

Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinasen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Jörg Brockmann
aus Schlüchtern

Würzburg 2005

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Möglichkeiten der Signalübertragung	1
2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	2
2.1	Signalübertragung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	3
2.2	Desensibilisierungsmechanismen	5
2.2.1	Homologe Desensibilisierung	6
2.2.2	Heterologe Desensibilisierung	7
2.2.3	Downregulation	8
2.2.4	andere Mechanismen der Signalabschaltung	9
3	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen	9
3.1	Klonierung	10
3.2	Expression	10
3.3	Struktur und Aufbau der GRK-Familie	11
3.4	Rezeptorsubstrate	14
3.5	Agonistenaktivierung und Membranlokalisation	15
3.6	Nicht-Rezeptorsubstrate der GRKs	17
3.7	Regulation der GRKs	18
3.7.1	Regulation durch Phosphorylierung	18
3.7.2	Regulation durch Interaktion	20
3.8	Genexpression	22
3.8.1	Pathologische Prozesse	22
3.9	Transgene und Knockout-Mausmodelle	23
3.9.1	Knockout-Mäuse	24
3.9.2	Transgene Mäuse	25
3.10	Inhibitoren der GRK	26
4	Zielsetzung	28

II	Materialien und Methoden	29
1	Materialien	29
1.1	Bakterienstämme	29
1.2	Eukaryontische Zelllinien	29
1.3	Plasmidvektoren / Plasmide	30
1.4	Proteine und Antikörper	31
1.4.1	Proteine	31
1.4.2	Antikörper	31
1.5	Substanzen und allgemeine Puffer	32
1.5.1	Lösungen und Puffer	32
1.5.2	Medien	32
1.5.2.1	Medien für prokaryontische Zellen	32
1.5.2.2	Medien für eukaryontische Zellen	33
2	Methoden	34
2.1	Molekularbiologische Methoden	34
2.1.1	Reinigung von Plasmid-DNA	34
2.1.1.1	Mengen- und Reinheitsbestimmung von DNA und Oligonukleotiden	34
2.1.1.2	Entfernen von verschiedenen Kontaminationen in DNA-Lösungen	34
2.1.2	Klonierung in Plasmide	35
2.1.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien	35
2.1.2.2	Transformation kompetenter Bakterien	35
2.1.2.3	Restriktionsanalyse gereinigter DNA	35
2.1.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.1.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
2.1.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten und Vektor-DNA	36
2.1.3	Amplifizierung von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.1.4	Subklonierung der PCR-Produkte	37
2.1.5	Herstellung von Baculoviren für die Insektenzellkultur	37
2.2	Proteinchemische Methoden	38
2.2.1	Proteinbestimmung	38
2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.2.3	Färbungen von SDS-Polyacrylamidgelen	39
2.2.3.1	Coomassie-Brilliant Blue Färbung	39
2.2.3.2	Kupferchloridfärbung	40

2.2.4	„Western“-Transfer von Proteinen	40
2.2.5	Immundetektion immobilisierter Proteine auf Membranen	40
2.2.6	Präparation von Zellzytosolen	41
2.2.7	Crosslinking von Zellzytosolen	41
2.2.8	Immunpräzipitation aus Zellzytosolen	42
2.2.9	Proteinreinigung	42
2.2.9.1	Reinigung von GRK2 aus Sf9 Zellen	42
2.2.9.2	Reinigung von GST-Fusionsproteinen	43
2.2.9.3	Präparation von Rhodopsin aus Rinderretinae	43
2.3	Phosphorylierungsversuche	45
2.3.1	Phosphorylierung von Rhodopsin durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen	45
2.3.2	Phosphorylierung von Rhodopsin durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen aus Zellzytosolen	45
2.3.3	Phosphorylierung von Rhodopsin durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen bei vorhergehender Phosphorylierung der GRKs durch PKC	46
2.3.4	Phosphorylierung von Tubulin durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen	46
2.3.5	Bestimmung der Phosphorylierungsstellen durch GRK2/5 auf Tubulin	46
2.4	Zellkultur	47
2.4.1	Kultivierung verschiedener Zelllinien	47
2.4.2	Einfrieren von Zellen	47
2.4.3	Splitten von Zellen auf Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen	47
2.4.4	Transfektion von DNA in Säugetierzellen	47
2.4.4.1	Calciumphosphatmethode	47
2.4.4.2	DEAE-Dextran-Methode	48
2.4.4.3	Lipofektion	48
2.4.5	Zellkultur von Insektenzellen	49
2.5	Methoden der Protein-Protein-Interaktionsmessung	50
2.5.1	Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR, Biacore)	50
2.5.2	Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)	50
2.5.3	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)	51
2.5.3.1	Messung in Lösung/Zellzytosol	51
2.5.3.2	Messung in intakten Zellen	51
2.5.4	Dansylfluoreszenz	51
2.5.4.1	Markieren von Calmodulin mit Dansylchlorid	52
2.6	Statistik	52

III	Ergebnisse	53
	Regulation der GRK2 durch Proteinkinase C und Calmodulin	53
1	Phosphorylierung der GRK2 durch PKC	53
1.1	Einfluss der Phosphorylierung auf gereinigte GRK2	54
1.2	Einfluss der Phosphorylierung auf GRK2 Aktivität im Zellzytosol	54
1.3	Einfluss der Phosphorylierung auf die GRK2-Rezeptorinteraktion	55
2	Inhibition der GRK2 durch Calmodulin	57
2.1	Calciumabhängigkeit	57
2.2	Bestimmung der inhibitorischen Potenz	58
2.3	Michaelis-Menten-Kinetik	59
2.4	Rezeptorspezifität	61
2.4.1	Abhängigkeit der Tubulinphosphorylierung von G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten	61
2.4.2	Kartierung der Phosphorylierungsstelle durch enzymatischen Verdau	62
2.4.3	Herstellung phosphorylierungsdefizienter Tubulinmutanten	63
2.4.4	Einfluss von Calmodulin auf die Tubulinphosphorylierung	65
2.5	Versuche mit Calmodulinantagonisten	66
2.6	G-Protein $\beta\gamma$ -Abhängigkeit der Inhibition	68
3	Interaktion von Calmodulin mit GRK2	69
3.1	Messung mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	70
3.2	Messung mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)	71
3.3	Messung mittels Oberflächen-Plasmonresonanz (Biacore)	73
3.4	Messung mittels dansylmarkiertem Calmodulin	74
4	Einfluss der Phosphorylierung der GRK2 durch PKC auf die Inhibition durch Calmodulin	78
4.1	GRK2-Aktivität mit gereinigten Proteinen	78
4.2	Co-Immunpräzipitation von GRK2 und Calmodulin in Abhängigkeit der PKC Aktivität	79
4.3	Interaktion von Calmodulin mit GRK(1-53) WT oder GRK(1-53) S29D	80
4.4	Vergleich zwischen Calmodulininhibition von GRK2 WT und GRK2 S29D	81

IV	Diskussion	82
	Regulation der GRK2 durch Calmodulin und PKC	82
1	Regulation der GRK2 durch Calmodulin	82
2	Regulation durch Phosphorylierung mit PKC	87
V	Zusammenfassung	93
VI	Summary	95
	Anhänge	97
	Anhang A: Abkürzungsverzeichnis	97
	Anhang B: molekulare Eigenschaften der GRKs	99
	Bibliographie	100
	Publikationen	121
	Lebenslauf	122
	Danksagung	123

I Einleitung

1 Möglichkeiten der Signaltransduktion

Jede Zelle, sowohl Einzeller als auch Mehrzeller, Zellen aus Gewebsverbänden und Organen, benötigt zum Überleben die Fähigkeit, extrazelluläre Reize und Signale in intrazelluläre Antworten und Reaktionen umzusetzen. Ebenso wie die Reize sehr divergent sind, so erstreckt sich auch die Vielfalt der Signaltransduktionsmechanismen über ein breites Feld.

Bereits Einzeller müssen auf äußere Einflüsse wie Konzentrationsgradienten reagieren können, um so Nahrungsquellen aufzuspüren oder den optimalen Lebensraum zu besiedeln. Im Falle von Zellen im Gewebsverband wird die Signalerkennung durch Kommunikation der Zellen und der unterschiedlichen Gewebe im Organismus untereinander noch deutlich komplexer. Hierbei müssen die Zellen nicht nur auf Reize der Umwelt reagieren können, sondern auch auf Signale ihrer Nachbarzellen oder weiter entfernt liegender Gewebe. Diese Rolle übernehmen dabei Botenstoffe (Neurotransmitter, Gewebshormone, Wachstumsfaktoren und Hormone). Die Neurotransmitter kommen bei der schnellen Signalübertragung zum Einsatz. Sie wirken in neuronalen Systemen an Synapsen über kurze Strecken (Beispiele sind Dopamin oder Noradrenalin). Andere Stoffe wie das Adrenalin können auch systemisch über längere Strecken hinweg Signale übertragen. Dabei werden die Signale über die Blutbahn weitergeben. Dieser Weg wird endokrin genannt und spielt hauptsächlich bei hormonellen Botenstoffen eine Rolle. Ein weiterer Übertragungsweg für kürzere Strecken in Geweben wird als parakrin bezeichnet und hat seine Bedeutung in der Signalübertragung mittels Gewebshormonen. Beeinflusst der ausgeschiedene Botenstoff die ausscheidende Zelle direkt, so spricht man von einer autokrinen Signalübertragung, wie sie im Falle der Neurotransmitter oder auch bei Hormonen von großer Bedeutung ist.

Für die Erkennung dieser Botenstoffe und die anschließende Umwandlung in zelluläre Antworten sind Rezeptoren verantwortlich. Rezeptoren sind von ihrer Art und Lokalisation sehr unterschiedlich. Generell unterscheidet man vier Rezeptorklassen, von denen drei an der Zelloberfläche lokalisiert sind und eine sich im Zellinneren befindet.

Intrazelluläre Rezeptoren sind die Zielstrukturen vieler kleiner hydrophober Hormone z.B. Cortison, Schilddrüsen- oder Sexualhormone. Sie können nach Bindung an den Botenstoff (Ligand) in den Zellkern translozieren und dort durch Interaktion mit der DNA die Expression verschiedener Gene regulieren. Aufgrund dieser Eigenschaft ist der Effekt relativ langsam, er liegt im Minuten- bzw. Stundenbereich.

Eine weitere große Gruppe von Rezeptoren stellen die membranständigen Ionenkanal-Rezeptoren dar. Sie bestehen meist aus verschiedenen Untereinheiten und vermögen den Ein- oder Ausstrom von Ionen in oder aus der Zelle zu steuern. Dies kann zur Aktivierung ionenabhängiger Enzyme in der Zelle führen (z.B. Aktivierung von Calmodulin durch Calciumeinstrom) oder zur Veränderung der Erregbarkeit einer Zelle durch Änderungen des Membranpotentials. Ionenkanäle können zum einen durch die Bindung von Liganden gesteuert werden, zum anderen gibt es aber auch Kanäle, die auf Spannungsänderungen reagieren. Ihren Effekt entfalten diese Kanäle innerhalb einer sehr kurzen

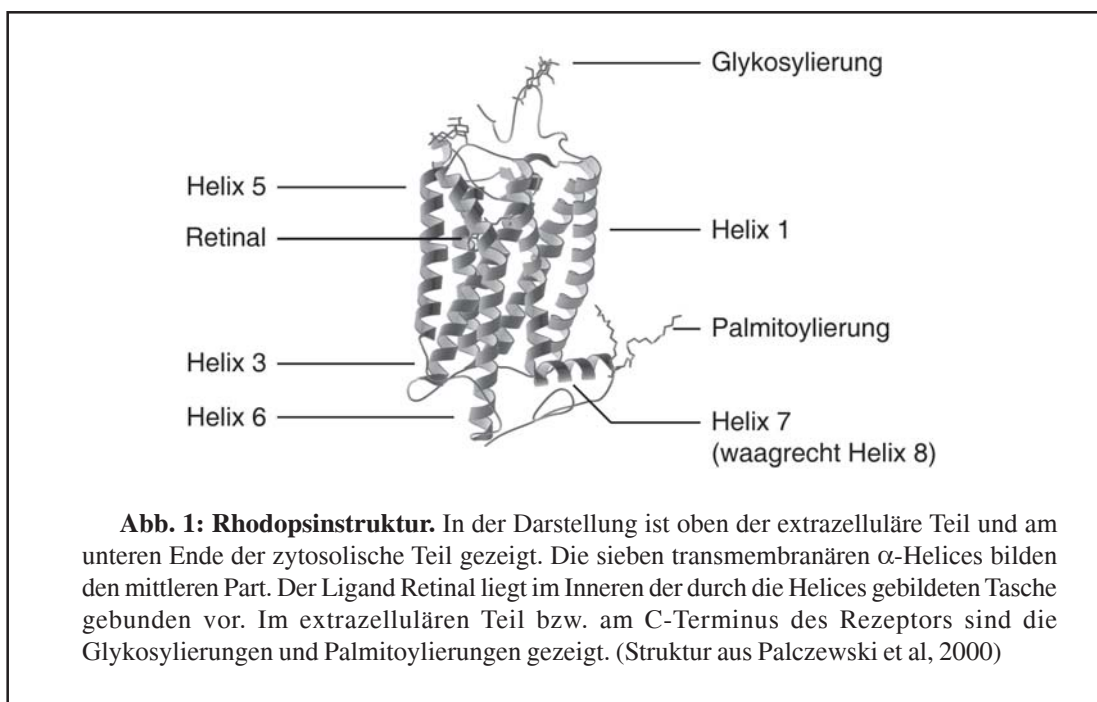
Zeit (Millisekunden).

