischen den GRK-Varianten unterschiedlich langem und wenig konserviertem carboxylterminalen Abschnitt eingeschlossen wird [40, 96, 83, 88]. Dem aminoterminalen Bereich der GRKs wird die maßgebliche Beteiligung an der Erkennung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und an der Lipidinteraktion und damit auch bei der Verankerung an der Zellmembran zugesprochen. In diesem Bereich konnte bei GRK5 im Bereich der Aminosäuren 22-29 eine Bindungsstelle für Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP_2) beschrieben werden, die auch bei den beiden anderen Mitgliedern der GRK4-Subfamilie (GRK4 und GRK6) stark konserviert erhalten ist [95]. Im aminoterminalen Abschnitt findet sich mit der sogenannten RH (*regulators of G protein signaling (RGS) homology*)-Domäne ein Abschnitt, der homolog zu den bekannten RGS-Proteinen ist, von denen über 30 in Säugetieren bekannt sind [13, 88, 139, 4]. Am carboxylterminalen Abschnitt werden die größten Unterschiede innerhalb der GRK Familie beobachtet, nicht nur im Hinblick auf die Länge und Konservierung der Aminosäuresequenz, sondern auch hinsichtlich der posttranslationalen Modifikationen. In der Familie der „visuellen“ GRKs (GRK1 und 7) findet sich im carboxylterminalen Bereich ein CAAX Motiv, das posttranslational isoprenyliert und

carboxymethyliert werden kann. Für GRK1 wird hier eine Farnesylierung beobachtet, während GRK7 geranylgeranylisiert wird [45, 135]. Für GRK2 und GRK3 konnte gezeigt werden, dass die *pleckstrin homology domain* (PH-Domäne) eine Membraninteraktion vermittelt, die die Translokation der GRK2 und 3 nach der Aktivierung des entsprechenden GPCRs ermöglicht, während die Kinasen im inaktivierten Zustand des entsprechenden GPCRs vor allem im Zytosol nachweisbar sind [88]. Die PH-Domäne umfasst einen *ca.* 120 Aminosäuren langen Abschnitt im carboxylterminalen Bereich, der auch in zahlreichen anderen Proteinen, wie in verschiedenen Serin-/Threoninkinasen und in gewissen Isoformen der Phospholipase C nachzuweisen ist [94, 19]. Außer der PH-Domäne findet sich im carboxylterminalen Bereich von GRK2 und GRK3 eine mit der PH-Domäne überlappende Gβγ-Bindungsdomäne (Aminosäuren 546-670). Durch diese beiden Domänen sind GRK2 und GRK3 in der Lage, sowohl mit dem Gβγ-Dimer als auch mit negativ geladenem PIP_2 (Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat) der Zellmembran zu interagieren [94, 21, 96]. Den Mitgliedern der GRK4 Unterfamilie, GRK4, GRK5 und GRK6, fehlt sowohl das CAAX-Motiv, als auch die PH-Domäne. In vorausgegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Teil der Proteine der murinen GRK6-Varianten (mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C) in intakten Zellen membranassoziiert vorliegt [127]. Für GRK4 und die humane GRK6-A konnte eine posttranslationale Palmitoylierung von Cysteinresten im carboxylterminalen Abschnitt nachgewiesen werden [120, 34]. Durch die Palmitoylierung dieser Cysteinreste wird nicht nur die Membranassoziation begünstigt, sondern es wird auch die Phosphorylierungsaktivität der Kinase gesteigert [65, 121]. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass bei einem Austausch der für die Palmitoylierung in Frage kommenden Cysteine gegen neutrale Alanine bei mGRK6-A Mutanten ein deutlicher Aktivitätsverlust gegenüber der Wildtyp mGRK6-A auftritt [112]. Ein ähnlicher Mechanismus der posttranslationalen Modifikation wird auch für die GRK4 angenommen, da auch sie Cysteinreste in ähnlicher Position im carboxylterminalen Abschnitt enthält wie die GRK6 [65]. Da für die GRK5 eine Membranassoziierung nachgewiesen werden konnte, bislang aber keine Daten für eine posttranslationale Lipidmodifikation vorliegen, werden andere Mechanismen der Membranassoziation diskutiert. So könnte eine, auch bei GRK4 (Aminosäuren 552-562) und GRK6 (Aminosäuren 553-563) vorhandene polybasische Aminosäuresequenz (Aminosäuren 552-562) im carboxylterminalen Bereich der GRK5 eine Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden der Zellmembran

ermöglichen [102, 127]. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit mGRK6-C-Mutanten, in denen basische Aminosäuren gegen neutrale Aminosäuren ersetzt worden waren, konnten die Bedeutung dieser Region für die Membraninteraktion belegen. So führte dieser Austausch zu einem nahezu vollständigen Verlust der Phosphorylierungsaktivität bezüglich membrangebundener Rezeptorsubstrate durch die Rezeptormutanten [50]. Für die GRK5 konnte auch ein Funktionsverlust gegenüber membrangebundenen Substanzen beim Fehlen dieser polybasischen Aminosäuresequenz gezeigt werden, wohingegen die Aktivität gegenüber löslichen Substraten unverändert blieb [102]. Nach neueren Untersuchungen ist sowohl bei der GRK5 als auch bei den GRK6-Varianten GRK6-A, GRK6-B und GRK6-C eine amphiphile α-Helix im Bereich der Aminosäuren 546-565 mit für die Membranassoziation verantwortlich. Der hydrophobe Anteil der α-Helix wird dabei durch die Aminosäuren Leu^{550}, Leu^{551}, Leu^{554} und Phe^{555} (Leu= Leucin, Phe= Phenylalanin) gebildet, die wie bereits erwähnt, von mehreren basischen Aminosäuren umgeben sind. Dies ermöglicht sehr wahrscheinlich eine Verbesserung der Membraninteraktion durch die zusätzliche Interaktionsmöglichkeit mit negativ geladenen Phospholipiden [126].

Analog zu den GPCRs wird auch die Aktivität der GRKs durch *second-messenger* abhängige Kinasen, besonders PKA und PKC beeinflusst [88], wobei sich hierbei große Unterschiede der Wirkung auf die unterschiedlichen GRKs zeigen. So wird GRK2 durch PKC vermutlich im aminoterminalen Abschnitt und hier wohl im Bereich der Calmodulin-Bindungsstelle phosphoryliert. Dies führt *in vitro* zu einer Zunahme der Phosphorylierungsaktivität gegenüber membrangebundenen Substraten [88] während die Aktivität gegenüber löslichen Substraten jedoch unverändert bleibt. Als Erklärung könnte eine erleichterte Membraninteraktion durch die PKC-abhängige Phosphorylierung angesehen werden. Im Gegensatz dazu wird die Phosphorylierungsaktivität von GRK5 durch die PKC-abhängige Phosphorylierung sowohl gegenüber membranassoziierten Substraten als auch gegenüber löslichen Substraten deutlich herabgesetzt. Als Ursache für diesen Effekt wird die Inhibierung der katalytischen Domäne der GRK5 durch die PKC-abhängige Phosphorylierung angenommen [102, 88].

Bei der Desensibilisierung von GPCRs durch GRKs spielt nicht nur die Inaktivierung durch Phosphorylierung eine Rolle, es gibt auch Hinweise auf Einflüsse, die unabhängig von der Phosphorylierung durch die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen auftreten [96,

105, 46, 139]. So können GRKs über die aminoterminale RH (*regulators of G protein signaling (RGS) homology*)-Domäne mit G-Proteinen interagieren. Für GRK2 konnte gezeigt werden, dass die Bindung an $G\alpha_q$ die Signalübertragung inhibiert [125, 139]. Abgesehen von Rezeptoren können auch andere, an der zellulären Signaltransduktion beteiligte Proteine wie Caveolin, Clathrin, das GTPase-aktivierende Protein GIT und PI-3-Kinasen mit GRKs interagieren [88, 139].

Erst die Ergebnisse aus *in vivo* Experimenten mit transgenen und Rezeptorkinase-defizienten Mäusen haben mehr Klarheit in die Bedeutung und Übertragbarkeit der *in vitro* gesammelten Daten bringen können [101]; wobei sich bei den *in vivo* Experimenten organspezifische Auswirkungen der Rezeptorkinasedefizienz auf die Rezeptorfunktion zeigten. Eine Ausnahme stellt hier die GRK2-defiziente Maus dar, da diese embryonale Letalität aufweist [101]. In heterozygoten GRK2-Mäusen ($GRK2^{+/-}$) wurde eine erhöhte kardiale Sensibilität auf adrenerge Stimulation nachgewiesen, womit die Bedeutung der GRK2 für die Desensibilisierung von β-Adrenorezeptoren [104] bestätigt werden konnte. Darüber hinaus wird eine erhöhte GRK2-Expression sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen mit arterieller Hypertonie in Verbindung gebracht [101]. Eine niederländische Forschergruppe konnte Veränderungen der Immunantwort im ZNS bei der experimentellen Autoimmunenzephalitis, einem Tiermodell der Multiplen Sklerose in heterozygoten GRK2-Mäusen und erniedrigte GRK2-Spiegel in Biopsien von Patienten mit Multipler Sklerose zeigen. So wiesen die GRK2-heterozygoten Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Tieren einen früheren Krankheitsbeginn auf, der mit einer verstärkten Einwanderung von T-Lymphozyten ins ZNS verbunden ist. Erstaunlicherweise entwickelten die GRK2-defizienten Tiere aber keine Rezidive [130]. Für GRK5 wurden Unterschiede in der Erregbarkeit muskarinischer M2-Acetylcholinrezeptoren in der Lunge von GRK5-defizienten im Vergleich zu wildtypischen GRK5 Mäusen beobachtet. Jedoch fielen beim gleichen Rezeptortyp im Herzen keine Unterschiede in der Erregbarkeit auf [132]. In Tieren, die als Modell einer frühen Alzheimer-Erkrankung dienen, wurde eine verringerte Menge der membranassoziierten GRK5 beobachtet [124].

Eine bedeutende Rolle in der Immunantwort spielt GRK6, so wurde in Lymphozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis eine deutlich erniedrigte GRK6-Expression beobachtet [62]. In GRK6-defizienten Mäusen wurde eine Zunahme von

Entzündungsreaktionen beobachtet, die mit einer verstärkten Gewebsschwellung bei erhöhter Gewebeinfiltration durch neutrophile Granulozyten einhergeht. Wie unterschiedlich die Reaktionen selbst innerhalb eines Organsystems, hier des Immunsystems, sind, wird daran deutlich, dass in GRK6-defizienten Tieren die Aktivierung von CXCR4 durch SDF-1α zu einer verminderten Chemotaxis von T-Lymphozyten führt, wohingegen die Chemotaxis in neutrophilen Granulozyten verstärkt wird.

Die Ursachen für die beobachteten Unterschiede sind weitgehend unklar, jedoch zeigen die Untersuchungen die Komplexität der Regulation der intrazellulären Signalübetragung durch GRKs. Deutlich wird die Komplexität auch, wenn man berücksichtigt, welche Kombinationsmöglichkeit in der Wechselwirkung von über 800 bekannten GPCRs mit den sieben bekannten Mitgliedern der GRK-Familie entstehen [101]. Hinzu kommt, dass die Kombinationsmöglichkeiten durch die generierten Varianten z.B. von GRK4 und GRK6 noch zunehmen. Einschränkend kann man sicher die unterschiedlichen Expressionsmuster und Lokalisationen der GRKs in den unterschiedlichen Zellen anführen. So wurde in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mGRK6-A in Leber- und Herzgewebe nachgewiesen, nicht aber mGRK6-B. In mesenterialen Lymphknoten, in der Milz und im Thymus traten dagegen sowohl Transkripte von mGRK6-A als auch mGRK6-B auf [127]. Erschwerend für das Verständnis der Wechselwirkung von GPCRs und GRKs bleibt, dass z.B. einerseits Untersuchungen an GRK5-defizienten Mäusen zeigen, dass der muskarinische M2-Rezeptor in unterschiedlichen Organsystemen durch verschiedene GRKs reguliert wird [132] und andererseits für den Dopamin-D2-Rezeptor im Striatum eine spezifische Interaktion mit GRK6 nachgewiesen wurde [101]. Bei diesem für die Entwicklung des Morbus Parkinson wichtigen Dopamin-D2-Rezeptor konnte bei GRK6-defizienten Tieren im Striatum eine erhöhte Rezeptor/G-Protein-Interaktion ermittelt werden. Im Gegensatz zu wildtypischen Tieren war bei GRK6-defizienten Tieren nach Gabe von stimulierenden Substanzen, wie Amphetaminen oder Kokain, eine gesteigerte motorische Aktivität zu beobachten.

1.4 Der Modellorganismus *Xenopus laevis*

Der Afrikanische Krallenfrosch (auch als glatter Krallenfrosch oder Apothekerfrosch bezeichnet) ist ein Mitglied der Gattung *Xenopus*, die insgesamt 18 Arten umfasst und zur Familie der zungenlosen Frösche (Pipidae) gehört. Der natürliche Lebensraum des *Xenopus laevis* liegt in Afrika südlich der Sahara. Seit den fünfziger Jahren wird *Xenopus laevis* als Modellorganismus für entwicklungsbiologische Untersuchungen genutzt. *Xenopus laevis* kann sehr einfach in mit Wasser gefüllten Aquarien gehalten werden. Aufgrund der einfachen Zuchtbedingungen, der großen Nachkommenzahl, der leichten Zugänglichkeit der in den Eiern befindlichen Embryonen, der relativ hohen Infektionsresistenz der Eier nach Eingriffen, zum Beispiel nach Transplantationen oder Injektionen, und der schnellen Reifung (Erreichen der Adoleszenz nach 2 Monaten) sind Krallenfrösche bevorzugte Modellorganismen für die entwicklungsphysiologische Lehre und Forschung. Die Eiablage des Weibchens kann durch Hormoninjektion ausgelöst werden. Pro Eiablage werden einige Tausend Eier gelegt. Anders als bei Säugetieren entwickeln sich die Embryonen von *Xenopus laevis* außerhalb des Mutterleibs in durchsichtigen Eiern und auch die Larve ist weitgehend transparent, so dass große Teile der Embryonalentwicklung auch an lebenden Embryonen zu beobachten sind. Die große Infektionsresistenz ermöglicht es, durch RNA oder DNA Injektionen in die Eier/Larven gezielt Gene zu überexprimieren und die folgende Veränderung der Embryonalentwicklung zu beobachten. Das gesamte Genom von *Xenopus laevis* wird zurzeit einer Sequenzanalyse unterzogen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Wie zahlreiche Untersuchungen an Mensch und Maus belegen, kommt der Familie der Rezeptorkinasen eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung von Rezeptor-regulierten Funktionen in adulten Tieren zu. Fehlfunktionen in der Regulation von Rezeptoren durch Rezeptorkinasen tragen zu pathophysiologischen Zuständen, wie Bluthochdruck, Rheumatoider Arthritis und Alzheimer Erkrankung bei. Über die Bedeutung von Rezeptorkinasen für die Regulation von Rezeptorfunktionen in der Embryonalentwicklung ist wenig bekannt [91] und es liegen nur wenige Informationen über die Funktion von GRKs in Nicht-Säugetieren vor. Bei *Xenopus laevis* handelt es sich um einen bekannten Modellorganismus, der es ermöglicht, die Bedeutung spezifischer Genprodukte in der

Embryonalentwicklung zu untersuchen. Ziel der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen war es daher, (i) GRK-ähnliche Sequenzen, insbesondere von Mitgliedern der GRK4-Familie aus der cDNA von *Xenopus laevis* zu isolieren und mit bekannten Säugetiersequenzen zu vergleichen, (ii) das Expressionsmuster der GRK-ähnlichen mRNAs in Geweben von adulten Tieren und in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* zu untersuchen und (iii) die von diesen cDNAs kodierten Proteine zu exprimieren und ihre Eigenschaften mit murinen GRKs vergleichend zu analysieren.

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
Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
Bacto Yeast Extract	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva - Bioproducts, Heidelberg
BSA Fraktion V	Boehringer, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva - Bioproducts, Heidelberg
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
E. coli RNA	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
EDTA, Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Fungizone®	Life Technologies GmbH, Eggenstein
GDP, Dinatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Gentamicin	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Glycerin	Roth, Karlsruhe

Glycin	Roth, Karlsruhe
Grace's Insect Medium	Biowhittaker Bioproducts, Heidelberg
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hank's *balanced salt solution*	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Sigma, Deisenhofen
HEPES (für Zellkultur)	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Insect Xpress	Biowhittaker - Bioproducts, Heidelberg
IPTG	Boehringer, Mannheim
Kupfersulfatlösung, 4 %	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Serva - Bioproducts, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Natriumdesoxycholat	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Natriumthiosulfat-pentahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PCR-Mineralöl	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Penicillin	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Pepstatin A	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Phenol	Sigma, Deisenhofen
Pierce SuperSignal® Substrat	KMF, St. Augustin
Pluronic F-68®	Life Technologies GmbH, Eggenstein
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Polymax RT Entwickler/Fixierer	Sigma, Deisenhofen
Pyronin Y	Sigma, Deisenhofen
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Streptomycin	Life Technologies GmbH, Eggenstein
TEMED	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Thimerosal	Sigma, Deisenhofen

TNM-FH-Insect Medium	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
TRIzol®	Life Technologies GmbH, Eggenstein
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

[α-^{32}P]dATP	(111 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[α-^{32}P]dCTP	(111 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[α-^{32}P]dGTP	(111 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[α-^{32}P]dTTP	(111 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[γ-^{32}P]ATP	(185 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[γ-^{35}S]GTP[S]	(46 TBq/mmol)	Du Pont NEN, Köln

2.1.3 Enzyme, Kits und Nukleinsäuren

ABI PRISM™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
BaculoGold™ Baculovirus DNA	Pharmingen, Hamburg
Biosizer III, IV	AGS, Heidelberg
Desoxynukleosidtriphosphat-Set	Boehringer, Mannheim
DIG-Kit für RNA-Polymerasen	Boehringer, Mannheim
DNase I	Life Technologies GmbH, Eggenstein

Klenow Enzym	Boehringer, Mannheim
Nucleobond™ AX PC-Kit-100	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin™-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Proteinase K	Merck, Darmstadt
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Boehringer, Mannheim
Ready-to-go™ T4-DNA-Ligase	Amersham Pharmacia, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	AGS, Heidelberg
RNase A	Boehringer, Mannheim
RNase T1	Boehringer, Mannheim
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
SP6/T7-Transkriptionskit	Boehringer, Mannheim
SuperScript™ cDNA-Synthese-Kit	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Taq-DNA-Polymerase	Sigma, Deisenhofen
Torula-RNA	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Blotpapier GB002	Schleicher & Schuell, Dassel
Kodak X-OMAT™ AR X-ray film	Sigma, Deisenhofen
Nitrozellulosemembranfilter (0.45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonmembran Biodyne B	Pall, Portsmouth, GB
Protran Nitrozellulose	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen, 75 cm^2 und 150 cm^2	Renner, Dannstadt
Zellkulturschalen, ∅ 100 mm	Renner, Dannstadt

2.1.5 Säulen und Gele für die Chromatographie

HiTrap™ SP-Sepharose-Säule, 1 ml/5 ml	Amersham Pharmacia, Freiburg
RESOURCE™ S, 1 ml	Amersham Pharmacia, Freiburg
Sephadex G-50	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.1.6 Pro- und eukaryontische Zellstämme

Escherichia coli DH5α	Clontech/ITC Biotechnology, Heidelberg
Escherichia coli XL1-Blue MRF´	Stratagene, Heidelberg
Spodoptera frugiperda (*Sf*9)-Zellen	Invitrogen, Heidelberg
Trichoplusia ni HighFive™ (H5)-Zellen	Invitrogen, Heidelberg

2.1.7 Plasmide

pBluescript™ II SK(-)	Stratagene, Heidelberg
pBK-CMV	Stratagene, Heidelberg, RZPD, Berlin
pCR2.1	Invitrogen, Leek, NL
pVL1393	Invitrogen, Leek, NL

2.1.8 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden in der Sektion Polymere der Universität Ulm und von der Firma Interaktiva, Ulm hergestellt.

2.1.8.1 Vektor-spezifische Oligonukleotide

pBluescript-*reverse*:	5´-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG T-3´
pBluescript-*universal*:	5´-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3´
pVL-*sense*:	5´-CTG TTT TCG TAA CAG T-3´
pVL-*antisense*:	5´-TGA GTT TTT GGT TCT TGC CG-3´
T3-*primer*:	5´-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3´
T7-*primer*:	5´-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA-3´
Sp6-*primer:*	5´-TTG ATT TAG GTG ACA CTA TA-3´

Die Oligonukleotid-*primer* für pBluescript wurden von der Firma Amersham Pharmacia, Freiburg bezogen.

2.1.8.2 xGRK4-spezifische Oligonukleotide

Seq1	5´-AGG CTG CCG CAC ATC AGC CA-3´

Seq2	5′-AAG GAC ATT AAT GTT TAT G-3′
Seq3	5′-TTC TGG ACA TTG AGC AGT T-3′
Seq4	5′-GAA ATG GAA GGA AAT GCT A-3′
Seq5	5′-CCA ATG TGA AGA ACT TCG A-3′
Seq6	5′-AAC TGC TCA ATG TCC AGA A-3′
Seq7	5′-CAT AAA CAT TAA TGT CCT T-3′
RTxGRK4-1	5′-TA AAG GAC ATT AAT GTT TAT GAG-3′
RTxGRK4-2	5′-ATA GAT ACA ATA AAA TAT TTG CAG T-3

2.1.8.3 xGRK5-spezifische Oligonukleotide

Seq1	5′-GTG ACC TCA AGT TCC ATA T-3′
Seq2	5′-CAG GAG TCC TAT TCT GCT A-3′
Seq3	5′-AAT GTG TGT ATA CAT ATA T-3′
Seq4	5′-GAC TAT CCA AGC TTG TGT GA-3′
Seq5	5′-TGC CTA ATA CCC TGT ACT G-3′
Seq6	5′-TCA ATG GCT CTG AAT GAG AA-3′
Seq7	5′-ACA ATG CTG ACA TAG CCA TTA-3′
Seq8	5′-AAA ACG AAA AGG GAG AAG CAA-3′
Seq9	5′-GGT GGC TTT GGG GAG GTG TG-3′
RTxGRK5-1	5′-AAG GAC CTC AAC ATC TTT GGA C -3′
RTxGRK5-2	5′-TAT CAC TGG TAA GGC TCA TGT TA-3′

2.1.8.4 xGRK6-spezifische Oligonukleotide

Seq1	5′-CAT AGT CTC TGT GAC CGA CA-3′
Seq2	5′-ACA TTT ATG GTT TCA ATG-3′
Seq3	5′-CTT TCC GAC AGT ACA GAG T-3′
Seq4	5′-GCA TTG AAA CCA TAA ATG T-3′
Seq5	5′-TAC ATA TTC CAG AAG ATC A-3′
Seq6	5′-TAG CAA CTG GGC AGT GCT-3′
Seq7	5′-CCT TTA AGC CTG ATC CTC A-3′
Seq8	5′-TCT CTG AAG CAT TTC ACA T-3′
RTxGRK6-1	5′-CTT TTG GGA TCT TAA GCG CAC TAC-3′

RTxGRK6-2 5′-GAG GAG TTA AGG ATT CAG TAG TAA-3′

2.1.8.5 Histon-spezifische Oligonukleotide

Histon A 5′-CGGGATAACATTCAGGGTATCACT-3′

Histon B 5′-ATCCATGGCGGTAACTGTCTTCCT-3′

2.1.9 cDNA-Genbanken

Xenopus laevis spleen cDNA (XNSP1 cDNA) RZPD, Berlin

Xenopus laevis tadpole Stage 24 (Xtad cDNA) RZPD, Berlin

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, *E. coli*	116
Phosphorylase b, Kaninchenmuskel	97,4
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	29

Der *low molecular weight marker* (LMW) wurde von der Firma Amersham Pharmacia, Freiburg bezogen.

Protein	Molekulargewicht (kD)
Phosphorylase b, Kaninchenmuskel	94
Rinderserumalbumin	67
Ovalbumin	43

Carboanhydrase, Rindererythrozyten	30
Trypsin Inhibitor, Sojabohne	20,1
α-Lactalbumin, Rindermilch	14,4
Aprotinin	6,5

2.1.11 Antikörper

Primäre Antikörper gegen:

Anti-GRK6 (mouse) (Anti-Pep2)	Polyklonal Kaninchen-IgG	B. Moepps

Sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper:

Anti-Kaninchen-IgG	Ziegen-IgG	Sigma, Deisenhofen

2.1.12 Spezielle Geräte

ABI 310 PRISM™ Genetic Analyzer	Perkin-Elmer, Weiterstadt
ÄKTA™ *explorer* 100	Amersham Pharmacia, Freiburg
Binokkular SZH 10	Olympus, Hamburg
CCD Kamera Olympus DP 10	Olympus, Hamburg
Concentrator 5301 (*speed vac*)	Eppendorf, Hamburg
Easy Breeze Air Gel Dryer, Hoefer	Amersham Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer groß (SDS-PAGE)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer klein (SDS-PAGE)	Sigma, Deisenhofen
Horizontalgelkammer	MBT-Brand, Heidelberg
IMAC-CCD S30 Kamera	Compuloc, Böblingen
Immunoblot Transferkammer	Renner GmbH, Darmstadt
Immunoblot Transferkammer Hoefer™ miniVE	Amersham Pharmacia, Freiburg
IMT-2-Mikroskop	Olympus, Hamburg
J2-HS Zentrifuge	Beckman Instruments, München
Milli-Q^{UF}_{PLUS}	Millipore, Eschborn
Minifuge GL	Heraeus Christ, Osterode
Optima™ TLX Ultrazentrifuge	Beckman Instruments, München
REFLEX III (MALDI-TOF-MS)	Bruker-Daltonics, Bremen
Rotixa-Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen

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
Ultra Turrax	Janke & Kunkel, Staufen i. Breisgau
UV-Stratalinker™ 1800	Stratagene, Heidelberg
Videodokumentationsystem CF8/1 DX	Kappa Meßtechnik GmbH, Gleichen

2.1.13 Software

GraphPad Prism®	Version 3.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA.
Micrografx Designer 9.0	Micrografx Inc. 1990-2001, München.
OMIGA 2.0	Oxford Molecular Ltd., 1996-1999, Rainbow Technologies
TreeView 1.6.1	Freeware: *http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html*
Wisconsin Package V. 9.1	Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc., USA.
Geneious 5.1	Biomatters Ltd.: http://www.geneious.com

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung von Luria-Bertani (LB)-Medium

Die *E. coli*-Stämme DH5α und XL1-Blue MRF´ wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert. Das LB-Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert und bei Raumtemperatur gelagert. Die Selektion der Bakterien erfolgte durch Zugabe von z.B. Ampicillin oder Kanamycin zum Medium (50 µg/ml). Der LB-Agar wurde 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 ddH_2O, durch einen Zelluloseacetatfilter (0,22 µm Porenweite) sterilfiltriert

Kanamycinlösung: 50 mg/ml in ddH_2O, durch einen Zelluloseacetatfilter (0,22 µm Porenweite) sterilfiltriert

2.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Eine Einzelkolonie der Bakterienstämme *E. coli* DH5α wurde von der Agarplatte mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 2,5 ml LB-Medium überführt. Nach Inkubation über Nacht auf dem Bakterienschüttler bei Standardbedingungen (37 °C und 200 Upm), wurden mit dieser Vorkultur weitere 100 ml LB-Medium angeimpft und diese Bakterienkultur unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm (OD_{600}) weiterinkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (2000 *g*, 10 min, Raumtemperatur), in 40 ml eiskaltem $CaCl_2$ resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2000 *g*, 10 min, Raumtemperatur) wurden die Bakterien in 2,5 ml eiskaltem 100 M $CaCl_2$-Puffer resuspendiert und mit 550 µl sterilem, kaltem Glycerin (86%ig) 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 (100 µl) kompetenter DH5α-Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, mit einem Ligationsansatz (s. 2.2.2.10) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock bei 42 °C für 30 s führte zur Aufnahme der zur Transformation zugesetzten Plasmid-DNA. Die Bakterien wurden danach 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium, in dem 10 mM $MgSO_4$ und 0,2 % (m/V) Glukose enthalten waren, wurden die Bakterien schließlich für 60 min unter Standardbedingungen inkubiert. Ein Aliquot dieser Bakterienkultur wurde mit einem Drigalski-Spatel auf zuvor getrocknete LB-Platten (LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt) ausplattiert.

SOC-Medium: 2% (m/V) Bactotrypton, 0,5% (m/V) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 0,2 % (m/V) Glucose.

2.2.1.4 Selektion von transformierten Bakterien

Die Selektion von Bakterien, welche die rekombinante Plasmid-DNA aufgenommen hatten, erfolgte in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums (v.a. Ampicillin oder Kanamycin). Bei Bakterien, die mit pBluescript-Vektoren oder mit dem Vektor pCR2.1 (Original TA Cloning® Kit, Invitrogen) transformiert worden waren, konnte zusätzlich eine blau/weiß-Selektionierung mit Hilfe der Substanzen IPTG und X-Gal durchgeführt werden. Blaue Bakterienkolonien enthielten Plasmide ohne rekombinante DNA und konnten eine funktionsfähige β-Galaktosidase herstellen. Nach Stimulation 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 eine Inaktivierung des β-Galaktosidase-Gens (LacZ), es konnte keine β-Galaktosidase hergestellt werden und die Kolonien blieben milchig-weiß. Ein Aliquot (200 µl) des Transformationsansatzes wurde auf mit dem entsprechenenden Antibiotikum versehenen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Falle der blau/weiß-Selektion wurden dem Aliquot vor dem Ausplattieren je 10 µl IPTG- und X-Gal-Lösung hinzugefügt.

IPTG-Lösung: 0,1 M in ddH_2O

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* DH5α wurden für die Präparationen von Plasmid-DNA aus 2,5 ml-Kulturen (Minipräpatation) Nukleospin-Kits und für die Präparationen von Plasmid-DNA aus 50 ml-Kulturen (Midipräparation) Nukleobond AX 100 Kits nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Bakterien waren vorher über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 Upm) in LB-Medium, welches mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt worden war, kultiviert worden. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

2.2.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Zur Entfernung von Proteinen, die bei der Extraktion von Nukleinsäuren aus Zellen, aber auch bei der Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen anfielen, wurden die wässrigen Nukleinsäurelösungen mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und nach dem Durchmischen für 5 min mit 12500 *g* bei RT zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt, um das restliche Phenol zu entfernen und wie oben zentrifugiert. Die Nukleinsäuren konnten aus dem Überstand durch Zugabe von 2,5 Volumen 100 % Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung pH 5,0 und einer Inkubation von mindestens 30 min bei -20 °C ausgefällt werden. Die Fällung von Nukleinsäuren aus größeren Volumina erfolgte durch den Zusatz von 0,7 Volumen Isopropanol und einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation des Fällungsansatzes für 10 min mit 12500 *g* bei Raumtemperatur wurde das Pellet mit 70%igem (V/V) Ethanol gewaschen und wie oben zentrifugiert. Das hierbei entstehende Pellet wurde anschließend entweder im Heizblock (37 °C), im Exsikkator oder in einem Vakuumkonzentrator (*speed vac*) getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH_2O aufgenommen.

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA entsprechend ihres Molekulargewichts in Agarosegelen erfolgte in einer Horizontalgelapparatur. Die Konzentration der Agarose richtete sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente.

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

nach Sambrook *et al.* [111]

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

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

Ethidiumbromidlösung: 10 mg Ethidiumbromid in 1 ml ddH_2O, dunkel gelagert

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

2.2.2.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurde die gewünschte DNA-Bande auf dem Transilluminator unter UV-Beleuchtung mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein vorgewogenes Eppendorf-Gefäß überführt. Durch erneutes Wiegen konnte durch Berechnen der Differenz das Gewicht des Gelstückes ermittelt werden. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben.

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
	0,3 µl	Restriktionsendonukleasen (10 U/µl)
	1,5 µl	10 x Restriktionspuffer
	ad 15 µl mit ddH_2O	

Der Restriktionsansatz wurde bei der empfohlenen Temperatur für mindestens 1 h inkubiert und anschließend mit 5 µl 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und im Vergleich mit einem bekannten Marker (Marker III [Lambda DNA/EcoRI + HindIII]) gelelektrophoretisch getrennt. Die Spaltungsprodukte wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen unter UV-Beleuchtung analysiert.

2.2.2.7 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um bei der Ligation (s. 2.2.2.9) eine Rezirkularisierung zu verhindern, wurden die Vektoren nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) an den 5´-Enden dephosphoryliert.

CIP-Ansatz:	2-3 µg	linearisierter Vektor
	6 µl	50 mM Tris/HCl, pH 7,5
	1 µl	CIP (1 U/µl)
	ad 60 µl mit ddH_2O	

Nach der Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde die CIP für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde der Ansatz 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 (s. 2.2.2.10) eingesetzt. Nach der

Transformation und dem Ausstreichen der Bakterien auf mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB-Platten gibt die Zahl 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 glattem Ende (*blunt end*), so dass eine Ligation zwischen zwei DNA-Strängen, die mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden, möglich ist.

Auffüllansatz:	10 µl	DNA-Fragment (*ca.* 0,5 µg)
	2 µl	10 mM dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
	2 µl	10 x One-Phor-All Puffer
	1 µl	Klenow-Fragment (2 U/µl)
	ad 20 µl mit ddH_2O	

Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min 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 Modifizierung des Vektors pBluescript II SK(-) durch T-tailing

Für das T-*tailing* des Vektors pBluescript™ II SK(-) wurde eine nach Marchuk *et al.* [68] veränderte Methode durchgeführt. *Taq*-DNA-Polymerasen hängen bei der Polymerasekettenreaktion (s. 2.2.2.13) an die 3′-OH-Enden der amplifizierten DNA-Fragmente jeweils ein einzelnes Nukleotid, meist ein Adenosin, an. Diese Eigenschaft wird beim T-*tailing* eines Vektors ausgenutzt. Dabei wird an die 3′-OH-Enden des mit *Eco*RV gerade geschnittenen Vektors durch Inkubation mit *Taq*-DNA-Polymerase und dTTP ein einzelnes Thymidin angehängt. Die A-T-Basenpaarung zwischen dem PCR-Fragment und dem Vektor erleichtert die Ligation und verhindert gleichzeitig eine Religation des Vektors. Zehn µg pBluescript™ II SK(-)-Plasmid-DNA wurden mit 40 U *Eco*RV für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die vollständige Linearisierung des Vektors wurde durch die

elektrophoretische Auftrennung eines Aliquots des RE-Ansatzes in einem 1 % (m/V) Agarosegel überprüft. Nach 10 min Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen bei 65 °C wurde der Ansatz phenolisiert und anschließend das linearisierte Plasmid mit Ethanol ausgefällt. Das T-*tailing* erfolgte durch Inkubation des linearisierten Plasmids mit *Taq*-DNA-Polymerase (1 U/µg DNA) und 2 mM dTTP für 2 h bei 70 °C. Nach erneuter Phenolisierung und Fällung des T-*tailed*-Vektors wurde dieser in ddH_2O gelöst und ein Aliquot zur DNA-Mengenabschätzung in einem 1 % (m/V) Agarosegel zusammen mit einem DNA-Größenstandard bekannter Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle des T-*tailing* wurde ein Aliquot des T-*tailed*-Vektors in einen Ligationsansatz eingesetzt. Nach der Transformation und dem Ausstreichen der Bakterien auf LB^{Amp+}-Platten gibt die Zahl der Bakterienkolonien Aufschluss über die Qualität des Vektors.

2.2.2.10 Ligation

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide, die dann in kompetente Bakterien eingeschleust werden konnten, wurde das gewünschte DNA-Fragment (*insert*) und der Plasmidvektor mit Hilfe einer Ligase über Phosphordiesterbindungen verknüpft.

Standard-Ligationsansatz:	1,5 µl	10 x Ligationspuffer
	1 µl	Vektor (*ca.* 20 ng)
	5 µl	DNA-Fragment (*ca.* 100 ng)
	1,5 µl	T4-Ligase (1 U/µl)
	ad 15 µl mit ddH_2O	

2.2.2.11 Gesamt-RNA-Extraktion mit TRIzol®

Ribonukleinsäuren wurden im Verlauf dieser Arbeit aus verschiedenen Geweben und Stadien von *Xenopus laevis* isoliert. Aufgrund der Kontaminationsgefahr durch RNasen wurde grundsätzlich mit Einmalhandschuhen, Einweggefäßen, RNase-freiem Wasser und eigens für RNA-Arbeiten verwendeten Chemikalien und Apparaturen gearbeitet.

Mit dem TRIzol®-Reagenz (Life Technologies) konnten parallel aus mehreren Geweben kleinere Mengen Gesamt-RNA isoliert werden (*ca.* 100 bis 300 µg). Das TRIzol®-Reagenz

ermöglicht einen Zellaufschluss mit gleichzeitiger potenter RNase-Inhibition und besteht aus einer kombinierten Lösung aus Phenol und Guanidinoisothiocyanat. Je nach Gewebetyp wurden 50-100 mg Froschgewebe mit 1 ml TRIzol®-Reagenz versetzt und mit Hilfe des Ultra-Turrax (Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau) für 30 s homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert, um Nukleoproteinkomplexe vollständig zu dissoziieren. Anschließend wurde pro 1 ml TRIzol®-Reagenz 0,2 ml Chloroform zugegeben, 15 s per Hand gemischt und 2-3 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde 15 min mit 12000 *g* bei RT zentrifugiert, wobei eine untere, rötlich gefärbte Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere, farblose, wässrige Phase erhalten wurde. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die darin enthaltene RNA durch Isopropanolzugabe (0,5 ml Isopropanol/ml TRIzol®-Reagenz) ausgefällt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die RNA pelletiert (10 min mit 12000 *g* bei RT), das Pellet mit 70 % (V/V) Ethanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und je nach Größe in 50-100 µl ddH_2O gelöst und bei -20 °C gelagert. Auf einem 1 % (m/V) Agarosegel wurde ein Aliquot der erhaltenen Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt, um eine mögliche Kontamination durch RNasen zu erkennen.

2.2.2.12 cDNA-Synthese

Nach der Anbindung von *antisense*-Oligo(dT)-Nukleotiden an Gesamt- oder mRNA konnten mit Hilfe der reversen Transkriptase komplementäre einzelsträngige cDNA-Stränge synthetisiert werden. Die Herstellung der cDNA erfolgte mit dem SuperScript™ cDNA-Synthese-Kit (Life Technologies) nach Herstellerangaben. Um eine eventuelle Kontamination der cDNA mit genomischer DNA zu vermeiden, wurden zunächst 2 µg Gesamt-RNA oder 0,5 µg poly(A)$^+$-RNA mit DNase I (Life Technologies) behandelt.

DNase I-Behandlung:	1 µl	10 x DNAse I-Puffer
	2 µl	RNA
	1 µl	DNase I (*amplification grade*, 1 U/µl)
	ad 10 µl mit ddH_2O	

Nach mindestens 1 h Inkubation bei RT wurde 1 µl 25 mM EDTA zugesetzt und das Enzym für 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurden 1 µl (0,5 µg/µl)

Oligo(dT)$_{12-18}$-Nukleotide und 3 µl ddH_2O zugesetzt. Durch eine Inkubation für 10 min bei 70 °C konnten Sekundärstrukturen der einzelsträngigen RNA-Moleküle aufgelöst werden, da diese die Oligonukleotidanbindung (*annealing*) behindern würden. Danach wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert, um die Oligo(dT)$_{12-18}$-Nukleotide an die poly(A)-Enden der mRNAs zu binden. Auf Eis wurden nun die für die eigentliche cDNA-Synthese benötigten Substanzen zugegeben.

Ansatz cDNA-Synthese:	15 µl	*annealing*-Ansatz
	2,5 µl	10 x PCR-Puffer
	2,5 µl	100 mM DTT
	1 µl	10 mM dNTP-Mix
	3 µl	25 mM $MgCl_2$

Nach 5 min Präinkubation bei 42 °C wurde 1 µl (200 U) reverse Transkriptase (SUPERSCRIPT II RT) hinzupipettiert und der Ansatz für 50 min bei 42 °C inkubiert. Nach 15 min Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die RNA durch Zusatz von 1 µl *E. coli* RNase H (2 U/µl) für 10 min bei 55 °C abgebaut. Die Qualität der cDNA wurde durch eine Standard-PCR mit Aktin-spezifischen Oligonukleotiden kontrolliert. Die Aktin-mRNA wird konstitutiv in allen Zellen exprimiert.

2.2.2.13 Polymerasekettenreaktion

Mit der *polymerase chain reaction* (PCR) kann enzymatisch *in vitro* ein bestimmter DNA- oder cDNA-Bereich mit Hilfe zweier Oligonukleotide (Primer) vervielfältigt werden, die den zu amplifizierenden Bereich in 5′→3′-Richtung begrenzen. Das Grundprinzip basiert auf sich wiederholenden Zyklen der DNA-Doppelstrangdenaturierung (*denaturation*), der Anbindung beider Oligonukleotide an ihre jeweilige Matrize (*annealing*) und der Verlängerung der Komplementärstränge an der entsprechenden Matrize (Primer *extension*) durch eine thermostabile DNA-Polymerase entweder aus dem thermophilen Archaebakterium *Thermus aquaticus* [77, 107] oder anderen thermophilen Bakterien. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die PCR-Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus cDNA und genomischer DNA sowie für die automatisierte, nichtradioaktive DNA-Sequenzanalyse (cycle sequencing) angewendet. PCR-Experimente mit einzelsträngiger cDNA als Matrize werden als RT-PCR *(Reverse transkriptase*-PCR) bezeichnet. Alle PCR-Versuche wurden in einem *thermocycler* (PTC-200, MJ-Research) durchgeführt.

2.2.2.13.1 Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von etwa 300 bis 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_2O	

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 bei 94°C hinzupipettiert (*hot start*). Die *annealing*-Temperatur lässt sich anhand der Oligonukleotid-Sequenzen berechnen: Jedem A- und T-Nukleotid entsprechen 2 °C, jedem G- und C-Nukleotid 4 °C [80].

PCR-Standardprogramm:

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

Vor dem Zyklusprogramm wurden alle Matrizenstränge vollständig denaturiert (Start); die Schlußextension (Ende) diente dazu, unvollständig synthetisierte Stränge aufzufüllen. Nach Beendigung der PCR wurde ein 10 µl-Aliquot des PCR-Ansatzes auf ein 1 % (m/V) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Beleuchtung analysiert.

2.2.2.13.2 Long range-PCR

Zur Amplifikation langer Fragmente wurden *long range*-PCR-Experimente mit dem Enzym TaKaRa LA *Taq*™ Polymerase (Bioproducts, Heidelberg) durchgeführt. Die in diesem Kit vorhandene Enzymkombination besitzt im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase *proof reading*-(d. h. 3′→5′-Exonuklease-) Aktivität, die die Fehleinbaurate von Nukleotiden in die neusynthetisierten Stränge reduziert.

Long range-PCR-Ansatz:

5 µl	10 x LA PCR-Puffer II (Mg^{2+}-frei)
1 µl	10 µM Oligonukleotid 1
1 µl	10 µM Oligonukleotid 2
8 µl	dNTP-Mix (je 2.5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
x µl	Matrizen-DNA (1 µg genomische DNA)
0,5 µl	TaKaRa LA *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl mit	ddH_2O

Long range-PCR-Programm:

	Denaturierung	*Annealing*	Extension
Start	94 °C, 3 min		
Zyklen 1-35	94 °C, 30 s	x °C, 1 min	72 °C, 15 min
Ende			72 °C, 10 min; dann 4 °C

Alle folgenden Schritte wurden analog 2.2.2.13.1 zu durchgeführt.

2.2.2.13.3 Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit zur Analyse der mRNA-Expression verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptorkinasen in Geweben und Stadien von *Xenopus laevis* eingesetzt. Der RT-PCR-Ansatz entsprach dem Ansatz der Standard PCR (s. 2.2.2.13.1). Die amplifizierten Fragmente besaßen eine Länge von 200-500 Basenpaaren.

RT-PCR-Programm:

	Denaturierung	*annealing*	Extension
Start	94 °C, 3 min		
Zyklen 1-28	94 °C, 30 sec	x °C, 1 min	72 °C, 2 min
Ende			72 °C, 10 min; dann 4 °C

Alle folgenden Schritte wurden analog zu der unter 2.2.2.13.1 beschriebenen Methode durchgeführt.

2.2.2.14 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* [113] durchgeführt. Die rekombinante DNA eines Plasmids kann je nach Bedarf von beiden Seiten der *multiple cloning site* mit zwei vektorspezifischen Oligonukleotiden ansequenziert werden, das eine Oligonukleotid bindet komplementär zum *sense*-Strang, das andere zum *antisense*-Strang des Vektors. Ausgehend von den damit erhaltenen Sequenzen der 5´- und 3´-Regionen der rekombinanten DNA können *insert*-spezifische Primer synthetisiert werden, mit deren Hilfe Sequenzen weiter stromabwärts (*downstream*) vom Startkodon bzw. stromaufwärts (*upstream*) vom Stopkodon ermittelt werden können. Diese als Primer-*walking* bezeichnete Methode wurde zur Analyse der genomischen Sequenz angewandt. Pro Sequenzieransatz wird ein Oligonukleotid eingesetzt, damit eine unidirektionale Strangsynthese mit einem definierten Startpunkt erfolgen kann. Vom 3´-OH-Ende des gebundenen Oligonukleotids aus beginnend wird ein zur Matrize komplementärer Strang unter Verwendung der vier 2´-Desoxynukleotide (dNTPs) synthetisiert. Parallel dazu erfolgt der Einbau von 2´-, 3´-Didesoxynukleotiden (ddNTPs) und damit der rein statistische Strangabbruch, da bei den ddNTPs die für die Elongation nötige 3´-OH-Gruppe fehlt. Somit entstehen unterschiedlich lange radioaktiv- oder fluoreszenzfarbstoffmarkierte DNA-Stücke, die in einem Harnstoff/Polyacrylamidgel aufgetrennt, per Autoradiographie sichtbar gemacht und Base für Base abgelesen bzw. auf einem automatischen Sequenzer analysiert werden können.

2.2.2.14.1 Radioaktiv markierte DNA-Sequenzierung

Alle radioaktiv markierten Sequenzierreaktionen wurden mit dem Sequenase® Version 2.0 Sequencing Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA wurde unter alkalischen Bedingungen denaturiert. Dazu wurden in einem 20 µl Ansatz 7 µl (1-2 µg) doppelsträngige DNA mit 4 µl 2 M NaOH versetzt, gut gemischt, und nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden zur Fällung der DNA 6 µl 3 M Natriumacetat pH 5,0, 14 µl ddH_2O und 250 µl 100 % Ethanol zugegeben. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20 °C. Das gewaschene und getrocknete DNA-Pellet wurde für die *annealing*-Reaktion in 6 µl ddH_2O, 2 µl *annealing*-Puffer und 2 µl Sequenzier-Primer (1 pmol/µl) aufgenommen, 3 min bei 94 °C inkubiert und sofort auf Eis überführt.

Labeling-Reaktion:	10 µl	DNA-Primer-Mix
	1 µl	100 mM DTT
	2 µl	*labeling*-Mix (1:5 Verdünnung in ddH_2O)
	0,5 µl	[α-^{35}S]dATP (*ca.* 37 TBq/mmol)
	2 µl	Sequenase Enzym (1,5 U/µl)

Die Reaktion wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert; dabei wurde radioaktiv markiertes dATP in die neu synthetisierten Stränge eingebaut.

Sequenzierreaktion:
In vier vorbereitete Eppendorf-Gefäße wurden je 2,5 µl eines der vier ddNTPs vorgelegt. Dazu wurden jeweils 3,5 µl des *labeling*-Ansatzes pipettiert und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Sequenzierreaktion wurde durch Zugabe von je 4,5 µl Stoplösung beendet.

Auftrennung der DNA-Nukleotide auf Polyacrylamidgelen

Es wurden 6 % (m/V) Polyacrylamidgele verwendet, die mit der LongRanger™-Gellösung (Biozym, Oldendorf) hergestellt wurden. Die Glasplatten (20 x 60 cm) und Abstandhalter (0,35 mm Dicke) wurden gründlich mit 96 % Ethanol entfettet. Die Antihaft-Platte wurde mit 5 ml *repel-silane*, die Haft-Platte mit 5 ml *bind-silane*-Lösung bestrichen. Nach 15 min wurden die Glasplatten nochmals mit 96 % Ethanol abgewischt und, durch die Abstandhalter getrennt, zusammengeklammert.

Gellösung:	29,4 g	Harnstoff (bei 50 °C in 50 ml ddH_2O gelöst)
	4,2 ml	10x TBE
	8,4 ml	LongRanger™-Gellösung
	ad 70 ml mit ddH_2O	

Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde die Gellösung für 5 min entgast. Durch Zugabe von 35 µl TEMED und 350 µl 10 % (m/V) APS wurde die Polymerisation des Gels gestartet.

Die Gellösung wurde zwischen die Platten gegossen und der Haifischzahnkamm mit der glatten Seite in die flüssige Gellösung gesteckt und mit zwei Klammern fixiert. Nach Polymerisation des Gels wurde der Kamm umgedreht und mit den Haifischzähnen in das Gel gesteckt. Nach einem Vorlauf des Gels von 30 min bei 40 W mit 0.6 x TBE-Puffer wurden je 4 µl der für 5 min bei 94 °C denaturierten Sequenzierreaktionsansätze aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 0,6 x TBE-Puffer bei 40 W/2500 V durchgeführt. Je nach benötigter Leseweite wurde der Lauf gestoppt, wobei Farbstoffe als Größenstandard dienten. In einem 6 % (m/V) Polyacrylamidgel migrieren Bromphenolblau und Xylencyanol bei 20 bp bzw. 138 bp. Zur Entfernung des Harnstoffs wurde das auf der Gelplatte haftende Gel für 15 min in 10 % Essigsäure fixiert und danach für 15 min in 15 % Methanol entwässert. Anschließend wurde das Gel für 2 h bei 80 °C getrocknet und ein Röntgenfilm über Nacht exponiert.

10x TBE-Puffer:	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH 8.0
***bind-silane*-Lösung:**	5 ml 100 % Ethanol/10 % (V/V) Essigsäure (4 VT/1 VT), 30 µl *bind-silane*

2.2.2.14.2 Automatisierte, nichtradioaktive DNA-Sequenzanalyse

Dieses Sequenzierverfahren besteht aus einer Kombination von linearer (*single* Primer) PCR und der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* [113]. Die rekombinante DNA eines Plasmids kann je nach Bedarf von beiden Seiten der *multiple cloning site* mit zwei vektorspezifischen Oligonukleotiden ansequenziert werden, wobei das eine

Oligonukleotid komplementär zum *Sense*-Strang, das andere zum *Antisense*-Strang des Vektors bindet. Ausgehend von den damit erhaltenen Sequenzen der 5´ und 3´-Regionen der rekombinanten DNA können *Insert*-spezifische Oligonukleotide synthetisiert werden mit deren Hilfe Sequenzen weiter stromabwärts (*Downstream*) vom Startkodon bzw. stromaufwärts (*Upstream*) vom Stoppkodon ermittelt werden können. Diese als primer walking bezeichnete Methode wurde zur Analyse der genomischen Sequenz angewandt. Damit eine unidirektionale Strangsynthese mit einem definierten Startpunkt erfolgen kann, wird pro Sequenzieransatz ein Oligonukleotid eingesetzt. Vom 3´-OH-Ende des gebundenen Oligonukleotides aus beginnend wird ein zur Matrize komplementärer Strang unter Verwendung der vier 2´-Desoxynukleotide (dNTPs) synthetisiert. Parallel dazu erfolgt der Einbau von fluoreszenzmarkierten 2´-, 3´-Didesoxynukleotiden (ddNTPs) und damit der rein statistische Strangabbruch, da bei den ddNTPs die für die Elongation nötige 3´-OH-Gruppe fehlt. Bei der *dye terminator*-Methode sind die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Somit entstehen unterschiedlich lange fluoreszenzfarbstoffmarkierte DNA-Stücke, die auf einem automatischen Sequenz-Analysegerät untersucht werden können.
Nach der Elongation der Oligonukleotide durch PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase (*cycle sequencing*) wurde die DNA gefällt, in Ladepuffer gelöst und nach der Denaturierung auf die Gelmatrix aufgetragen. Durch Laserabtastung der mit Farbstoff markierten DNA-Fragmente während der Kapillargelelektrophorese im Sequenzer wurde die DNA-Sequenz ermittelt.

Standardansatz:	4 µl	Big*Dye™ Terminator Ready Reaction Mix*
	1 µl	dsDNA-Plasmid (200-400 ng)
	2,5 µl	Sequenzier-Primer (2 pmol/µl)
	ad 10 µl mit ddH_2O	

Cycle sequencing-Programm:

	Denaturierung	*Annealing*	Extension
Start	96 °C,		1 min
Zyklen 1-25	96 °C, 30 s	51 °C, 20 s	60 °C, 4 min
Ende			60 °C, 5 min; dann 4 °C

Nach Beendigung der PCR wurden 90 µl ddH_2O zugegeben, die DNA für 10 min bei 4 °C mit 2,5 Volumen 100 % Ethanol gefällt und für 20 min bei Raumtemperatur und 15800 *g* zentrifugiert. Das DNA-Pellet des Sequenzieransatzes wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in der *speed vac* getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 11 µl *Template Suppression Reagent* (ABI) gelöst, für 2 min bei 90 °C denaturiert, auf Eis inkubiert und in den Probenwechsler des Sequenzers gestellt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillargelelektrophorese (POP6 Rapid Polymer, ABI) mit 1 x *Genetic Analysis Buffer* (ABI) für 36 min bei 50 °C und 15 kV. Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Frau S. Gierschik durchgeführt.

2.2.2.15 Nachweis spezifischer Nukleinsäuren

Als Nachweis dient der Transfer von Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (nach Southern [118]). Nach elektrophoretischer Auftrennung der Nukleinsäuren in einem Agarose-Gel, wurden diese anschließend unter denaturierenden Bedingungen (0,4 M NaOH) durch Kapillarsog über Nacht auf eine Nylonmembran (Biodyne B) transferiert. Um später die Laufweiten der hybridisierenden Banden reproduzieren zu können, wurde das Agarosegel zuvor mit angelegtem Lineal unter UV-Licht fotographiert. Die denaturierenden Bedingungen während des Transfers sind notwendig, um mögliche interne komplementäre Sequenzbereiche an der Ausbildung rückgefalteter Bereiche zu hindern, da nur einzelsträngige Nukleinsäuren an Nylonmembranen haften. Durch Bestrahlung der Membranen mit UV-Licht (*cross-linking*) konnten die Nukleinsäuren auf der Membran fixiert und anschließend mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert werden.

2.2.2.15.1 Southern blotting

Bei einem *Southern blot* handelt es sich um den Transfer von DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+). Die DNA wurde nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend, wie oben beschrieben (s. 2.2.2.15), unter denaturierenden Bedingungen auf eine Nylonmembran fixiert.

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

2.2.2.15.2 PCR blot

PCR-Fragmente wurden mit einer dem *Southern blot*-analogen Technik an Nylonmembranen gebunden. Die PCR-Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend, wie oben beschrieben (s. 2.2.2.15), unter denaturierenden Bedingungen auf eine Nylonmembran fixiert.
Denaturierungslösung: 0,4 M NaOH

2.2.2.16 *In vitro*-Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung mit dem *Random Primed DNA Labeling Kit* (Boehringer Mannheim) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip der *random primed* DNA-Markierung nach Feinberg und Vogelstein [26] beruht auf der Hybridisierung einer Mischung von Hexanukleotiden beliebiger Sequenz an die Matrizen-DNA. Die Hexanukleotide dienen als Primer für das Klenow-Fragment, das in Anwesenheit aller vier dNTPs, von denen eines radioaktiv markiert ist ([α-^{32}P]dCTP), radioaktiv markierte Komplementärstränge synthetisiert. Zur Herstellung einer DNA-Sonde wurden 2 µg rekombinante Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten, um die einklonierte cDNA (*insert*) zu isolieren. Dieser RE-Ansatz wurde auf ein 1 % (m/V) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die rekombinante DNA wurde aus dem Gel mittels eines Skalpells unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten und aus dem Gelstück extrahiert (s. 2.2.2.5).

Standardansatz:	x µl	DNA-Matrize (50-100 ng)
	3 µl	0,5 mM dNTP-Mix (dATP, dGTP, dTTP)
	2 µl	10 x Hexanukleotid-Mix
	ad 20 µl mit ddH_2O	

Nach der DNA-Denaturierung für 5 min bei 100 °C wurde der Ansatz für 3 min auf Eis gestellt, mit 3 µl [α-^{32}P]dCTP (10 µCi/µl bzw. 3000 Ci/mmol) sowie 2 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) versetzt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die DNA-Synthese mit 5 µl Bpb-Lösung und 250 µl TE-Puffer gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide, Hexanukleotide und kurze DNA-Fragmente wurden durch Gelfiltration in einer Sephadex G-50-Säule mit 1 ml Säulenvolumen durch Zentrifugation für 90 s bei RT und 200 *g* abgetrennt. Aufgrund ihres großen Molekulargewichtes können die längeren DNA-Stränge nicht in die Poren der Gelmatrix eindringen und eluieren deshalb mit dem

Ausschlussvolumen der Säule. Das Eluat mit der radioaktiv markierten Sonde wurde 5 min bei 100 °C denaturiert und sofort in die Hybridisierungsröhre pipettiert, in der sich bereits 10 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung (s. 2.2.2.17) und der zu hybridisierende Filter befanden.

Bpb-Lösung: 5 mg Bromphenolblau in 10 ml 25 mM Tris/HCl (pH 7,5)

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0)

2.2.2.17 Hybridisierung

Die Hybridisierung von Nylonmembranen wurde mit geringfügigen Abwandlungen nach der von Church und Gilbert [16] beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurde die Membran zunächst für 2-5 h bei 65 °C im Schüttelbad in einer entsprechenden Menge Prähybridisierungslösung (2 ml/cm^2 Membran) prähybridisiert, um unspezifische Bindungen der markierten DNA-Sonde an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Membran in eine vorgewärmte Hybridisierungsröhre mit 10 ml Prähybridisierungslösung transferiert, die markierte DNA-Sonde (siehe 2.2.2.16) hinzu gegeben und im Rotationsofen (Biometra) über Nacht bei 60 °C hybridisiert. Am folgenden Tag wurde die Membran durch mehrere Waschschritte bei zunehmender Stringenz und Waschtemperatur unter Monitorkontrolle solange gewaschen, bis alle unspezifischen Bindungen der Sonde beseitigt waren. Die Waschlösungen bestanden aus 5 x und 2 x SSC mit jeweils 0,1 % (m/V) SDS, die Waschtemperatur betrug 64 °C. Die Spezifität, mit der die Sonde an die DNA bindet, nimmt mit steigender Temperatur und sinkender Na^+-Ionenkonzentration zu [111]. Die Identifizierung von Hybridisierungssignalen erfolgte unter Verwendung eines Phosphorimagers (Molecular Dynamics) oder über Röntgenfilme.

Hybridisierungslösung: 0,125 M NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 pH 7,2, 1 mM EDTA pH 8,0, 7 % (m/V) SDS, 1 % (m/V) BSA

20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0

2.2.2.18 Autoradiographie

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

Die Röntgenfilme wurden manuell wie folgt entwickelt:

2-3 min Polymax RT Entwickler-Lösung
Waschen mit H_2O
1-3 min Polymax RT Fixierlösung

Danach wurde der Film mit ddH_2O gewaschen und luftgetrocknet.

2.2.2.19 *Screening* von cDNA-Banken

Die Isolierung des *Xenopus*-Homologs der GRK 4 und 6 erfolgte aus einer Milz-cDNA-Genbank von adulten Tieren. Die Milz-cDNA-Genbank und die isolierten, positiven Klone wurden freundlicherweise vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung in Berlin zu Verfügung gestellt. Die Isolierung der cDNA der homologen G-Protein-gekoppelten-Rezeptorkinase 5 (GRK 5) des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* erfolgte aus einer cDNA-Genbank von *Xenopus* Kaulquappen im Tadpole-Stadium 24, die ebenfalls freundlicherweise vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung bereitgestellt wurde.

2.2.2.19.1 Screening von cDNA-Banken des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung (RZPD)

Die cDNA-Genbank von *Xenopus laevis,* hergestellt aus der Milz adulter Tiere, wurde nach den Angaben des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung behandelt. Die Hybridisierung, die anschließenden Waschschritte und die Exposition eines

Röntgenfilms auf der Membran wurden analog zu den Abschnitten 2.2.2.16 bis 2.2.2.18 durchgeführt. Den positiven Signalen auf dem Röntgenfilm wurden nach Angaben des RZPDs bestimmte Koordinaten zugeordnet, die anschließend mit einer Formel berechnet wurden. Mit Hilfe der Ergebnisse der Rechnung wurden die entsprechenden Bakterienklone beim RZPD bestellt. Aus den erhaltenen Bakterienkulturen wurde die Plasmid-DNA anschließend per Minipräparation isoliert.

2.2.3 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

2.2.3.1 Kultivierung von Insektenzellen

2.2.3.1.1 Medien

Für die Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* (*Sf*9)-Zellen wurden Medien verwendet, die von den Firmen Biowhittaker Bioproducts, Heidelberg und Sigma, Deisenhofen bezogen wurden; dem Medium musste teilweise noch FCS und Antibiotika zugesetzt werden.

Zellkulturmedium für adhärent-wachsende *Sf*9-Zellen

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

Medium für Zellen in Suspensionskultur

Grace's Insect Medium (enthält 10 % FCS und Gentamicin) für *Sf*9-Zellen
versetzt mit
- 2 ml Pluronic F-68® (10 % m/V) auf 100 ml Medium
- 1 ml Fungizone® (250 µg/ml) auf 100 ml Medium

2.2.3.1.2 Kultivierung von Insektenzellen

Die Kultivierung von adhärent-wachsenden *Spodoptera frugiperda* (*Sf*9)-Zellen erfolgte in 15 ml TNM-FH-Medium bei 27 °C in 75 cm^2-Kulturflaschen (Renner, Dannstadt). Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren (*ca.* 2 x 10^7 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 *Sf*9-Zellen das Medium abgesaugt, die Zellen mit frischem Medium abgelöst und in einen sterilen Fernbachkolben überführt. Die Zellzahl pro ml wurde durch Auszählen eines mit Trypanblau-Lösung (0,5 % in 0.85 %iger NaCl-Lösung) verdünnten Aliquots mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Sie betrug im günstigsten Fall 2 x 10^6 Zellen/ml (das entspricht 800 x 10^6 Zellen in 400 ml Medium), mindestens jedoch 0,5 x 10^6 und maximal 3,5 x 10^6 Zellen/ml. Die Zellen wurden bei Bedarf durch Zugabe von neuem Medium verdünnt. Der Fernbachkolben wurde bei 27 °C bei 80 Upm geschüttelt. Die Generationszeit der Zellen betrug unter diesen Umständen ungefähr 48 h.