Zur dritten Gruppe der Rezeptoren, den membranständigen Enzymrezeptoren, gehören die Enzymkinaserezeptoren, deren genereller Aufbau aus einer ligandenbindenden extrazellulären Domäne, einer membrangängigen Domäne und der enzymatisch aktiven intrazellulären Domäne besteht. Die meisten dieser Rezeptoren, wie die Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder Insulin, besitzen Tyrosinkinase-Eigenschaften. Nach Aktivierung durch Liganden und Dimerisierung vermögen sie sowohl sich selbst als auch andere Zielproteine zu phosphorylieren und so deren Struktur und Funktion zu verändern, was eine intrazelluläre Signalkaskade startet. Eine andere Untergruppe der Enzymkinaserezeptoren sind die Serin-/Threoninkinase-Rezeptoren, zu denen zum Beispiel der Activinrezeptor gehört. Eine Sonderstellung in dieser Gruppe der Enzymkinaserezeptoren stellen Rezeptoren dar, denen die intrazelluläre Kinasedomäne fehlt. Sie können aber nach Ligandenbindung lösliche intrazelluläre oder auch andere membranständige Tyrosinkinasen binden und so deren enzymatische Aktivität beeinflussen. Ebenfalls zu den Enzymrezeptoren gehören die Guanylylcyclaserezeptoren, die statt einer Kinasedomäne eine Guanylylcyclase tragen. Ein Beispiel hierfür ist der Rezeptor des atrialen natriuretischen Peptids.

Die therapeutisch wichtigste Gruppe der Rezeptoren bildet die Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die im folgenden genauer besprochen wird.

2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) bilden bei weitem die größte Gruppe an membranständigen Rezeptoren und zeichnen sich durch eine Vielzahl von verschiedenen Liganden und Signalwegen aus (Wise et al., 2004). Allen GPCRs ist ihr struktureller Aufbau gemein. Er ist charakterisiert durch einen extrazellulären N-Terminus, der je nach Rezeptorart unterschiedlich



ausfallen kann. Dieser wird gefolgt von sieben hydrophoben α -Helices, die in die Zellmembran eingelagert sind und durch insgesamt sechs Schleifen (loops), von denen je drei intra- und drei extrazellulär lokalisiert sind, miteinander verbunden sind. Die Länge des sich anschließenden intrazellulären C-Terminus und die der sechs Schleifen variiert wiederum stark zwischen den verschiedenen Rezeptoren. Aufgrund ihrer sieben Membranhelices werden die GPCRs gelegentlich als Serpentinrezeptoren bezeichnet. Abbildung 1 zeigt die Struktur des Rhodopsin in seinem inaktiven Zustand.

Wie sich aus dem weitaus gebräuchlicheren Namen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, ableiten lässt, interagieren die Rezeptoren mit einer Klasse von intrazellulär membranständigen Proteinen, den Guanosintriphosphat-bindenden Proteinen (G-Proteine). G-Proteine sind heterotrimere Proteine, die aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit bestehen. Im inaktiven Zustand bindet die α -Untereinheit Guanosindiphosphat (GDP).

2.1 Signalweg der GPCR

Ein genereller Mechanismus in der Signaltransduktion der GPCRs ist, dass es nach Ligandenbindung zu einer Aktivierung durch Konformationsänderung vor allem der transmembranären Helices 3 und 6 (Palczewski et al., 2000; Vilardaga et al., 2003) kommt. Der aktive Rezeptor katalysiert auf der α -Untereinheit des G-Proteins den Austausch von GDP durch GTP. Nach GTP-Bindung an die α -Untereinheit des G-Proteins dissoziiert der Komplex aus α - und β/γ -Untereinheiten auseinander und die frei werdenden α - und β/γ -Untereinheiten können getrennt ihre jeweiligen Effektorsysteme beeinflussen. Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass es spezifisch bei der $G\alpha_i$ -Untereinheit nicht zu einer vollständigen Dissoziation, sondern eher zu einer Konformationsänderung kommt (Bünemann et al., 2003).

Zur Terminierung des Effektes wird das in der $G\alpha$ -Untereinheit gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und so der inaktive Ausgangszustand des heterotrimeren G-Proteins wieder hergestellt.

Die 13 verschiedenen α -Untereinheiten der G-Proteine (Splicevarianten von $G\alpha_s$ sind nicht mitgezählt) werden in drei große Klassen eingeteilt, die sich durch ihren Hauptangriffspunkt in der Signalkaskade unterscheiden. Die α_s -Untereinheiten wirken stimulierend auf die Adenylylcyclase und erhöhen somit die Konzentration an intrazellulärem cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Dem entgegen stehen die α_i -Untereinheiten, die die Adenylylcyclaseaktivität hemmen und somit die Konzentration an cAMP senken.

Ein ganz anderer Signalweg wird durch die $G\alpha_q$ -Untereinheiten aktiviert. Sie steigern die Aktivität von Phospholipasen des C-Subtyps und führen so einer Steigerung von intrazellulärem Calcium und Inositoltriphosphat (IP_3), die beide zur Aktivierung der Proteinkinase C notwendig sind. Eine Übersicht der verschiedenen Signalwege von GPCRs ist in Abbildung 2 dargestellt.

Neben diesen Haupteffektorsystemen beeinflussen $G\alpha$ -Untereinheiten aber noch viele andere Proteine, wie verschiedene Ionenkanäle für Kalium, Calcium oder Natrium/Protonen-Pumpen, andere Phospholipasen (A_2 und D-Subtyp) und die cGMP-Phosphodiesterasen. Das kleine G-Protein Rho wird von den "neueren" $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ aktiviert.

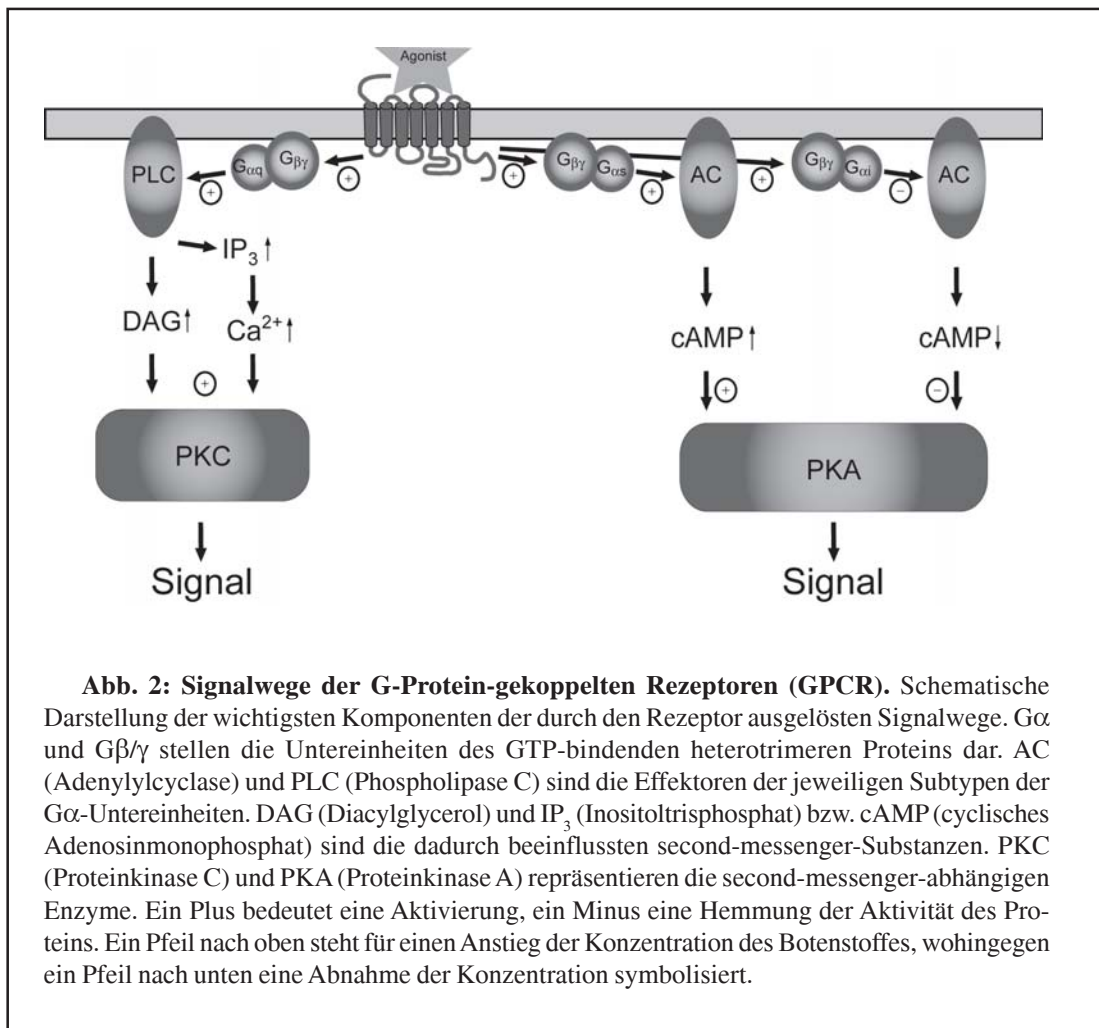


Abb. 2: Signalwege der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Schematische Darstellung der wichtigsten Komponenten der durch den Rezeptor ausgelösten Signalwege. G α und G $\beta\gamma$ stellen die Untereinheiten des GTP-bindenden heterotrimeren Proteins dar. AC (Adenylylcyclase) und PLC (Phospholipase C) sind die Effektoren der jeweiligen Subtypen der G α -Untereinheiten. DAG (Diacylglycerol) und IP $_3$ (Inositoltrisphosphat) bzw. cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) sind die dadurch beeinflussten second-messenger-Substanzen. PKC (Proteinkinase C) und PKA (Proteinkinase A) repräsentieren die second-messenger-abhängigen Enzyme. Ein Plus bedeutet eine Aktivierung, ein Minus eine Hemmung der Aktivität des Proteins. Ein Pfeil nach oben steht für einen Anstieg der Konzentration des Botenstoffes, wohingegen ein Pfeil nach unten eine Abnahme der Konzentration symbolisiert.

Auch bei den β/γ -Untereinheiten ist die Variabilität sehr groß. So gibt es fünf verschiedene β -Untereinheiten und mindestens sieben verschiedene γ -Untereinheiten. Zusammen wirken sie auf eine Vielzahl von Effektoren wie Adenylylcyclasen, Phospholipasen C β und A $_2$, Phosphoinositid-3-Kinase, Raf-1-Kinase, Kalium- und Calciumkanäle, Calmodulin und G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen 2 und 3.

Die so aktivierten Systeme verursachen in der Zelle verschiedenartigste Antworten wie Proteinphosphorylierung, Gentranskription, Reorganisation des Cytoskeletts, Membrandepolarisation, etc. Dabei erfolgt in jedem Schritt der Signalkaskade eine Amplifizierung des Signals, da ein aktiviertes Protein mit mehreren, meist gleichartigen Effektoren wechselwirkt. So aktiviert ein G $_s$ -gekoppelter Rezeptor mehrere G α_s -Proteine, die durch die Aktivierung von Adenylylcyclasen große Mengen cAMP produzieren lassen. Auf diese Weise kann ein einzelner Rezeptor 10 5 bis 10 6 Moleküle cAMP produzieren.

Eine Selektierung dieser Signalwege erfolgt in der Natur durch unterschiedliche Affinitäten der einzelnen Subklassen von Rezeptoren, G-Proteinen, etc. zu ihren jeweiligen Effektoren. So besitzen die verschiedenen Subtypen der G-Proteinuntereinheiten verschieden stark ausgeprägte Affinitäten zu ihren Effektorproteinen, und auch Rezeptoren koppeln präferentiell an bestimmte G-Proteine.

Ein weiterer Mechanismus, um eine größere Divergenz der Signale zu erzeugen, ist die unterschiedliche Expression der einzelnen Komponenten und Subtypen in den verschiedenen Zelltypen und Geweben. Im Zusammenspiel der verschiedenen Proteine ergeben sich weitere Möglichkeiten der Signalspezialisierung. So können z.B. bestimmte GPCRs nacheinander verschiedene G-Protein-Subtypen aktivieren. In diesem Fall spricht man von divergierenden Signalen. In der Literatur ist ein Umschalten des β_2 -Rezeptors von einer G_s - zu einer G_i -Kopplung nach Proteinkinase-A-(PKA)-Phosphorylierung beschrieben (Daaka et al., 1997a). Oder es wird z.B. ein G-Protein-Subtyp von verschiedenen GPCRs aktiviert, was zu einer Konvergenz des Signals führt.

Ein zusätzlicher Mechanismus, der die Vielfalt der möglichen Signalwege weiter vergrößert, ist das Prinzip der Rezeptordimerisierung/-oligomerisierung, dessen Bedeutung für die Funktionalität und Spezifität von Rezeptoren und ihren Signalen noch nicht geklärt ist. Am deutlichsten wird dies am Beispiel der Klasse der Opioidrezeptoren. Obwohl nur drei Gene für Opioidrezeptoren kloniert wurden, sind auf Grund von pharmakologischen Studien mehrere Unterklassen postuliert worden. In neueren Studien konnte diese Diskrepanz zwischen der Anzahl der Gene und der verschiedenen pharmakologischen Eigenschaften auf die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von Opioidrezeptoren zurückgeführt werden. So wurde gezeigt, dass sich das Bindungsverhalten für Agonisten und Antagonisten bei Oligomeren des κ - und δ -Opioidrezeptors drastisch verändert. Die Affinitäten für selektive Agonisten stiegen synergistisch bei Oligomerbildung an (Jordan und Devi, 1999). Auch der Signalweg der Rezeptoren durch Oligomerisierung wird verändert. Heterooligomere zwischen μ - und δ -Opioidrezeptoren zeigten im Gegensatz zu den Monomeren eine Insensitivität auf Pertussistoxinbehandlung, was auf eine veränderte G-Proteinkopplung schließen ließ (George et al., 2000). Diese Vielfalt der Signaltransduktionsmechanismen setzt sich auch bei den Mechanismen der Signaltermination fort.

2.2 Desensibilisierungsmechanismen der GPCR

Genauso wie es für die Zelle von entscheidender Bedeutung ist, ein Signal spezifisch in eine Antwort zu überführen, ist es ebenso bedeutend, dieses Signal spezifisch wieder abzuschalten, ohne dabei andere, ähnliche Signale zu beeinflussen.