2.2.4 Proteinexpression in Insektenzellen

Für die Expression von Proteinen in Insektenzellen wurde das Baculovirus-Expressionssystem (Pharmingen) verwendet. Dieses Expressionssystem ermöglicht unter Verwendung von rekombinanten Baculoviren die Expression und Modifikation von Proteinen die posttranslationellen Modifikationen unterliegen, wie Acylierungen, Phosphorylierungen und Methylierungen. Durch homologe Rekombination eines die spezifische cDNA-tragenden Baculovirus-Transfervektors mit der Baculovirus-DNA wird dazu ein rekombinantes Baculovirus generiert mit dem dann Insektenzellen infiziert werden können. Bei der Baculovirus-DNA handelt es sich um eine modifizierte Form der DNA des *Autographa californica nuclear polyhedrosis viruses* (AcNPV), die eine letale Deletion enthält. Durch homologe Rekombination mit einem entsprechenden Transfervektor (z.B. pVL1392 oder pVL1393) kann diese Deletion kompensiert werden. Die Baculovirus-Transfervektoren besitzen zudem einen starken Promotor für das viruseigene Polyhedringen, das in der modifizierten Baculovirus-DNA deletiert ist. Nach erfolgreicher Rekombination kontrolliert dieser, der einklonierten cDNA vorgeschaltete, Polyhedrinpromotor die Expression der rekombinanten Proteine.

2.2.4.1 Transfektion

Die Insektenzellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode nach Graham und van der Eb [37] transfiziert. Von frisch umgesetzten, zu 60 % konfluent gewachsenen Insektenzellen (*ca.* 4 x 10^6 Zellen pro 25 cm^2-Kulturflasche) wurde nach maximal 30 min

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

Transfektionspuffer: 25 mM HEPES/NaOH pH 7,1, 125 mM NaCl, 125 mM $CaCl_2$

2.2.4.2 Amplifikation der Baculoviren

Für die Amplifikation der Viren wurden 6,5 x 10^6 Zellen (das entspricht 60 % konfluenten Zellen) in eine 60 cm^2 Petrischale (Renner, Dannstadt) ausgesät. Nach dem Absetzten der Zellen (*ca*. 30 min) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Virusüberstand für 1 h bei 27 °C stehen gelassen. Anschließend wurden 10-13 ml Medium zugegeben und die Zellen für 3 Tage bei 27 °C inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, abgelöste Zellen abzentrifugiert (250 *g*) und der Überstand (Viruslösung) bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.4.3 Infektion von Insektenzellen

Die Infektion erfolgte analog zur Amplifikation. Die Virusmenge sowie die Dauer der Infektion für eine optimale Expression des rekombinanten Proteins wurden anhand der Proteinmenge auf SDS-Polyacrylamidgelen bestimmt. Gleiches galt für das Verhältnis der Virusmengen bei Koinfektionen. Das Volumen der eingesetzten Viruslösungen lag zwischen 0,4 und 1 ml pro Petrischale, die Infektion erfolgte für 2 Tage. Um größere Proteinmengen zu produzieren, wurden Suspensionskulturen von Insektenzellen infiziert.

Die Zellen (8-10 x 10^8) wurden mit 250 *g* für 5 min abzentrifugiert und in 20 ml Medium und 30 ml Virussuspension in einem 50 ml-Röhrchen resuspendiert. Nach Inkubation bei 27 °C für 1 h wurden die Zellen in einen sterilen Fernbachkolben überführt und mit 350 ml frischem Medium auf eine Zellzahl von 2 x 10^6 Zellen/ml verdünnt.

2.2.5 Proteinbiochemie

2.2.5.1 Proteinexpression der Kinase xGRK 6

2.2.5.1.1 Expression der xGRK6 in Insektenzellen

Mit den von der Kinase xGRK6 von Xenopus generierten rekombinaten Baculoviren wurden Sf9-Zellen infiziert und für zwei Tage inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen von den Kulturschalen oder -flaschen abgespült und in 15 bzw. 50 ml Röhrchen bei 250 *g* abzentrifugiert. Die nachfolgende Proteinpräparation der xGRK6 wurde im Wesentlichen nach Loudon und Benovic (1994) durchgeführt. Nach der Zentrifugation der Zellen einer 10 cm-Kulturschale, wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet auf Eis überführt und mit 200 µl HE-Puffer, der 250 mM NaCl enthielt, versetzt (bei 150 cm^2 Kulturflasche entsprechend 400 µl Puffer). Die Zellen wurden resuspendiert und homogenisiert, indem die Zellsuspension mindestens sechsmal durch eine 0,5 x 23 mm (18 Gauge) Kanüle auf- und abgezogen wurde. Zelltrümmer und nicht lysierte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 323 *g*, 4 °C und 1 min abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals für 30 min bei 300000 *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde abgenommen und in 20 µl Portionen aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Im Falle von Suspensionskulturen erfolgte der Zellaufschluss mit Hilfe von Ultraschall. Dazu wurden die Zellen zunächst in 50 ml Röhrchen überführt und bei 250 *g* abzentrifugiert. Nach dem Waschen der Zellen mit kaltem CMF-PBS wurden die Zellen auf Eis mit HE-Puffer, der 250 mM NaCl enthielt, versetzt (*ca*. 1 ml Puffer pro 2 x 10^7 Zellen). Die Zellsuspension wurde dreimal für 20 s durch Ultraschall homogenisiert und zwischen den Aufschlußphasen 1 min lang auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 30 min bei 40000 *g* und 4 °C wurden Zelltrümmer und Zellorganellen abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals für 30 min bei

300000 *g* und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand für spätere säulenchromatographische Auftrennungen in ein 50 ml Röhrchen überführt, ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

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

2.2.5.1.2 Präparation von GRK-Proteinen aus Geweben von *Xenopus laevis*

Verschiedene Gewebe von *Xenopus laevis* wie Lunge, Leber, Herz, Gehirn, Milz, Ovar, Hoden, Skelettmuskel und Niere wurden je nach Größe in 0,5 bis 3 ml Extraktions-Puffer für 30 s auf Eis mit Hilfe eines Ultra Turrax-Homogenisators zerkleinert. Zelltrümmer, Zellkerne und Bindegewebe wurden für 45 s mit 2000 *g* bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Zentrifugation für 30 min mit 26000 *g* bei 4 °C in eine lösliche (Überstand) und eine partikuläre (Pellet) Fraktion separiert. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wurde dieser in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Extraktions-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 7,5, 3 mM Benzamidin, 0,1 mM PMSF, 1 µM Pepstatin A, 1 µM Leupeptin, 2 µg/ml Trypsininhibitor aus Sojabohnen, 1 µg/ml Aprotinin, evtl. 3 µM GDP

2.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach der Methode von Bradford [7] wurden alle Werte durch Doppelbestimmung ermittelt. Zur Erstellung einer Eichgerade wurden 0, 10, 20, 30 und 40 µl (entsprechend 0, 3,4, 6,8, 10,2 und 13,6 µg Protein) einer Proteinstandardlösung (0,34 mg/ml Rinder-IgG) eingesetzt. Von den zu messenden Proben wurden jeweils 30 µl einer geeigneten Verdünnung (bei Rezeptorpräparationen eine 1:20-Verdünnung) eingesetzt. Die Proben wurden mit ddH_2O 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 wurde ein 1 l-Glasgefäß und ein Magnetrührstab mit 85%iger H_3PO_4 gespült und mit ddH_2O gewaschen. Das Coomassie-Brilliantblau wurde im Glasgefäß in dem entsprechenden Volumen Ethanol gelöst. Nach Zugabe der Phosphorsäure wurde die Lösung für weitere 60 min gerührt, mit ddH_2O auf das Endvolumen aufgefüllt und anschließend über einen Faltenfilter abfiltriert und bei 4 °C gelagert.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli [57] durchgeführt. Es wurden drei Vertikalapparaturen verwendet: Ein Hoefer-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) mit 16 x 18 cm großen Glasplatten und 1,5 mm dicken Abstandshaltern für große Gele, ein Sigma-System (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) mit 8 x 10 cm großen Glasplatten und 1 mm dicken Abstandshaltern für kleine Gele sowie ein Mini-Protean® II System (BioRad, München) mit 8 x 10 cm großen Glasplatten und 1 mm dicken Abstandshaltern für die Auftrennung radioaktiv markierter Proteine. Zuerst wurde die Trenngellösung zwischen die Glasplatten gegossen.

Trenngellösung:

Prozent (m/V) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	15 %
Monomerlösung	15 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml
H_2O	7 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 ein großes Gel oder vier kleine Gele ausreichend. Die Trenngellösung wurde mit H_2O überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das

Wasser abgegossen, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und der Kamm eingesetzt.

Sammelgellösung:

Prozent (m/V) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	6 %
Monomerlösung	2 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
H_2O	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 ein großes Gel oder vier kleine Gele ausreichend. Die Proteinproben sowie die Markerproteinlösung wurden mit gleichen Volumina 2 x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und mit einer 100 µl Hamilton Spritze in die mit 1 x Tankpuffer gespülten Geltaschen geladen. Proteinproben, in denen G-Protein gekoppelte Rezeptoren enthalten waren, durften nicht gekocht werden, da diese Rezeptoren sonst zu hochmolekularen Komplexen aggregieren, die im Westernblot nicht mehr nachweisbar sind. Die Elektrophorese wurde in 1 x Tankpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 45 mA für ein großes Gel (90 mA bei zwei Gelen) oder bei konstanter Spannung von 100 V für kleine Gele durchgeführt. Die Auftrennung wurde beendet, wenn der Farbmarker das Ende des Geles erreicht hatte.

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

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
90,75 g Tris wurden in 400 ml ddH_2O gelöst, der pH mit *ca*. 16 ml konz. HCl auf 8,8 eingestellt, mit ddH_2O 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_2O gelöst, der pH mit *ca*. 9 ml konz. HCl auf 6,8 eingestellt, mit ddH_2O auf 200 ml aufgefüllt und die Lösung über einen 0,45 µm Filter filtriert.

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

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

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

2.2.5.4 Färbung von Polyacrylamidgelen

2.2.5.4.1 Coomassie-Brilliantblau-Färbung

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

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

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

2.2.5.5 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 *ca*. 4 h in dem *Gel Dryer* getrocknet.

2.2.5.6 Immunoblotting von Proteinen (Western-Blot)

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

2.2.5.6.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel und ein Stück Nitrozellulosemembran (Protran) passender Größe mit Transferpuffer getränkt. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das

Gel aufgelegt, das Sandwich zwischen zwei Schaumstoffschwämmen und einer Lage Blotpapier GB002 (Schleicher & Schuell, Daßel) in eine Plastikhalterung eingespannt und in die mit Transferpuffer I gefüllte Immunoblot-Transferkammer überführt. Das Gel war der Kathode, die Membran der Anode zugewandt, so dass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel zur Membran hinwanderten. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 125 mA und einer Leistung von 2 W für 12 h. Die Markerstreifen wurden nach dem Transfer abgetrennt, kurz in ddH_2O 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, Nitrozellulosemembran und Blotpapier mit Hilfe von Schaumstoffschwämmen eingespannt war. Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer II gefüllt, in einen Kühlwassertank gehängt und die Proteine bei konstanter Stromstärke von 400 mA für 1,25 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

2.2.5.6.2 Immunchemischer Nachweis transferierter Proteine

Die Membran wurde nach dem Transfer für 1 h in Blotto inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu blockieren. Die nachfolgende Inkubation mit dem in Blotto verdünnten ersten Antikörper wurde für 1 h durchgeführt. Der Antikörperlösung wurde als Konservierungsmittel entweder 0,05 % (m/V) Thimerosal oder 0,02 % NaN_3 zugesetzt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBS/Tween wurde der zweite, in Blotto 1:2000 verdünnte Antikörper (Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG) für 30-60 min auf den Blot gegeben und danach dreimal mit TBS/Tween und einmal mit TBS (jeweils für 5 min) gewaschen. Sämtliche Inkubationen

wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt. In Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper wurde anstelle von TBS auch PBS verwendet. Der Nachweis der Immunkomplexe erfolgte mit Hilfe des ECL™-Systems oder des SuperSignal®-Substrats durch Inkubation der Membran in einer 1:1-Mischung der jeweiligen Lösungen 1 und 2 für 1-5 min. Die Chemolumineszenzsignale wurden durch Schwärzung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

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

PBS: 80 mM Na_2HPO_4, 20 mM NaH_2PO_4, 100 mM NaCl pH 7,5

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

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

Blotto: 5 % (m/V) Magermilchpulver in TBS/Tween

2.2.5.6.3 Amidoschwarzfärbung von Nitrozellulosemembranen

Mit Amidoschwarz-Färbung können Proteinmengen bis 50 ng/Bande auf der Nitrozellulosemembran nachgewiesen werden. Die Membran wurde dreimal je 5 min mit ddH_2O gewaschen, 1 min in Amidoschwarz-Färbelösung gefärbt, zweimal je 1 min in 2 % (V/V) Essigsäure entfärbt, dreimal je 10 min in ddH_2O gewaschen und auf Blotpapier getrocknet.

Färbelösung: 0,1 % (m/V) Amidoschwarz 10B in 2 % (V/V) Essigsäure

2.2.6 Chromatographische Methoden

Alle säulenchromatographischen Auftrennungen wurden bei 4 °C durchgeführt.

2.2.6.1 Kationenaustausch-Chromatographie

Zunächst wurde die in Sf9-Insektenzellen rekombinant exprimierte xGRK6 durch Chromatographie an einer SP-Sepharose-Matrix (GE-Healthcare-Amersham) unter Einsatz des Äkta-Systems (GE-Healthcare-Amersham) angereinigt. Dazu wurden 5 ml-HiTrap-Säulen eingesetzt, die mit HE-Puffer mit 15 % (V/V) NaCl äquilibriert wurden. Der Salzgehalt der Proben (300000 g Überstände, 250 mM NaCl) wurde durch Zusatz von

NaCl-freiem HE auf 150 mM NaCl verdünnt. Die Proben wurden filtriert (0,45 µm) und auf die Säule geladen. Die Flussrate betrug 1 ml/min und es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Matrix wurde im Anschluss mit 8 Säulenvolumina gewaschen und die Proteine mit HE-Puffer mit 50 % (V/V) NaCl in einem 50 ml-Gradienten eluiert. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden in SDS-PAGE- und *Western blot*-Analysen untersucht.

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

2.2.6.2 Affinitätschromatographie

Die zuvor durch Kation-Austauschchromatographie angereinigten xGRK6-Proteine wurden durch Affinitätschromatographie an einer Heparin-Sepharose-Matrix (GE-Healthcare-Amersham) weiter aufgereinigt. Dazu wurde eine 1 ml-HiTrap-Säule mit NaCl-haltigen HE-Puffer äquilibriert. Durch Zusatz von NaCl-freiem HE-Puffer zu den vom Kationaustauscher eluierten Proben wurden letztere auf einen NaCl-Gehalt von 100 mM reduziert und auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 8 Säulenvolumina gewaschen. Dabei betrug die Flussrate 0,5 ml/min. Das xGRK6-Protein wurde im Anschluss in einem linearen Gradienten von 50 ml (NaCl: 0,3-1 M) eluiert. Alle säulenchromatographischen Auftrennungen wurden bei 4 °C durchgeführt. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden in SDS-PAGE- und *Western blot*-Analysen untersucht.

2.2.6.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der xGRK6-Peptide wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Markus Wunderlin (Sektion Massenspektrometrie, Universität Ulm) durchgeführt. Die Bestimmung der molekularen Massen der Proteine erfolgte mittels einer *delayed extraction matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* Massenspektrometrie (MALDI-MS) auf einem Bruker REFLEX III *time-of-flight* Spektrometer mit einem UV-Stickstofflaser (337 nm). Die Proben wurden nach den Angaben des Herstellers mit ZipTip^{TM} C18-Pipettenspitzen (0,6 µl *resin*, Millipore) konzentriert und entsalzt. Die Elution der Proben von der C18-Matrix erfolgte mit

Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure (v/v) im Verhältnis 2:1 (v/v). 1 µl der eluierten Lösung wurde mit 1 µl gesättigter α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure-Lösung (gesättigte Lösung in Acetonitril: 0,1 % (V/V) TFA (2:1)) vermischt und auf dem Probenträger auskristallisiert. Die Spektren wurden nach der Verdampfung des Lösungsmittels aufgenommen. Die einfach und zweifach geladenen Ionensignale des bovinen Ubiquitins (M_r = 8565,85) wurden zur externen Massenkalibrierung verwendet.

2.2.7 Methoden zur Untersuchung der Kinaseaktivität von GRKs

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

2.2.7.1 *In vitro*-Bestimmung der Kinaseaktivität von GRKs

2.2.7.1.1 Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Phosvitin als Substrat

Die Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Phosvitin als Substrat wurde in Anlehnung an die von Loudon und Benovic beschriebene Methode (1994) durchgeführt. Phosvitin ist ein *ca*. 45 kD großes saures Protein, das als Substrat für die hGRK6 beschrieben wurde [64]. Die zu untersuchende GRK (5-10 µM) wurde in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA pH 7,5 und 3,7 mM MgCl2 zusammen mit 6,25 µg Phosvitin (Sigma, Deisenhofen) und 1,3 µl ATP-Mix (final 100 µM ATP) für 1 h bei 30 °C in 15 µl Gesamtvolumen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 µl 2 x Probenpuffer (siehe 2.2.5.3) gestoppt und die Proteine über SDS-PAGE auf einem 10 % Acrylamidgel bei konstanter Stromstärke (105 V) aufgetrennt. Die Exposition des Coomassie-gefärbten Gels mit einem Röntgenfilm erfolgte über Nacht bei -80 °C in einer Filmkassette.

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

2.2.7.1.2 Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Rhodopsin als Substrat

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

Reaktionsansatz:
- 1,5 µl 10 x TEM-Puffer
- x µl GRK (5-10 µM)
- 1 µl ROS-Membranen (240 nM, d. h. 1:50 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, > 5000 Ci/mmol)]
- *ad* 15 µl mit ddH2O

Die Proben wurden für 10 min bei 30 °C belichtet, die Reaktion im Anschluss durch Zugabe von 10 µl 2 x Probenpuffer (siehe 2.2.5.3) gestoppt und die Proteine auf einem 10 % Acrylamidgel bei einer konstanten Spannung von 105 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Coomassie-gefärbte Gel wurde über Nacht mit einem Röntgenfilm bei -80 °C in einer Filmkassette exponiert.

TEM-Puffer: 200 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM EDTA pH 7,5 und 37 mM $MgCl_2$

2.2.8 Arbeiten mit Xenopus laevis

2.2.8.1 Whole-mount-in-situ-Hybridisierung

Die *Whole-mount-in-situ*-Hybridisierung wurde nach dem Protokoll von Harland [41] durchgeführt und zum Teil leicht verändert. Diese Methode erlaubt es, sowohl die zeitliche als auch die räumliche Expression eines Gens im gesamten Embryo sichtbar zu machen. Dazu werden Digoxygenin-markierte *antisense*-RNA-Sonden in die einzelnen Zellen des Embryos eingebracht, damit diese mit den Transkripten des zu untersuchenden Gens hybridisieren. Der Nachweis erfolgt über anti-Digoxygenin-F_{ab}-Fragmente, die kovalent an

Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt sind. Nach geeigneter F_{ab}-Substratzugabe (z.B. NBT/BCIP) für die AP kommt es dann zu einer Färbung.

2.2.8.1.1 Fixieren von *Xenopus laevis* Embryonen

Nachdem die Embryonen das für das zu untersuchende Gen geeignete Stadium erreicht hatten, wurden sie für 10 bis 20 min in Proteinase-K-Lösung II inkubiert. Dadurch wurde die sie umgebende Vitellinmembran für die Hybridisierung durchlässig gemacht. Zusätzlich wurde bei Embryonen zwischen dem Blastula- und Neurulastadium das Blastocoel mit einer dünnen Nadel punktiert. Diese Behandlung verhinderte eine erhöhte Hintergrundfärbung. Danach wurden die Embryonen zweimal mit 1 x MBSH gewaschen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4 °C) in MEMPFA fixiert und anschließend schrittweise in Ethanol oder Methanol überführt und bei -20 °C gelagert.

Proteinase-K-Lösung II: 1 µl Proteinase-K (0.01 M) in 4 ml 1 x MBSH

MEMPFA: 0,1 M MOPS pH 7,4, 2 mM EGTA, 1mM $MgSO_4$, 4 % Paraformaldehyd

2.2.8.1.2 Herstellung Digoxigenin-markierter *antisense*-RNA-Sonden

Für die *in vitro*-Transkription linearisierter DNA-Proben wurde der DIG-RNA-Labeling Kit (SP6/T3/T7) von Boehringer (Mannheim) verwendet.
Standardansatz für 20 µl Endvolumen:

x µl linearisierte DNA-Probe (1 µg)
2 µl 10 x DIG-RNA-Labeling Mix
2 µl 10 x Transkriptionspuffer
1 µl RNase Inhibitor (20 U/µl)
2 µl RNA-Polymerase (SP6, T3 oder T7 in Abhängigkeit von der DNA-Probe)
ad 20 µl H_2O

Nach einer Transkriptionszeit von zwei Stunden bei 37 °C wurde die DNA-Probe durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase I (10 U/µl) und einer Inkubation von 15 min hydrolysiert. Der Erfolg der Transkription wurde durch das Auftragen von 1 µl der RNA-Lösung auf ein Agarosegel kontrolliert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 2 µl EDTA

(200 mM) in den Transkriptionsansatz pipettiert. Die Reinigung der RNA erfolgte mit RNeasy-Säulen (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.8.1.3 Whole-mount-in-situ-Hybridisierung

Die *Whole-mount-in-situ*-Hybridisierung wurde in 5 ml-Glasgefäßen (RNase-frei) mit Schraubdeckel durchgeführt. Das Protokoll umfaßt vier Tage, wobei an den ersten beiden Tagen RNase-frei gearbeitet werden mußte.

1. Tag

Die in Ethanol oder Methanol gelagerten Embryonen wurden mit jeweils 5 ml 75 % Ethanol und 25 % H_2O, 50 % Ethanol und 50 % H_2O, 25 % Ethanol und 75 % PTW für jeweils 5 min bei Raumtemperatur rehydriert. Um die Membran durchlässig zu machen, wurden die Embryonen weitere viermal für 5 min in 100 % PTW inkubiert. Danach erfolgte eine Behandlung mit 1 ml Proteinase-K-Lösung I für 20 min. Dabei wurden die Gefäße vertikal geschwenkt. Dieser Schritt diente der Herabsetzung des Hintergrundes in der abschließenden Färbung, welcher durch unspezifische Bindungen der DIG-RNA an Reste der Gallerthülle und Vitellinmembran entstehen kann. Im Anschluss daran wurden die Embryonen dreimal für 5 min mit Triethanolamin gewaschen. Zum dritten Waschschritt wurden 12,5 µl Essigsäureanhydrid gegeben. Nach 5 min horizontalen Schüttelns wurden für 5 min weitere 12,5 µl Essigsäureanhydrid hinzugefügt. Danach folgten zwei Waschschritte mit je 5 ml PTW. Durch die anschließende Behandlung mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min wurden die Embryonen erneut fixiert. Dann wurde weitere fünfmal für 5 min mit PTW gewaschen. Um die Embryonen für die Prähybridisierung vorzubereiten, wurden diese mit 1 ml PTW und 250 µl Hybridisierungspuffer versetzt. Nach 1 Minute wurde die Lösung abgenommen und durch 500 µl Hybridisierungslösung ersetzt. Die Proben wurden nun 10 min in ein auf 60 °C temperiertes Schüttelwasserbad gestellt und leicht geschüttelt. Danach wurde der Hybridisierungspuffer erneuert und die Embryonen wurden für 24 h bei 60 °C im Schüttelwasserbad prähybridisiert.

2. Tag

Die mit zweimal 30 µl von den RNeasy-Säulen eluierte Digoxigenin-markierte *antisense*-RNA wurde mit 60 µl deionisiertem Formamid vermischt. Um eventuell entstandene

Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA aufzulösen, wurde die Probe 30 s bei 96 °C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Die Prähybridisierungslösung wurde von den Embryonen abgenommen, die RNA wurde mit 380 µl Hybridisierungspuffer auf die Embryonen gegeben und für 12 h bei 60 °C inkubiert.

3. Tag

Die eingesetzte Digoxigenin-markierte *antisense*-RNA wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert. Sie kann je nach Signalstärke mehrfach für eine Hybridisierung verwendet werden. Um die überschüssige DIG-RNA zu entfernen, folgten mehrere Waschschritte. Zunächst für 10 min bei 60 °C mit 500 µl Hybridisierungspuffer, dann 10 min bei 60 °C mit 1 ml 2 x SSC und dreimal für 20 min bei 60 °C mit 2 x SSC. Die Entfernung nicht hybridisierter DIG-RNA erfolgte durch eine RNase-Behandlung. Frei vorliegende RNA-Moleküle wurden durch zweimalige Inkubation mit je 1 ml 2 x SSC, mit 2 µl RNase-A (20 mg/ml) und 1 µl RNase-T1 (10 U/ml) für 20 min bei 37 °C entfernt. Nach weiteren Waschschritten, 10-60 min mit 5 ml 2 x SSC bei Raumtemperatur und zweimal 30 min mit 5 ml 0,2 x SSX bei 60 °C wurden die Embryonen für die Antikörperinkubation vorbereitet. Dazu wurden sie zweimal für 15 min mit 5 ml MAB, dann 1 h mit 5 ml MAB und 2 % Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim) und danach 1 h mit 5 ml MAB, 2 % Blocking Reagenz und 20 % Lammserum bei Raumtemperatur geschwenkt. Die DIG-F_{ab}-Fragmente mit Alkalischer Phosphatase wurden im Verhältnis 1:2000 zu MAB, 2 % Blocking Reagenz und 20 % Lammserum hinzugegeben. 0,5-1 ml dieser Lösung wurde auf die Embryonen pipettiert. Die Inkubation betrug minimal 4 h bei Raumtemperatur. Um die Hintergrundfärbung möglichst gering zu halten, mussten die nicht gebundenen F_{ab}-Fragmente entfernt werden. Dazu wurde zuerst zweimal 15 min bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4 °C mit MAB gewaschen.

4. Tag

Nach zweimaligem Waschen mit MAB für je 1 h bei Raumtemperatur wurden die Embryonen in kleine Petrischalen überführt und zweimal mit 5 ml AP-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach dem Abnehmen des AP-Puffers wurde die Färbung durch Zugabe von 0,5 ml BM-Purple AP Substrat (ausreichend für *ca.* 20 Embryonen) eingeleitet. Während der Färbung mussten die Gefäße mit den Embryonen im Dunkeln aufbewahrt werden. Nach ausreichender Färbung (1-12 h) wurden die Embryonen 2 h bei

Raumtemperatur in MEMPFA fixiert. Anschließend wurden sie in Methanol überführt und bei 4 °C gelagert. Die erste Auswertung der *Whole-mount-in-situ*-Hybridisierung erfolgte in Methanol.

PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,5 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 1,5 mM KH_2PO_4, (pH 7,3)
PTW:	PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20
Proteinase-K-Lösung I:	0,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) in PTW
Triethanolamin:	0,1 M pH 7.8 (eingestellt mit NaOH)
20 x SSC (pH 7.0):	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat
100 x Denhardt´s:	2 % Ficoll 400, 2 % Polyvinylpyrolidon, 2 % BSA
Hybridisierungspuffer:	50 % Formamid (deionisiert), 5 x SSC, 100 µg/ml Heparin, 1 mg/ml tRNA, 0.1 % CHAPS, 0.1 % Tween 20, 5 mM EDTA, 1 x Denhardt´s
RNase H Lösung:	1 µl RNase H (10 U/ml), 40 µl $MgCl_2$, ad 10 ml 2 x SSC
RNase A:	20 mg/ml in 2 x SSC
RNase T1:	10 U/ml in 2 x SSC
MAB-Lösung (pH 7.5):	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl
Lamm-Serum:	30 min bei 55 °C hitzeinaktiviert und sterilfiltriert
Blocking Reagenz:	Boehringer Mannheim
BM-purple:	AP Substrat (präzipitierend)
AP-Puffer:	100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 0,1 % Tween 20, 5 mM Levamisol

2.2.8.1.4 Bleichen und Durchsichtigmachen von *Xenopus laevis* Embryonen

Die Embryonen von *Xenopus laevis* sind mehr oder weniger stark pigmentiert. Dies hat zur Folge, dass die durch die *Whole-mount-in-situ*-Hybridisierung angefärbten Bereiche häufig nicht gut zu erkennen sind. Aus diesem Grund wurden die Embryonen mit 10 % Wasserstoffperoxid in Methanol depigmentiert. Die Dauer der Behandlung betrug zwischen einer Stunde und zwei Tagen. Danach wurden sie zur Auswertung wieder in Methanol überführt. Um eine eventuelle Färbung innerer Bereiche der *Xenopus laevis* Embryonen zu erkennen, wurden diese transparent gemacht. Dafür wurden die Embryonen

in Glasschalen mit Benzylbenzoat/Benzylalkohol (Verhältnis 2:1) überführt. Eine vollständige Transparenz tritt nach *ca.* 15 min ein.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und Charakterisierung der cDNAs von Varianten der Kinasen G Protein-gekoppelter Rezeptoren Typ 4, 5 und 6 von *Xenopus laevis*

3.1.1 Isolierung von für Kinasen G Protein-gekoppelter Rezeptoren kodierenden cDNAs aus cDNA-Banken von *Xenopus laevis*

Zur Isolierung von cDNAs, die für Kinasen G Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) aus der GRK4 Unterfamilie (GRK4, GRK5 und GRK6) im Krallenfrosch *Xenopus laevis* kodieren, wurden cDNA-Banken, die aus der RNA (I) der Milz eines adulten, weiblichen Frosches (RZPD-Berlin, XNSP1, Nr. 412) und (II) aus Embryonen des Embryonalstadiums 24 (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD)-Berlin, Tadpole Stage 24, Nr. 725) hergestellt worden waren, mit einem ^{32}P-markierten GRK6-cDNA-Fragment von *Mus musculus* mit geringer Stringenz (60° C) über Nacht hybridisiert. Nachdem die Blots der cDNA-Banken bei 60° C mit 5 x SSC, 0,1 % SDS (m/V) für 30 min und 2 x SSC, 0,1 % SDS (m/V) für 30 min gewaschen worden waren, wurde für 2 h ein Röntgenfilm exponiert. Auf diese Weise wurden neun Klone identifiziert, die von dem „Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung“ GmbH zur weiteren Untersuchung bezogen wurden. Die Analyse der Nukleotidsequenzen der cDNA dieser Klone erfolgte über Restriktionsspaltung und DNA-Sequenzierungen. Durch die Sequenzanalysen wurden cDNAs von *Xenopus laevis* identifiziert, die große Übereinstimmung in ihren Nukleotidsequenzen mit den humanen GRK4-, GRK5- und GRK6-kodierenden cDNAs aufwiesen. Diese cDNAs von *Xenopus laevis* wurden im Folgenden weiter charakterisiert.