In den meisten Fällen ist der Auslöser, der die Maschinerie der Signaltermination antreibt, das Signal selber. So werden z.B. hormonelle Signale im Körper durch den Mechanismus der negativen Rückkopplung (negativer Feedback) gebremst, indem die Zielorgane nach Stimulation durch die Hormone ihrerseits Botenstoffe aussenden, die die Hormonproduktion direkt oder indirekt drosseln.

Ebensolche Mechanismen spielen auch auf zellulärer Ebene eine Rolle, wenn die Aktivität der an der Signalkaskade beteiligten Proteine (Rezeptor, G-Protein, Effektoren) beeinflusst wird. Durch die bereits weiter oben beschriebene Amplifizierung des Signals sind die effektivsten Methoden zur Abschaltung auf der Ebene des Rezeptors und der G-Proteine zu finden. Folglich sind diese Mechanismen auch heutzutage am besten untersucht.

Bei der Abschaltung des Signals unterscheidet man in erster Linie nach spezifisch durch den Rezeptor ausgelösten (homologen) oder generalisiert durch andere Signale ausgelösten (heterologen) Mechanismen (siehe Übersicht in Abbildung 3).

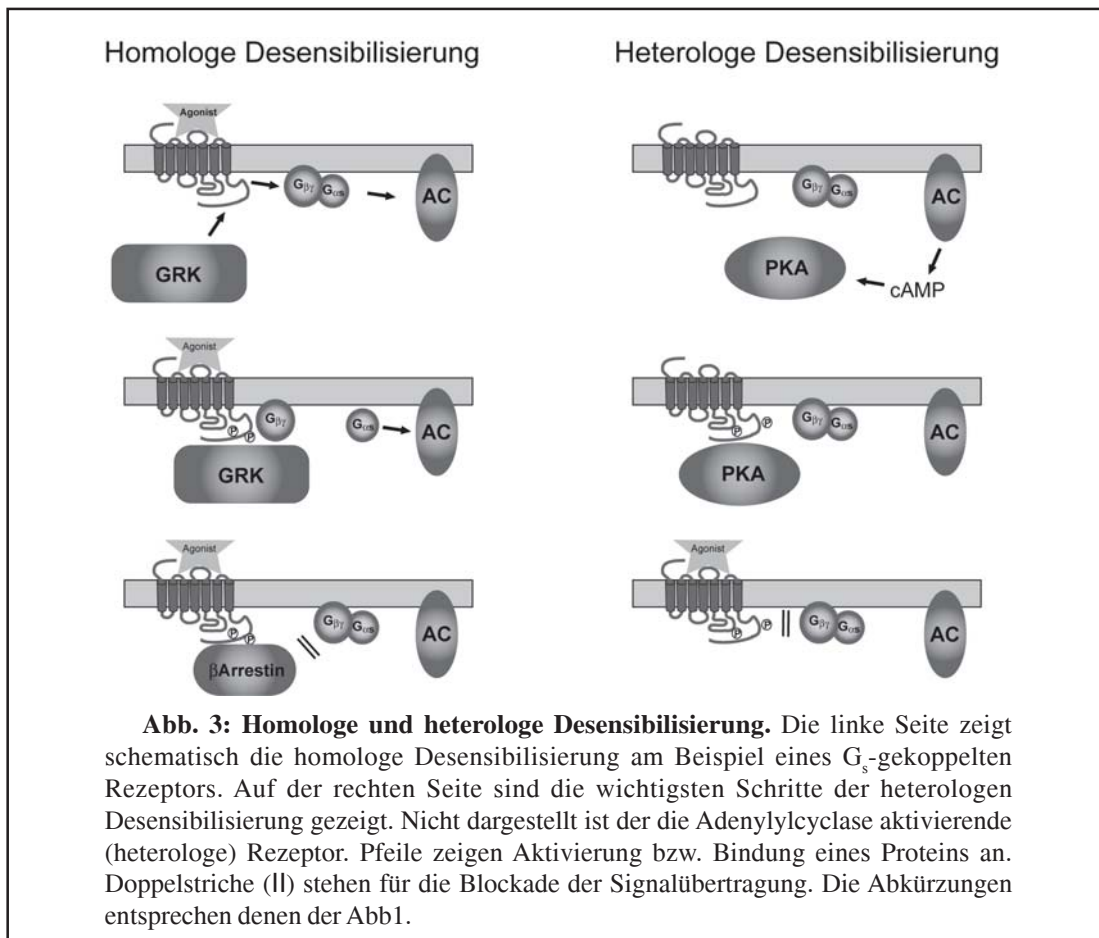


Abb. 3: Homologe und heterologe Desensibilisierung. Die linke Seite zeigt schematisch die homologe Desensibilisierung am Beispiel eines G_s-gekoppelten Rezeptors. Auf der rechten Seite sind die wichtigsten Schritte der heterologen Desensibilisierung gezeigt. Nicht dargestellt ist der die Adenylylcyclase aktivierende (heterologe) Rezeptor. Pfeile zeigen Aktivierung bzw. Bindung eines Proteins an. Doppelstriche (||) stehen für die Blockade der Signalübertragung. Die Abkürzungen entsprechen denen der Abb1.

Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit ist die Geschwindigkeit der Abschaltung: schnell, also innerhalb von Sekunden oder Minuten versus langsam, innerhalb von Stunden oder gar Tagen. Diese ist eng mit der Dauer der Abschaltung verknüpft. So spricht man bei einer kurzzeitigen Entkopplung des Rezeptors von seinem G-Protein von Desensibilisierung, wohingegen die Abnahme der Rezeptorzahl zu einem langfristigen Verlust der Ansprechbarkeit der Zelle auf Signale führt und als Downregulation bezeichnet wird (Lohse, 1993).

2.2.1 Homologe Desensibilisierung

Die wohl wichtigste Form der Regulation des Signalweges von GPCRs ist deren Phosphorylierung durch receptorspezifische Kinasen, den G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs). Sie führt zu einem schnellen und deutlichen Funktionsverlust (50-70%) der Rezeptoren (Lohse, 1993). Ausgelöst wird die Phosphorylierung durch die mit der Ligandenbindung einhergehende Konformationsänderung des Rezeptors. Dieser kann nun selektiv von den GRKs erkannt und phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung per se hat jedoch keine inhibitorischen Eigenschaften auf das Rezeptorsignal. Sie erhöht lediglich die Affinität des Rezeptors für eine weitere Klasse von Proteinen, den sogenannten Arrestinen. Durch die Bindung von Arrestin an den phosphorylierten Rezeptor kommt es zur Entkopplung des Rezeptors von dem gebundenen und aktivierten G-Protein

und nachfolgend zu einer Abschaltung des Rezeptors. Da dieser Regulationsmechanismus durch den aktivierten Rezeptor selbst ausgelöst wird, wird er auch homologe Desensibilisierung genannt. Die Phosphorylierung des Rezeptors durch die GRKs erfolgt sehr rasch (< 2 Minuten) und ist in manchen Fällen persistent, d.h. eine erneute Rezeptorstimulation führt zu einer schnelleren Abschaltung des Signals, da Arrestin an den schon phosphorylierten Rezeptor binden kann (C. Krasel, persönliche Mitteilung).

2.2.2 Heterologe Desensibilisierung

Im Gegensatz zur homologen Desensibilisierung kommt es bei der heterologen Desensibilisierung zur Phosphorylierung des Rezeptors durch Kinasen der Signalkaskade, hauptsächlich durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und die Proteinkinase C (PKC). Hierbei ist die Phosphorylierung des Rezeptors im Gegensatz zu den GRKs nicht der Hauptzielpunkt der Kinasen, sondern eher Nebenprodukt bei der Phosphorylierung anderer Proteine der Signalkaskade. PKA und PKC vermögen den Rezeptor auch Agonist-unabhängig zu phosphorylieren (Benovic et al., 1985). Allerdings verläuft die heterologe Phosphorylierung deutlich langsamer als die homologe durch GRKs (Roth et al., 1991) und sie benötigt zur Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein keine weiteren Komponenten wie Arrestin (Pitcher et al., 1992).

Für den adrenergen β_2 -Rezeptor sind zwei Phosphorylierungsstellen für PKA beschrieben (Bouvier et al., 1989), die auch als PKC-Substrate fungieren können (Pitcher et al., 1992). Da PKA direkt durch G_s stimuliert wird, hat diese Phosphorylierung auch die Funktion eines negativen Feedbackloops, ähnlich wie bei G_q -gekoppelten Rezeptoren, die direkt PKC aktivieren.

Neben dem β_2 -Rezeptor findet sich dieser Mechanismus auch bei den G_s -gekoppelten Histamin H_2 - und Prostaglandin- PGE_1 -Rezeptoren. Die Phosphorylierung durch PKC findet sich neben dem β_2 -Rezeptor vor allem bei G_q -gekoppelten Rezeptoren wie dem 5-HT $_{1A}$ -Serotonin-Rezeptor (Raymond, 1991), dem PTH-Rezeptor (Pernalette et al., 1990), einigen olfaktorischen Rezeptoren (Boekhoff et al., 1992) oder den α_1 -Rezeptor-Subtypen (Diviani et al., 1997). Bei letzteren konnte auch gezeigt werden, dass sie durch Aktivierung anderer G_q -gekoppelter Rezeptoren (Endothelin ET $_A$ -Rezeptor (Vazquez-Prado et al., 1997)) oder auch G_i -gekoppelter Rezeptoren (Lysophosphatid-säure (LPA)-Rezeptor (Casas-Gonzalez et al., 2003)) über Aktivierung von PKC durch Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) einer Steuerung durch heterologe Desensibilisierung unterliegen.

Einen Hinweis darauf, dass diese beiden Desensibilisierungsmechanismen auch einen funktionell bedeutenden Unterschied auf die Rezeptorinternalisierung haben, zeigen neuere Arbeiten, in denen verschiedene Mutanten des β_1 -adrenergen Rezeptors, die entweder nicht von PKA oder GRKs phosphoryliert werden konnten, auch verschiedene Wege der Internalisierung nutzen (Rapacciuolo et al., 2003). Auch Arbeiten am metabotropen Glutamatrezeptor-1A zeigen Unterschiede in der PKC oder GRK vermittelten Internalisierung (Mundell et al., 2003).

2.2.3 “Downregulation”

Die bis jetzt beschriebenen Mechanismen dienen vor allem der kurzfristigen Abschaltung nach Rezeptorstimulation. Physiologisch ist es aber oft auch sinnvoll, dass sich die Zellen oder der Körper vor zu langanhaltender Stimulation schützen können. Hierfür gibt es die sogenannte Rezeptordownregulation. Dabei kann direkt über eine vermehrte proteolytische Degradation die Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermindert werden oder die Neusynthese durch Reduktion der mRNA-Menge verringert werden.

Zur “Downregulation” kommt es z.B., wenn nach Internalisierung der Rezeptor nicht wieder durch Recycling an die Zelloberfläche zurück gelangt, sondern in lysosomalen Kompartimenten abgebaut wird. Im allgemeinen erfolgt die Internalisierung von GPCRs nach Bindung von Arrestin an den aktivierten Rezeptor. Arrestin akkumuliert den Rezeptor in “Clathrin-coated-pits”. Dieser Hauptmechanismus wird von den meisten GPCRs benutzt. Allerdings gibt es auch hier Ausnahmen. So ist für den muskarinischen M₂-Rezeptor gezeigt, dass er sowohl Clathrin- als auch Arrestin-unabhängig internalisiert (Werbonat et al., 2000). Der 5-HT_{2A}-Serotonin-Rezeptor benötigt zwar Clathrin, aber kein Arrestin zur Internalisierung (Bhatnagar et al., 2001). Die Internalisierung läuft im Gegensatz zur Desensibilisierung wesentlich langsamer ab. Ihr Maximum erreicht sie abhängig vom jeweiligen Rezeptorsystem nach Minuten bis Stunden. Die Faktoren, die für die Unterscheidung zwischen Recycling und lysosomalem Abbau verantwortlich sind, sind gerade in letzter Zeit intensiv untersucht worden. So wurde für den δ -Opioidrezeptor ein Protein identifiziert, das dessen Recycling fördert (GASP, G-protein-coupled receptor-associated sorting protein (Whistler et al., 2002)). Für den β_2 -Rezeptor wurde ein ähnliches Prinzip entdeckt, das durch Phosphorylierung mit GRK5 blockiert werden kann (Cao et al., 1999). Dieses Prinzip wurde allerdings in neueren Veröffentlichungen wieder angezweifelt (Millman et al., 2004). Voraussetzung für das Recycling der GPCRs ist einerseits das Dissoziieren des Liganden, das vermutlich durch das saure Milieu der Vesikel hervorgerufen wird (Krueger et al., 1997), sowie die Dephosphorylierung des Rezeptors. Hierfür wurde die Phosphatase vom Typ 2A identifiziert, die wahrscheinlich den Rezeptor nach Konformationsänderung durch das Dissoziieren des Liganden erkennt (Pitcher et al., 1995a).

Eine weitere Möglichkeit der Downregulation ist die kürzlich entdeckte Regulation der GPCRs durch Ubiquitinierung, die Voraussetzung für den Übergang des internalisierten Rezeptors von den „late endosomes“ in das Lysosom zu sein scheint (Shenoy et al., 2001). Jockers et al. postulieren einen weiteren Mechanismus, der wahrscheinlich durch proteolytischen Abbau an der Zellmembran zustande kommt und unabhängig von endozytotischen Wegen stattfindet (Jockers et al., 1999).

Auf der Ebene der mRNA-Stabilität sind zwei generelle Mechanismen beschrieben, die beide auf die Gegenwart eines Agonisten angewiesen sind. Es handelt sich zum einen um einen PKA-abhängigen (Danner und Lohse, 1997) und zum anderen um einen PKA-unabhängigen Weg (Bouvier et al., 1989). Mechanistisch spielt dabei wahrscheinlich vor allem die Bindung eines destabilisierenden RNA-Bindungsproteins an eine AU-reiche Box des 3'-untranslatierten Teils des β_2 -Rezeptorgens eine Rolle (Danner et al., 1998).