3.1.2 Sequenzanalyse der xGRK4-cDNA

Die cDNA (RZPD *clone* ID: HACHp412M0819Q2), die unter den in 3.1.1 beschriebenen cDNAs die größte Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz mit der humanen GRK4-

cDNA zeigte, wurde mittels *primer walking* weitergehend sequenziert. Die Sequenz der als xGRK4 bezeichneten cDNA ist in Abbildung 5 dargestellt. Die xGRK4 cDNA umfasst insgesamt 1926 Basenpaare (bp). Der kodierende Abschnitt ist 1725 bp lang und kodiert für 575 Aminosäuren und somit für ein 66,422 kDa großes Protein. Wie der auf Grundlage der Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen erzeugte Stammbaum zeigt (Abbildung 8, Clustal-W-Algorithmus), besitzt die Aminosäuresequenz von xGRK4 große Ähnlichkeit mit GRK4 Proteinen anderer Spezies.

```
   1  TATTGGGAGCACAGGAGCTGCACAGCTGGAATCAAACACAAATGTGAGAGACATGCGGCTGCACAGCCAGGGGATCTATG
  81  CAAGGAGAGGGCAGTTGCTGCTCAGCCTGTAGTAGGCACATTCCCTAGGATCAGTGGATCTGCAGTCAGACATGTGTGCT
                         M  E  I  E  N  I  V  A  N  T  V  L  L  K  A  R  E  G  G  G
 161  TTCCCCTGCTGCATTTGATCATGGAGATTGAAAACATTGTGGCCAACACTGTCTTGCTGAAAGCCAGAGAAGGGGGTGGT
      G  K  R  N  G  R  S  K  K  W  K  E  M  L  R  L  P  H  I  S  Q  C  E  E  L  R  H
 241  GGCAAGAGAAACGGACGCAGTAAGAAATGGAAGGAAATGCTAAGGCTGCCGCACATCAGCCAATGTGAAGAACTTCGACA
       T  V  E  I  D  Y  S  N  L  C  E  K  Q  P  I  G  R  L  L  R  R  Q  F  C  D  T  R
 321  TACAGTTGAAATAGACTACAGCAATCTGTGTGAGAAACAGCCAATAGGAAGACTACTTTTCAGGCAGTTTTGTGACACCA
        P  E  L  K  R  C  I  E  F  L  D  A  V  A  D  Y  E  L  A  P  D  E  K  R  R  D
 401  GGCCAGAGCTGAAAAGATGTATTGAATTCCTGGATGCTGTGGCAGACTACGAACTGGCTCCAGATGAGAAAAGGAGAGAC
      H  G  L  R  I  L  D  T  Y  F  N  N  G  S  A  A  H  L  P  E  I  P  Q  D  T  V  H
 481  CACGGCTTAAGGATTTTGGACACCTACTTCAACAATGGGTCTGCAGCCCATTTGCCGGAAATACCTCAGGACACAGTCCA
       E  C  K  E  K  L  E  Q  S  P  C  K  E  L  F  K  D  C  T  R  V  V  H  D  Y  L  S
 561  TGAATGTAAGGAGAAACTGGAGCAAAGCCCCTGCAAAGAACTTTTCAAAGACTGCACTAGAGTTGTACATGATTACTTGA
        G  T  P  L  G  D  F  Q  D  S  M  Y  F  S  R  F  L  Q  W  K  W  L  E  R  Q  P
 641  GTGGAACGCCATTGGGGGATTTTCAAGACAGTATGTACTTTTCACGATTCCTACAGTGGAAATGGCTGGAAAGACAACCA
      V  T  K  N  T  F  R  H  Y  R  V  L  G  K  G  G  F  G  E  V  C  A  C  Q  V  R  A
 721  GTGACAAAGAATACATTTCGGCATTACAGGGTGCTTGGGAAAGGAGGCTTTGGGGAGGTGTGCGCTTGCCAAGTCCGAGC
       T  G  K  M  Y  A  C  K  K  L  E  K  K  R  I  K  K  R  K  G  E  S  M  A  L  N  E
 801  AACAGGGAAAATGTACGCTTGCAAGAAGCTAGAGAAGAAAAGGATAAAGAAGAGGAAAGGAGAATCCATGGCATTAAATG
        K  Q  I  L  E  K  V  N  S  R  F  V  V  S  L  G  Y  T  Y  E  T  K  D  A  L  C
 881  AGAAACAGATTTTAGAAAAAGTAAATAGTCGATTTGTAGTGAGTTTAGGGTACACGTATGAAACGAAGGACGCCCTTTGC
      L  V  L  T  I  M  N  G  G  D  L  K  F  H  I  Y  N  M  G  N  P  G  F  D  E  Q  R
 961  TTAGTATTAACCATTATGAACGGAGGGGATTTGAAGTTTCACATATACAATATGGGCAACCCGGGCTTCGACGAGCAGAG
       A  V  F  Y  A  A  E  L  C  C  G  L  E  D  L  Q  R  E  R  I  V  Y  R  D  L  K  P
1041  GGCGGTGTTCTATGCTGCAGAGCTGTGCTGTGGGCTGGAAGACCTGCAAAGGGAAAGAATTGTTTACAGAGACTTAAAGC
        E  N  I  L  L  D  T  R  G  H  I  R  I  S  D  L  G  L  A  V  R  I  P  E  G  E
1121  CTGAAAATATCCTGCTGGACACCCGCGGACATATCAGGATTTCAGATCTGGGACTAGCCGTCAGAATTCCAGAAGGGGAA
      T  I  R  G  R  V  G  T  V  G  Y  M  A  P  E  V  I  N  N  E  S  Y  A  F  S  P  D
1201  ACAATTCGTGGGCGTGTTGGGACTGTGGGATATATGGCCCCAGAAGTAATCAACAACGAAAGCTACGCGTTCAGCCCAGA
       W  W  G  L  G  C  L  I  Y  E  M  I  Q  G  Q  S  P  F  R  K  R  K  E  K  V  K  R
1281  CTGGTGGGGGCTCGGCTGTTTAATATATGAAATGATCCAGGGCCAGTCACCCTTCAGGAAGCGGAAAGAGAAAGTAAAGC
        D  E  V  D  R  R  V  R  E  D  E  E  E  Y  S  E  K  F  S  E  D  A  K  S  I  C
1361  GGGACGAGGTTGACCGGCGAGTCAGAGAGGACGAGGAAGAATATTCGGAGAAATTCTCCGAGGATGCCAAGTCGATATGC
      R  M  L  L  S  K  D  P  K  Q  R  L  G  C  T  G  N  G  A  S  D  V  K  Q  H  P  I
1441  AGGATGTTACTTTCCAAAGACCCCAAGCAGAGGCTGGGCTGCACAGGCAATGGGGCAAGTGATGTGAAACAGCACCCTAT
       R  K  S  I  N  F  K  R  L  E  A  N  I  L  E  P  P  F  V  P  D  P  R  A  V  Y  C
1521  ATTCAAGAGCATCAACTTCAAGCGGCTGGAAGCAAACATACTGGAGCCACCCTTTGTACCCGATCCACGCGCTGTTTATT
        K  D  V  L  D  I  E  Q  F  S  T  V  K  G  V  N  L  D  T  T  D  D  D  F  Y  S
1601  GCAAGGATGTTCTGGACATTGAGCAGTTTTCCACGGTGAAAGGGGTGAACCTGGATACCACAGATGATGATTTCTATTCC
      K  F  V  T  G  S  V  S  I  P  W  Q  E  E  M  I  E  T  E  C  L  K  D  I  N  V  Y
1681  AAGTTTGTGACTGGAAGTGTCTCCATCCCCTGGCAGGAGGAGATGATTGAAACAGAGTGCTTAAAGGACATTAATGTTTA
       E  M  D  G  C  L  S  P  D  L  D  V  S  K  P  N  V  K  P  K  R  S  F  F  H  R  P
1761  TGAGATGGACGGCTGTTTGTCACCGGACTTGGATGTCAGCAAACCGAACGTAAAACCAAAGAGAAGCTTCTTTCATCGAC
        F  R  R  G  V  C  F  K  S  S  Y  S  E  D  E  E  E  A  S  K  P  *
1841  CTTTCAGAAGAGGGGTCTGTTTTAAGTCTTCCTACAGTGAGGATGAAGAAGAGGCCTCAAAACCATGAACCACTGTCCAG
1921  TAGCCC
```

Abb. 5: Nukleotid- und Aminosäurensequenz der Kinase G Protein-gekoppelter Rezeptoren 4 von *Xenopus laevis* (xGRK4).

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz von xGRK4. Start- und Stopkodon sind blau hinterlegt. Die kodierende DNA-Sequenz wurde in die entsprechende Aminosäurensequenz translatiert und ist im Einbuchstabencode oberhalb der Nukleotidsequenz dargestellt. Beginn und Ende der Aminosäuresequenz der konservierten katalytischen Domäne der Rezeptorkinase sind rot markiert.

3.1.3 Sequenzanalyse der rekombinanten xGRK5-cDNA

Die cDNA (RZPD *clone* ID: DKFZp725H0354Q2), die unter den in 3.1.1 beschriebenen cDNAs die größte Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz mit der humanen GRK5-cDNA zeigte, wurde ebenfalls mittels *primer walking* sequenziert. Hierbei zeigte sich, dass der 5'-kodierende Abschnitt nicht vollständig erhalten war. Insbesondere fehlten das Startkodon und die folgenden, die amino-terminale Domäne kodierenden Abschnitte. Um eine vollständige xGRK5-kodierende Sequenz zu erhalten, wurden drei weitere cDNA-Banken, (I) die aus der RNA der Milz eines adulten, weiblichen Frosches (RZPD-Berlin, XNSP1, Nr. 412), (II) aus der RNA von Eizellen (RZPD-Berlin, Oocyte, Nr. 724) und (III) aus der RNA von Embryonen im Stadium 24 (RZPD-Berlin, Tadpole Stage 24, Nr. 725) gewonnen worden waren, mit einem ^{32}P-markierten *Xenopus laevis* GRK5-cDNA-Fragment (947 Nukleotide) mit geringer Stringenz (60° C) über Nacht hybridisiert. Nach dem Waschen der Blots bei 60° C mit 5 x SSC, 0,1 % SDS (m/V) für 30 min, 2 x SSC, 0,1 % SDS (m/V) für 30 min und 0,1 x SSC, 0,1 % SDS (m/V) für 50 min wurden Röntgenfilme für 2 h mit den Blots exponiert. Auf diese Weise wurden neun Klone identifiziert, die von dem „Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung" GmbH zur weiteren Untersuchung bezogen wurden. Die Analyse der Nukleotidsequenzen dieser Klone erfolgte über Restriktionsspaltung und DNA-Sequenzierungen. Durch die Sequenzanalysen wurde eine cDNA von *Xenopus laevis* identifiziert (RZPD *clone* ID: DKFZp724L2332Q2), die große Übereinstimmung in ihrer Nukleotidsequenz mit der humanen GRK5-kodierenden cDNA aufwies. Die Nukleotidsequenz der isolierten xGRK5-cDNA ist 2397 bp lang (Abbildung 6). Der kodierende Anteil umfasst 1761 bp und kodiert für ein Protein mit 587 Aminosäuren, das 67,920 kDalton groß ist. Wie der auf Grundlage der Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen erzeugte Stammbaum zeigt (Abbildung 8, Clustal-W-Algorithmus), besitzt die Aminosäuresequenz von xGRK5 große Ähnlichkeit mit GRK5 Proteinen anderer Spezies.

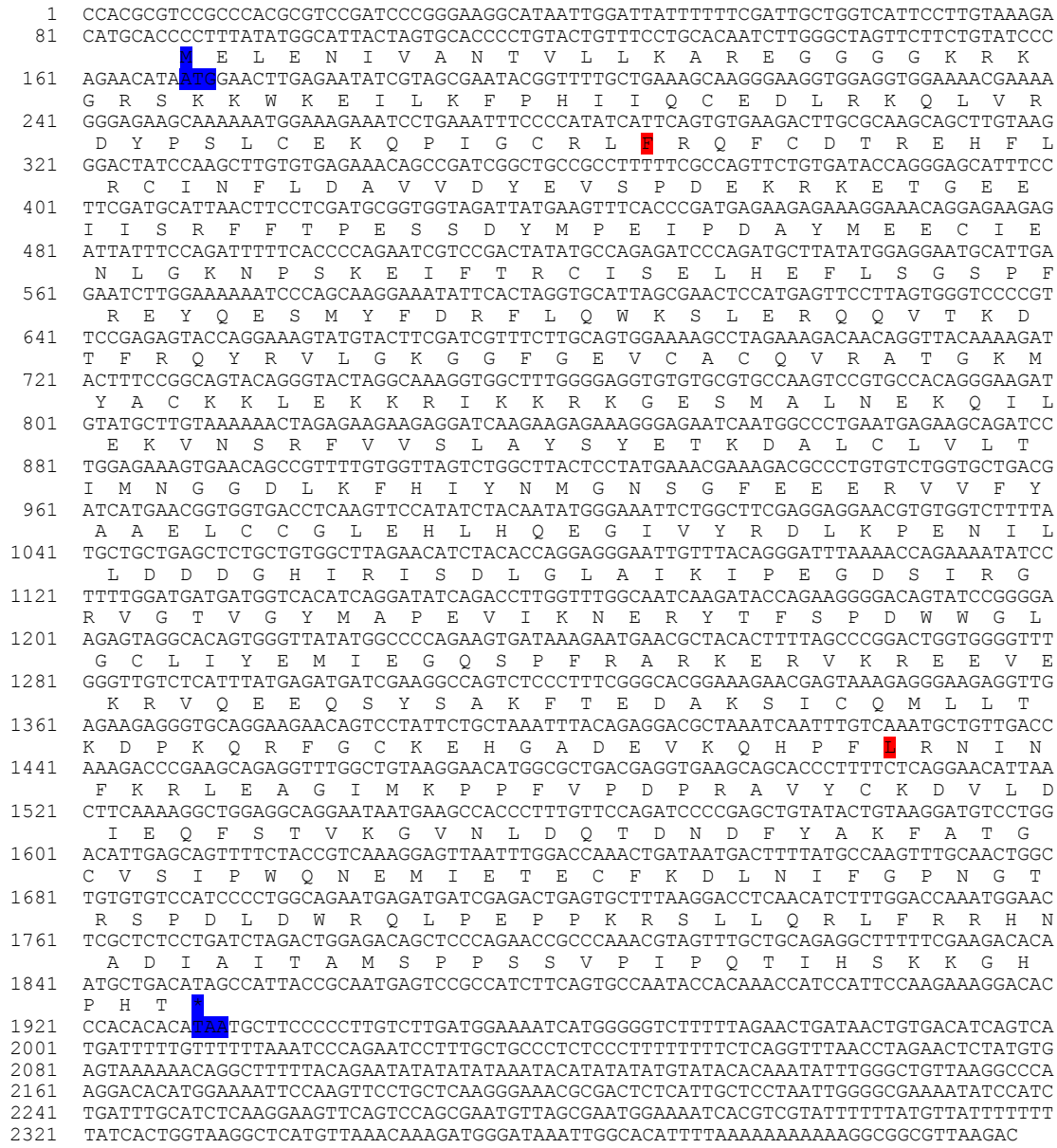


Abb. 6: Nukleotid- und Aminosäurensequenz der Kinase G Protein-gekoppelter Rezeptoren 5 von *Xenopus laevis* (xGRK5).

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz von xGRK5. Start- und Stopkodon sind blau hinterlegt. Die kodierende DNA-Sequenz wurde in die entsprechende Aminosäurensequenz translatiert und ist im Einbuchstabencode oberhalb der Nukleotidsequenz dargestellt. Beginn und Ende der Aminosäuresequenz der konservierten katalytischen Domäne der Rezeptorkinase sind rot markiert.

3.1.4 Sequenzanalyse der rekombinanten xGRK6-cDNA

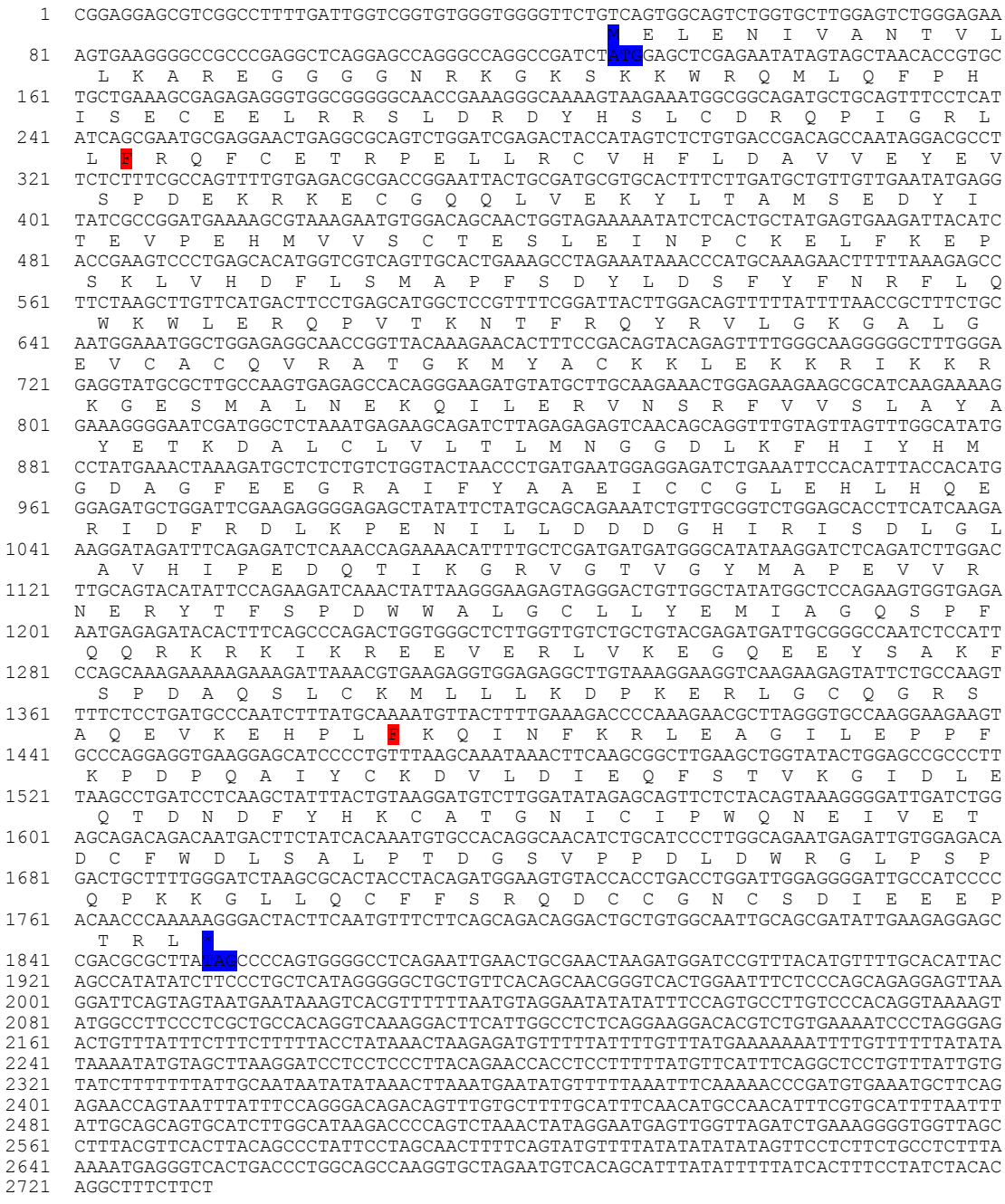


Abb. 3.3: Nukleotid und Aminosäurensequenz der Kinase G Protein-gekoppelter Rezeptoren 6 von *Xenopus laevis* (xGRK6).

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz von xGRK6. Start- und Stopkodon sind blau hinterlegt. Die kodierende DNA-Sequenz wurde in die entsprechende Aminosäurensequenz translatiert und ist im Einbuchstabencode oberhalb der Nukleotidsequenz dargestellt. Beginn und Ende der Aminosäuresequenz der konservierten katalytischen Domäne der Rezeptorkinase sind rot markiert.

Die cDNA (RZPD *clone* ID: HACHp412G0342Q2), die unter den in 3.1.1 beschriebenen cDNAs die größte Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz mit der humanen GRK6-cDNA zeigte, wurde ebenfalls mittels *primer walking* sequenziert. Die Nukleotidsequenz der isolierten xGRK6-cDNA ist 2732 bp lang (Abb. 7). Der kodierende Anteil umfasst 1725 bp und kodiert für ein Protein mit 575 Aminosäuren, das 66,449 kDalton groß ist. Wie der auf Grundlage der Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen erzeugte Stammbaum zeigt (Abb. 8, Clustal-W-Algorithmus), besitzt die Aminosäuresequenz von xGRK6 große Ähnlichkeit mit GRK6 Proteinen anderer Spezies.

3.1.5 Aminosäuresequenzverwandschaft der Kinasen G Protein-gekoppelter Rezeptoren Typ 4, 5 und 6 von *Xenopus laevis*

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der Rezeptorkinasen 4, 5 und 6 von *Xenopus laevis*, so zeigen sie die von anderen Spezies in der GRK4 Unterfamilie bekannten typischen Übereinstimmungen. Jedoch ist hervorzuheben, dass Vertreter der GRK4 Unterfamilie bisher nur für höhere Säugetiere beschrieben worden sind und erst seit kurzem Informationen auch für niedere Vertebraten vorliegen. Die Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen zwischen den in *Xenopus laevis* gefundenen Rezeptorkinasen und den bisher bekannten GRKs von Vertretern der Säugetiere betragen 69-86 %. xGRK4 zeigt mit 75 % identischen Aminosäuren eine geringfügig geringere Übereinstimmung mit der menschlichen GRK4-Aminosäuresequenz, als dass dies die entsprechende Sequenz aus der Maus mit 77 % übereinstimmenden Aminosäuren [100] bzw. die Sequenz der Ratte mit 88 % übereinstimmenden Aminosäuren zeigt [128]. Die Aminosäuresequenz von xGRK5 entspricht zu etwa 71-85 % den bereits bekannten GRK5 Aminosäuresequenzen von Säugetieren und xGRK6 schließlich zeigt mit 79-82 % Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz im Vergleich zu Säugetier GRK6s die am stärksten konservierte Aminosäuresequenz. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich auch die entsprechenden Zuordnungen der xGRKs in die Untergruppen GRK4, GRK5 und GRK6 (Abb. 8, Clustal-W-Algorithmus).

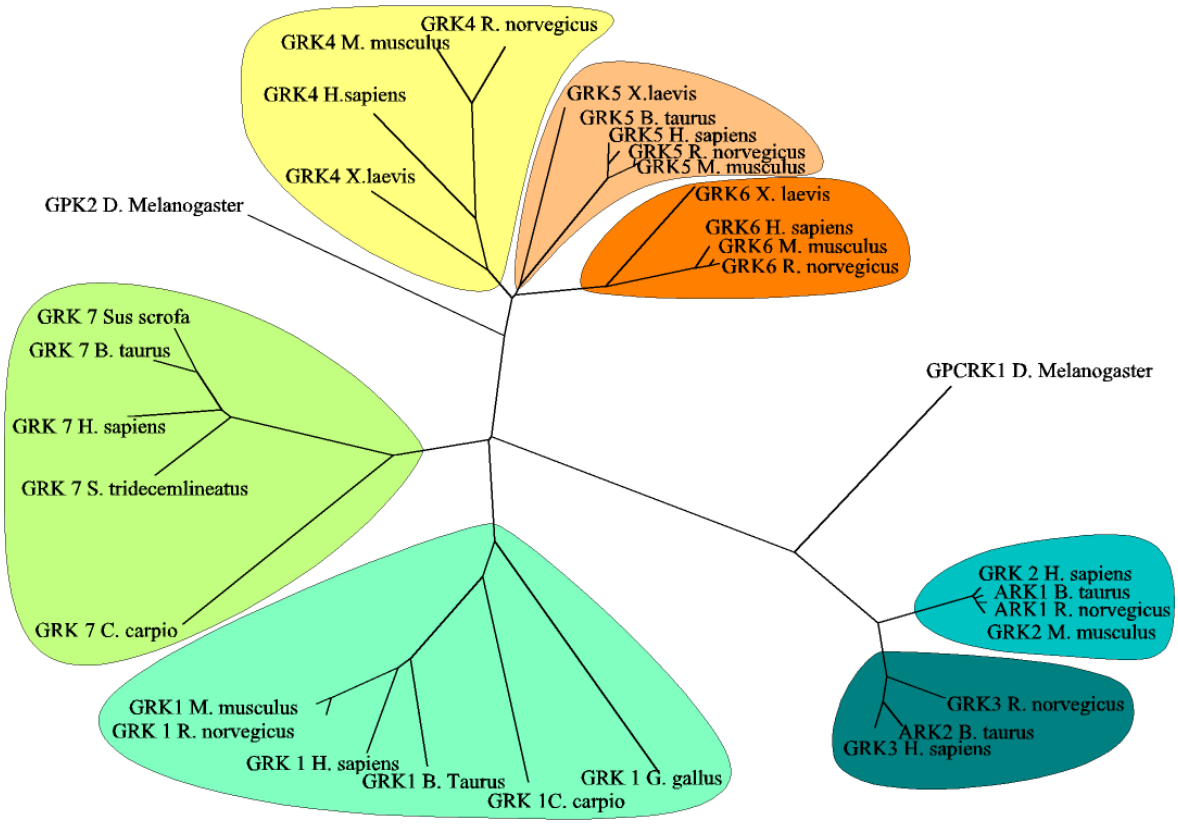


Abb. 8: Verwandschaftsbeziehungen der bekannten Mitglieder der Familie von Kinasen G Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRK).

Dargestellt ist ein Dendrogramm aller bisher bekannten Mitglieder der Familie der Kinasen G Protein-gekoppelter Rezeptoren. Die Daten, die dem Dendrogramm zu Grunde liegen wurden mit Hilfe des Programms Omiga™ 2.0 (Clustal W-Algorithmus) berechnet, die Darstellung des Dendrogramms erfolgte mit dem Programm TreeView 1.6.6.

3.2 Analyse der mRNA-Expression von xGRK4, 5 und 6 in Embryonen und Geweben adulter Tieren von *Xenopus laevis*

Zur räumlichen und zeitlichen Analyse der mRNA-Expression der xGRK4, xGRK5 und xGRK6 in *Xenopus laevis* wurden *reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) Analysen und/oder *Whole-mount-in-situ*-Hybridisierungen mit Embryonen und Geweben adulter Tiere durchgeführt. Mit Hilfe dieser Experimente sollte ermittelt werden, wo und in welchen Embryonalstadien und in welchen Organen adulter Tiere Transkripte

von xGRK4, xGRK5 und xGRK6 auftreten. Für die Unterscheidung der drei Rezeptorkinasen in den RT-PCR-Experimenten wurden dazu zunächst spezifische Oligonukleotide generiert und ihre Spezifität in Kontrollversuchen überprüft.

3.2.1 Untersuchung zur Spezifität der in den RT-PCR-Analysen verwendeten Oligonukleotide

Um die Spezifität der in den RT-PCR-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide zu gewährleisten, wurden zunächst die cDNA-Fragmente kloniert, die von diesen Oligonukleotiden in der RT-PCR generiert werden. Das so gewonnene xGRK4-Fragment umfasst 760 bp (Nukleotid 425-1185), das xGRK5-Fragment entspricht 1053 bp (Nukleotide 1-1053) und das xGRK6-Fragment ist 365 bp lang (Nukleotide 1894-2259). Mit diesen Plasmid-cDNAs wurden im Anschluss RT-PCR-Experimente mit den xGRK4-spezifischen Oligonukleotiden RTxGRK4-1 und RTxGRK4-2 (60° C *annealing*-Temperatur), den xGRK5-spezifischen RT-PCR- Oligonukleotide RTxGRK5-1 und RTxGRK5-2 (60° C *annealing*-Temperatur) und den xGRK6-spezifischen RT-PCR-Oligonukleotide RTxGRK6-1 und RTxGRK6-2 (64° C *annealing*-Temperatur) mit jeweils 28 Zyklen durchgeführt. Den jeweiligen Reaktionsansätzen waren zuvor 0,1 ng, 1 ng und 10 ng Plasmid-DNA der isolierten xGRK4-, xGRK5- und xGRK6-Fragmente zugegeben worden, so dass für jedes Oligonukleotidpaar Reaktionsansätze mit drei verschiedenen Plasmid-DNAs in jeweils drei Konzentrationen vorlagen. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferriert und mit Hilfe einer ^{32}P-markierten xGRK4- (Nukleotide 425-1185), xGRK5- (Nukleotide 1-1053) oder xGRK6 entsprechenden Sonde (Nukleotide 1894-2259) nachgewiesen. Die in Abb. 9 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass selbst bei Einsatz von geringen Mengen an Plasmid-DNA mit den gewählten Oligonukleotidpaaren spezifische PCR-Produkte nachzuweisen waren und dass auch bei hohen Konzentrationen keine oder nur wenige unspezifische Produkte auftraten (mittlere Spuren).

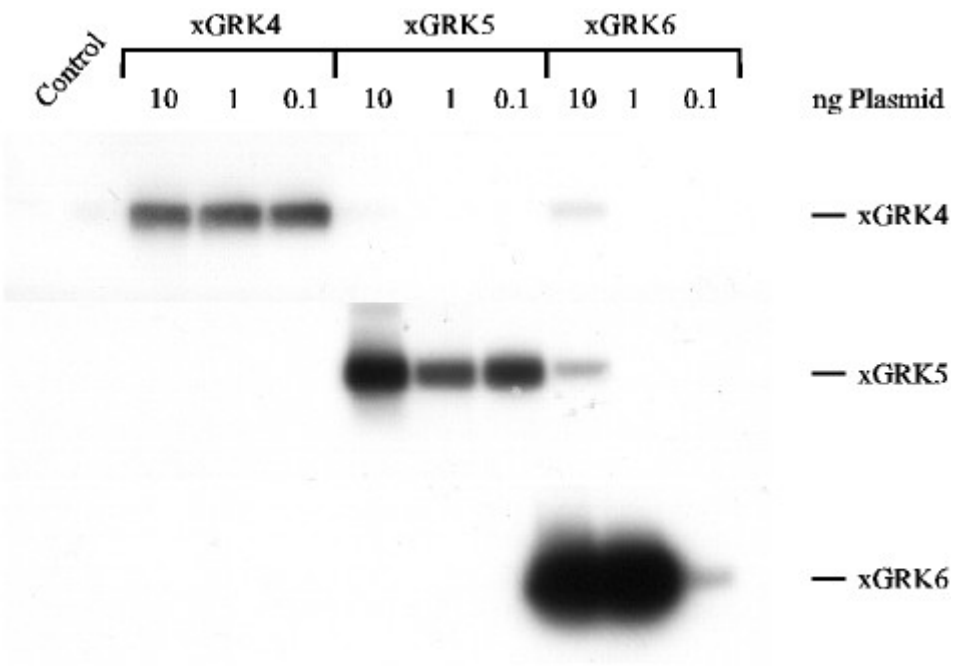


Abb. 9: Vergleich der Spezifität der in Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) Experimenten verwendeten Oligonukleotide von aus *Xenopus laevis* stammenden Kinasen G Protein-gekoppelter Rezeptoren (xGRK).

Drei xGRK4-, xGRK5- und xGRK6-kodierende Fragmente wurden in absteigenden Konzentrationen (10 ng, 1 ng, 0,1 ng) in jeweils drei RT-PCR-Reaktionsansätze mit jeweils einem der drei spezifischen Oligonukleotidpaare eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferriert und mit Hilfe einer ^{32}P-markierten xGRK4, xGRK5 oder xGRK6 entsprechenden Sonde nachgewiesen.

3.2.2 RT-PCR Analysen zur Untersuchung der xGRK-Expression in Embryonalstadien von *Xenopus laevis*

Um den zeitlichen Verlauf der Expression von xGRK4, xGRK5 und xGRK6 in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* zu untersuchen, wurde RNA aus Embryonen unterschiedlicher Embryonalstadien gewonnen, mittels der Reversen-Transkriptase in cDNA überschrieben und im Anschluss in semiquantitativen RT-PCR-Analysen mit den spezifischen Oligonukleotidpaaren eingesetzt. Die dazu notwendigen Embryonen wurden nach dem von Nieuwkoop und Faber [81] beschriebenen Merkmalen in Enwicklungsstadien (Stadium 2 bis Stadium 45) eingeteilt. Die mRNA von Embryonen von 13 verschiedenen Entwicklungsstadien wurde untersucht. Um einen Vergleich der RNA-Expressionstärken in den verschiedenen Embryonalstadien zu ermöglichen, wurde

die Menge der einzusetzenden cDNA anhand der Ergebnisse einer mit Histon H4-spezifischen Oligonukleotiden von *Xenopus laevis* (xHiston) durchgeführten RT-PCR angeglichen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass sich die mRNA Expression von Histon H4 im Verlauf der Embryonaldifferenzierung nicht ändert. Die RT-PCR-Experimente wurden mit den für die xGRK4 spezifischen RT-PCR-Primern RTxGRK4-1 und RTxGRK4-2 (60° C *annealing*-Temperatur), den für die xGRK5 spezifischen RT-PCR-Primern RTxGRK5-1 und RTxGRK5-2 (60° C *annealing*-Temperatur) und den für die xGRK6 spezifischen RT-PCR-Primern RTxGRK6-1 und RTxGRK6-2 (64° C *annealing*-Temperatur), sowie den xHiston-Primern Histon A und Histon B (54° C *annealing*-Temperatur) mit jeweils 28 Zyklen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferriert und mit Hilfe einer ^{32}P-markierten xGRK4- (Nukleotide 425-1185), xGRK5- (Nukleotide 1-1053), xGRK6- (Nukleotide 1894-2259) oder xHiston-H4 Sonde (Nukleotide 1491-1679, EMBL/GenBank accession no. X03017) nachgewiesen (Abb 10-12). Die in Abb. 10 dargestellten Ergebnisse zeigen eine schwache Expression der xGRK4-mRNA im Embryonalstadium 2 (obere Reihe). Im Gegensatz dazu wurden in den weiteren untersuchten Entwicklungsstadien bis zum Embryonalstadium 18 keine xGRK4-Transkripte nachgewiesen. Erst in Embryonen des Stadiums 18 wurde wiederum eine Zunahme der xGRK4 mRNA-Expression beobachtet, die in Embryonen des Stadiums 20 einen Höhepunkt erreicht, um dann bis zum Stadium 28 abzufallen. Mit Beginn des Stadiums 31 wurde eine erneute starke Zunahme der nachweisbaren xGRK4-Transkripte in den Embryonen beobachtet, die in den weiteren untersuchten Entwicklungsstadien auf diesem hohen Niveau verblieb und in Embryonen des Stadiums 40 ein deutliches Maximum zeigte. Die beobachteten Unterschiede waren nur zu einem geringen Anteil auf Schwankungen in den eingesetzten cDNA Mengen zurückzuführen, wie die zur Kontrolle durchgeführten Experimente mit Histon H4-spezifischen Oligonukleotiden zeigten (Abb. 10, untere Reihe).

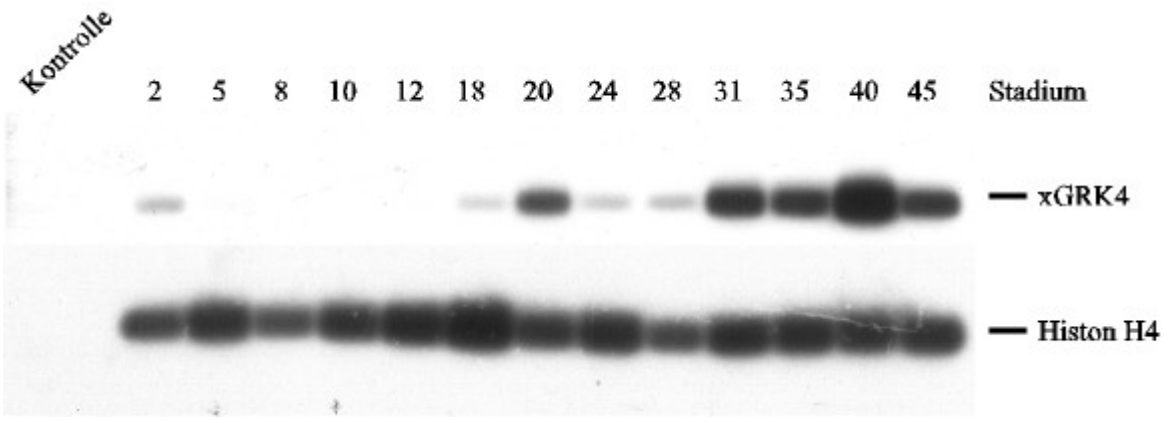


Abb. 10: Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) Analysen der Kinase G Protein-gekoppelter Rezeptoren 4 aus *Xenopus laevis* messenger Ribonukleinsäure (xGRK4-mRNA-)Expression in Embryonalstadien von *Xenopus laevis*. mRNA wurde aus verschiedenen Embryonalstadien (Stadien 2-45) von *Xenopus laevis* isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese diente dann als Matrize für RT-PCR-Analysen mit xGRK4-spezifischen Oligonukleotiden (obere Reihe). Zur Kontrolle wurde eine RT-PCR mit xHiston H4-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt (untere Reihe). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einem ^{32}P-radioaktiv markierten xGRK4- (Nukleotide 425-1185) oder xHiston H4-cDNA-Fragment (Nukleotide 1491-1679, EMBL/GenBank accession no. X03017) hybridisiert. Die Autoradiogramme der Hybridisierungen sind abgebildet. Als Kontrolle wurde eine PCR-Reaktion ohne Zusatz einzelsträngiger Matrizen-cDNA durchgeführt (Kontrolle).

Die in Abb. 11 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch bei xGRK5 wiederum eine schwache Expression im Embryonalstadium 2 nachzuweisen war. In den Embryonen der folgenden Entwicklungsstadien 5-12 wurden dagegen keine Transkripte detektiert. Im Gegensatz dazu war ein starker Anstieg der xGRK5 mRNA-Expression in Embryonalstadium 18 zu beobachten; dieser Anstieg war in Embryonen des Stadiums 20 erstaunlicherweise vollständig verschwunden. In Embryonen der Stadien 28 und 31 wurden keine und in den Embryonen der Stadien 24, 35-45 nur geringe Mengen an xGRK5-Transkripten nachgewiesen. Wiederum waren die beobachteten Unterschiede in der Transkription nur zu einem geringen Anteil auf Schwankungen in den eingesetzten cDNA Mengen zurückzuführen, wie die zur Kontrolle durchgeführten Experimente mit Histon H4-spezifischen Oligonukleotiden zeigten (Abb. 11, untere Reihe).

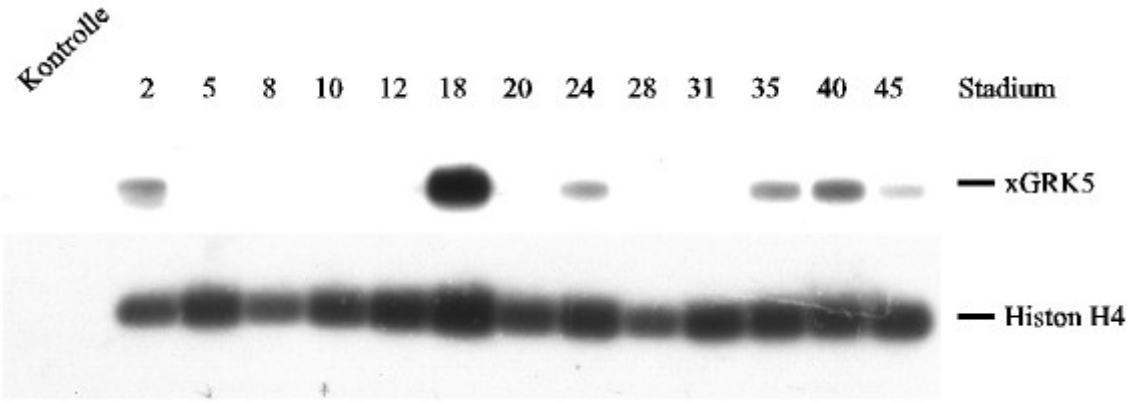


Abb. 11: Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) Analysen der Kinase G Protein-gekoppelter Rezeptoren 5 aus *Xenopus laevis* messenger Ribonukleinsäure (xGRK5-mRNA-)Expression in Embryonalstadien von *Xenopus laevis*. mRNA wurde aus verschiedenen Embryonalstadien (Stadien 2-45) von *Xenopus laevis* isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese diente dann als Matrize für RT-PCR-Analysen mit xGRK5-spezifischen Oligonukleotiden (obere Reihe). Zur Kontrolle wurde eine RT-PCR mit xHiston H4-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt (untere Reihe). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einem ^{32}P-radioaktiv markierten xGRK5- (Nukleotide 1-1053) oder xHiston H4-cDNA-Fragment (Nukleotide 1491-1679, EMBL/GenBank accession no. X03017) hybridisiert. Die Autoradiogramme der Hybridisierungen sind abgebildet. Als Kontrolle wurde eine PCR-Reaktion ohne Zusatz einzelsträngiger Matrizen-cDNA durchgeführt (Kontrolle).

Die Untersuchungen zur Expression der mRNA von xGRK6 sind in Abb. 12 dargestellt (obere Reihe). Die Ergebnisse zeigen, dass auch für xGRK6 Transkripte im Embryonalstadium 2 und darüber hinaus in Embryonen des Stadiums 5 nachzuweisen waren. Wiederum wurde ein starker Anstieg von xGRK6 Transkripten in Embryonen des Stadiums 18 beobachtet. Dagegen wurde nur wenig mRNA in Embryonen des Stadiums 24 und keine RNA in Embryonen des Stadiums 20 sowie der Stadien 28-45 nachgewiesen. Wie in den vorausgegangenen Versuchen waren die beobachteten Unterschiede in der Transkription von xGRK6 nur zu einem geringen Anteil auf Schwankungen in den eingesetzten cDNA Mengen zurückzuführen, wie die Kontrollexperimente mit Histon H4-spezifischen Oligonukleotiden zeigten (Abb. 12, untere Reihe).

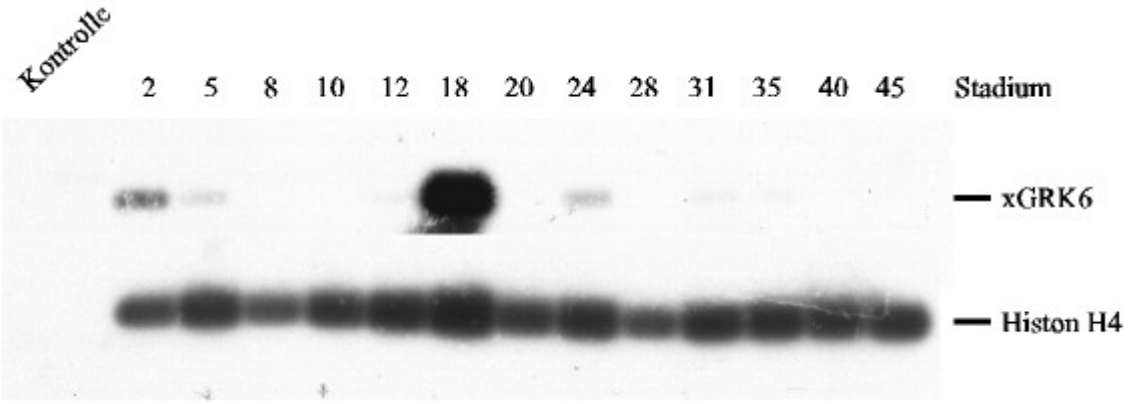


Abb. 12: Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) Analysen der Kinase G Protein-gekoppelter Rezeptoren 6 aus *Xenopus laevis* messenger Ribonukleinsäure (xGRK6-mRNA-)Expression in Embryonalstadien von *Xenopus laevis*. mRNA wurde aus verschiedenen Embryonalstadien (Stadien 2-45) von *Xenopus laevis* isoliert, in cDNA umgeschrieben und die cDNA diente dann als Matrize für RT-PCR-Analysen mit xGRK6-spezifischen Oligonukleotiden (obere Reihe). Zur Kontrolle wurde eine RT-PCR mit xHiston H4-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt (untere Reihe). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einem ^{32}P-radioaktiv markierten xGRK6- (Nukleotide 1894-2259) oder xHiston H4-cDNA-Fragment (Nukleotide 1491-1679, EMBL/GenBank accession no. X03017) hybridisiert. Die Autoradiogramme der Hybridisierungen sind abgebildet. Als Kontrolle wurde eine PCR-Reaktion ohne Zusatz einzelsträngiger Matrizen-cDNA durchgeführt (Kontrolle).

3.2.3 RT-PCR-Analysen zur Untersuchung der xGRK-Expression in Geweben von *Xenopus laevis*

Neben der Analyse der Expression der mRNA von xGRKs in Embryonen von *Xenopus laevis*, sollte auch die Menge an xGRK-Transkripten in Geweben adulter Tiere untersucht werden. Dazu wurden die Gewebe mit Hilfe eines Ultra Turrax-Homogenisators in TRIzol® zerkleinert, die Gesamt-RNA isoliert und diese mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die so gewonnene cDNA wurde dann in RT-PCR-Analysen mit den bereits beschriebenen xGRK4-, xGRK5- oder xGRK6-spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt (s. Kapitel 3.2.1). Um einen semiquantitativen Vergleich der RNA-Expression in den verschiedenen Geweben zu ermöglichen, wurde die Menge der einzusetzenden cDNA wiederum entsprechend der mit xHiston H4-spezifischen Oligonukleotiden ermittelten

Expression angeglichen. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einem ^{32}P-radioaktiv markierten xGRK4- (Nukleotide 425-1185), xGRK5- (1- 1053) oder xGRK6- (Nukleotide 1894-2259) oder xHiston H4-cDNA-Fragment (Nukleotide 1491-1679, EMBL/GenBank accession no. X03017) hybridisiert. Die in Abb. 13 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass xGRK4-Transkripte in der Leber, der Niere, dem Herz, den Hoden und dem Muskel nachzuweisen waren. Eine geringere xGRK4-Expression wurde im Gehirn, in der Lunge und im Magen beobachtet. In der Haut ließen sich keine xGRK4-Transkripte nachweisen. Das Verteilungsmuster der xGRK4-mRNA weicht von dem der bekannten GRK4-Varianten von Säugetieren ab, bei welchen ein allgemein schwaches Expressionssmuster in vielen Geweben und eine starke Expression der entsprechenden mRNA aber bisher nur aus Hodengewebe beobachtet wurde [98, 2, 108].

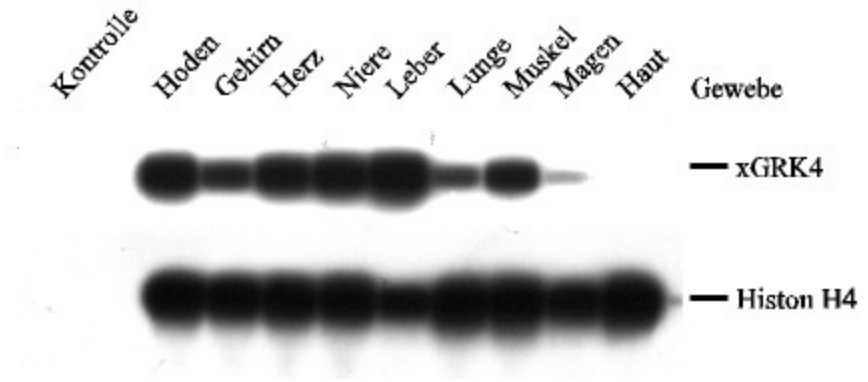


Abb. 13: Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) Analysen der Kinase G Protein-gekoppelter Rezeptoren 4 aus *Xenopus laevis* messenger Ribonukleinsäure (xGRK4-mRNA-)Expression in Geweben von *Xenopus laevis*. mRNA wurde aus verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis* isoliert, in cDNA umgeschrieben und die cDNA diente dann als Matrize für RT-PCR-Analysen mit xGRK4-spezifischen Oligonukleotiden (obere Reihe). Zur Kontrolle wurde eine RT-PCR mit xHiston H4-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt (untere Reihe). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einem ^{32}P-radioaktiv markierten xGRK4- (Nukleotide 425-1185) oder xHiston H4-cDNA-Fragment (Nukleotide 1491-1679, EMBL/GenBank accession no. X03017) hybridisiert. Die Autoradiogramme der Hybridisierungen sind abgebildet. Als Kontrolle wurde eine PCR-Reaktion ohne Zusatz einzelsträngiger Matrizen-cDNA durchgeführt (Kontrolle).

Mittels der RT-PCR-Analysen wurde xGRK5-mRNA in großen Mengen in der Leber und dem Herz, sowie in etwas geringeren Mengen im Hoden nachgewiesen (Abb. 14). In der Niere und im Muskelgewebe wurde nur eine schwache Expression beobachtet. Keine Expression von xGRK5-mRNA zeigte sich dagegen im Gehirn, der Haut, der Lunge und im Magen. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich vom Verteilungsmuster der GRK5-mRNA im Menschen. Kunapuli und Benovic [55] beobachtete die höchsten Konzentrationen an GRK5-Transkripten im Gehirn und im Muskeln, gefolgt von Pankreas, Herz, Lunge, Plazenta, Nieren und schließlich mit der schwächsten Expression in der Leber.

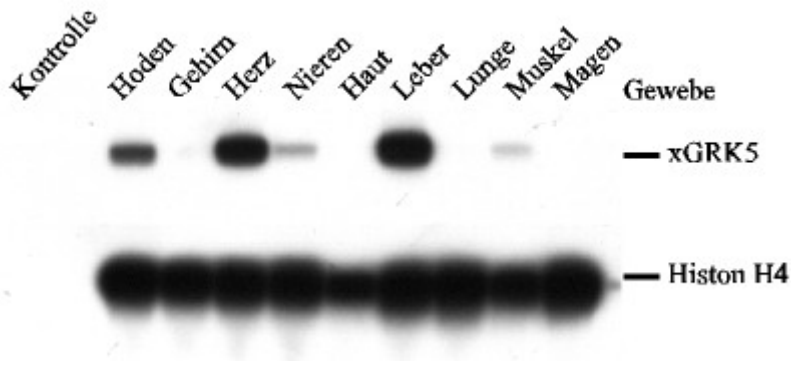


Abb. 14: Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) Analysen der Kinase G Protein-gekoppelter Rezeptoren 5 aus *Xenopus laevis* messenger Ribonukleinsäure (xGRK5-mRNA-)Expression in Geweben von *Xenopus laevis*. mRNA wurde aus verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis* isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese diente dann als Matrize für RT-PCR-Analysen mit xGRK5-spezifischen Oligonukleotiden (obere Reihe). Zur Kontrolle wurde eine RT-PCR mit xHiston H4-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt (untere Reihe). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einem ^{32}P-radioaktiv markierten xGRK5- (Nukleotide 1-1053) oder xHiston H4-cDNA-Fragment (Nukleotide 1491-1679, EMBL/GenBank accession no. X03017) hybridisiert. Die Autoradiogramme der Hybridisierungen sind abgebildet. Als Kontrolle wurde eine PCR-Reaktion ohne Zusatz einzelsträngiger Matrizen-cDNA durchgeführt (Kontrolle).

Das Expressionsmuster der xGRK6-mRNA ist in Abb. 15 dargestellt. Zahlreiche xGRK6-Transkripte wurden im Hoden, im Herz, im Muskel und in der Niere nachgewiesen. Eine

etwas schwächere xGRK6-mRNA Expression zeigte sich im Gehirn und in der Lunge. Keine Expression wurde in der Haut, in der Leber und im Magen nachgewiesen.

Abb. 15: Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) Analysen der Kinase G Protein-gekoppelter Rezeptoren 6 aus *Xenopus laevis* messenger Ribonukleinsäure (xGRK6-mRNA-)Expression in Embryonalstadien von *Xenopus laevis*. mRNA wurde aus verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis* isoliert, in cDNA umgeschrieben und die cDNA diente dann als Matrize für RT-PCR-Analysen mit xGRK6-spezifischen Oligonukleotiden (obere Reihe). Zur Kontrolle wurde eine RT-PCR mit xHiston H4-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt (untere Reihe). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einem ^{32}P-radioaktiv markierten xGRK6- (Nukleotide 1894-2259) oder xHiston H4-cDNA-Fragment (Nukleotide 1491-1679, EMBL/GenBank accession no. X03017) hybridisiert. Die Autoradiogramme der Hybridisierungen sind abgebildet. Als Kontrolle wurde eine PCR-Reaktion ohne Zusatz einzelsträngiger Matrizen-cDNA durchgeführt (Kontrolle).

3.2.4 *Whole-mount-in-situ*-Hybridisierung zur Analyse der xGRK4-mRNA-Expression in Embryonen von *Xenopus laevis*

Um die räumliche Verteilung von xGRK4-Transkripten in den sich entwickelten Embryonen zu ermitteln, wurden *Whole-mount-in-situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Als Vorlage für die Synthese von xGRK4-spezifischer antisense RNA diente ein *ca.* 1,8 kbp großes Fragment der xGRK4-cDNA (Nukleotide: 1-1825). Die in Abb. 16 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Transkripte in Embryonen des Stadiums 21/22 insbesondere in der Region der Gehirnanlage und der Neuralleiste nachzuweisen waren. In späteren Embryonalstadien (28-34) wurde xGRK4-mRNA ebenfalls im sich differenzierenden

Gehirn, in den Augenanlagen, den Ohrvesikeln und in den Branchialbögen angefärbt. In Embryonen des Stadiums 28 ist die vermehrte Expression von xGRK4-Transkripten in den Somiten besonders gut zu erkennen.

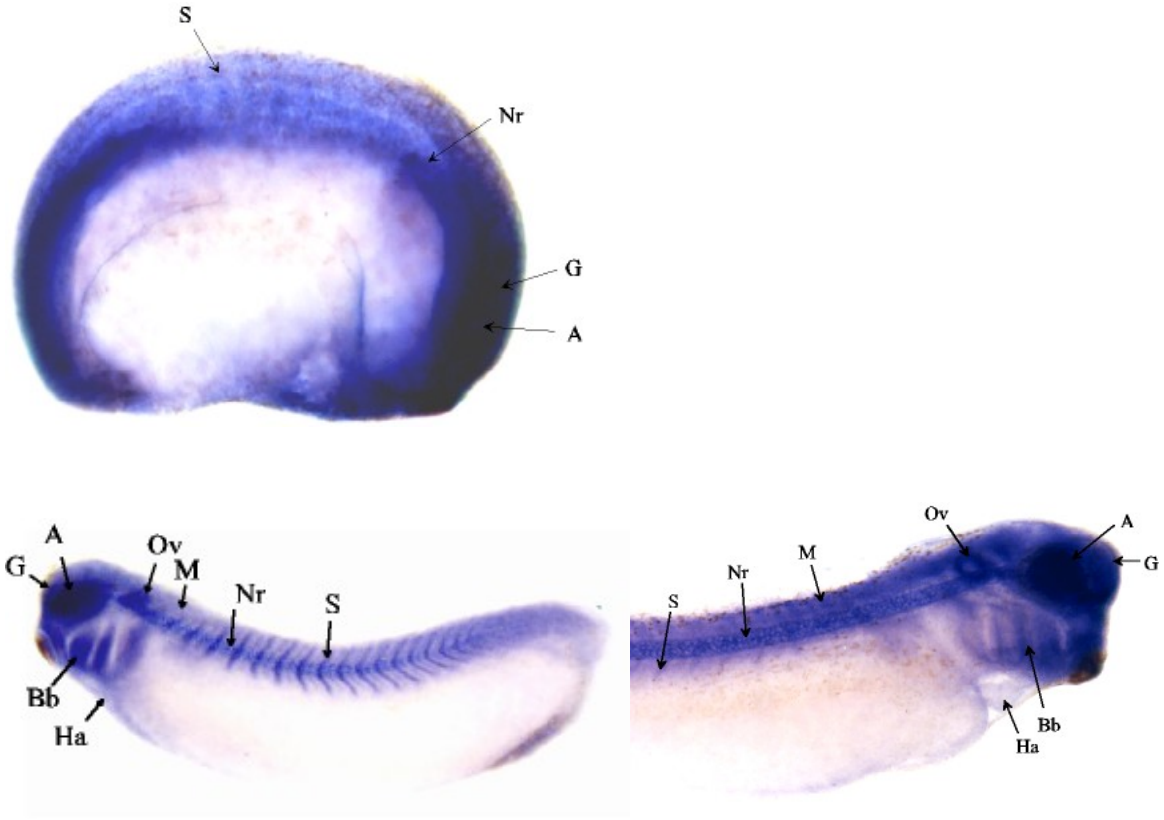


Abb. 16: *Whole-mount-in-situ*-Hybridisierung zur Analyse der Kinase G Protein-gekoppelter Rezeptoren 4 messenger Ribonukleinsäure (xGRK4-mRNA-) Expression in Embryonen von *Xenopus laevis*.

Whole-mount-in-situ-Hybridisierung von *Xenopus laevis* Embryonen. Dargestellt sind drei Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Das erste Bild zeigt einen Embryo des Stadiums 21/22, darunter sind links ein Embryo des Stadiums 28/29 und rechts der Kopf eines Embryos des Stadiums 33/34 abgebildet. Die Färbung erfolgte mit Digoxigenin-markierter xGRK4 *antisense*-RNA. A, Augenanlage; Bb, Branchialbogen; G, Gehirn; Ha, Herzanlage; M, Muskel; Nr, Neuralrohr; Ov, Ohrvesikel; S, Somit.

3.2.5 Nachweis der Proteinexpression von xGRKs in verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis*

Die große Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von xGRK4, xGRK5 und xGRK6 zu den entsprechenden Vertretern der Wirbeltiere und insbesondere zur Maus ermöglichte

es, einen in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Antikörper gegen die murine GRK6 zur Charakterisierung der Proteinexpression von xGRK-Proteinen in Geweben von *Xenopus laevis* zu verwenden. Der Antikörper ist gegen einen Teil der katalytischen Domäne der murinen GRK6 gerichtet, der in allen GRKs, darunter auch in den drei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten GRKs aus *Xenopus laevis* konserviert ist (Abb. 17).

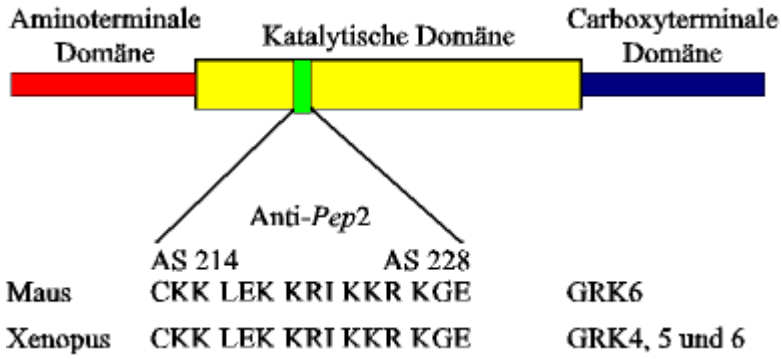


Abb. 17: Schematische Darstellung des vom Anti-*Pep*2 Antikörper erkannten Epitops. Der Antikörper Anti-*Pep*2 ist gegen das Aminosäuresequenzmotiv ^{214}CKKLEKKRIKKRKGE^{228} der katalytischen Domäne der GRK6 der Maus gerichtet. Dieses Sequenzmotiv findet sich auch in den katalytischen Domänen der xGRKs von *Xenopus laevis*.

Da xGRK4, xGRK5 und xGRK6 das vom Anti-*Pep*2 erkannte Aminosäuresequenzmotiv enthalten, ist jedoch eine Zuordnung der Proteinexpression zu den einzelnen GRKs nicht möglich. Die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass GRK-Proteine in größeren Mengen insbesondere im Herzen und in der Leber, sowie im Ovar, in der Haut und im Magen nachzuweisen waren. Eine sehr geringe Expression von xGRK-Proteinen wurde im Muskelgewebe, in der Milz, in der Lunge, im Darm und im Gehirn beobachtet.

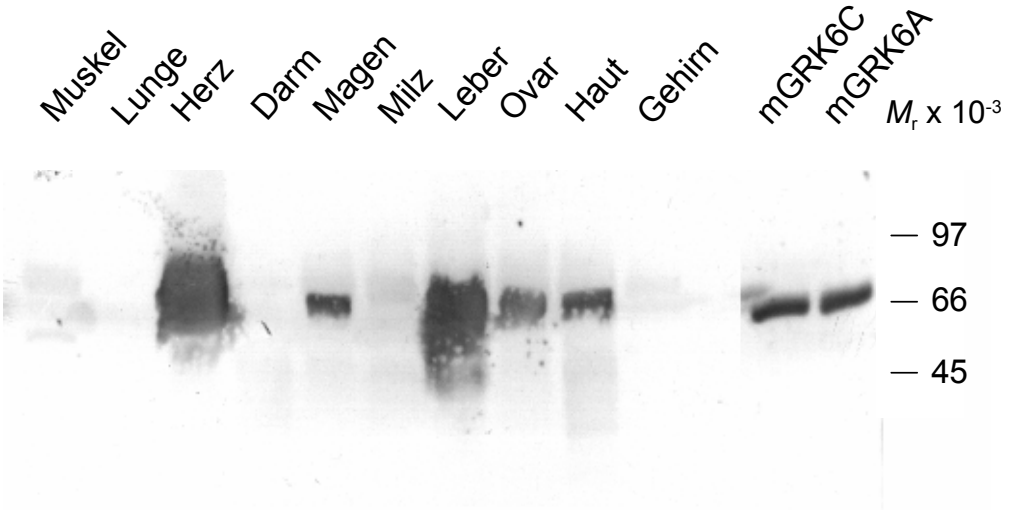


Abb. 18: Proteinexpression der xGRKs in verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis*. Unterschiedliche Gewebe von *Xenopus laevis* wurden homogenisiert, die Zellen aufgeschlossen und die Zellhomogenate durch Zentrifugation in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion getrennt. Ein Aliquot der in der partikulären Fraktion enthaltenen Proteine (50 µg/Spur) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt [10% SDS-PAGE (m/V)], die Proteine wurden auf Nitrocellulosemembranen transferiert und xGRK6-Proteine mit einem Antikörper gegen das Peptid *Pep*2 detektiert. Gereinigte murine GRK6-Proteine dienten als Kontrolle.

3.2.6 Expression von rekombinant hergestellter xGRK6 in Insektenzellen

Da GRK6 in *Xenopus laevis* trotz der ausgeprägten Homologie der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen ein weniger ausgeprägtes Verteilungsmuster sowohl in den Geweben adulter Tiere als auch in der embryonalen Entwicklung zeigte, als die bisher näher betrachteten Vertreter der GRK6 sollte das Phosphorylierungsverhalten von xGRK6 in Rhodopsin- und Phosvitin-Phosphorylierungsassays mit der in unserer Arbeitsgemeinschaft bekannten mGRK6C verglichen werden. Hierzu wurden zunächst xGRK6 und mGRK6C mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems in *Sf*9- und H5-Insektenzellen exprimiert und das rekombinante Protein anschließend mittels biochemischer Methoden charakterisiert. Um die cDNA für die rekombinanten xGRK6-Viren zu generieren, wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease BamHI ein etwa 1900

Bp großes cDNA-Fragment aus dem vorhandenen Konstrukt pBluescript™ II SK(-)/ xGRK6 ausgeschnitten und nach Extraktion aus dem 1 % (m/V) Agarosegel in den linearisierten dephosphorylierten pVL1393 ligiert. Die erhaltenen xGRK6/pVL1393 Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung kontrolliert. Analog war zuvor bereits mit dem mGRK6C-Fragment verfahren worden.