2.2.4 Andere Mechanismen der Signalabschaltung

Neben der Möglichkeit, die Signalkaskade auf der Ebene des Rezeptors zu unterbrechen, gibt es noch eine Vielzahl von weiteren Regulationsmöglichkeiten, die sich auf nachgeschaltete Moleküle, Proteine und Enzyme auswirken. So kann zum Beispiel das gebildete cAMP durch Phosphodiesterasen abgebaut werden, oder es können durch Phosphorylierung aktivierte Enzyme durch Phosphatasen dephosphoryliert werden.

Eine andere Möglichkeit bieten die sogenannten RGS-Proteine (regulator of G-protein signaling). Diese Familie von Proteinen besteht zur Zeit aus fünf Unterfamilien und insgesamt über 20 Proteinen, die alle die Eigenschaft haben, die GTPase-Aktivität der GTP-gebundenen $G\alpha$ -Untereinheiten zu erhöhen und somit die Hydrolyse des in der aktivierten Form der $G\alpha$ -Untereinheiten gebundenen GTPs zu GDP zu beschleunigen. Die GDP-gebundene Form der $G\alpha$ -Untereinheit stellt die inaktive Form dar und reassoziert mit den $G\beta/\gamma$ -Untereinheiten zum inaktiven heterotrimeren G-Protein. Die überwiegende Mehrheit der bis jetzt bekannten RGS-Proteine beeinflusst die $G\alpha_q$ - und $G\alpha_i$ -Untereinheiten (Ishii und Kurachi, 2003).

3 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen

Die Übertragung von Phosphatgruppen auf Proteine ist in der Natur ein weit verbreiteter Regulations- und Kommunikationsweg. Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, werden Kinasen genannt. Sie bilden eine der größten Gruppen an Proteinen und zeigen große Unterschiede in ihrer Struktur, Regulation und vor allem in ihren Substratspezifitäten. Allen gemeinsam ist jedoch eine 250-300 Aminosäure-große Kinasedomäne, die für die katalytische Funktion verantwortlich und relativ stark innerhalb der Gruppe konserviert ist.

Auf Grund ihrer Substratspezifitäten unterscheidet man in erster Linie zwischen Serin/Threonin-Kinasen und Tyrosinkinase. Innerhalb dieser recht groben Einteilung werden die Kinasen wiederum anhand ihrer Substratspezifität und Regulationsmechanismen in Familien zusammengefasst.

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) gehört zur sogenannten AGC-Gruppe. Zu dieser Gruppe gehören ebenfalls die cyclisch-Nukleotid-abhängigen Kinasen (PKA und PKG), die Familie der Proteinkinase C (PKC), die Familie der Akt-Kinase (ehemals PKB) und die ribosomale-S6-Kinase-Familie. Ihnen allen ist gemeinsam, dass sie bevorzugt Serine und Threonine in unmittelbarer Umgebung von Arginin und Lysin phosphorylieren (Hanks und Hunter, 1995).

Allerdings gehorchen die GRKs dieser Regel nicht, da sie bevorzugt Serine und Threonine in der Nachbarschaft von sauren oder neutralen Resten phosphorylieren, wie Versuche mit Substratpeptiden gezeigt haben (Palczewski et al., 1988; Benovic et al., 1990; Onorato et al., 1991; Kunapuli et al., 1994b; Loudon und Benovic, 1994). Ein weiteres Charakteristikum der GRKs ist deren großer Amino- und Carboxyterminus, die sich in bestimmten Subdomänen deutlich von den anderen Kinasen unterscheiden. GRKs erkennen als Hauptsubstrat selektiv die Agonist-besetzte Form der GPCRs.

3.1 Klonierung der GRKs

Der erste Vertreter aus der Familie der GRKs, die GRK1 oder auch Rhodopsinkinase, wurde 1972 lange vor den anderen Vertretern dieser Gruppe entdeckt (Kühn und Dreyer, 1972). Die Reinigung erfolgte allerdings erst 1978 zeitgleich durch zwei unabhängige Gruppen (Kühn, 1978; Shichi und Somers, 1978). Dennoch war es die GRK2, von der 1989 die erste Nukleotidsequenz aus der Gruppe von Robert J. Lefkowitz aufgeklärt werden konnte (Benovic et al., 1986a). Sie wurde kurz vorher von derselben Gruppe aus S49 kin⁺ Lymphomzellen gereinigt (Benovic et al., 1986b).

Als Substrat verwendete man damals hauptsächlich den β_2 -adrenergen Rezeptor, weshalb diese GRK ursprünglich β -adrenerge Rezeptorkinase (β ARK) genannt wurde. Mittlerweile setzt sich aber immer mehr die von Inglese 1993 vorgeschlagene Nomenklatur durch, in der die Kinasen allgemeiner als G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) bezeichnet werden und die Nummerierung sich nach dem Zeitpunkt ihrer Entdeckung richtet.

Aus einer Rinderhirnbibliothek wurde 1991 eine Isoform der GRK2, die GRK3 kloniert, die anfänglich auch als β ARK2 bezeichnet wurde (Benovic et al., 1991). Zeitgleich wurde auch die Primärsequenz der Rhodopsinkinase (RK oder GRK1) aufgeklärt und so die zuvor postulierte Proteinkinasefamilie anhand der Homologie bestätigt (Sterne-Marr und Benovic, 1995). Die homologen Gene in *Drosophila* wurden ebenfalls 1991 zum ersten Mal beschrieben (Cassill et al., 1991). Sie wurden analog zur Familie der GRKs mit GPRK1 und GPRK2 bezeichnet (G-protein coupled receptor kinase).

Ungefähr ein Jahr später wurde eine cDNA mit hoher Homologie zu den bekannten GRKs gefunden (GRK4, (Ambrose et al., 1992)). Danach wurde festgestellt, dass von GRK4 vier Splicevarianten existieren (Premont et al., 1996). Ein weiterer sehr wichtiger Vertreter der GRK-Familie, GRK5, wurde 1993 zuerst aus einer cDNA-Bibliothek von humanem Herzen isoliert (Kunapuli und Benovic, 1993) und später ebenfalls in den Geschmackspapillen des Rindes gefunden (Premont et al., 1994). GRK6 wurde ebenfalls aus einer cDNA-Bibliothek aus humanem Hirn kloniert (Benovic und Gomez, 1993). Auch bei GRK6 wurden in der Maus vier Splicevarianten identifiziert, GRK6A-D (Moepps et al., 1999). In Datenbanken wie Swissprot finden sich auch für die humane Variante von GRK6 vier unveröffentlichte Splicevarianten (Premont & Lefkowitz, swissprot Eintrag). Als letztes Mitglied der Familie der GRKs wurde 1998 die GRK7 von zwei unabhängigen Gruppen analog zur GRK1 aus den Zäpfchen der Retina kloniert (Hisatomi et al., 1998; Weiss et al., 1998). Die Sequenz des menschlichen Genoms scheint für keine weiteren GRKs zu codieren.

3.2 Gewebsexpression der GRKs

Um eine gewisse Spezifität der GRKs auf spezielle GPCRs zu erreichen, werden manche der GRKs nur in bestimmten Geweben exprimiert. GRK1 (in Stäbchen) und GRK7 (in Zäpfchen) sind ausschließlich in der Retina bzw. GRK1 in geringen Mengen auch in der Zirbeldrüse zu finden. So entsteht eine Prävalenz dieser beiden GRKs für Rhodopsin und andere Opsine. GRK4 findet sich in größeren Mengen vor allem in Spermatozoen und GRK6 spielt in Zellen des Immunsystems eine dominierende Rolle.

Für die anderen Isoenzyme der GRK-Familie ist eine praktisch ubiquitäre Expression beschrieben worden, die allerdings in der Quantität der einzelnen GRKs untereinander stark vom Gewebe abhängig ist. So wird bis auf bestimmte Bereiche der Hoden und des Gehirns nur ca. 10-20% an GRK3 im Vergleich mit GRK2 exprimiert (Benovic et al., 1991). Im Gehirn konnte durch Immunfluoreszenz und *in-situ*-Hybridisierung gezeigt werden, dass GRKs vor allem an den prä- und postsynaptischen

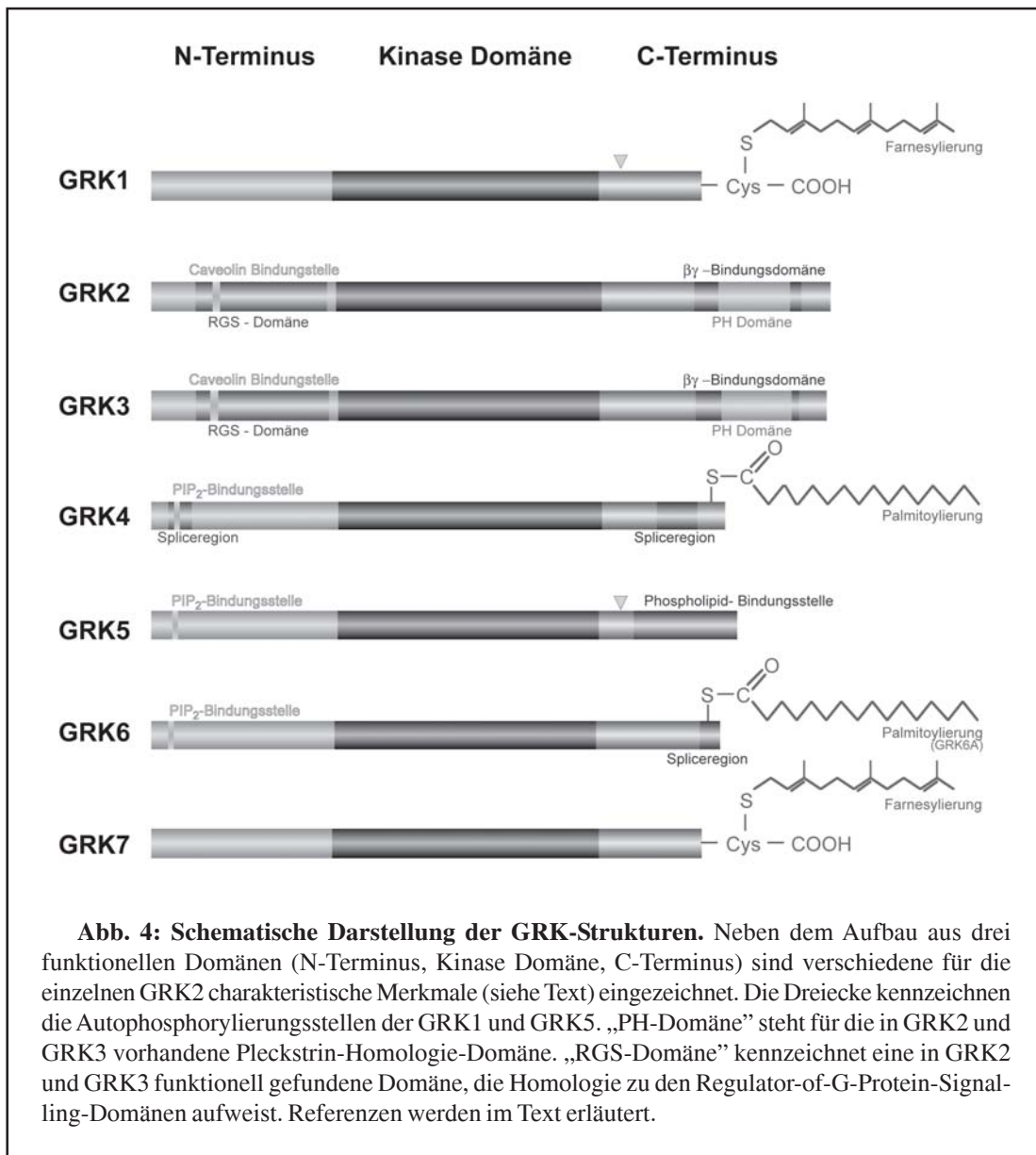
Gen	Alternativname	Expression	Literatur
GRK1	Rhodopsinkinase	Retina: Zäpfchen und Stäbchen >> Zirbeldrüse	Lorenz et al., 1991
GRK2	β -adrenerge Rezeptorkinase1 β ARK1	ubiquitär: Leukozyten, Hirnrinde >> Herz > Lunge > Niere	Benovic et al., 1989b
GRK3	β -adrenerge Rezeptorkinase2 β ARK2	ubiquitär: Hirn > Milz > Herz, Lunge, Niere	Benovic et al., 1991
GRK4	IT11	Hoden >>> Hirn, periphere Nerven	Sallese et al., 1997
GRK5		ubiquitär: Herz, Plazenta, Lunge > Skelettmuskel > Hirn, Leber, Pankreas > Niere	Kunapuli und Benovic, 1993
GRK6		Hirn, Skelettmuskel	Benovic und Gomez, 1993
GRK7		Retina: Zäpfchen	Weiss et al., 1998

Tab. 1: Gewebeexpression von GRKs. Bestimmt durch Northernblots und Immunhistochemie. Näheres dazu in den angegebenen Referenzen.

Nervenendigungen vorkommen (Arriza et al., 1992). Dies spricht für die postulierte dominante Rolle bei der Regulation neuronaler GPCRs. GRK2 und GRK3 spielen allerdings auch in der Desensibilisierung von Rezeptoren in nicht neuronal innervierten Zellen eine Rolle, da sie auch dort in größeren Mengen exprimiert werden. Interessant dabei ist, dass die verschiedenen Mitglieder der Familie der GRKs auch in Geweben anscheinend in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden. So konnte für die Expression im Herzen gezeigt werden, dass GRK2 (und β -Arrestin1) in den Endothelzellen, GRK3 und GRK5 dagegen in den Myocyten vorkommen (Vinge et al., 2001). Genaue Expression und Referenzen sind in Tabelle 1 dargestellt.

3.3 Struktur und Aufbau der GRK-Familie

Der generelle Aufbau ist allen Kinasen aus der Familie der GRKs gleich. Die katalytische bzw. kinaseaktive Domäne wird von einer aminoterminalen (N-Terminus) und einer carboxyterminalen (C-Terminus) Domäne flankiert. Eine schematische Übersicht des Aufbaus der verschiedenen GRKs ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Proteinsequenz der katalytischen Domäne ist zwischen den einzelnen GRKs stark konserviert und besteht aus ca. 280 Aminosäuren, deren Zentrum ein Lysin darstellt, das für die Bindung von ATP verantwortlich ist. Auch andere Kinasen der AGC-Gruppe besitzen eine homolog zur GRK-Familie aufgebaute katalytische Domäne. Aus diesem Grund wurde bereits 1996 versucht, die katalytische Domäne der GRK2 anhand der schon bekannten Struktur der katalytischen Untereinheit der PKA zu modellieren (Iino und Shibano, 1996). Diese Strategie wurde auch von anderen Autoren verfolgt, um anhand der postulierten Struktur neue Leitstrukturen für Inhibitoren dieser Kinasen zu entwickeln (Kassack et al., 2000; Iino et al., 2002).



So homolog die katalytischen Domänen der einzelnen GRKs zueinander sind, so heterolog sind ihre N- und C-Termini. Besonders der C-Terminus variiert sowohl in seiner Aminosäuresequenz als auch in seiner Länge stark zwischen den einzelnen Familien der GRKs.

In neuerer Zeit ist es erstmals gelungen, mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse die genaue Kristallstruktur für einen Vertreter der GRK-Familie zu bestimmen. Der Gruppe um John J.G. Tesmer gelang es 2003 die Struktur der GRK2 im inaktiven Zustand in Verbindung mit der G-Protein β_1/γ_2 -Untereinheit zu lösen (Lodowski et al., 2003). Dabei zeigte sich, dass die GRK2 die Form eines geschlossenen Klappmessers hat, wobei das Scharnier des Messers die katalytische Domäne darstellt und der Griff und die Schneide die beiden N- und C-terminalen Enden der GRK2 symbolisieren sollen. Der zu phosphorylierende Rezeptor würde dabei am Scharnier mit der GRK2 interagieren und die G β/γ -Untereinheit an der Spitze zwischen Schneide und Griff angreifen (siehe Abbildung 5).

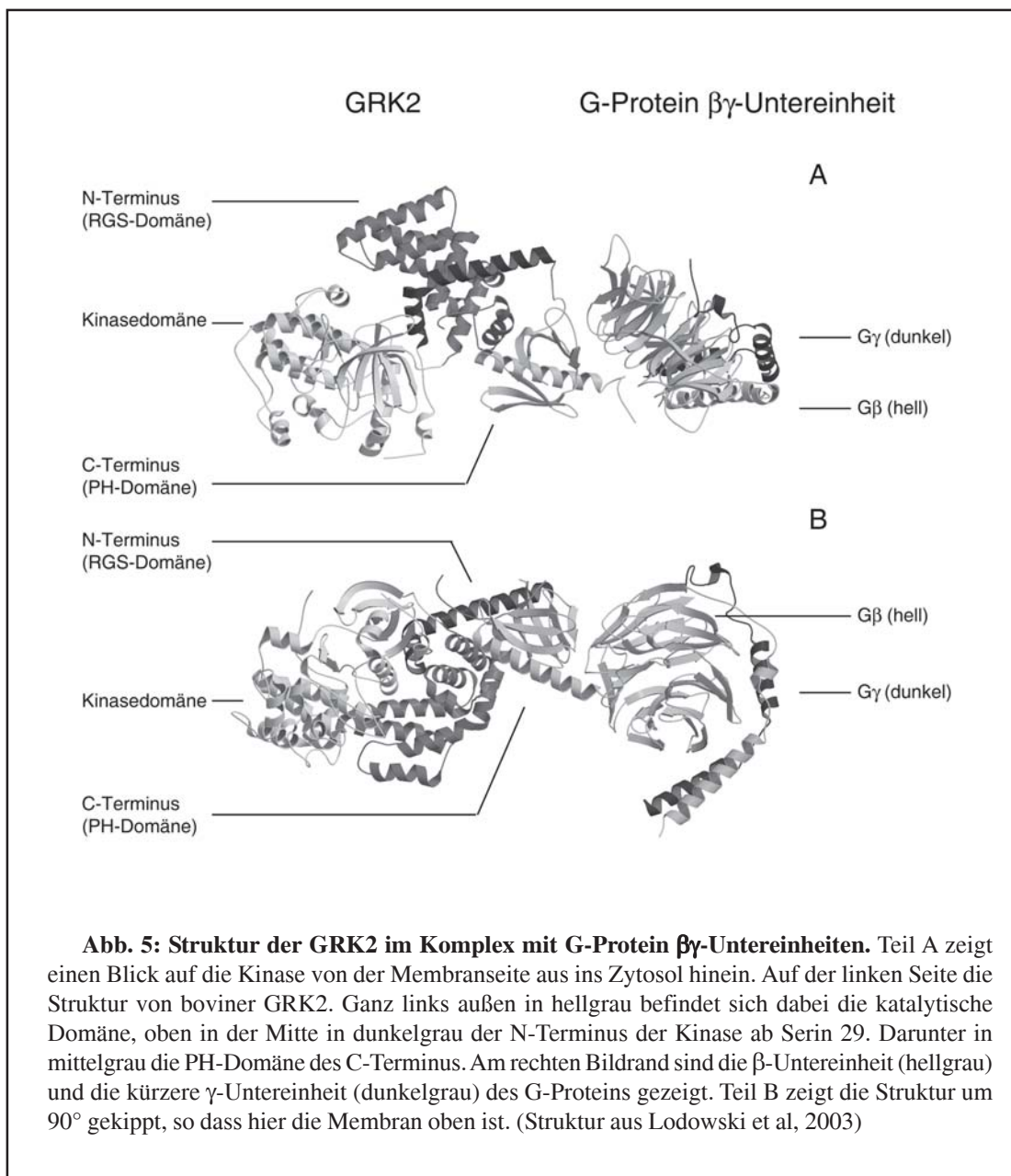


Abb. 5: Struktur der GRK2 im Komplex mit G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Teil A zeigt einen Blick auf die Kinase von der Membranseite aus ins Zytosol hinein. Auf der linken Seite die Struktur von boviner GRK2. Ganz links außen in hellgrau befindet sich dabei die katalytische Domäne, oben in der Mitte in dunkelgrau der N-Terminus der Kinase ab Serin 29. Darunter in mittelgrau die PH-Domäne des C-Terminus. Am rechten Bildrand sind die β -Untereinheit (hellgrau) und die kürzere γ -Untereinheit (dunkelgrau) des G-Proteins gezeigt. Teil B zeigt die Struktur um 90° gekippt, so dass hier die Membran oben ist. (Struktur aus Lodowski et al, 2003)

GRK2/3 nehmen in der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen eine Sonderstellung ein. Sie vermögen Signalwege über GPCR nicht nur durch Phosphorylierung zu beeinflussen, sondern auch über einen Bereich im N-Terminus (AS 54 bis 175), der starke Homologie zu sogenannten RGS-Proteinen (Regulator of G-protein signalling) aufweist. Diese Proteine erhöhen die GTPase-Aktivität der GTP-gebundenen $G\alpha$ -Untereinheiten und führen so zu einer beschleunigten Signalterminierung. Die RGS-Domäne der GRK2/3 wirkt dabei spezifisch auf $G\alpha_{q/11}$ und führt somit zu einer schnelleren Abschaltung von Signalen der so gekoppelten Rezeptoren. Die RGS-Aktivität der GRK2/3 ist unabhängig von der katalytischen Aktivität der Kinase (Reiter et al., 2001) und vom Phosphorylierungsstadium der Rezeptoren (Olivares-Reyes et al., 2001; Dhimi et al., 2002).

3.4 Rezeptorsubstrate

Eine besondere Eigenschaft der GRKs ist es, dass sie nur die Agonist-aktivierte Form der GPCRs zu phosphorylieren vermögen. Dieser Mechanismus trifft auf jeden GPCR zu, von dem bis heute sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden konnte, dass er als GRK-Substrat dient. Ein weiterer Unterschied zu anderen Kinasen besteht bei den GRKs darin, dass ihre katalytische Aktivität direkt durch Bindung des Substrates reguliert wird und nicht wie bei anderen Kinasen der AGC-Gruppe durch Phosphorylierung oder Bindung an Co-Faktoren beeinflusst wird. Eine Ausnahme stellt hierbei allerdings GRK5 da, die auch durch Autophosphorylierung reguliert wird.

Allerdings scheint es auch für die Familie der GRKs einen aktivierten Zustand zu geben, wie Versuche mit Peptiden aus dem C-Terminus von Rhodopsin zeigten. Diese wurden effektiver phosphoryliert, wenn aktiviertes Rhodopsin anwesend war (Brown et al., 1992). Ein anderer Ansatz, bei dem Wildtyp und trunkiertes Rhodopsin, welches nicht mehr phosphoryliert werden kann, verwendet wurden, bestätigte diese Theorie (Palczewski et al., 1991). In den folgenden Jahren wurden diese Befunde auch auf andere Rezeptorsysteme wie das β -adrenerge und das muskarinische System übertragen (Chen et al., 1993; Kameyama et al., 1994). Für GRK1 konnte die Existenz des aktiven Zustandes direkt gezeigt und deren Halbwertszeit auf zwei Minuten bestimmt werden (Dean und Akhtar, 1996).

Erstaunlicherweise stehen der großen Anzahl von knapp 1000 bekannten und unbekanntem GPCRs (im humanen Genom sind noch Informationen über ca. 150 GPCRs ohne bekannten Liganden vorhanden (Wise et al., 2004)) nur sieben GRKs und einige Splicevarianten gegenüber. Eine Möglichkeit der spezifischeren Zuordnung zwischen Kinase und Rezeptor läge in der gemeinsamen, exklusiven Expression in bestimmten Zelltypen. Dies trifft zumindest für drei Vertreter der GRK-Familie zu: GRK1 und GRK7 sind sehr spezifisch in Retina und Zirbeldrüse (GRK1) zu finden, GRK4 fast ausschließlich in Spermatozoen (siehe Kapitel 3.2). Durch diese Lokalisation wird die Auswahl an Rezeptoren für diese GRKs stark eingeschränkt.

Die anderen Vertreter dieser Familie werden praktisch ubiquitär exprimiert. Einige Untersuchungen haben sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* Rezeptorpräferenzen für diese GRKs gezeigt. So wurde berichtet, dass der PTH-Rezeptor zwar von GRK2/3 und GRK5, nicht aber von GRK4 oder GRK6 reguliert wird (Flannery und Spurney, 2001). Gleiches gilt z.B. für den metabotropen Glutamatrezeptor 4 (Iacovelli et al., 2004). Es gibt allerdings insgesamt recht widersprüchliche Berichte über die Spezifität von GRKs auf GPCRs. So wird für den δ -Opioidrezeptor die Rolle der GRK2 unterschiedlich bewertet (Willets und Kelly, 2001; Schulz et al., 2002a).

Selbst die stark homologen Vertreter GRK2 und GRK3 scheinen Unterschiede in der Rezeptorerkennung zu besitzen (Boekhoff et al., 1994; Schulz et al., 2002b). Ob diese Unterschiede aber direkt mit der Rezeptor-GRK-Interaktion zusammenhängen oder vielmehr aus unterschiedlichen Affinitäten zu verschiedenen G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins zur GRK resultieren, wird diskutiert (Daaka et al., 1997b).

Ein weiterer sehr interessanter Aspekt der GRK-GPCR-Phosphorylierung ist die Bedeutung für die Rezeptordesensibilisierung. Analog zu den Unterschieden zwischen der Phosphorylierung des Rezeptors durch GRKs oder anderen Kinasen scheint auch die Phosphorylierung eines Rezeptors durch verschiedene GRKs Unterschiede in der Desensibilisierung des Rezeptors hervorzurufen (Willems et al., 2001).

3.5 Agonistaktivierung und Membranlokalisation

Die Hauptsubstrate der GRKs, die GPCRs, sind in der Zellmembran lokalisiert. Trotzdem findet man die GRKs hauptsächlich im Zytosol der Zelle. Sie müssen also nach oder durch Aktivierung an die Membran translozieren und dort verankert werden, um ihre Zielproteine zu phosphorylieren. Dieses Prinzip findet sich auch bei anderen Kinasen wieder (Mochly-Rosen, 1995). So wird die PKA durch spezielle Ankerproteine, den sogenannten AKAPs (A-kinase anchoring proteins), in der Nähe ihres potentiellen Targets gehalten und so über die Spezifität zu bestimmten AKAPs wiederum eine Selektivität erreicht. PKC-Isoformen und Raf-1-Kinase werden über Lipidstrukturen der Membranen verankert.

Die Bedeutung dieser doch auf den ersten Blick sehr aufwendigen Art der Translokation nach Aktivierung liegt im Übergang von einem dreidimensionalen in ein zweidimensionales System, was eine erhebliche Konzentrationserhöhung an der gewünschten Zielstruktur zur Folge hat.

Auch GRK2 und GRK3 werden nach Agonistenstimulation der GPCRs an die Zellmembran transloziert (Strasser et al., 1986; Garcia-Higuera und Mayor, 1992; Daaka et al., 1997b). Die Translokation der GRK2 an die Zellmembran erfolgt sehr rasch nach Agonistenstimulation. Mittels der BRET-Methode (Bioluminescence-resonance-energy transfer) am Oxytocinrezeptor konnte gezeigt werden, dass es innerhalb von vier Sekunden nach Agonistenapplikation zu einer Translokation der GRK2 an die Zellmembran kam, die zehn Sekunden nach Agonistengabe ihr Maximum erreicht hatte. Die nachfolgende Arrestintranslokation setzte zu diesem Zeitpunkt erst ein und erreichte nach zwei Minuten ein Plateau (Hasbi et al., 2004).

Für die Membranverankerung scheint dabei der C-Terminus der GRKs eine entscheidende Rolle zu spielen, da eine Expression des C-Terminus von GRK2 sowohl die Translokation der GRK an die Membran, als auch die Rezeptorphosphorylierung und Desensibilisierung verhindern kann (Koch et al., 1992; Boekhoff et al., 1994; Daaka et al., 1997b). Die C-Termini der GRKs sind allerdings im Gegensatz zu den katalytischen Domänen sehr heterogen aufgebaut. Dementsprechend unterschiedlich sind auch die Methoden der Membranassoziation der einzelnen GRKs.