Zur Expression in *Sf*9-Insektenzellen bzw. H5-Zellen wurden im Anschluss xGRK6-kodierende rekombinante Baculoviren generiert. Dazu wurden Insektenzellen mit der cDNA xGRK6/pVL1393-cDNA in Anwesenheit von Baculovirus-DNA transfiziert und die durch homologe Rekombination generierten Baculoviren bis zu einem geeigneten Titer amplifiziert. Im Anschluss wurden *Sf*9- oder H5-Zellen mit den Baculoviren infiziert und die Protein-exprimierenden Zellen nach 48 h mit einem 250 mM NaCl-enthaltenden Extraktionspuffer aufgeschlossen. Bei dieser Salzkonzentration sollte es möglich sein, den Teil der durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran haftenden überexprimierten Rezeptorkinasen abzulösen. Die löslichen (300000 x *g* Überstand) bzw. die partikulären Fraktionen der infizierten Zellen wurden über SDS-PAGE auf einem 10% (m/V) Acrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit dem gegen die katalytische Domäne gerichteten Antikörper Anti-*Pep-2* detektiert (siehe Abb. 19). Die in Abbildung 19 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl in den Überständen der aus *Sf*9-Zellen als auch aus H5-Zellen gewonnen Extrakte Proteine mit einem der murinen mGRK6C-ähnlichen molekularen Masse nachzuweisen waren. Es zeigte sich jedoch, dass sich in den Extrakten von Baculovirus-infizierten *Sf*9-Zellen wesentlich mehr rekombinantes Protein befand.

Da in den mit xGRK6-kodierenden Baculoviren infizierten *Sf*9-Zellen mehr Protein in der löslichen Fraktion nachzuweisen war als in infizierten H5-Zellen, wurden für die Produktion größerer Mengen der xGRK6 *Sf*9-Insektenzellen verwendet. Um für die Aufreinigung eine ausreichende Mengen an Ausgangsmaterial zu produzieren, wurden 400 ml *Sf*9-Schüttelkultur (im Fernbachkolben) mit xGRK6-kodierenden Baculoviren infiziert. Um später die Reinigung der xGRK6-Proteine mit der Reinigung von mGRK6C-Proteinen vergleichen zu können, wurde eine entsprechende mit mGRK6-kodierenden Baculoviren infizierte Suspensionskultur hergestellt. Die in den 300.000 x *g* Überständen der jeweiligen Zelllysate enthaltenen rekombinanten xGRK6 und mGRK6 wurden zunächst an einer Sepharose-Matrix aufgereinigt (5 ml HiTrap-Sepharose-Matrix, Äkta-System) und die in

den Fraktionen um den Elutionspeak (300-450 mM NaCl) enthaltenen Proteine analysiert. In Abb. 20 ist das Chromatogramm der Reinigung von xGRK6 und in Abb. 21 ist das Chromatogramm der Reinigung von mGRK6 abgebildet.

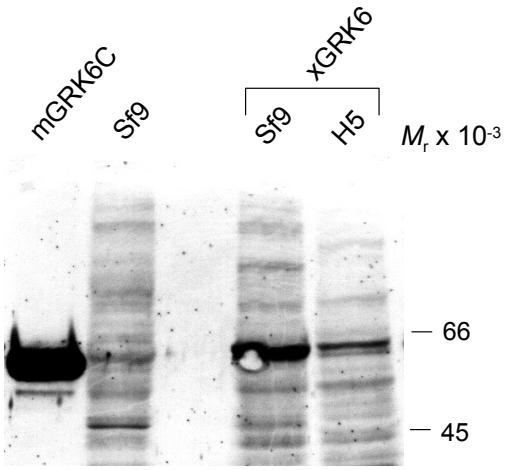
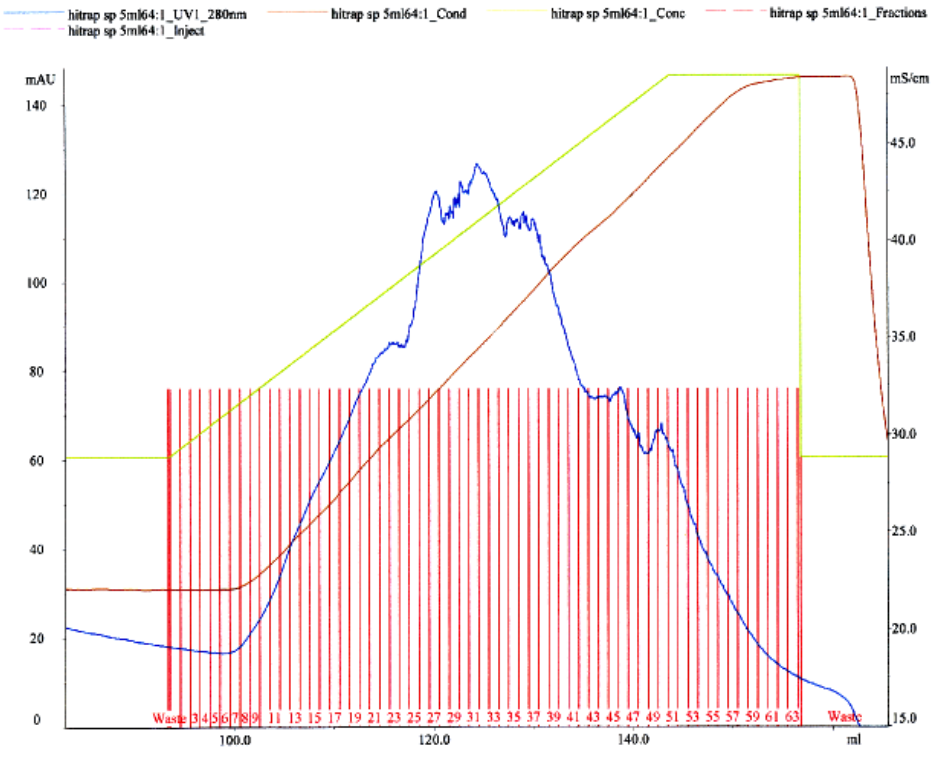


Abb. 19: Proteinexpression von mGRK6C und xGRK6 in *Sf*9- und H5-Insektenzellen. *Sf*9-Zellen bzw. H5-Zellen wurden mit mGRK6-kodierenden bzw. xGRK6-kodierenden Baculoviren infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen aufgeschlossen und das Zelllysat durch Zentrifugation in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion separiert. Die in der löslichen Fraktion enthaltenen Proteine wurden in einem 10 %igem (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot unter Verwendung des Anti-*Pep2*-Antikörpers analysiert.



A

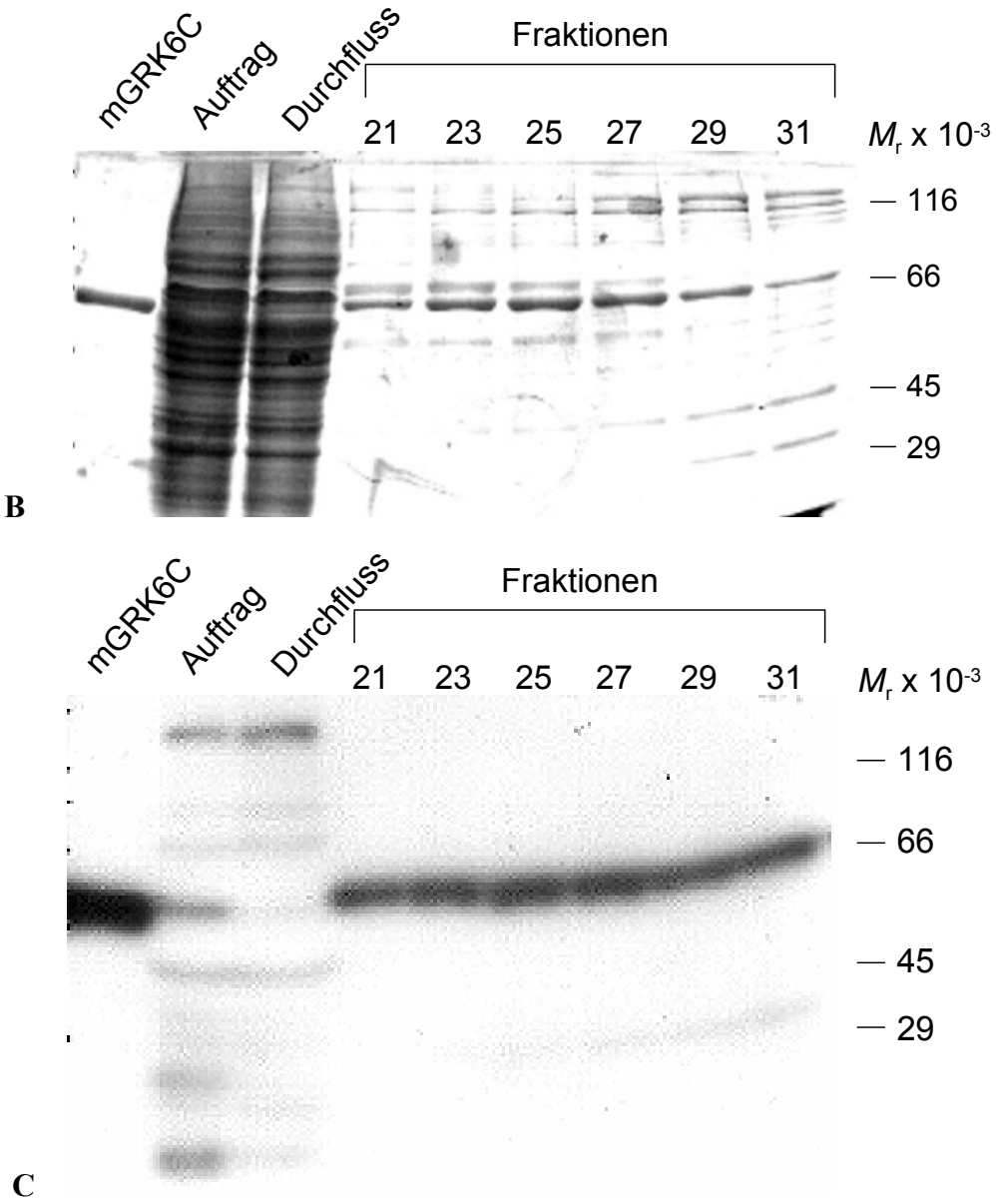
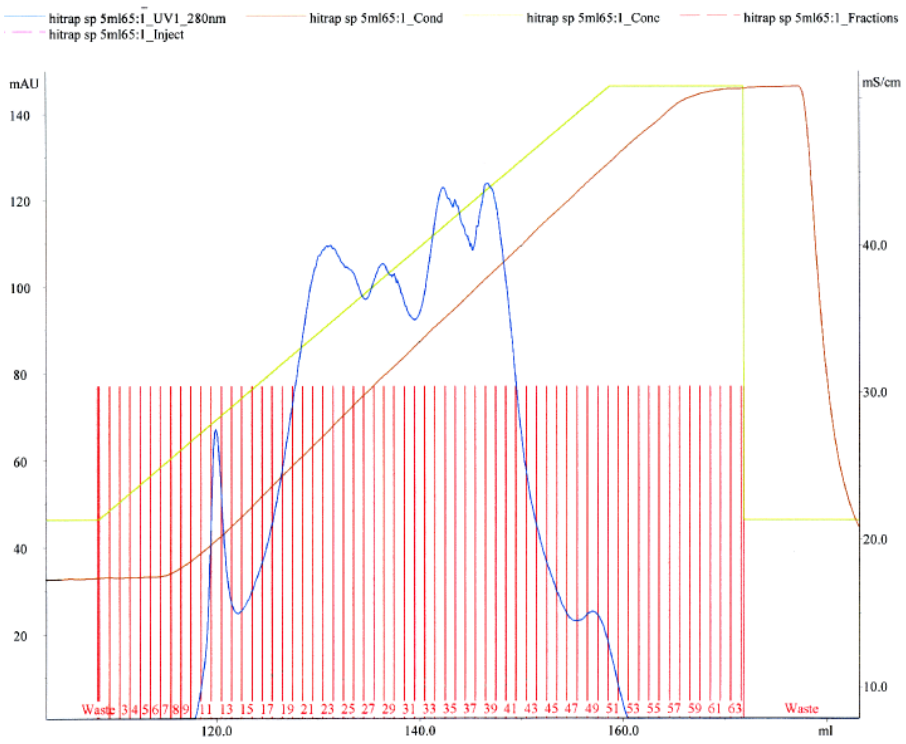


Abb. 20: Säulenchromatographische Aufreinigung der rekombinanten xGRK6 an einer HiTrap® SP-Sepharose-Matrix. A) Die mit xGRK6C-Baculoviren-infizierten *Sf*9-Insektenzellen wurden aufgeschlossen, der Extrakt durch differentielle Zentrifugation in eine lösliche und partikuläre Fraktion separiert und die in der löslichen Fraktion erhaltenen Proteine an einer HiTrap® SP-Sepharose-Matrix chromatographisch aufgetrennt (Äkta-System; Gradient 150-500 mM NaCl, Flussrate 1 ml/min, Fraktionsgröße 0,5 ml). **B)** Die in den Fraktionen um den Elutionspeak enthaltenen Proteine (Fraktionen 21-31) wurden in einem 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, oder **C)** auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit dem Anti-*Pep2*-Antikörper nachgewiesen. Als Referenz diente chromatographisch gereinigtes mGRK6C-Protein. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage der Molekulargewichtsstandards sind eingezeichnet.

A)



B)

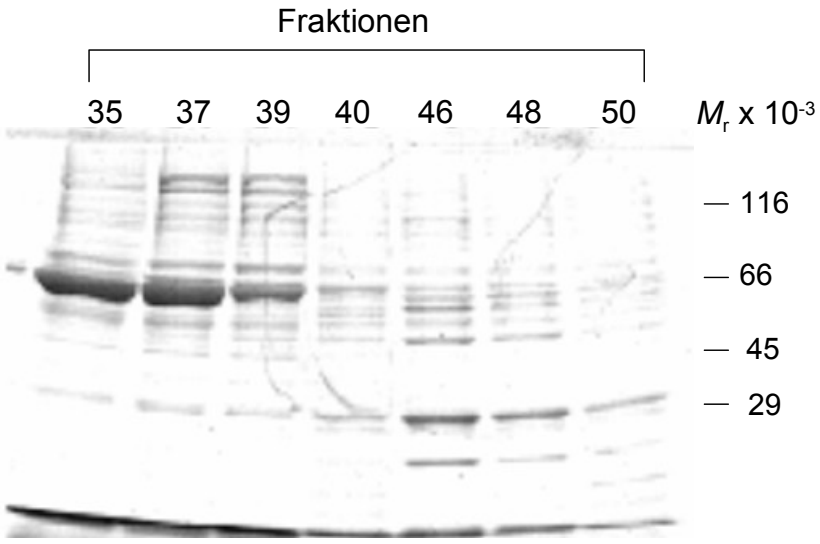
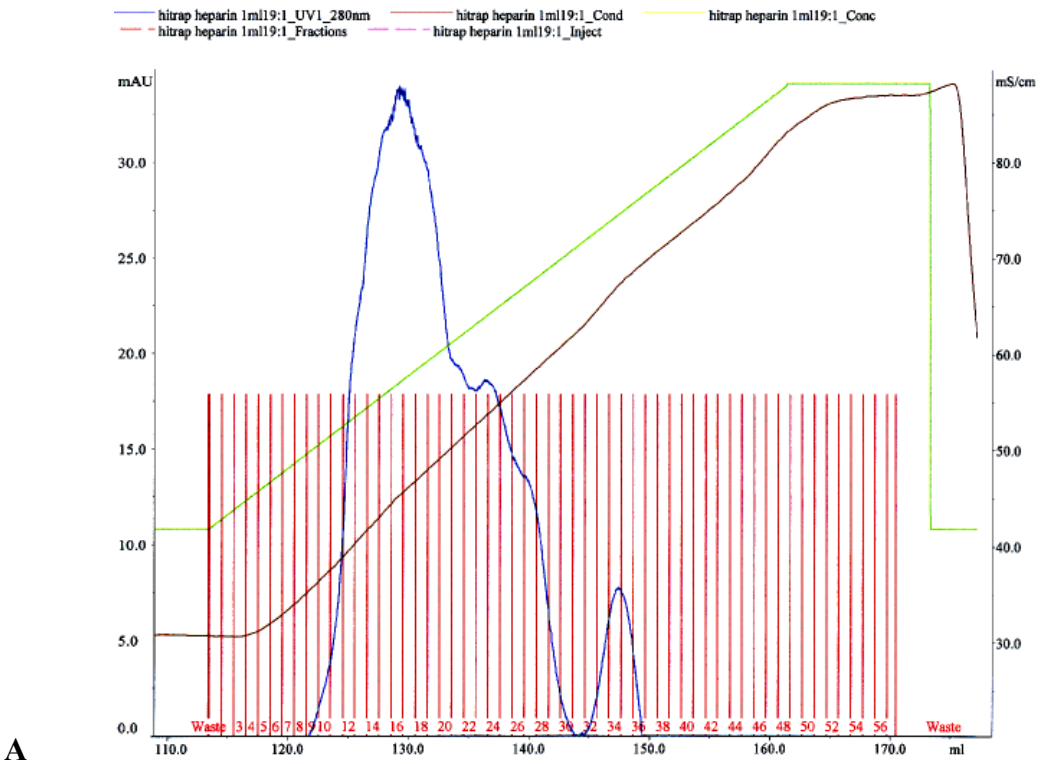


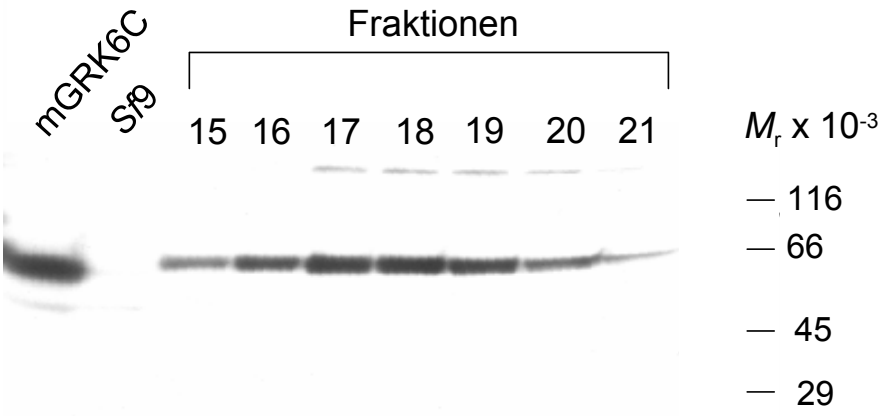
Abb. 21: Säulenchromatographische Aufreinigung der rekombinanten mGRK6C an einer HiTrap® SP-Sepharose-Matrix. A) Die mit mGRK6C-Baculoviren-infizierten *Sf*9-Insektenzellen wurden aufgeschlossen, der Extrakt durch differentielle Zentrifugation in eine lösliche und partikuläre Fraktion separiert und die in der löslichen Fraktion erhaltenen Proteine an einer HiTrap® SP-Sepharose-Matrix chromatographisch aufgetrennt (Äkta-System; Gradient 150-500 mM NaCl, Flussrate 1 ml/min, Fraktionsgröße 0,5 ml). **B)** Die in den Fraktionen um die Elutions-*peaks* enthaltenen Proteine (Fraktionen 35-50) wurden in einem 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage der Molekulargewichtsstandards sind eingezeichnet.

Die in Abb. 20 und Abb. 21 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich sowohl aus den Lysaten der mit xGRK6-Baculoviren-infizierten Zellen, als auch aus den Lysaten der mit mGRK6-Baculoviren infizierten Zellen, Proteine anreichern ließen. Den Chromatogrammen ist zu entnehmen, dass der Hauptteil der gebundenen Proteine bei einer NaCl-Konzentration von 300-450 mM NaCl im Elutionspuffer eluierte. Um zu untersuchen, ob es sich bei den eluierten Proteinen um die rekombinanten Proteine xGRK6 und mGRK6C handelte, wurden die Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau gefärbt bzw. *Western blot*-Analysen durchgeführt (siehe Abb. 20 und Abb. 21). Die Untersuchungen zeigten, dass sich in beiden Fällen Proteine mit molekularen Massen von *ca.* 66 kDa nachweisen ließen. Die Analysen zeigten darüber hinaus, dass die xGRK6-Proteine erst bei höheren Konzentrationen an NaCl (400-450 mM -xGRK6- *versus* 300-400 mM -mGRK6) und über einen deutlich breiteren Bereich eluierten.

Da in den von der Sepharose-Matrix eluierten Fraktionen neben den gesuchten Proteinen weitere enthalten waren, wurde ein zweiter Reinigungsschritt unter Verwendung einer Heparin-Sepharose-Matrix durchgeführt. Dazu wurden die in den Fraktionen um die jeweiligen *peaks* der vorausgegangenen Reinigung enthaltenen Proteine vereinigt und an einer HiTrap Heparin-Sepharose-Matrix chromatographiert (Abb. 3.18 und 3.19). Die eluierten Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert und eine *Western blot*-Analyse mit dem Anti-*Pep2*-Antikörper durchgeführt.

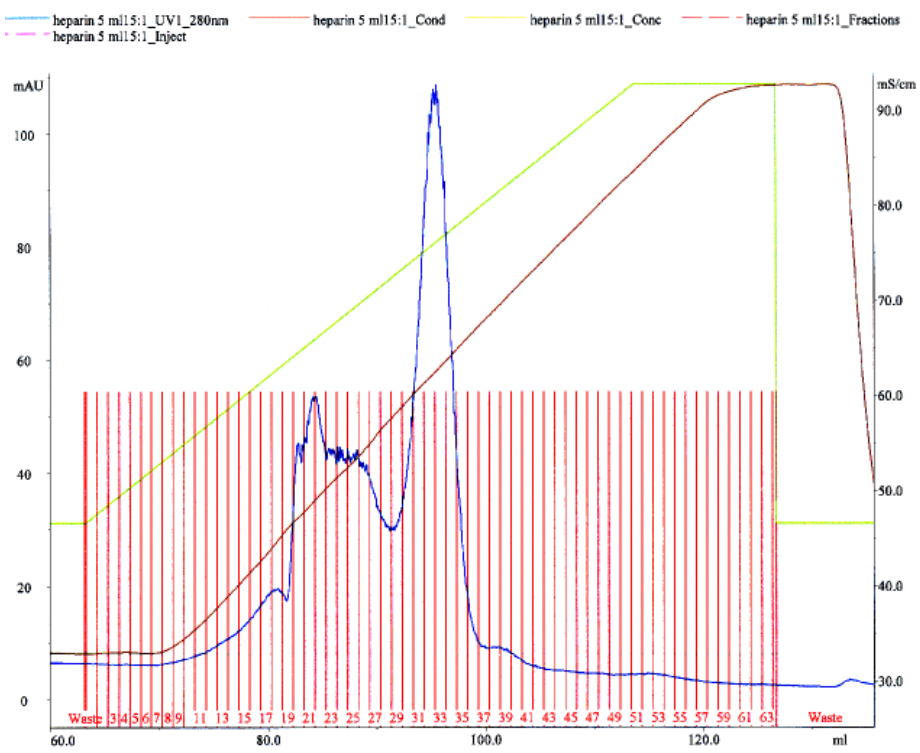


A



B

Abb. 22: Säulenchromatographische Aufreinigung der rekombinanten xGRK6 an einer HiTrap® Heparin-Sepharose-Matrix. A) Die in den Fraktionen über dem Elutions-*peak* aus der Chromatographie an der HiTrap® SP-Sepharose-Matrix enthaltenen Proteine wurden vereinigt (Fraktionen 21-31) und an einer HiTrap® SP-Sepharose-Matrix chromatographisch aufgetrennt (Äkta-System; Gradient 300-1000 mM NaCl, Flussrate 0,5 ml/min, Fraktionsgröße 0,5 ml). **B)** Die in den Fraktionen um den Elutions-*peak* enthaltenen Proteine (Fraktionen 15-21) wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit dem Anti-*Pep2*-Antikörper nachgewiesen. Als Referenz diente chromatographisch gereinigtes mGRK6C-Protein. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage der Molekulargewichtsstandards sind eingezeichnet.



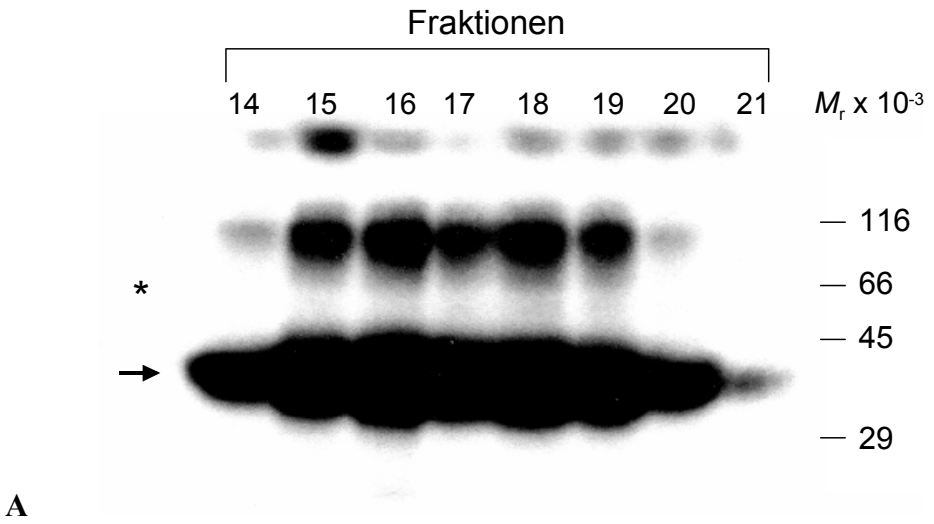
A

B

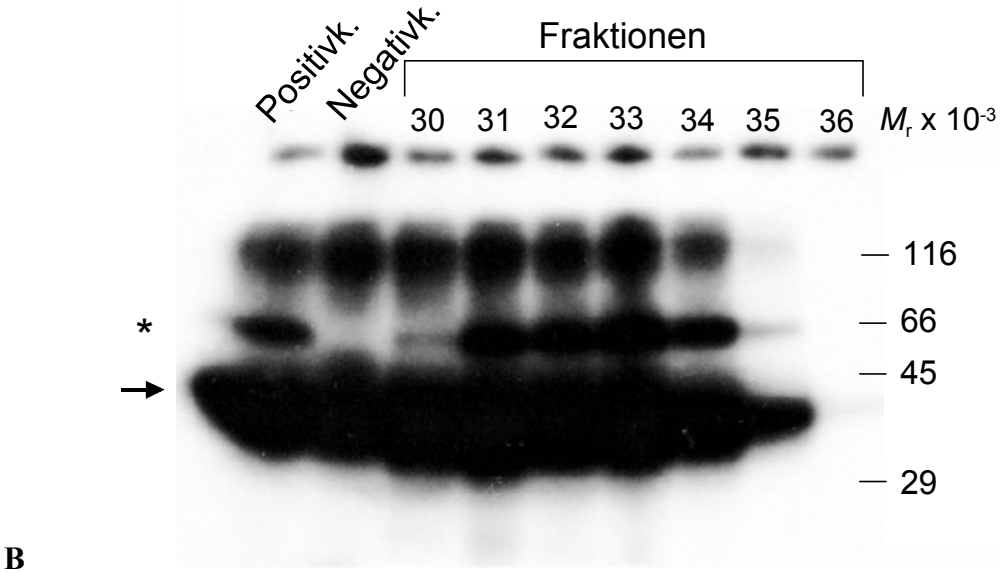
Abb. 23: Säulenchromatographische Aufreinigung der rekombinanten mGRK6C an einer HiTrap® Heparin-Sepharose-Matrix. A) Die in den Fraktionen über dem Elutions-*peak* aus der Chromatographie an der HiTrap® SP-Sepharose-Matrix enthaltenen Proteine (Fraktionen 32-42) wurden vereinigt und an einer HiTrap® SP-Sepharose-Matrix chromatographisch aufgetrennt (Äkta-System; Gradient 300-1000 mM NaCl, Flussrate 0,5 ml/min, Fraktionsgröße 0,5 ml). **B)** Die in den Fraktionen um den Elutions-*peak* enthaltenen Proteine (Fraktionen 24-36) wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit dem Anti-*Pep2*-Antikörper nachgewiesen. Als Referenz diente chromatographisch gereinigtes mGRK6C-Protein. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage der Molekulargewichtsstandards sind eingezeichnet.

Die in den Abb. 22 und Abb. 23 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass durch die Chromatographie an der Heparin-Sepharose-Matrix xGRK6- und mGRK6C-Proteine mit molekularen Massen von *ca.* 66 kDa weiter angereichert werden konnten. Die Menge des gereinigten xGRK6-Proteins lag aber deutlich unter der des mGRK6C-Proteins. Hinzu kommt, dass ein Großteil des xGRK6-Proteins bereits bei einem NaCl-Gehalt von *ca.* 470-590 mM eluierte, während das mGRK6C-Protein erst bei einem NaCl-Gehalt von 710-740 mM im Elutiospuffer von der Säulenmatrix abgelöst werden konnte.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob xGRK6 ähnlich wie mGRK6 in der Lage ist, lösliche Nicht-Rezeptorsubstrate wie Phosvitin bzw. Rezeptoren wie Rhodopsin zu phosphorylieren [64]. Die Rezeptorkinasen gehören zur Familie der Ser/Thr-Kinasen, d. h. sie können die γ-Phosphatgruppe von ATP auf Serin- und Threoninreste ihrer Substrate übertragen. Die katalytische Aktivität der Rezeptorkinasen kann deshalb in Phosphorylierungsversuchen bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Phosphorylierungsaktivität der gereinigten mGRK6C mit der der gereinigten xGRK6 verglichen (Abb. 24 und Abb. 25). Die Ergebnisse zeigen, dass xGRK6 ähnlich wie mGRK6C in der Lage war Phosvitin zu phosphorylieren (Abb. 24, Pfeile). Im Gegensatz zu mGRK6C wies xGRK6 keine oder wenn überhaupt nur eine geringe Autophosphorylierung auf (siehe Sternchen in Abb. 24 und Abb. 25). Unklar bleibt, welche Proteine sich mit einer molekularen Masse von *ca.* 116 kDa phosphoryliert nachweisen lassen. Diese Proteinbanden traten sowohl in den Phosphorylierungsansätzen mit xGRK6 als auch mGRK6C auf.



A



B

Abb. 24: Phosphorylierung von Phosvitin durch gereinigte xGRK6 und mGRK6C. Die sequentiell an SP-Sepharose- und Heparin-Sepharose gereinigten GRK6-Proteine wurden auf ihre Fähigkeit das Nicht-Rezeptor-Substrat Phosvitin in Anwesenheit von [γ-^{32}P]ATP zu phosphorylieren untersucht. Je 1 µl der gereinigten xGRK6-Proteine **(A)** aus den Fraktionen 14-22 (Abb. 22) bzw. mGRK6C-Proteine **(B)** aus den Fraktionen 30-36 (Abb. 23) wurden mit 12,5 µg Phosvitin in Anwesenheit von 100 µM [γ-^{32}P]ATP für 1 h bei 30 °C inkubiert. Zum Vergleich wurde Phosvitin mit gereinigter mGRK6C (Positivkontrolle) bzw. *Sf*9-Extrakt (Negativkontrolle) inkubiert. Die Reaktionen wurden gestoppt und die im Reaktionsansatz enthaltenen Proteine in einem 10%igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde für 1,5 Stunden mit einem Röntgenfilm exponiert. Die Positionen des phosphorylierten Substrats (→) sowie der autophosphorylierten Kinase (*) sind markiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage der Molekulargewichtsstandards sind eingezeichnet.

Für die Mitglieder der humanen Rezeptorkinase-Familie (GRK1, GRK2, GRK3, GRK4α, GRK5, GRK6 und GRK7) ist bekannt, dass sie den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Rhodopsin lichtabhängig phosphorylieren [32, 109, 135]. Auch für die murine GRK6C war eine Rhodopsin Phosphorylierung nachgewiesen worden [127]. Als nächstes wurde daher untersucht, ob auch xGRK6 ähnlich wie mGRK6C Rhodopsin Licht-abhängig phosphoryliert (Abb. 25). Für diese Untersuchungen wurde Rhodopsin eingesetzt, das zuvor aus ROS (*rod-outer-segment*)-Membranen isoliert worden war (freundlicherweise von Dr. Petra Vatter, Institut Pharmakologie und Toxikologie, zur Verfügung gestellt). Wie die in Abb. 25 (**A** und **B**) dargestellten Ergebnisse zeigen, wurde für die xGRK6 (**A**) im Gegensatz zur mGRK6C (**B**) keine Phosphorylierung des Rezeptorsubstrats Rhodopsin beobachtet.

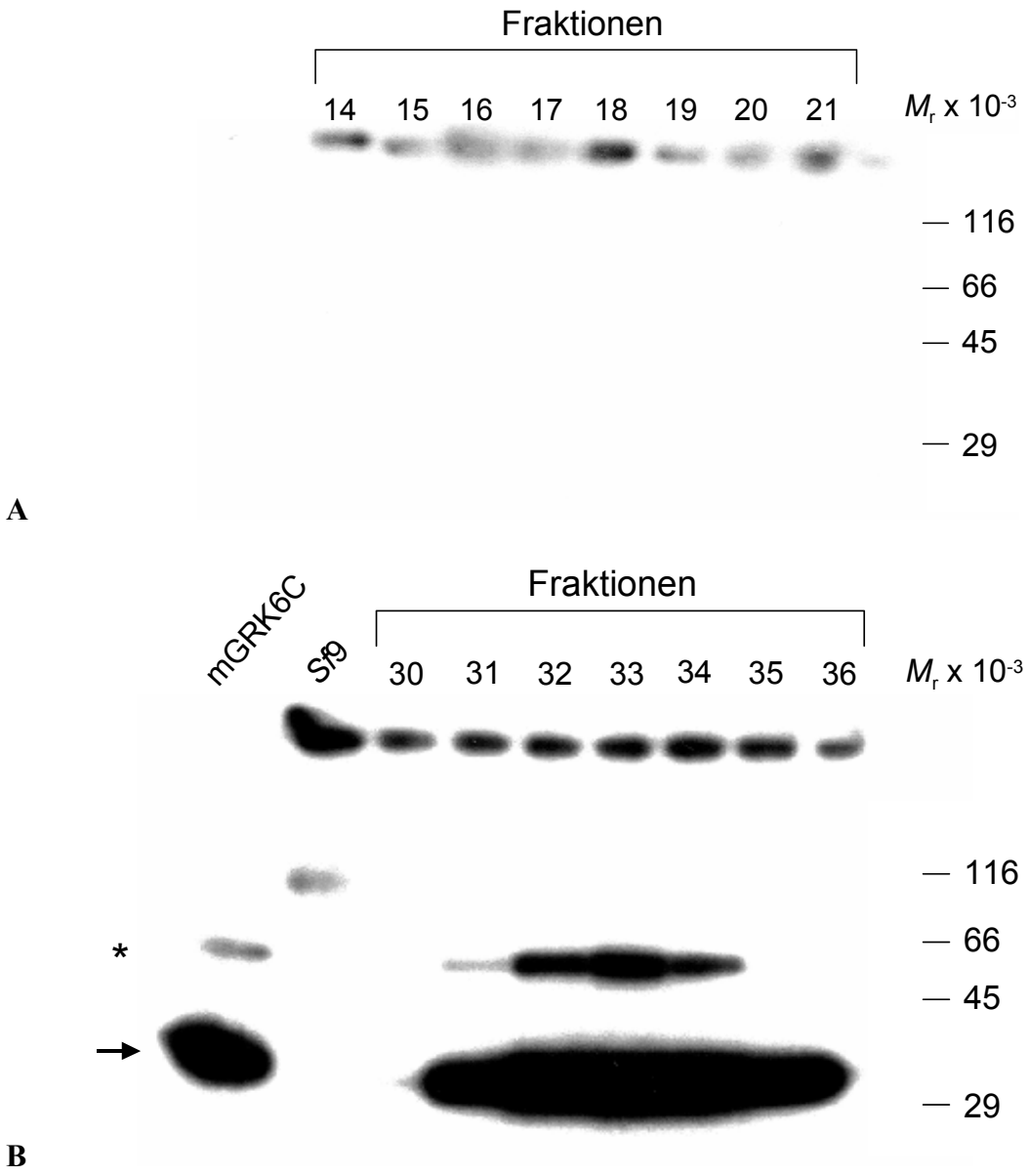


Abb. 25: Phosphorylierung von lichtaktiviertem Rhodopsin durch xGRK6 und mGRK6C. Um die Aktivität der säulenchromatographisch aufgereinigten xGRK6- (**A**) und mGRK6C-Proteine (**B**) bezüglich des Rezeptorsubstrats Rhodopsin miteinander zu vergleichen, wurden 240 nM Rhodopsin mit jeweils 1 µl der xGRK6- (**A**) bzw. mGRK6C-enthaltenden Fraktionen (**B**) versetzt und die Phosphorylierung von Rhodopsin nach 10 minütiger Belichtung in Anwesenheit von [γ-^{32}P]ATP untersucht. Die Reaktion wurde gestoppt, das Reaktionsgemisch wurde in einem 10 % igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und ein Röntgenfilm für 16 h mit dem Gel exponiert. Als Referenz wurde mGRK6C-Protein bzw. *Sf*9-Insektenzellextrakt eingesetzt (**B**). Die Positionen des phosphorylierten Substrats (→) sowie der autophosphorylierten Kinase (*) sind markiert. Die Nummern der analysierten Fraktionen und die Lage der Molekulargewichtsstandards sind eingezeichnet.

3.2.7 Massenspektrometrische Untersuchung von xGRK6

Um zu klären, ob es sich bei dem in den *Sf*9-Insektenzellen exprimierten Protein tatsächlich um xGRK6 handelt, wurde eine massenspektrometrische Untersuchung durchgeführt. Dazu wurde das mit Hilfe der Säulenchromatographie aufgereinigte xGRK6-Protein einem Trypsinverdau unterzogen und von den Proben anschließend 1 µl mittels einer ZipTip™ C18-Pipettenspitze gereinigt, mit 1µl gesättigter α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure-Lösung (gesättigte Lösung in Acetonitril: 0,1 % (V/V) TFA (2:1)) vermischt und auf dem Probenträger auskristallisiert. Mit freundlicher Unterstützung von Dr. Markus Wunderlin (Sektion Massenspektrometrie, Universität Ulm) wurden die Spektren nach Verdampfung des Lösungsmittels mit Hilfe eines Bruker Reflex-III-TOF-Massenspektrometer nach dem MALDI-TOF Verfahren (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight) aufgenommen. Die Kalibrierung erfolgte extern mit den Molekülionen von BSA. Ein Abgleich des so erzeugten Protein-„Fingerprints“ (siehe Abb. 26) mit den in der Mascot Datenbank gespeicherten bekannten Proteinproben zeigte keine signifikanten Ähnlichkeiten auf. Solche Übereinstimmungen sind nur zu erwarten, wenn beim Proteinverdau mit Trypsin Abbauprodukte entstehen, deren Aminosäuresequenz zu 100% mit bereits im MALDI-TOF-Massenspektrometer analysierten und in den entsprechenden Datenbanken gespeicherten Proteinen bzw. Protein-„Fingerprints“ übereinstimmen. Da bislang keine GRKs aus *Xenopus laevis* bekannt sind und die Aminosäuresequenzhomologie maximal 80% beträgt zogen wir zum Untersuchen der gemessenen Molekülmassen ein vom Computer berechnetes Trypsin-Proteinverdau-Muster der von uns propagierten xGRK6-Aminosäuresequenz heran. Der Vergleich der gemessenen Molekülmassen mit denen der von der Software GPMAW 5.11 berechneten Abbauprodukten zeigte eine geringfügige Abweichung der Messergebnisse von den errechneten Werten. Diese Abweichung war mit den Ergebnissen der als Kontrolle parallel analysierten mGRK6C Probe vergleichbar, die im Abgleich mit der Mascot Datenbank als GRK6 der Maus erkannt wurde. Der Vergleich der den Messergebnissen entsprechenden Sequenzbruchstücke mit den Sequenzen der bekannten Mitglieder der GRK4 Unterfamilie zeigte, dass nur zwei der gemessenen Molekülmassen-Peaks Aminosäuresequenzen entsprechen könnten, die absolute Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz der GRK6 aus Maus zeigen. Diese beiden Molekülmassen-Peaks entsprechen Aminosäuresequenzabschnitten, die sich überschneiden. Die weiteren signifikanten Molekülmassen-Peaks, die mit dem errechneten Verdau in Einklang zu

bringen sind, zeigten Unterschiede in der Aminosäuresequenz von mindestens einer und maximal vier Aminosäuren zu den bekannten Vertretern der GRK4 Unterfamilie. Allein der Austausch einer Aminosäure reicht aber aus, um die Molekülmasse so zu verändern, dass ein exakter und automatisierter Vergleich der Ergebnisse unmöglich wird. In Anbetracht der auch für die mGRK6C beobachteten Abweichungen deuten die massenspektrometrischen Untersuchungen darauf hin, dass es sich bei dem gereinigten Protein um xGRK6 handelt.

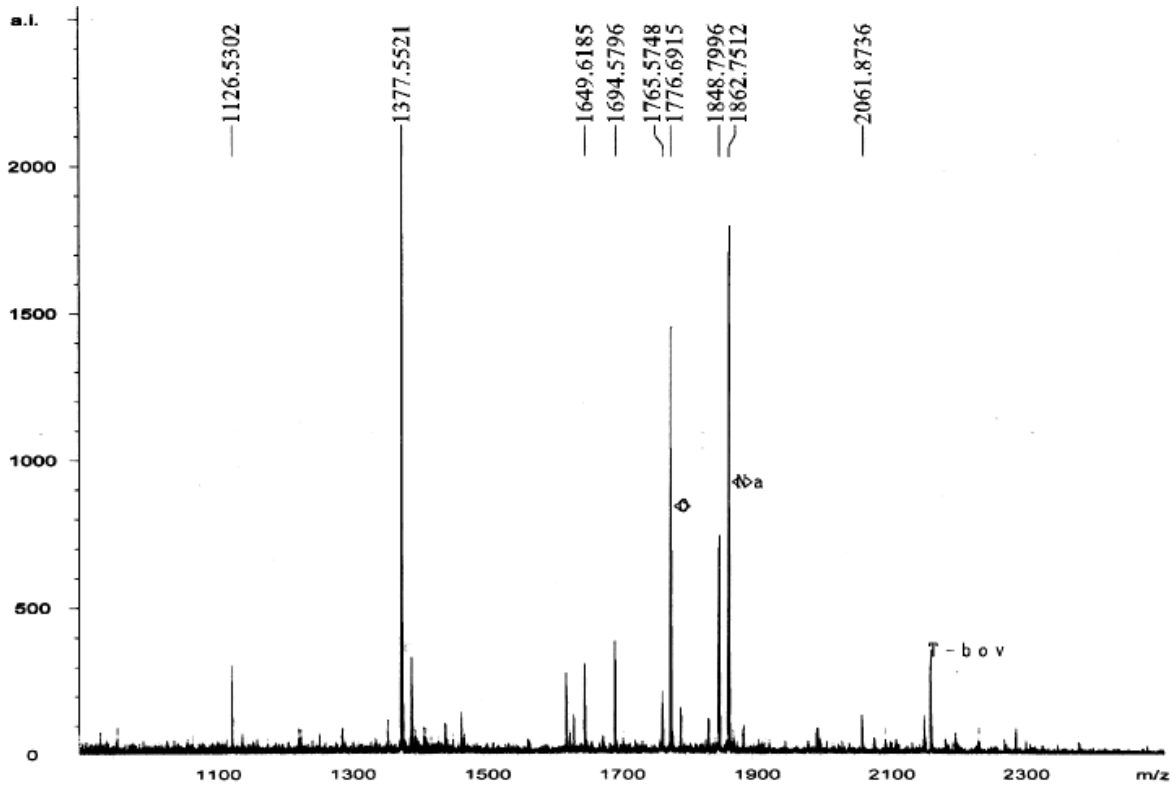


Abb. 26: MALDI-Massenspektrum der rekombinanten xGRK6. Säulenchromatographisch aufgereinigte Kinase G Protein gekoppelter Rezeptoren 6 aus Xenopus laevis (xGRK6) wurde mit α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure als Matrix [gesättigte Lösung in Acetonitril: 0,1 % (V/V) TFA (2:1)] nach Verdampfen des Lösemittels mit Hilfe des MALDI-TOF Verfahren (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight) analysiert. Das Spektrum wurde mit einem Bruker Reflex-III-TOF-Massenspektrometer aufgenommen. Die Abbildung zeigt die $[M+H]^+$-Molekülionensignale des Spektrums.

4 Diskussion

Bei wiederholten oder anhaltenden Aktivierungen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (z.B. β-Adrenozeptoren oder Chemokinrezeptoren) durch Liganden kommt es durch einen als Desensibilisierung bezeichneten Vorgang zu einer Verringerung bzw. auch zum kompletten Verlust der Stimulierbarkeit des Rezeptors. Eine Schlüsselfunktion bei diesem Vorgang kommt einer Unterfamilie der Serin/Threonin-Kinasen, den Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) zu [103, 79]. Von der Familie der GRKs sind bislang sieben Mitglieder (GRK 1-7) beschrieben worden. Die GRKs weisen zentrale konservierte katalytische Domänen auf, die von, in ihren Strukturen, variablen aminoterminalen und carboxylterminalen Abschnitten flankiert werden [103, 9]. Die Kinasen unterscheiden sich insbesondere in der Länge und in strukturellen Eigenschaften der carboxylterminalen Enden, für die gezeigt werden konnte, dass sie maßgeblich an der Regulation der Interaktion der Kinasen mit der Plasmamembran verantwortlich sind [103]. Für die Phosphorylierung von aktivierten Rezeptorsubstraten durch die GRKs ist deren Membranassoziation erfoderlich. Aufgrund der Übereinstimmungen in ihren Aminosäuresequenzen und insbesondere aufgrund der genannten gemeinsamen Strukturmerkmale in den carboxylterminalen Abschnitten werden die GRKs in drei Unterfamilien eingeteilt [103]. Die Unterfamilie der „visuellen“ Kinasen, deren Expression auf die Retina beschränkt ist, umfasst GRK1 und 7. Diese Kinasen werden am carboxylterminalen Ende farnesyliert bzw. geranylgeranyliert. Für die Mitglieder der zweiten Unterfamilie - GRK2 und GRK3 - wurde gezeigt, dass sie in ihrem carboxylterminalen Bereichen *pleckstrin homology* (PH)-Domänen aufweisen, die durch Interaktion mit βγ-Untereinheiten eine Translokation dieser Kinasen aus dem Cytoplasma an die Plasmamembran ermöglichen. Sowohl GRK2 als auch GRK3 werden ubiquitär exprimiert und wurden ursprünglich als Rezeptorkinasen für β-Adrenozeptoren (βARK) beschrieben. Die letzte und größte Unterfamilie, die GRK4-Familie, umfasst die Mitglieder GRK4, 5 und 6 [103]. Sowohl von GRK4 als auch von GRK6 des Menschen und der Maus und der Ratte wurden darüber hinaus Isoformen beschrieben, die durch einen alternativen *splice*-Vorgang aus Vorläufer mRNAs hervorgehen [73, 100]. Die GRK4 und GRK6-A weisen Cysteinreste in ihren carboxylterminalen Enden auf, die posttranslational palmitoyliert werden können [103]. Im carboxylterminalen Abschnitt von GRK5 finden

sich basische Aminosäuren, die eine Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden erlauben [103]. Während die humane GRK5 und GRK6 ubiquitär exprimiert werden, wurden GRK4 Transkripte und Proteine vor allem im Hoden und in deutlich geringeren Mengen im Gehirn und in den Nieren nachgewiesen [99, 100]. Der aminoterminale Abschnitt der GRKs enthält ebenfalls basische Aminosäuresequenzabschnitte, die zur Interaktion der GRKs mit der Plasmamembran beitragen [95, 83]. Darüber hinaus scheint dieser Abschnitt eine Rolle bei der Interaktion mit Rezeptorsubstraten zu spielen [85].

In zahlreichen Untersuchungen ist gezeigt worden, dass Rezeptorkinasen für die Aufrechterhaltung von Rezeptor-regulierten Funktionen in adulten Tieren eine zentrale Rolle spielen, und dass Fehlfunktionen in der Regulation von Rezeptoren durch Rezeptorkinasen zu pathophysiologischen Zuständen in adulten Tieren führen [27, 24, 129, 71, 103, 101, 22]. Im Gegensatz dazu ist über die Bedeutung von Rezeptorkinasen für die Regulation von Rezeptorfunktionen in der Embryonalentwicklung wenig bekannt [47, 90, 114, 91]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit diente *Xenopus laevis* als Modellorganismus, um die Rolle von GRKs in der Embryonalentwicklung zu untersuchen. Des Weiteren sollte die enzymatische Aktivität einer oder mehrerer GRKs des Froschs mit denen der Maus, z.B. der Isoform GRK6C, verglichen werden. Ziel war es daher, (i) GRK-ähnliche Sequenzen, insbesondere von Mitgliedern der GRK4-Familie aus der cDNA von *Xenopus laevis* zu isolieren und mit bekannten Säugetiersequenzen zu vergleichen, (ii) das Expressionsmuster der GRK-ähnlichen mRNAs in Geweben von adulten Tieren und in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* zu untersuchen und (iii) die von diesen cDNAs kodierten Proteine zu exprimieren und ihre Eigenschaften mit murinen GRKs vergleichend zu analysieren. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse sollten einen Beitrag zum Verständnis einer möglichen Rolle von GRKs für die Regulation von Rezeptorfunktionen in der Embryonalentwicklung liefern.

Bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen nur wenige Hinweise auf GRK-ähnliche cDNAs aus Organismen außerhalb der Gruppe der Säugetiere vor. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnten drei cDNAs isoliert werden, deren kodierte Aminosäuresequenzen deutliche Übereinstimmungen mit den Aminosäuresequenzen von GRK4-, GRK5- und GRK6-Proteinen aufweisen, wie sie vom Menschen und der Maus bekannt sind [103, 22]. So stimmt die als xGRK4 bezeichnete Aminosäuresequenz mit den

Sequenzen des Menschen, der Maus und der Ratte zwischen 69% (im Vergleich zu GRK4 isoform 1 Mus musculus, NP_001074212) und über 86% (im Vergleich zu GRK4 isoform Alpha, NP_892027) der Aminosäuren überein. Im Vergleich der bekannten GRK4-Proteine zeigt sich eine durchschnittliche Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von 76%. Bei den beiden anderen Vertretern der GRK4 Unterfamilie, mit xGRK5 und xGRK6 bezeichnet, zeigen sich im Durchschnitt sogar noch größere Übereinstimmungen. So wurde für xGRK5 die niedrigste Übereinstimmung mit der GRK5 der Ratte (NP_110456) mit 71,8% und die höchste Übereinstimmung mit 84,9% im Vergleich zum Rind (Bos Taurus, NP_776756) gesehen, der Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen Maus, Mensch, Ratte, Rind und Xenopus zeigte eine Übereinstimmung der Sequenzen untereinander von 88,1 %. Für die bekannten GRK6 Proteine wurde eine Übereinstimmung untereinander von 93,6 % identischer Aminosäuren gesehen, xGRK6 zeigte dabei die geringste Übereinstimmung mit 79,1% im Vergleich zur humanen GRK6 isoform B (NP_002073) und die höchste Übereinstimmung mit 81,6% zur humanen GRK6 isoform A (NP_001004106). Besonders große Übereinstimmungen wurden dabei im Bereich der konservierten katalytischen Domäne beobachtet wobei die katalytische Domäne der xGRK4 mit der katalytischen Domäne der Ratte (NP_075217) zu 100% übereinstimmt. Diese Übereinstimmungen spiegeln sich auch in dem erstellten Dendrogramm wieder, in dem sich die entsprechenden xGRKs an der Basis der Seitenzweige der GRK4, GRK5 und GRK6-Kinasen finden und deutlichen Abstand zu anderen Mitgliedern der GRK-Subfamilien aufweisen (Abb. 8).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Geweben adulter Tiere sowie Embryonen durchgeführten mRNA- und Protein-Expressionsanalysen haben zu einer Vielzahl interessanter Ergebnisse geführt. So wurden Transkripte von xGRK4 in zahlreichen Geweben, darunter in großen Mengen in Hoden und im Gehirn, sowie in der Niere und in der Leber, in der RNA des Herzens und der Lunge und in geringerem Umfang auch in der RNA des Magens nachgewiesen. In Maus und Mensch wurde die Expression von GRK4-mRNA zunächst fast ausschließlich aus dem Hoden beschrieben und es wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass es sich hierbei um das einzige GRK4 exprimierende Organ handelt [99, 128, 108]. Zahlreiche neuere Untersuchungen deuten auf eine wichtige Rolle von GRK4 auch in anderen Organen, darunter im Herzen, in der Niere und im Gehirn hin. So reguliert GRK4 die Funktionen von Rezeptoren des zentralen Nervensystems und der

Niere, wie des metabotropen Glutamatrezeptors 1 [110, 44] und des renalen Dopaminrezeptors 1 [134, 27, 140, 141]. Genvarianten einer der GRK4-Isoformen (α-γ), GRK4γA142V werden mit primärer Hypertension in Verbindung gebracht [27]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aus der cDNA von *Xenopus laevis* keine weitere Isoform isoliert. Den Angaben der Datenbanken ist zu entnehmen, dass in *Xenopus laevis* im Gegensatz zum Menschen nur zwei Varianten (Xenopus laevis G protein-coupled receptor kinase 4 (grk4-a) und Xenopus laevis G protein-coupled receptor kinase 4 (grk4-b)) exprimiert werden [51].

Das für die xGRK5-mRNA ermittelte Expressionsmuster zeigt Übereinstimmungen aber auch Unterschiede zu der für den Menschen beschriebenen Expression. So wurden xGRK5-Transkripte ähnlich der menschlichen GRK5 in großen Mengen im Herzen nachgewiesen [55, 97]. Darüber hinaus fanden sich xGRK5-Transkripte in der Leber und im Hoden und im geringeren Umfang in der Niere und im Muskel, nicht jedoch im Gehirn und in der Lunge. Im Gegensatz dazu wurden beim Menschen GRK5-Transkripte auch im Gehirn und in der Lunge nachgewiesen [55].

Zahlreiche Hinweise liegen aus Untersuchungen in der Maus und für den Menschen vor, die zeigen, dass GRK2, GRK5 und GRK6 für die Regulation von Funktionen von Zellen des Immunsystems von Bedeutung sind [131]. So führt die Applikation des proinflammatorischen Interleukin-1β in den Lungen von Ratten zu einer vermehrten Expression von GRK2 und GRK5 in der Lunge, was durch die gleichzeitige Behandlung mit Dexamethason verhindert werden kann [131]. Sowohl homozygote als auch heterozygote GRK6-defiziente Mäuse zeigen auf die topische Anwendung von Arachidonsäure sowohl eine massiv verstärkte Ödembildung als auch eine vermehrte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten [131]. Menschen mit rheumatoider Arthritis oder multipler Sklerose bzw. Ratten mit experimenteller adjuvanter Arthritis (einem Modell für die rheumatoide Arthritis bei Ratten) zeigen herabgesetzte GRK2 und GRK6 Proteinspiegel in mononuklären Zellen des peripheren Blutes bzw. in Organen des Immunsystems während der erhöhten inflammatorischen Aktivität [62, 131]. Dabei weisen nur die Zelluntergruppen, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, wie CD^{4+} T-Zellen und B-Lymphozyten, aber nicht CD^{8+}-T-Zellen eine Änderung der GRK-Expression auf [131]. Bei einer verminderten Expression von GRK2 und GRK5 wurde auch eine

verstärkte CXC-Chemokin (Interleukin-8 und GROα)-induzierte Migration von neutrophilen Granulozyten beobachtet [131].

Die vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe an Mäusen hatten gezeigt, dass RNA-Transkripte sowie die von dieser RNA kodierten Proteine der GRK6-Varianten (GRK6A-C) insbesondere in lymphoiden Geweben, wie mesenterialen und peripheren Lymphknoten, im Knochenmark und in der Milz, aber auch in der Niere nachzuweisen sind [73]. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit eine sehr starke Expression der xGRK6-mRNA im Hoden, in der Skelettmuskulatur, im Herzen und in der Niere beobachtet. Eine weniger ausgeprägte Expression wurde in der Lunge und im Gehirn ermittelt. In der Leber fanden sich keine Transkripte. Bei diesen Analysen fiel auf, dass sich das Expressionsmuster von xGRK6 weniger weit gefächert darstellt als von xGRK4 und dass xGRK4-Transkripte in deutlich größeren Mengen nachzuweisen waren als xGRK6-Transkripte. Dies könnte darauf hindeuten, dass xGRK4 und xGRK6 ähnliche bzw. vertauschte Rollen in *Xenopus leavis* im Vergleich zu den Funktionen von GRK4 und GRK6 in Mensch und Maus übernehmen. Die an *Xenopus laevis* Embryonen durchgeführten Expressionsanalysen deuten auf eine spezifische Rolle von xGRK4 nicht jedoch von xGRK6 oder xGRK5 in der Embryogenese hin. Während für xGRK5 und xGRK6 eine starke mRNA-Expression fast ausschließlich im Embryonalstadium 18 nachzuweisen war, traten xGRK4-Transkripte ab dem Emryonalstadium 18 auf, deren Menge dann ab dem Stadium 31 anstieg und im Stadium 40 ihr Maximum erreichte. In der Maus dagegen waren Transkripte von GRK5 und GRK6, nicht jedoch von GRK4 in Embryonen nachgewiesen worden [73, 100]. In *Whole-mount-in-situ*-Hybridisierungen wurde eine xGRK4 Expression vor allem im sich entwickelnden zentralen Nervensystem und in Sinnesorganen, wie Vorderhirn und Neuralrohr sowie Ohr- und Augenanlage ermittelt. xGRK4-spezifische Anfärbungen fanden sich auch in und sehr wahrscheinlich zwischen den Somiten sowie in den Branchialbögen. Letzteres könnte auf eine Bedeutung von xGRK4 für die Funktion von Neuralleistenzellen, insbesondere auch in der Entwicklung des Herzens und des peripheren Nervensystems hinweisen [10, 53, 54]. Im Gegensatz zu der für das Herz adulter Tiere ermittelten starken Expression von xGRK4-mRNA wurden in der Herzanlage des sich entwickelnden Embryos nur sehr geringe Mengen von xGRK4-Transkripten detektiert.

Welche Bedeutung die Mitglieder der GRK4-Familie für die Embryonalentwicklung haben und ob dabei die Regulation der Funktionen von klassischen sieben transmembranären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Vordergrund steht, müssen weitere Untersuchungen zeigen. So liegen aus neueren Untersuchungen an Zebrafisch-Embryonen Hinweise darauf vor, dass GRK2 abhängig von der Aktivität als Kinase durch Phosphorylierung des 7TM-GPCRs-ähnlichen Rezeptors *smoothened* die *hedgehog*-regulierte Gentranskription kontrolliert [70, 91]. Andere Autoren beschreiben Kinaseaktivität-unabhänige Funktionen von GRK2, wie die Inhibition der nukleären Translokation von Cyclin B1, die zu einem frühen Entwicklungsarrest im Embryo führt [49]. Ob auch Mitglieder der xGRK4-Familie solche Funktionen übernehmen, wird Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Die durchgeführten Proteinexpressionsanalysen zeigen, dass xGRK-Proteine der xGRK4-Familie insbesondere im Herzen und in der Leber, aber auch in Magen, Ovar und Haut nachzuweisen sind. Sehr geringe Mengen wurden in der Milz und im Gehirn beobachtet. Entsprechend den in mRNA-Expressionsanalysen gemachten Beobachtungen müsste es sich bei den nachgewiesenen xGRK-Proteinen um xGRK4 und xGRK5 handeln. Über die Bedeutung von Mitgliedern der GRK4-Subfamilie für die Regulation von Rezeptoren in der Leber ist wenig bekannt. Für GRK2 wurde beschrieben, dass diese Kinase die Glykogensynthese in der Leber negativ reguliert [117]. Wichtige Funktionen von GRKs im Herzen wurden auch für den Menschen ermittelt [42, 59, 23]. Hier regulieren insbesondere GRK2 und GRK5 Rezeptoren die für Herzfunktionen von Bedeutung sind, wie β-Adrenorezeptoren, α1-Adrenorezeptoren und muskarinische M2 Cholinorezeptoren [22, 23]. Jedoch sterben nur GRK2-defiziente nicht jedoch GRK5-defiziente Mäuse an kardialen Abnormitäten, die in der Embryogenese auftreten [69]. GRK5- und GRK6-defiziente Mäuse weisen dagegen insbesondere degenerative Veränderungen bzw. Veränderungen in der Neurotransmission im zentralen Nervensystem auf [60, 33, 34]. Neueste Untersuchungen deuten auf eine Rolle von GRK6 bei der Entstehung visceraler Hyperalgesie hin [25]. Interessant ist auch die nachgewiesene Expression von xGRK-Proteinen im Ovar von *Xenopus laevis*. Humanes Myometrium exprimiert GRK2, -4γ, -5 und -6, wohingegen GRK3, -4α, -4β und -4δ nicht nachgewiesen werden konnten [8]. Bei der Ratte wurde die Expression von GRK2 im schwangeren Myometrium nachgewiesen, deren Menge im Verlauf der Schwangerschaft stark ansteigt und am ersten Tag postpartum ein Maximum erreicht [106]. Im Menschen lässt sich GRK2 nur während einer

Schwangerschaft nachweisen [8]. Für GRK6 wurde beschrieben, dass diese Kinase an der Regulation der Funktion von β-Adrenozeptoren und Oxytocinrezeptoren in glatten Muskelzellen des Myometriums beteiligt ist [116, 137]. Für GRK5 wurde gezeigt, dass eine verstärkte Autophosphorylierung und eine damit erhöhte Phosphorylierung und Desensibilisierung von Rezeptorsubstraten wie β-Adrenozeptoren Wehen-auslösend wirkt [8].