GRK1 - Isoprenylierung

Im C-Terminus der GRK1 befindet sich ein sogenanntes „CAAX“-Motiv, an dessen Cysteinrest es nach Carboxymethylierung zu einer Isoprenylierung kommt (Gibbs, 1991). GRK1, die als Isoprenylrest einen Farnesylrest trägt, assoziiert nach Lichtaktivierung des Rhodopsins mit der Membran. Mutationen im CAAX-Motiv führen zu katalytisch defizienten Kinasen, die nicht mehr an die Membran translozieren können. Konsequenterweise ist eine GRK1, die eine Geranylgeranylgruppe trägt und so dauerhaft mit der Membran assoziiert, voll katalytisch aktiv (Inglese et al., 1992a; Inglese et al., 1992b).

GRK2/3 - G $\beta\gamma$ Bindung

Sowohl GRK2 als auch GRK3 werden durch G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten in ihrer katalytischen Aktivität gegenüber GPCRs gesteigert (Haga und Haga, 1990, 1992). Hierbei scheinen die G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aber nicht nur für die Membranassoziation von Bedeutung, sondern können die Kinase zum einen an den aktivierten Rezeptor, von dem sie freigesetzt wurden, translozieren. Zum anderen spielt die vorher schon beschriebene Prävalenz verschiedener GRKs für unterschiedliche G $\beta\gamma$ -Untereinheiten eine Rolle. So bevorzugen GRK2 und GRK3 G $\gamma_{2/5/7}$ deutlich vor G $\gamma_{1/3}$ (Müller et al., 1993; Müller et al., 1997), und G $\beta_{1/2}$ vermag GRK2 und 3 zu translozieren, wohingegen G β_3 nur GRK3 translozieren kann (Daaka et al., 1997b).

Die Bindung von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten an die GRK2/3 kann durch G $\beta\gamma$ -bindende Proteine reguliert werden. Die Regulation durch Phosducin (Danner und Lohse, 1996) konnte sowohl *in vivo* (Schulz et al., 1996) als auch *in vitro* gezeigt werden (Hekman et al., 1994). Auch die bereits erwähnte GRK3-Translokation durch olfaktorische Rezeptoren konnte durch Phosducin gehemmt und so die rasche Termination des Geruchstoff-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration verhindert werden (Boekhoff et al., 1997).

Die Bindung der G $\beta\gamma$ -Untereinheiten an die GRK2 erfolgt durch den C-terminalen Teil der GRK2. In einer ganzen Reihe von Untersuchungen konnte sie auf einen kleinen Teil des C-Terminus, den Bereich der Aminosäuren 648 bis 665, kartiert werden (Koch et al., 1993; Pitcher et al., 1995b; Chuang et al., 1997). Dieser Bereich überlappt zum kleinen Teil mit einer sowohl in GRK2 als auch in GRK3 vorhandenen Domäne, der Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne). Diese Domäne wurde 1993 auf Grund von Sequenzvergleichen in Proteinen der Signaltransduktion gefunden (Haslam et al., 1993; Mayer et al., 1993; Musacchio et al., 1993). Als Bindungspartner dieser Domäne kam man schnell auf G $\beta\gamma$ -Untereinheiten als mögliche Kandidaten und konnte diese auch experimentell nachweisen (Touhara et al., 1994; Srinivasan et al., 1996). Allerdings sind diese Experimente mit Proteinen durchgeführt worden, die jeweils noch weitere Sequenzbereiche im C-terminalen Abschnitt der PH-Domäne beinhalteten und die für die Funktionalität der PH-Domäne im Bezug auf G $\beta\gamma$ -Bindung notwendig waren. Eine Zusammenfassung dieser Daten findet sich auch bei Cozier et al. (2004). Die reine PH-Domäne scheint indes für die Interaktion der GRK2 und GRK3 mit Phospholipiden in der Zellmembran ausreichend zu sein (Pitcher et al., 1995b; Touhara et al., 1995; Pitcher et al., 1996). Einige Befunde deuten auch darauf hin, dass die Interaktion zwischen Phospholipiden und der PH Domäne der GRK2 im Gegensatz zur Interaktion zwischen GRK2 und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten nicht von der Aktivierung durch GPCRs abhängig ist (Murga et al., 1997).

Neuere Veröffentlichungen zeigen, dass es auch im N-terminalen Teil der GRK2 eine Bindungsstelle für G $\beta\gamma$ -Untereinheiten gibt (Eichmann et al., 2003). Welche der beiden Bindungsstellen der GRK2 für G $\beta\gamma$ -Untereinheiten die physiologisch Bedeutendere ist, bleibt zu erforschen.

Es gibt im Falle der GRK2 einige Untersuchungen, die belegen, dass für die Rezeptorsubstraterkennung zwei Regionen der GRK2 verantwortlich sind. Dies ist zum einen eine C-terminale Region, welche die Aminosäuren 458-546 direkt im Anschluss an die katalytische Domäne umfasst. Sie ist direkt für die Rezeptorbindung verantwortlich und beeinflusst nicht die G $\beta\gamma$ -Bindung (Gan et al., 2000; Dhami et al., 2004). Zum anderen wurde auch von einer N-terminalen Bindungsstelle auf der GRK2 für Rezeptorsubstrate berichtet. Sie umfasst im wesentlichen die ersten 15 Aminosäuren

der GRK2 und beinhaltet ein für die Interaktion bedeutsames Aspartat an Position 5. Ein ähnliches Motiv existiert auch in GRK1 (Yu et al., 1999). Im Falle der GRK2 allerdings ist es unklar, ob sich durch die eingeführten Mutationen nicht auch eine Beeinträchtigung der N-terminalen G $\beta\gamma$ -Bindung ergeben hat. In einer dritten Arbeit wird die Rolle des Aspartats an Position 278 in der katalytischen Domäne für die Substraterkennung mitverantwortlich gemacht. Diese Daten beruhen zum Großteil auf Modellen der GRK2, die auf die bekannte Struktur der PKA angepasst wurden (Iino et al., 1997).

GRK4 Familie - Direkte Lipidbindung und Palmitoylierung

Im Vergleich zu der GRK2/3 Familie ist die Membranassoziation der GRK4 Unterfamilie weitaus weniger erforscht. Für GRK4 und GRK6 konnten an verschiedenen Cysteinen (Cys⁵⁶¹, Cys⁵⁶² und/oder Cys⁵⁶⁵) Palmitoylierungen gezeigt werden (Stoffel et al., 1994; Premont et al., 1996). Dass solche Modifikationen die Membranlokalisierung und Aktivität von Proteinen der Signalkaskade beeinflussen können, konnte bereits gezeigt werden (Milligan et al., 1995). Inwieweit dies allerdings auch für GRK4 und GRK6 zutrifft, bleibt noch zu ergründen.

Im Gegensatz zu den anderen GRKs ist GRK5 konstitutiv mit der Membran assoziiert und folgt nicht einer Translokation nach Rezeptoraktivierung (Premont et al., 1994). Ältere Untersuchungen zeigen, dass im N-Terminus der GRK5 eine Bindungsstelle für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat vorhanden ist, die aus sechs basischen Aminosäuren (Lysin) besteht und innerhalb der Subfamilie konserviert ist (Pitcher et al., 1996). Die Splicevariation der GRK4 umfasst diesen Bereich, was Spekulationen über unterschiedliche Regulierungsmethoden der einzelnen Splicevarianten zulässt, und auch in der GRK6 wurde eine Palmitoylierungsstelle in einer Splicevariante gefunden (Moepps et al., 1999).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch der C-Terminus der GRK5 für die Membranassoziation von Bedeutung ist (Pronin et al., 1998). Es konnten vier hydrophobe Aminosäuren (Lys^{550, 551 und 554}, Phe⁵⁵⁵) ausfindig gemacht werden, die in Form einer α -Helix für die Interaktion mit der Membran verantwortlich sind. Eine Mutation des hydrophoben Motives verhindert auch die konstitutive Membranlokalisierung der GRK5 (Thiyagarajan et al., 2004). Dieses Motiv ist auch in den anderen GRKs der GRK4-Unterfamilie vorhanden, dort ist über dessen Rolle allerdings noch nichts bekannt.

3.6 Nicht-Rezeptorsubstrate der GRKs

Neben den agonistaktivierten Rezeptoren können GRKs auch eine Reihe weiterer löslicher Proteine phosphorylieren. Dazu zählen das Phosducin und das Phosducin-like-protein (PhLP), beides bekannte Bindepartner für G $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Nach Phosphorylierung durch GRK2 sinkt die Affinität von Phosducin zu den G $\beta\gamma$ -Untereinheiten signifikant ab (Ruiz-Gomez et al., 2000). Ein weiteres Substrat ist das zum Zytoskelett gehörige Tubulin. Es wurde bereits 1998 als Substrat der GRK2 und GRK5 gefunden (Carman et al., 1998; Haga et al., 1998; Pitcher et al., 1998), allerdings ist die Bedeutung der Phosphorylierung für die Tubulinfunktion bis heute ungeklärt. Kürzlich gelang es allerdings, die Phosphorylierungsstellen der GRK2 auf Tubulin zu lokalisieren (Yoshida et al., 2003).

Synucleine, eine Klasse von 14 kDa großen Proteinen, von denen angenommen wird, dass sie an der Entstehung von M. Alzheimer und M. Parkinson beteiligt sind, sind ebenfalls Substrate der GRK2 und auch GRK5. Allerdings unterscheiden die Kinasen zwischen den einzelnen Isoformen der Synucleine. Nach Phosphorylierung verlieren die Synucleine (vor allem α - und β -Isoformen) ihre Fähigkeit, Phospholipase D₂ und damit die Membranzusammensetzung zu regulieren (Pronin et al., 2000).

Eine andere Kinase aus der GRK-Familie, GRK6A (Splicevariante von GRK6) vermag NHERF (Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor) zu phosphorylieren. Diese Phosphorylierung findet in einer weit verbreiteten Struktur, der sogenannten PDZ-Domäne statt (Hall et al., 1998). Welche Funktion die Phosphorylierung auf NHERF hat, ist bis heute ungeklärt, allerdings liegt NHERF normalerweise als konstitutiv phosphoryliertes Protein vor. Generell zeigt sich aber, dass PDZ-Domänen wichtige Interaktionsstellen für Protein-Protein-Wechselwirkungen sind und dass diese durch Phosphorylierung gestört werden. So hemmt GRK5 nach Phosphorylierung des β_1 -adrenergen Rezeptors die Interaktion des Rezeptors mit PSD-95, eines PDZ-Domänen enthaltenden Proteins und verhindert so die normale Rezeptorfunktion (Hu et al., 2002).

Einen ganz anderen Weg verfolgt die Phosphorylierung von P2, eines ribosomalen Proteins, durch GRK2. Nach Rezeptoraktivierung und Phosphorylierung wird die Proteinneusynthese gesteigert und so die translationale Aktivität indirekt durch GPCRs beeinflusst (Freeman et al., 2002).

In die Klasse der GPCRs gehören ebenso virale Chemokinrezeptoren wie der US28-Rezeptor. Hier hat die Phosphorylierung durch GRK2 ähnliche Effekte wie bei der Phosphorylierung anderer GPCRs: Es kommt zur Desensibilisierung und zu verringerter Oberflächenexpression sowie zu verstärkter MAP-Kinase-Aktivierung (Freeman et al., 2002; Miller et al., 2003).

3.7 Regulation der GRK-Aktivität

Wie alle Vorgänge in der Zelle oder im Körper, so muss auch die Phosphorylierung durch GRKs bestimmten Regulationsmechanismen unterliegen. Einen weit verbreiteten Mechanismus stellt, wie die Regulation der GPCRs durch die GRKs selbst, die Phosphorylierung dar. Eine andere Möglichkeit ist direkte Bindung an andere Proteine, so dass die zu regulierenden Proteine nicht mehr mit ihren Zielproteinen oder Aktivatoren interagieren können. Die regulierenden Mechanismen können auf unterschiedliche Arten aktiviert werden. Oft handelt es sich um dominante Mechanismen, die im Ruhezustand der Zelle für die Inaktivierung des zu diesem Zeitpunkt unerwünschten Signals sorgen. Andererseits können die Regulationsmechanismen auch durch das Signal selbst ausgelöst werden und es wieder abschalten. Solche Regulationen treten meist erst ab einer bestimmten Signalstärke auf und verhindern ein Überschießen des Signals. Dieser Mechanismus wird negativer Feedback genannt und spielt eine große Rolle bei der Regulation von Hormonsignalen im Körper. Eine Übersicht der bekannten Regulatoren der GRKs zeigt Abbildung 6.

3.7.1 Regulation durch Phosphorylierung

Wie die GRKs selbst die Signale von GPCRs über Phosphorylierung vermindern können, so werden sie auch selbst durch Phosphorylierung reguliert. Diese Regulierung kann in beide möglichen

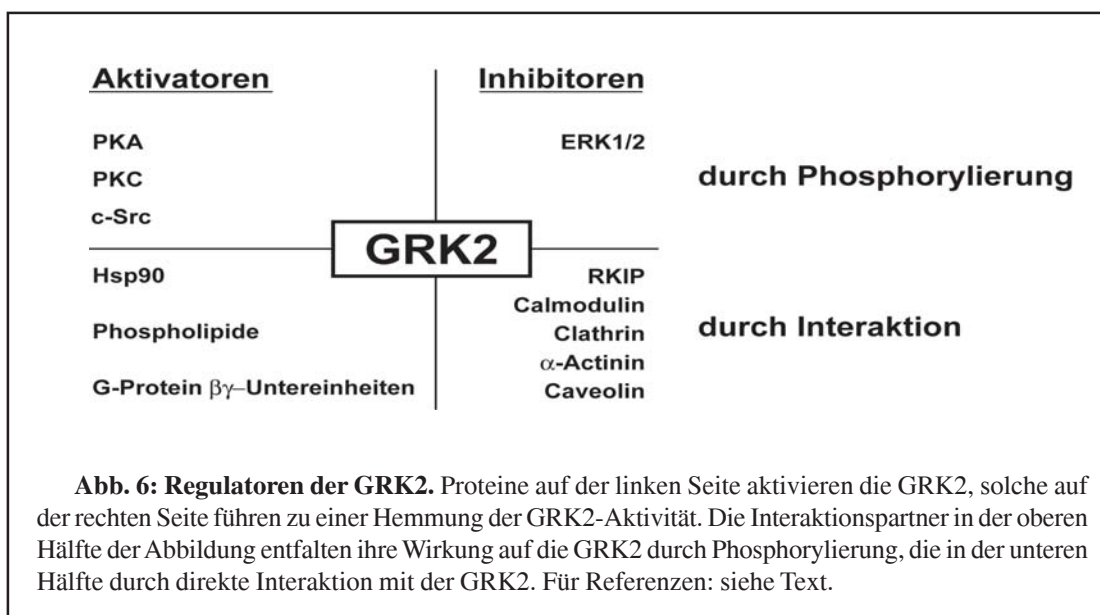
Richtungen erfolgen, Aktivierung und Deaktivierung. Der wohl am besten untersuchte Weg hierbei ist die Regulation der GRK2 durch Kinasen der MAP (mitogen activated protein)-Kinase-Familie. ERK1/2 (extracellular regulated kinase 1/2), ein prominenter Vertreter dieser Kinasefamilie, phosphoryliert GRK2 Serin⁶⁷⁰ im distalen C-Terminus. Phosphorylierung führt zur Abnahme der katalytischen Aktivität der GRK2 gegenüber GPCRs (Pitcher et al., 1999). Der vermutliche Grund dafür liegt in einer verstärkten proteosomalen Abbaurate der GRKs nach ERK1/2-Phosphorylierung (Theilade et al., 2002; Elorza et al., 2003).

Andere Phosphorylierungen führen dagegen eher zu einer Verstärkung der katalytischen Aktivität der GRK2 gegenüber GPCRs. So führt Phosphorylierung an Serin⁶⁵⁸ durch PKA zu einer deutlichen Steigerung der Phosphorylierung des β_2 -adrenergen Rezeptors. Der Grund hierfür dürfte eine verstärkte Bindung der GRK2 an G $\beta\gamma$ -Untereinheiten sein. Für die Phosphorylierung der GRK2 durch PKA ist ein weiteres Protein, AKAP79, das PKA in räumlicher Nähe zu GRKs verankert, unerlässlich (Cong et al., 2001).

Nach Phosphorylierung der GRK2 durch die lösliche Tyrosinkinase c-Src kommt es zwar zu einer verstärkten Aktivität der GRK2 (Sarnago et al., 1999), allerdings wird auch der Turnover durch c-Src-Phosphorylierung beschleunigt, was zu verminderten GRK2-Mengen führen sollte (Penela et al., 2001). Diese Diskrepanz ist bis heute nicht aufgeklärt.

Schließlich wird die Aktivität der GRK2 in Zellen noch durch Phosphorylierung mittels PKC Isoformen (vor allem α , γ und δ) gesteigert. Die Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus ist Teil dieser Arbeit.

Eine letzte Möglichkeit der Interaktion durch Phosphorylierung stellt die sogenannte Autophosphorylierung dar, bei der sich die Kinasen selbst phosphorylieren. Dieser Mechanismus spielt vor allem bei Rezeptoren vom Rezeptortyrosinkinasetyp eine zentrale Rolle bei der Aktivierung.



Nur für GRK1 und GRK5 sind stöchiometrisch und funktionell bedeutende Autophosphorylierungen beschrieben. GRK1-Autophosphorylierung (Lee et al., 1982) erfolgt primär an zwei Stellen des C-Terminus, Thr⁴⁸⁹ und Ser⁴⁸⁸ als sekundäre Phosphorylierungsstelle (Palczewski et al., 1992). Sie ist unabhängig von Membranbindung bzw. Aktivierung durch Rezeptoren und beeinflusst die Heparinbindung der Kinase. Gleiches gilt auch für GRK7 (Weiss et al., 1998). Während die Aktivität der GRK1 nach Autophosphorylierung nicht verändert ist, findet sich jedoch ein Einfluß auf die Substraterkennung. So phosphoryliert eine autophosphorylierungsdefiziente Mutante der GRK1 Rhodopsin im Dunkeln deutlich besser als der Wildtyp (Palczewski et al., 1995). Es wurde postuliert, dass die Autophosphorylierung die Dissoziation von phosphoryliertem Rhodopsin und GRK1 erleichtern soll (Buczylko et al., 1991). Die Autophosphorylierungsstellen sind zwar zwischen GRK1 und GRK5 konserviert, sie unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer Funktion: Die Autophosphorylierung der GRK5 ist phospholipidabhängig und führt zu einem Aktivitätsverlust der Kinase um den Faktor zehn (Kunapuli et al., 1994a). Die Autophosphorylierungsstellen finden sich auch in GRK6 und zum Teil in GRK4 wieder. Für beide sind aber noch keine entsprechenden Befunde veröffentlicht. Interessant ist, dass sich an dieser Stelle in der Sequenz der GRK2-Unterfamilie fast durchweg das stark saure Motiv DEED findet, welches eine den Phosphatgruppen ähnliche Ladung an dieser Stelle in das Molekül einführt.

3.7.2 Regulation durch Interaktion

Ebenso vielfältig und funktionell unterschiedlich wie die Regulation durch Phosphorylierungen ist die Regulation der GRKs durch Interaktion mit anderen Proteinen. Dabei lassen sich zwei Auswirkungen auf die Funktion der GRKs unterscheiden: Inhibition oder Aktivierung.

Zu den Interaktionspartnern, die GRKs inhibieren können, zählt das Caveolin. Es inhibiert sowohl GRK1 und GRK2 wie auch GRK5 (Carman et al., 1999). Für die Bindung scheinen Teile des N-Terminus der Kinasen verantwortlich zu sein. GRK2 wird dabei in 10-fach niedrigeren Konzentrationen inhibiert als GRK1 und GRK5 (0,4 µM vs. 3,0 µM). Welche funktionelle Bedeutung die Inhibition auf die Rezeptorsequestrierung hat, bleibt zu untersuchen.

Einen weiteren inhibitorischen Bindungspartner stellt das α -Actinin dar. Es inhibiert alle bekannten GRKs mit ungefähr der gleichen Potenz, die wiederum mit der des Caveolin vergleichbar ist. Allerdings scheint es sich mechanistisch dabei vom Caveolin zu unterscheiden. Der hemmende Effekt von α -Actinin auf die Phosphorylierung von Rezeptoren durch GRKs lässt sich durch die Zugabe von PIP₂ kompensieren. Anders verhält sich dagegen die Hemmung löslicher Substrate. Sie kann durch die Zugabe von Calmodulin, einem Inhibitor der GRKs bezüglich der Rezeptor-phosphorylierung, aufgehoben werden (Freeman et al., 2000).

Einen sehr interessanten Mechanismus der Inhibition stellt die Hemmung der GRK2 durch RKIP (Raf-kinase Inhibitorprotein) dar. Im nativen Zustand inhibiert RKIP Raf-1 mit hoher Affinität. Wird RKIP allerdings nach Rezeptoraktivierung durch PKC phosphoryliert, so gewinnt es an Affinität für GRK2 und hemmt diese, wobei gleichzeitig die Affinität für Raf-1 verloren geht. Der Signalweg des Rezeptors über Raf-1 wird somit verstärkt und gleichzeitig die Abschaltung des Signals über GRK2 verhindert. Dieser Sachverhalt ließ sich experimentell durch eine Zunahme der Kontraktion von Cardiomyocyten nach Rezeptoraktivierung zeigen, die bei RKIP-defizienten Zellen vermindert ausfiel (Lorenz et al., 2003).

Eine sehr bedeutende Gruppe an inhibitorischen Proteinen stellen die Calcium-selektiven Proteine wie Calmodulin und Recoverin dar. Sie vermögen GRKs Calcium-abhängig zu inhibieren. Recoverin inhibiert mit hoher Affinität selektiv die GRK1 (Chen et al., 1995; Klenchin et al., 1995). Ein anderes potentes Calcium-Sensorprotein, das eine Vielzahl von GRKs zu inhibieren vermag, ist das Calmodulin (CaM). Es inhibiert GRK5, GRK4/6 und GRK2/3 mit absteigender Affinität (Sallese et al., 2000). Die Mechanismen der Inhibition scheinen dabei aber sehr divergent zu sein. Die Inhibition bei der höchsten Affinität im Falle der GRK5 ($IC_{50} = 50 \text{ nM}$) scheint zum einen durch eine direkte Bindung von Calmodulin begründet zu sein. Eine Folge der CaM-Bindung an GRK5 ist eine Erhöhung der Autophosphorylierung der GRK5 um den Faktor sechs bis acht. Die Autophosphorylierung der GRK5 verringert die Rezeptorbindung und somit die Phosphorylierung des Rezeptors. Somit könnte die gesteigerte Autophosphorylierung als Gedächtnis fungieren, wenn die direkte Inhibition durch Calmodulin bereits durch gesunkene Calciumspiegel wieder aufgehoben wurde (Pronin et al., 1997). Die Affinität der GRK2 zu Calmodulin ist deutlich schwächer ($IC_{50} = 2 \text{ }\mu\text{M}$) als die der GRK5 und die daraus resultierende Hemmung scheint auch mechanistisch unterschiedlich zu sein. So wird die katalytische Aktivität der GRK2 durch die Bindung von Calmodulin nicht beeinflusst. Calmodulin scheint lediglich die Rezeptorinteraktion zwischen GRK2 und GPCRs zu hemmen (Haga et al., 1997). Eine detaillierte Betrachtung der Inhibition von GRK2 durch Calmodulin ist Teil dieser Arbeit.

Ein anderer Weg der Hemmung der GRKs wird genutzt, um den GRK2-Spiegel nach oxidativem Stress zu senken. Der beobachtete Abfall der GRK2-Spiegel um fast 50% nach H_2O_2 -Stimulation der Zellen konnte auf einen verstärkten nicht-proteasomalen Abbau durch die Protease Calpain zurück geführt werden (Lombardi et al., 2002). Dabei blieb aber die Expression (gemessen als mRNA-Spiegel) der GRK2 unbeeinflusst. Dieser Mechanismus könnte eine Verknüpfung zwischen Stress und verstärkter adrenerger Aktivität darstellen. Ein ähnlicher Mechanismus, allerdings zur Aktivierung der GRK2, wird durch Hsp90 (heat-shock-protein 90) induziert. Dabei verhindert die Bindung von Hsp90 an GRK2 deren proteasomalen Abbau, wie Versuche mit diversen Inhibitoren zeigen konnten (Luo und Benovic, 2003).

Direkte Aktivierungsmechanismen der GRKs sind vor allem die Interaktionen mit den Bindungspartnern zur Membranlokalisation (s. 3.5). Dementsprechend erhöhen Substanzen, die GRKs zusätzlich in die Nähe ihrer Substrate (GPCRs) verankern, die Phosphorylierung der Rezeptoren, ohne jedoch die katalytische Aktivität der GRKs direkt zu beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist Clathrin, das durch Bindung an GRK2 die Phosphorylierung des β_2 -adrenergen Rezeptors erhöht. Schon seit langem ist bekannt, dass der β_2 -adrenerge Rezeptor über einen Clathrin-abhängigen Weg internalisiert wird. Die Bindung von Clathrin an die GRK2 erfolgt über ein fünf Aminosäuren großes Motiv in deren C-Terminus (Aminosäuren 498-502) (Shiina et al., 2001).

Einen ähnlichen Mechanismus scheint die Interaktion zwischen GRK2 und GIT1 (GRK interactor) zu verfolgen. Durch Interaktion mit GRK2 wird GIT1 in der Nähe der an der Signalkaskade beteiligten Proteine platziert und kann so zu einer Sequestrierung der Rezeptoren führen (Premont et al., 1998). Diese Interaktion führt allerdings nicht über eine Steigerung der GRK-Aktivität oder der Rezeptorphosphorylierung, sondern wahrscheinlich über eine gesteigerte GTPase-Aktivität zur Abschaltung des Rezeptorsignals.

Ein Großteil der GRK2 liegt in der Zelle im Zytosol gebunden an microsomale Membranen vor. Diese Bindung scheint sich aber von der Bindung an die Zellmembran nach Rezeptoraktivierung zu unterscheiden, da sie zum einen G $\beta\gamma$ -unabhängig ist und nicht durch C-terminale, sondern durch N-terminale Konstrukte der GRK2 gehemmt werden kann (Murga et al., 1997).

Neuere Untersuchungen deuten auch auf einen intramolekularen Regulationsmechanismus innerhalb des GRK2 Proteins hin. So scheinen intrazelluläre Interaktionen zwischen N- und C-Terminus die Kinase *in vitro* in einem inaktiven Zustand zu halten (Sarnago et al., 2003).

3.8 Genexpression

Durch die Kenntnis über die Sequenz des humanen Genoms sind auch die Positionen der Gene der sieben GRKs und ihrer Strukturen darauf bekannt (siehe Anhang). Bei einem Vergleich der Genstrukturen für GRK1 (Khani et al., 1996), GRK2 (Penn und Benovic, 1994) und GRK4 (Premont et al., 1996), einem Vertreter aus jeder Familie, zeigt sich, dass selbst nah verwandte Proteine sehr stark in ihrer Intron/Exon-Struktur abweichen können. Dies und weitere Befunde zeigen, dass die Trennung der GRK-Genfamilien bereits vor der Trennung Insekten/Säuger stattfand. So ist GPRK1 aus *Drosophila melanogaster* der GRK2 und GPRK2 der GRK4 sehr ähnlich. Auch sind die Genstrukturen innerhalb einer GRK-Genfamilie ähnlich: Das Gen für GRK3 ist dem der GRK2 verwandt (Premont et al., 1996), und sowohl für GRK4 als auch für GRK6 sind Splicevarianten berichtet worden.