Bei der vergleichenden Analyse der für die menschlichen und murinen GRKs beschriebenen Strukturmerkmale zeigte sich, dass insbesondere Merkmale der katalytischen Domäne einer starken Konservierung unterliegen [61, 103]. So ist aus Untersuchungen an Säugetier-GRKs bekannt, dass die Kinasen die γ-Phosphatgruppe von ATP auf Serin- und Threoninreste ihrer Substrate, d.h. insbesondere auf Serin-Reste im carboxylterminalen Bereich oder in den intrazellulären Schleifen von ligandenaktivierten G Protein-gekoppelten Rezeptoren übertragen [96]. Das für die Übertragung wichtige GXGXXG-Motiv [63] findet sich auch in der putativen katalytischen Domäne der xGRK4, xGRK5 und xGRK6 an Aminosäureposition 193-198. Dabei zeigten xGRK4 und xGRK5 eine identische Aminsäurensequenz (Gly^{193}-Lys^{194}-Gly^{195}-Gly^{196}-Phe^{197}-Gly^{198}), während bei der xGRK6 das Gly^{196} gegen Ala^{196} und das Phe^{197} gegen Leu^{197} ausgetauscht vorliegt. Zwei weitere konservierte Aminosäurereste, Lys^{216} und Asp^{332}, die für den Transfer der γ-Phosphatgruppe notwendig sind [62], kommen ebenfalls in allen drei in dieser Arbeit dargestellten GRKs von *Xenopus laevis* vor. Während die Position des Lys^{216} dabei in allen drei GRKs konserviert ist, liegt das Asp^{332} um drei zum aminoterminalen Ende verschobenen Aminosäurepositionen vor (Asp^{329}). Eine von Pitcher *et al.* [95] postulierte Lipidbindungsstelle im aminoterminalen Bereich der GRKs der GRK4-Subfamilie mit basischen Aminosäuren an Position 22, 23, 24, 26, 28 und 29 findet sich auch in den xGRKs weitgehend konserviert. Somit sollten die xGRKs zumindest über diese Bindungsstelle in der Lage sein mit membranständigen Rezeptoren zu interagieren. Auch die von Stoffel *et al.* [119] für die humane GRK6 beschriebene Palmitoyierungsstelle mit drei konservierten Cysteinresten im carboxylterminalen Bereich (Cys^{561}, Cys^{562} und Cys^{565}) ist in der xGRK6 erhalten. Vorausgegangene Untersuchungen an der humanen GRK5 hatten gezeigt, dass diese Kinase keiner Lipidmodifikation, wie Palmitoylierung unterliegt [119, 102]. Dennoch liegt die Kinase aufgrund eines im carboxylterminalen Bereich zwischen den Aminosäuren 552-562 liegenden, hydrophobe Aminosäuren enthaltenden

Motivs (Leu^{550}, Leu^{551}, Leu^{554} und Phe^{555}) assoziiert mit der Plasmamembran vor [126]. Auch in der xGRK5 wurde ein hydrophobes Motiv (Leu^{549}, Leu^{550}, Leu^{553} und Phe^{554}) identifiziert. Jedoch findet sich dieses aminoterminal um eine Aminosäureposition verschoben.

Wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse gezeigt haben, lässt sich die xGRK6 ähnlich wie die murine mGRK6 in Insektenzellen unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems exprimieren und aus den Zelllysaten der Insektenzellen unter Verwendung verschiedener chromatographischer Methoden (SP-Sepharose und Heparin-Sepharose-Matrix) aufreinigen. Der in massenspektrometrischen Untersuchungen (MALDI-TOF) erhaltene „Fingerprint“ (Abb.26) bestätigte, dass es sich bei dem gereinigten Protein um xGRK6 handelte. Interessanterweise zeigte die xGRK6 bei der Reinigung ein zur mGRK6 abweichendes Verhalten an dem Kationaustauscher. So eluierte das Protein bei bereits deutlich geringeren Konzentrationen an NaCl im Elutionspuffer (520 mM *versus* 720 mM). Die Untersuchungen mit dem löslichen Substrat Phosvitin belegten, dass das gereinigte Protein xGRK6 enzymatisch aktiv ist. In diesen Untersuchungen wurde auch beobachtet, dass xGRK6 im Gegensatz zur mGRK6 keiner Autophosphorylierung unterliegt [73, 127]. Für die humane GRK5 wurde gezeigt, dass eine (Auto)phosphorylierungs-defiziente Mutante eine um das 15-20-fache reduzierte Kinaseaktivität gegenüber dem β2-Adrenorezeptor und Rhodopsin aufweist [56]. Demnach könnte die ausbleibende Phosphorylierung des membranären Substrats Rhodopsin durch xGRK6 auch auf eine fehlende Aktivierung des Enzyms durch die (Auto)phosphorylierung zurückzuführen sein [88, 103]. Die enzymatische Aktivität von GRKs gegenüber membranständigen Substraten setzt die Interaktion mit der Plasmamembran voraus [103]. So finden sich im carboxylterminalen Abschnitt der GRK6-Kinasen von Maus und Mensch Cysteinreste, die posttranslational palmitoyliert werden können und so als Membrananker fungieren [73, 100, 119, 65]. Auch in der Aminosäuresequenz von xGRK6 wurden an entsprechender Position diese Cysteinreste (Cys^{561}, Cys^{562} und Cys^{565}) identifiziert. Eine Erklärung für das Ausbleiben der Phosphorylierung von Rhodopsin durch xGRK6 könnte darin liegen, dass der Anteil an posttranslational korrekt modifizierten xGRK6 nach säulenchromatographischer Reinigung an der SP-Sepharose-Matrix zu gering ist. Ähnliches wurde auch von anderen Arbeitsgruppen [65] und der eigenen Arbeitsgruppe bei der Reinigung der humanen bzw. der murinen GRK6 beobachtet [112]. So wurde auch bei

der Reinigung der humanen GRK6 zwar eine Phosphorylierung des löslichen Substrats Phosvitin, aber keine oder nur eine geringe Phosphorylierung von Rhodopsin ermittelt [56, 20]. In unserer Arbeitsgruppe wurde im Rahmen einer Dissertation bei Arbeiten zur mGRK6A und speziellen Mutanten dieser Kinase gezeigt, dass die gereinigten Proteine mGRK6A und die Mutanten mGRK6A-M4 und -M5 Phosvitin phosphorylierten, während nur eine äußerst schwache Phosphorylierung von Rhodopsin zu beobachten war [112]. In beiden Fällen wurde davon ausgegangen, dass nur die nicht-palmitoylierte und nicht die palmitoylierte Form der GRK6 isoliert worden war. Somit könnte das Ausbleiben der Phosphorylierung von Rhodopsin durch xGRK6 auf die fehlende Palmitoylierung des Enzyms und somit die verringerte Affinität zu den Rhodopsin-enthaltenden Membranen zurückzuführen sein. Erste Untersuchungen der Arbeitsgruppe an COS-7-Zellen, die xGRK4-6-Proteine und humane Chemokinrezeptoren transient exprimieren deuten auf eine Regulation der Rezeptorfunktion durch die GRKs von *Xenopus laevis* hin und bestätigen somit letztere Annahme.

5 Zusammenfassung

Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von physiologischen und pathophysiologischen Rezeptorfunktionen, indem sie Liganden-aktivierte G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) phosphorylieren und auf diese Weise desensibilisieren. Die Subfamilie der GRKs umfasst in Säugetieren sieben Mitglieder, GRK1-7, die alle zur Familie der Serin-/Threonin-Kinasen gehören. Die Proteine der GRK-Familie weisen große strukturelle Gemeinsamkeiten auf. So wird in allen Proteinen die zentrale, hochkonservierte katalytische Domäne von variablen amino- und carboxylterminalen Abschnitten flankiert. Über das Auftreten und die Funktion von GRKs in Nicht-Säugetieren, insbesondere auch während der Embryonalentwicklung ist wenig bekannt. In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus der mRNA des Krallenfroschs *Xenopus laevis* drei verschiedene GRK-kodierende cDNAs (xGRKs) isoliert, xGRK4, xGRK5 und xGRK6. Die von den cDNAs kodierten Proteine stimmen mit den entsprechenden Proteinen von Mensch und Maus in 69-86 % ihrer Aminosäuren überein. Besonders große Übereinstimmungen wurden im Bereich der katalytischen Domäne beobachtet, so dass die Zuordnung zur Gruppe der GRKs eindeutig ist.

Mit Hilfe von RT-PCR (reverse Transkriptase-*polymerase chain reaction*)-Analysen und *Whole-mount-in-situ*-Hybridisierungsexperimenten wurde in Geweben adulter Tiere und in Embryonalstadien von *Xenopus laevis* eine differentielle mRNA-Expression der verschiedenen xGRKs beobachtet. Dabei überwog die Expression der mRNA von xGRK4 sowohl in den Organen adulter Tiere als auch in den untersuchten Embryonalstadien. Diese Ergebnisse deuten auf eine besondere Rolle von xGRK4 in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* hin. Sowohl das mRNA-Expressionsmuster aller untersuchter xGRKs als auch die Verteilung der xGRK-Proteine in den Geweben von *Xenopus laevis* lassen vermuten, das diese Kinasen *in vivo* an der Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren im Herzen beteiligt sind. In der Leber implizieren die in Expressionsanalysen erzielten Ergebnisse eine spezifische Rolle von xGRK4 und xGRK5 nicht jedoch von xGRK6.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte biochemische und funktionelle Charakterisierung der xGRK6 zeigte, dass sich dieses Protein ähnlich wie ein murines Pendant (mGRK6C) in Insektenzellen exprimieren und aus Insektenzelllysaten unter

Verwendung chromatographischer Methoden aufreinigen lässt. Das xGRK6-Protein unterschied sich hinsichtlich der Phosphorylierungsaktivität des nicht-membranären Substrats Phosvitin nicht von der der murinen GRK6C und war katalytisch aktiv. Jedoch war xGRK6 nicht in der Lage, das membranständige Rezeptorsubstrat Rhodopsin zu phosphorylieren. Die enzymatische Aktivität von GRKs gegenüber membranständigen Substraten setzt die Interaktion mit der Plasmamembran voraus. Im carboxylterminalen Abschnitt der xGRK6 finden sich wie bei den entsprechen Kinasen aus Mensch und Maus Cysteinreste, die posttranslational palmitoyliert werden können und so als Membrananker fungieren. Die ausbleibende Aktivität von xGRK6 könnte demnach auf eine unzureichende posttranslationale Modifikation des gereinigten xGRK6-Proteins hindeuten. Des Weiteren wurde beobachtet, dass das xGRK6-Protein keine Autophosphorylierung aufwies. Für andere Kinasen wie GRK5 ist bekannt, dass die Autophosphorylierung und/oder die Interaktion mit Calciumsensorproteinen die Aktivität gegenüber Substraten moduliert. Somit könnte der Grund für die fehlende Phosphorylierungsaktivität der xGRK6 für das Substrat Rhodopsin auf der unzureichenden Palmitoylierung und/oder fehlenden Autophosphorylierung zurückzuführen sein. Diese Vermutungen werden von ersten Untersuchungen an intakten xGRK-exprimierenden Zellen gestützt, die auf eine Funktionalität der xGRKs gegenüber Rezeptoren in den Zellen hinweisen.

6 Literaturverzeichnis

1: Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJ, Zucker CS (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* **100:** 693-702

2: Ambrose C, James M, Barnes G, Lin C, Bates G, Altherr M, Duyao M, Groot N, Church D, Wasmuth JJ, Lehrach H, Housman D, Buckler A, Gusella JF, MacDonald ME (1992) A novel G protein-coupled receptor kinase gene cloned from 4p16.3. *Human Mol Genet* **1:** 697-703

3: Baldwin JM (1994) Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **6:** 180-190

4: Bansal G, Druey KM, Xie Z (2007) R4 RGS Proteins: Regulation of G Protein Signaling and Beyond. *Pharmacol Ther* **116:** 473-495

5: 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

6: Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* **18(7):** 1723-1729

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

8: Brenninkmeijer CB, Price SA, López Bernal A, Phaneuf S (1999) Expression of G-protein-coupled receptor kinases in pregnant term and non-pregnant human myometrium. *J Endocrinol* **162:** 401-408

9: Brinks H, Koch WJ (2010) betaARKct: a therapeutic approach for improved adrenergic signaling and function in heart disease. *J Cardiovasc Transl Res* **3:**499-506

10: Brown CB, Baldwin HS (2006) Neural crest contribution to the cardiovascular system. *Adv Exp Med Biol* **589:** 134-154

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

12: 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

13: Carman VC, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis, PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL, Kozasa T (1999) Selective Regulation of $G\alpha_{q/11}$ by an RGS Domain in the G Protein-coupled Receptor Kinase, GRK2. *J Biol Chem* **274(48):** 34483-34492

14: Carty DJ, Padrell E, Codina J, Birnbaumer L, Hildebrandt JD, Iyengar R (1990) Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three G_i proteins. *J Biol Chem* **265:** 6268-6273

15: 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

16: Church GN, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81:** 1991-1995

17: Cismowski MJ (2006) Non-receptor activators of heterotrimeric G-protein signaling (AGS proteins). *Semin Cell Dev Biol* **17(3):** 334-344

18: Clapham DE, Neer EJ (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37:** 167-203

19: 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

20: DebBurman SK, Ptasienski J, Boetticher E, Lomasney JW, Benovic JL, Hosey MM (1995) Lipid-mediated Regulation of G Protein-coupled Receptor Kinases 2 and 3. *J Biol Chem* **270:** 5742-5747

21: DebBurman SK, Ptasienski J, Benovic JL, Hosey MM (1996) G Protein-coupled Receptor Kinase GRK2 Is a Phospholipid-dependent Enzyme That Can Be Conditionally Activated by G Protein βγ Subunits. *J Biol Chem* **271:** 22552-22562

22: Dorn GW 2nd (2009) GRK mythology: G-protein receptor kinases in cardiovascular disease. *J Mol Med* **87:** 455-463

23: Dorn GW 2nd, Liggett, SB (2009) Mechanisms of Pharmacogenomic Effects of Genetic Variation within the Cardiac Adrenergic Network in Heart Failure. *Mol Pharmacol* **76:** 466-480

24: Dzimiri N, Muiya P, Andres E, Al-Halees Z (2004) Differential functional expression of human myocardial G protein receptor kinases in left ventricular cardiac diseases. *Eur J Pharmacol* **489:** 167-177

25: Eijkelkamp N, Heijnen CJ, Elsenbruch S, Holtmann G, Schedlowski M, Kavelaars A (2009) G protein-coupled receptor kinase 6 controls post-inflammatory visceral hyperalgesia. *Brain Behav Immun* **23:** 18-26

26: Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132:** 6-13

27: Felder RA, Sanada H, Xu J, Yu PY, Wang Z, Watanabe H, Asico LD, Wang W, Zheng S, Yamaguchi I, Williams S, Gainer J, Brown NJ, Hazen-Martin D, Wong LJ, Robillard JE, Carey RM, Eisner GM, Jose PA (2002) G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* **99:** 3872-3877

28: Ferguson S (2001) Evolving Concepts in G Protein-coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling. *Pharmacol Rev* **53:** 1-24

29: Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-Coupled Receptor List. *Pharmacol Rev* **57:** 279-288

30: Fredriksson R, Lagerström M, 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

31: Fredriksson R, Schiöth HB (2005) The Repertoire of G-Protein Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes. *Mol Pharmacol* **67:** 1414-1425

32: Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* **51:** 319-351

33: Gainetdinov RR, Bohn LM, Sotnikova TD, Cyr M, Laasko A, Macrea AD, Torres GE, Kim KM, Lefkowitz RJ, Caron MG, Premont RT (2003) Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. *Neuron* **38:** 291-303

34: 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

35: Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56:** 615-649

36: Gether U, Kobilka BK (1998) G protein-coupled receptors II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **273:** 17979-17982

37: Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52:** 456-467

38: Gutkind JS (1998) The Pathways Connecting G Protein-coupled Receptors to the Nucleus through Divergent Mitogen-activated Protein Kinase Cascades. *J Biol Chem* **273:** 1839-1842

39: Hamm HE (1998) The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* **273:** 669-672

40: Hanks SK, Hunter T (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9:** 576-596

41: Harland RM (1991) In situ hybridization: an improved whole-mount method for Xenopus embryos. *Methods Cell Biol* **36:** 685-695

42: Hata JA, Koch WJ (2003) Phosphorylation of G Protein-Coupled Receptors: GPCR Kinases in Heart Disease. *Mol Interv* **3:** 264-272

43: Hepler JR, Gilman AG (1992) G proteins. *Trends Biochem Sci* **17:** 383-387

44: Iacovelli L, Salvatore L, Capobianco L, Picascia A, Barletta E, Storto M, Mariggiò S, Sallese M, Porcellini A, Nicoletti F, De Blasi A (2003) Role of G Protein-coupled Receptor Kinase 4 and β-Arrestin 1 in Agonist-stimulated Metabotropic Glutamate Receptor 1 Internalization and Activation of Mitogen-activated Protein Kinase. *J Biol Chem* **278:** 12433-12442

45: Inglese J, Koch WJ, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled kinases. *Nature* **359:** 147-150

46: Iwata K, Luo J, Penn RB, Benovic JL (2005) Bimodal Regulation of the Human H1 Histamine Receptor by G Protein-coupled Receptor Kinase 2. *J Biol Chem* **280:** 2197-2204

47: Jaber M, Koch WJ, Rockman H, Smith B, Bond RA, Sulik KK, Ross J Jr, Lefkowitz RJ, Caron MG, Giros B (1996) Essential role of β-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc Natl Acad Sci USA* **93:** 12974-12979

48: Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998) G Protein-coupled Receptors I. Diversity of Receptor-Ligand Interactions. *J Biol Chem* **273:** 17299-17302

49: Jiang X, Yang P, Ma L (2009) Kinase activity-independent regulation of cyclin pathway by GRK2 is essential for zebrafish early development. *Proc Natl Acad Sci USA* **106:** 10183-10188

50: 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

51: Klein SL, Strausberg RL, Wagner L, Pontius J, Clifton SW, Richardson P (2002) Genetic and Genomic Tools for Xenopus Research: The NIH Xenopus Initiative. *Developmental Dynamics* **225:** 384-391

52: Krasel C, Bunemann M, Lorenz K, Lohse MJ (2005) β-Arrestin Binding to the β2-Adrenergic Receptor Requires Both Receptor Phosphorylation and Receptor Activation. *J Biol Chem* **280:** 9528-9535

53: Kuan CY, Tannahill D, Cook GM, Keynes RJ (2004) Somite polarity and segmental patterning of the peripheral nervous system. *Mech Dev* **121:** 1055-1068

54: Kulesa PM, Bailey CM, Kasemeier-Kulesa JC, McLennan R (2010) Cranial neural crest migration: new rules for an old road. *Dev Biol* **344:** 543-554

55: Kunapuli P, Benovic JL (1993) Cloning and expression of GRK5: A member of the G protein-coupled receptor kinase family. *Proc Natl Acad Aci USA* **90:** 5588-5592

56: Kunapuli P, Gurevich VV, Benovic JL (1994) Phospholipid-stimulated Autophosphorylation Activates the G Protein-coupled Receptor Kinase GRK5. *J Biol Chem* **269:** 10209-10212

57: Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680-685

58: Lefkowitz RJ (1993) G protein-coupled receptor kinases. *Cell* **74:**409-412

59: Leineweber K, Rhode P, Beilfuß A, Wolf C, Sporkmann H, Bruck H, Jakob HG, Heusch G, Philipp T, Brodde OE (2005) G-protein-coupled receptor kinase activity in human heart failure: Effects of β-adrenoceptor blockade. *Cardiovasc Res* **66:** 512-519

60: Liu J, Rasul I, Sun Y, Wu G, Li L, Premont RT, Suo WZ (2009) GRK5 Deficiency Leads to Reduced Hippocampal Acetylcholine Level via Impaired Presynaptic M2/M4 Autoreceptor Desensitization. *J Biol Chem* **284:** 19564-19571

61: Lodowski DT, Tesmer VM, Benovic JL, Tesmer JJ (2006) The Structure of G Protein-coupled Receptor Kinase (GKR)-6 Defines a Second Lineage of GRKs. *J Biol Chem* **281:** 16785-16793

62: Lombardi MS, Kavelaars A, Schedlowski M, Bijlsma JW, Okihara KL, van de 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

63: Lorenz W, Inglese J, Palczewski K, Onorato JJ, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) The receptor kinase family: Primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the ß-adrenergic receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88:** 8715-8719

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

65: 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

66: Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ (1999) Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* **11:** 177-183

67: Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of ß-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* **115:** 455-465

68: Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* **19:** 1154

69: Matkovich SJ, Diwan A, Klanke JL, Hammer DJ, Marreez Y, Odley AM, Brunskill EW, Koch WJ, Schwartz RJ, Dorn GW 2nd (2006) Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and beta-adrenergic signaling. *Circ Res* **99:** 996-1003

70: Meloni AR, Fralish GB, Kelly P, Salahpour A, Chen JK, Wechsler-Reya RJ, Lefkowitz RJ, Caron MG (2006) Smoothened Signal Transduction Is Promoted by G Protein-Coupled Receptor Kinase 2. *Mol Cell Biol* **26:** 7550-7560

71: Métayé T, Gibelin H, Perdrisot R, Kraimps JL (2005) Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* **17:** 917-928

72: Milligan G, Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology* **147:** S46-S55

73: 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-protein-coupled receptor kinase 6. *Genomics* **60:** 199-209

74: Moore CA, Milano SK, Benovic JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69:** 451-482

75: Morris AJ, Malbon CC (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* **79:** 1373-1430

76: Mousavi SA, Malerød L, Berg T, Kjeken R (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* **377:** 1-16

77: Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155:** 335-350

78: Murdoch C, Finn A (2000) Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* **95:** 3032-3043

79: Murga C, Penela P, Ribas C, Mayor F Jr (2010) G protein-coupled receptor kinases: Specific phosphorylation of 7TM receptors and beyond *Drug Discov Today Technol* **7:** e43-e49

80: Nelson T, Brutlag D (1979) Addition of homopolymers to the 3‘-ends of duplex DNA with terminal transferase. *Methods Enzymol* **68:** 41-50

81: Nieuwkoop PD, Faber J (1994) *Normal table of Xenopus laevis (Daudin):* a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. *Garland*, New York.

82: Niimura Y, Nei M (2003) Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **100:** 12235-12240

83: 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

84: Offermanns S (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* **83:** 101-130

85: Palczewski K, Buczytko J, Lebioda L, Crabb JW, Polans AS (1993) Identification of the N-terminal Region in Rhodopsin Kinase Involved in Its Interaction with Rhodopsin. *J Biol Chem* **268:** 6004-6013

86: 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

87: Pebay-Peyroula E, Rummel G, Rosenbusch JP, Landau EM (1997) X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipid cubic phases. *Science* **277:** 1676-1681

88: 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

89: Penela P, Ribas C, Aymerich I, Eijkelkamp N, Barreiro O, Heijnen CJ, Kavelaars A, Sánchez-Madrid F, Mayor F Jr (2008) G protein-coupled receptor kinase 2 positively regulates epithelial cell migration. *The EMBO Journal* **27:** 1206-1218

90: Peppel K, Boekhoff I, McDonald P, Breer H, Caron MG, Lefkowitz RJ (1997) G Protein-coupled Receptor Kinase 3 (GRK3) Gene Disruption Leads to Loss of Odorant Receptor Desensitization. *J Biol Chem* **272:** 25425-25428

91: Philipp M, Fralish GB, Meloni AR, Chen W, MacInnes AW, Barak LS, Caron MG (2008) Smoothened signalling in vertebrates is facilitated by a G protein-coupled receptor kinase. *Mol Biol Cell* **19:** 5478-5489

92: Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cel Biol* **3:** 639-650

93: 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

94: Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ (1995) Pleckstrin homoglogy domain-mediated membrane association and activation of the ß-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with Gβγ subunits and lipid. *J Biol Chem* **270:** 11707-11710

95: Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ, Lefkowitz RJ (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure and regulation of the PIP2 bindingsite distinguishes the GRK subfamilies. *J Biol Chem* **271:** 24907-24913

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

97: Premont RT, Koch WJ, Inglese J, Lefkowitz RJ (1994) Identification, Purification, and Characterization of GRK5, a Member of the Family of G Protein-coupled Receptor Kinases. *J Biol Chem* **269:** 6832-6841

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

99: 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

100: Premont RT, Macrae AD, Aparicio SA, Kendall HE, Welch JE, Lefkowitz RJ (1999) The GRK4 Subfamily of G Protein-coupled Receptor Kinases Alternative Splicing, Gene Organization, And Sequence Conservation. *J Biol Chem* **274:** 29381-29389

101: Premont RT, Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69:** 511-534

102: 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

103: Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, García-Hoz C, Jurado-Puevo M, Aymerich I, Mayor F Jr (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation. *Biochim Biophys Acta.* **1768**:913-922

104: 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 β-Adrenergic Receptor Kinase 1 in Gene-targeted Mice. *J Biol Chem* **273:** 18180-18184

105: Ruiz-Gómez 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

106: Ruzycky AL, DeLoia JA (1997) Expression of β-adrenergic receptor kinase subtypes in the pregnant rat myometrium. *Am J Obstet Gynecol* **176:** 1077-1083

107: 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

108: Sallese M, Lombardi MS, De Blasi A (1994) Two isoforms of G protein-coupled receptor kinase 4 identified by molecular cloning. *Biochem Biophys Res Commun* **199:** 848-854

109: Sallese M, Mariggiò S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Baccetti B, De Blasi A (1997) G Protein-coupled Receptor Kinase GRK4. *J Biol Chem* **272:** 10188-10195

110: Sallese M, Salvatore L, D'Urbano E, Sala G, Storto M, Launey T, Nicoletti F, Knöpfel T, De Blasi A (2000) The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. *FASEB J* **14:** 2569-2580

111: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor

112: Samel I (2007) Regulation leukozytärer Chemokinrezeptoren durch Kinasen G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie, Medizinische Fakultät, Universität Ulm

113: Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74:** 5463-5467

114: Sefton M, Blanco MJ, Penela P, Mayor F, Nieto MA (2000) Expression of the G protein-coupled receptor kinase 2 during early mouse embryogenesis. *Mech Dev* **98:** 127-131

115: Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252:** 802-808

116: Simon V, Robin MT, Legrand C, Cohen-Tannoudji J (2003) Endogenous G Protein-Coupled Receptor Kinase 6 Triggers Homologous β-Adrenergic Receptor Desensitization in Primary Uterine Smooth Muscle Cells. *Endocrinology* **144:** 3058-3066

117: Shahid G, Hussain T (2007) GRK2 Negatively Regulates Glycogen Synthesis in Mouse Liver FL83B Cells. *J Biol Chem* **282:** 20612-20620

118: Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98:**503-517

119: Stoffel RH, Randall RR, Premont RT, Lefkowitz RJ, Inglese J (1994) Palmitoylation of G Protein-coupled Receptor Kinase, GRK6. *J Biol Chem* **269:** 27791-27794

120: Stoffel RH, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1997) Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates. *J Membrane Biol* **157:** 1-8

121: 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

122: Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev biochem* **63:** 101-132

123: Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *Faseb J* **9:** 745-754

124: 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 beta-amyloid accumulation. *J Neurosci* **24:** 3444-3452

125: Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kotasa T, Tesmer JJ (2005) Snapshot of Activated G Proteins at the Membrane: The $G\alpha_q$-GRK2-$G\beta\gamma$ Complex. *Science* **310:** 1686-1690

126: Thiyagarajan MM, Stracquantanio RA, 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

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

128: Virlon B, Firsov D, Cheval L, Reiter E, Troispoux C, Guillou F, Elalouf JM (1998) Rat G Protein-Coupled Receptor Kinase GRK4: Identification, Functional Expression, and Differential Tissue Distribution of Two Splice Variants. *Endocrinology* **139:** 2784-2795

129: Voigt C, Holzapfel HP, Meyer S, Paschke R (2004) Increased expression of G-protein-coupled receptor kinases 3 and 4 in hyperfunctioning thyroid nodules. *J Endocrinol* **182:** 173-182

130: 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

131: Vroon A, Heijnen CJ, Kavelaars A (2006) GKRs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J Leukoc Biol* **80:** 1214-1221

132: 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:** 312-319

133: Watson S, Arkinstall S (1994) The G-Protein linked receptor. Facts Book, *Academic Press*, London.

134: Watanabe H, Xu J, Bengra C, Jose PA, Felder RA (2002) Desensitization of human renal D_1 dopamine receptors by G protein-coupled receptor kinase 4. *Kidney International* **62:** 790-798

135: 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

136: Wess J (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *Faseb J* **11:** 346-354

137: Willets JM, Brighton PJ, Mistry R, Morris GE, Konje JC, Challiss RA (2009) Regulation of Oxytocin Receptor Responsiveness by G Protein-Coupled Receptor Kinase 6 in Human Myometrial Smooth Muscle. *Mol Endocrinol* **23:** 1272-1280

138: Winkelbauer R, Medina A, Swain RK, Steinbeisser H (2001) Frizzled-7 signalling controls tissue separation during Xenopus gastrulation. *Nature* **413:** 856-860

139: Yang W, Xia SH (2006) Mechanisms of regulation and function of G-protein-coupled receptor kinases. *World J Gastroenterol* **12:** 7753-7757

140: Zeng C, Sanada H, Watanabe H, Eisner GM, Felder RA, Jose PA (2004) Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. *Physiol Genomics* **19:** 233-246

141: Zeng C, Felder RA, Jose PA (2006) A New Approach for Treatment of Hypertension: Modifying D1 Dopamine Receptor Function. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **4:** 369-377

142: Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS und Ryba NJ (2003) Coding of sweet, bitter and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **112:** 293-301

143: Zozulya S, Echeverri F, Nguyen T (2001) The human olfactory receptor repertoire. *Genome Biol* **2:** RESEARCH0018

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei sehr vielen Menschen, die auf die unterschiedlichsten Arten und Weisen ihren Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Gierschik für das Ermöglichen der Doktorarbeit durch die freundliche Aufnahme in die Abteilung, die wissenschaftliche Betreuung, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und die aufmunternden, freundlichen Worte.

Meiner Betreuerin Frau PD Dr. Barbara Möpps möchte ich von ganzem Herzen für ihre intensive Betreuung danken. Durch ihr außergewöhnliches Engagement, ihre unermüdliche Unterstützung, ausdauernde Geduld, ausgeprägte Hilfsbereitschaft und ihr Vertrauen ermöglichte sie die Vollendung dieser Arbeit und gab mir Einblick in eine sehr faszinierende Welt.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Petra Vatter und Herrn Dr. Mike Braun für die gute Einarbeitung und Unterstützung bei auftretenden Schwierigkeiten. Mike danke ich besonders für die Einführung in die Arbeiten mit Xenopus laevis und die ausdauernde Hilfe bei den *Whole-mount-in-situ* Hybridisierungen, zu denen auch die Mitarbeiter der Abt. Biochemie dankbarerweise einen großen Beitrag leisteten.

Dr. Markus Wunderlin möchte ich für die freundliche Unterstützung und Ermöglichung der massenspektrometrischen Untersuchungen danken.
Frau S. Gierschik möchte ich für die Durchführung der fast „unzähligen“ DNA-Analysen danken.

Besonderen Dank verdienen aber auch die Mitglieder und Ehemaligen des Labors 4202 („OpenLab“) für die schöne Arbeitsatmosphäre, die gegenseitige Hilfsbereitschaft, die offenen Ohren und vielen angenehmen und lustigen Stunden. Besonders danke ich Claudia und Ines für die gemeinsamen Phosphorylierungsassays, Elke und Carolin meinen Platznachbarn, Karin, Petra, Ingrid, Stephan, Gudrun, Patrizia und allen anderen.

Ganz besonders möchte ich aber meinem Vater für die anhaltende Unterstützung danken. Meiner Frau und meinen beiden Töchtern schulde ich Dank für ihre Geduld und das Verständnis, das sie mir entgegenbrachten.

Lebenslauf

Jan Holger Lowak	geboren am 21.05.1976 in Meersburg am Bodensee
1982-1983	Stephan-Brodmann-Grundschule in Immenstaad
1983-1986	Grundschule Oberteuringen
1986-1995	Karl-Maybach-Gymnasium in Friedrichshafen
06/1995	Abitur
10/1995-07/1996	Wehrdienst
10/1996-06/2003	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
2002/2003	Praktisches Jahr: Kinderheilkunde, Chirurgie und Innere Medizin am Universitätsklinikum Ulm
09/2004-03/2011	Assitenzarzt in der Abteilung Innere Medizin im Klinikum Fichtelgebirge, Haus Selb
seit 04/2011	Assistenzarzt in der Abteilung Innere Medizin des Helios Spitals Überlingen