Bei einem Mitglied der GRK-Familie gibt es eine rezessiv vererbare Mutation. Im Gen der GRK1 wurde eine Mutation gefunden, die als Ursache für das Oguchi-Syndrom, eine Form der angeborenen Nachtblindheit, verantwortlich gemacht werden konnte (Yamamoto et al., 1997). Neuere Untersuchungen berichten von zwei Mutationen in Genen der GRK-Familie. Zum einen wird von Mutationen in der Promotorregion des GRK2-Gens im Zusammenhang mit Schizophrenie berichtet, die aber von den Autoren selbst als nicht ursächlich angenommen werden (Yu et al., 2004), zum anderen berichtet eine weitere Gruppe über Mutationen in der Promotorregion des GRK3-Gens. Diese wird von den Autoren in Verbindung mit manisch-depressiven Erkrankungen gebracht. Inwieweit diese Mutationen aber ursächlich für die Krankheit sind, bleibt noch genauer zu erforschen (Barrett et al., 2003). Obwohl die GRK4 bei der Suche nach den genetischen Ursachen für Chorea Huntington gefunden wurde, ist bis heute nichts über Erbkrankheiten in Verbindung mit dem GRK4-Gen bekannt.

3.8.1 Pathologische Prozesse

Viele pathologische Prozesse haben als Grund oder als Folge eine Verschiebung der Expression von Proteinen. Meist findet sich eine Veränderung der mRNA-Produktion auch in einer Veränderung der Proteinaktivität wieder. Dies hat im Falle der GRKs eine veränderte Desensibilisierung von GPCRs zur Folge.

Die wohl am besten untersuchte Krankheit ist die Herzinsuffizienz, da die β -adrenergen Rezeptoren die chronotropen, dromotropen und inotropen Effekte der Catecholamine vermitteln und so die Funktionsfähigkeit des Herzens maßgeblich beeinflussen (Lohse et al., 1996; Lohse et al., 2003). Einer der wichtigsten physiologischen Mechanismen, um die eingeschränkte Herzleistung in der

Herzinsuffizienz zu erhöhen, ist die vermehrte Ausschüttung von Catecholaminen. Wie dadurch zu erwarten, kommt es zu einer erhöhten Desensibilisierung von Rezeptoren, die neben einer erhöhten Downregulation (und damit verminderter Rezeptorzahl an der Zelloberfläche) auch zu einer vermehrten Entkopplung von $G\alpha_s$ führt. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass für diese Ereignisse GRKs eine bedeutende Rolle spielen. So kommt es im menschlichen Herzen zu einer erhöhten cytosolischen GRK-Aktivität (Ungerer et al., 1993) und zu einer vermehrten GRK-Produktion auf mRNA Ebene (Ungerer et al., 1994). Die Spiegel für GRK3, β -Arrestin1 und β -Arrestin2 blieben dabei unverändert. Ähnliches wurde auch für die myokardiale Ischämie gefunden, wobei hier die mRNA-Spiegel für GRK2 im Gegensatz zur GRK-Aktivität nur transient erhöht waren (Ungerer et al., 1996).

Verschiedene Gruppen konnten mittlerweile zeigen, dass bei der linksventrikulären Hypertonie die GRK2-Menge und die GRK2-Aktivität in Lymphozyten erhöht waren, wohingegen GRK5 und GRK6 unbeeinflusst blieben (Gros et al., 1997; Park et al., 2004). Diese Befunde sind besonders vor dem Hintergrund einer möglichen Rezeptorspezifität einzelner Kinasen interessant und ermöglichen so eventuell die Eröffnung neuer Therapieansätze (Iaccarino et al., 1999).

Auch bei Erkrankungen in anderen Geweben werden die Spiegel der verschiedenen GRKs verändert. So gibt es Berichte über verminderte GRK2/5-Spiegel in der Großhirnrinde in einem Mausmodell des M. Alzheimer (Suo et al., 2004). Andere Autoren untersuchten die Expression der GRKs im Gehirn depressiver Patienten und konnten eine Zunahme an GRK2 bei depressiven Patienten feststellen, die nach Therapie mit einem nicht näher spezifizierten Antidepressivum normalisiert werden konnte (Grange-Midroit et al., 2003). Allerdings zeigen Berichte aus derselben Gruppe, dass bestimmte Antidepressiva (Desipramin) die membranassoziierten GRK2/3-Spiegel im Rattenhirn steigern können (Miralles et al., 2002). Bei chronischer Opiatgabe konnte in Ratten eine deutlich verminderte GRK2-mRNA-Menge im Gehirn festgestellt werden, die nach Entzug zusammen mit der GRK5-mRNA-Menge wieder stark anstieg (Fan et al., 2002).

Ein Zusammenhang zwischen eingeschränkter Rezeptorfunktion und erhöhten GRK2-Spiegeln konnte auch bei Patienten mit Zystischer Fibrose (Mak et al., 2002) nachgewiesen werden. Gleiches gilt auch für die GRK2-Spiegel in der Gebärmutter von Ratten vor der Niederkunft (Simon et al., 2001) und die GRK5-Spiegel in menschlichen Gewebeproben von Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen (Metaye et al., 2002). Ein Mausmodell, bei dem der C-Terminus der GRK2 als GRK-Inhibitor osteoblastenspezifisch überexprimiert wurde, zeigt eine deutlich verstärkte Knochendichte und Knochenvolumen. Die Überexpression wirkt dabei anabol (Spurney et al., 2002).

3.9 Transgene und Knockout-Mausmodelle

Eine völlig neue Art, die Frage der Rezeptorspezifität der verschiedenen GRKs zu untersuchen, ist die Verwendung von sogenannten Knockout-Mausmodellen. Mittlerweile gibt es für alle GRKs solche Modelle mit Ausnahme von GRK7, die in der Maus nicht vorkommt. Durch die entgegengesetzte Möglichkeit einer Überexpression der einzelnen GRKs lässt sich die Frage der Rezeptorspezifität noch genauer untersuchen, da hier eine gewebsspezifische Überexpression möglich ist. Aufgrund der pathophysiologischen Befunde der GRK-Expression bei diversen Erkrankungen wurde das Hauptaugenmerk auf eine kardiale Überexpression gelegt. Eine Übersicht der wichtigsten Mausmodelle und deren Phänotypen findet sich in Tabelle 2.

Gen	Knockout Phänotyp (Maus)	Literatur
GRK1	Lichtabhängige Retinadegradation Mensch: Oguchi Syndrom (Nachtblindheit)	Chen et al., 1999 Yamamoto et al., 1997
GRK2	homozygot: embryonal letal, thin myocardium syndrome heterozygot: verstärkte basale und adrenerge Erregbarkeit in erwachsenen Heterozygoten	Jaber et al., 1996 Rockman et al., 1998
GRK3	Verlust der olfaktorischen Rezeptordesensibilisierung gestörte Regulation der Luftwege über muskarinische M2-Rezeptoren verminderte Fentanyltoleranz, aber normale Morphintoleranz	Peppel et al., 1997 Walker et al., 1999 Terman et al., 2004
GRK4	kein Phänotyp erkennbar	Gainetdinov et al., 2004
GRK5	gestörte zentrale muskarinische M2-Rezeptorregulation gestörte muskarinische M2-Rezeptorregulation in der Lunge, aber nicht im Herz	Gainetdinov et al., 1999 Walker et al., 2004
GRK6	gestörte zentrale Dopamin-Rezeptorregulation verminderte Lymphozyten-Chemotaxis verstärkte Neutrophilen-Chemotaxis	Gainetdinov et al., 2003 Fong et al., 2002 Kavelaars et al., 2003 Vroon et al., 2004
GRK7	Gen wird in der Maus nicht exprimiert	

Tab. 2: Liste der Phänotypen der GRK-Knockout-Mäuse. Für GRK7 kann kein Knockout im Mausmodell generiert werden, da dieses Gen dort nicht exprimiert wird. Der GRK4-KO ist zur Zeit noch nicht publiziert. Nach Hinweisen in dem angegebenen Review scheint er aber keinen bis heute festgestellten Phänotyp zu besitzen.

3.9.1 Knockout-Mäuse

Wie durch die sehr spezifische Expression der GRK1 fast ausschließlich in Retina zu erwarten war, zeigen GRK1-Knockout-Mäuse veränderte Reaktionen auf Lichtimpulse. Die Regenerationszeit nach Lichtreiz ist deutlich verlängert und konstante Lichtreize führen zu Apoptose der Sehzellen (Chen et al., 1999; Lyubarsky et al., 2000). Im Falle der GRK2 zeigt der homozygote Knockout einen sehr drastischen Phänotyp. Homozygote Knockout-Mäuse überleben den Tag 15,5 der Schwangerschaft nicht. Sie zeigen das sogenannte „thin myocardium syndrome“, denselben Phänotyp, der auch bei Inaktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren auftritt. Dabei kommt es zu einer gestörten Ausbildung des Herzgewebes, die bis hin zu einer nur einzelligen Schicht des Herzvorläufergewebes führt (Jaber et al., 1996). Wird dagegen nur ein Allel des Gens für GRK2 in Mäusen ausgeknockt, so überleben die Tiere und zeigen einen ausgeprägten kardialen Phänotyp mit

verstärkter Kontraktilität (Rockman et al., 1998). Einen Hinweis auf Rezeptorspezifitäten geben die Mäuse, denen die Gene für GRK3 fehlen. Obwohl GRK2 und GRK3 in den meisten Geweben nebeneinander exprimiert werden, überleben diese Mäuse im Gegensatz zu ihren GRK2-Knockout-Verwandten die Schwangerschaft. Auch zeigen sie per se keinen kardialen Phänotyp. Sie sind jedoch deutlich ansprechbarer auf cholinerge Reize im Vergleich zu GRK2-heterozygoten und Wildtyp-Tieren. Diese verstärkte Ansprechbarkeit auf Acetylcholin zeigt sich auch im Bereich der Atemwege (Walker et al., 1999). Ein weiteres Merkmal der GRK3-KO-Maus ist der Verlust der Sensibilisierung auf Geruchstoffe (Peppel et al., 1997). Aus der GRK4-Familie sind bis heute KO-Mäuse von GRK5 und GRK6 beschrieben. Der Knockout der GRK4 scheint keinen bis jetzt entdeckten Phänotyp zu besitzen (Gainetdinov et al., 2000). GRK5-KO-Mäuse haben klassische zentrale cholinerge Symptome wie Hypothermie, Hypoaktivität, Tremor und Speichelfluß, die auf eine besondere Rolle der GRK5 in der Regulation zentraler muskarinergere Acetylcholinrezeptoren schließen lassen (Gainetdinov et al., 1999). Diese Effekte sind wahrscheinlich auf den M2-Ach-Rezeptor-Subtyp zurückzuführen (Wess, 2000). Erwartungsgemäß zeigen GRK5-KO-Tiere auch in den Atemwegen eine verstärkte muskarinische Antwort. Ein kardialer Phänotyp ließ sich allerdings nicht beobachten (Walker et al., 2004).

Die GRK6 scheint eine wichtige Rolle in der positiven Regulation des Immunsystems zu spielen. KO-Mäuse zeigen eine veränderte Chemotaxis verschiedener Zelltypen des Immunsystems auf Chemokinreiz (Fong et al., 2002; Vroon et al., 2004). Außerdem zeigen GRK6-KO-Tiere eine verstärkte Reaktion auf die Gabe von Psychostimulantien wie Kokain und Amphetamin. Im Striatum dieser Tiere kommt es auch zu einer stärkeren Kopplung von D2-Rezeptoren und Signalbildung nach Agonistenapplikation. Dies deutet auf eine Beteiligung von GRK6 an der Regulation zentraler dopaminergere Neuronen hin (Gainetdinov et al., 2003).

3.9.2 Transgene Mäuse

Ebenso wie in Tieren, bei denen ein bestimmtes Gen zerstört und somit die Expression eines Proteins unterbunden wird, kann man auch in Tieren die Spezifitäten der GRKs für einzelne Organe oder Rezeptoren untersuchen, die ein Gen verstärkt exprimieren. Der Vorteil dieser sogenannten „transgenen“ Tiere (TG) liegt in der gezielten Überexpression in bestimmten Geweben. So wurde zum Beispiel die GRK5 herzspezifisch überexprimiert. Dabei zeigte sich eine Spezifität dieser Kinase für β -Rezeptoren, die verstärkt desensibilisiert wurden. Es kam so zu geringerer Herzfrequenz und Kontraktilität basal und nach Stimulation der β -Rezeptoren. Die kardiale Antwort auf Angiotensin-II-Gabe war jedoch nicht verändert. Mäuse mit kardialer Überexpression der GRK2 zeigten auf den Stimulus durch Angiotensin-II jedoch einen deutlich abgeschwächten Anstieg der Kontraktilität im Vergleich mit Wildtypmäusen (Rockman et al., 1996). In Mäusen, die entweder den α_{1B} -adrenergen Rezeptor als Wildtyp oder als konstitutiv aktive Mutante kardial überexprimieren, konnte lediglich die Überexpression von GRK3 das verstärkte second-messenger-Signal der aktiven Mutante reduzieren. Allerdings kam es sowohl bei GRK5- als auch bei den GRK3-Mäusen zu einer Reduzierung des Phänotyps (Hypertrophie), GRK2 hatte auf keinen der gemessenen Parameter einen Einfluss (Eckhart et al., 2000). Die alleinige Überexpression von GRK2 oder GRK3 hat jedoch keinen erkennbaren Phänotyp. Diese Mäuse reagieren erst unterschiedlich zu ihren Wildtyp-verwandten, wenn externe Stimuli einwirken, wie im Fall von Angiotensin-II-Gabe bei GRK2-TG.

Bei den GRK3-TG zeigt sich allerdings in solchen Studien auch keine veränderte Wirkung, sie zeigten dagegen eine Abschwächung der Thrombinsignalwege im Herzen (Iaccarino et al., 1998).

In einer anderen Untersuchung wurde GRK2 vaskulär überexprimiert. Durch verstärkte β -adrenerge Desensibilisierung kam es dabei zu verminderter Vasodilatation und nachfolgend zu einer Erhöhung des Blutdruckes sowie zu vaskulärer und kardialer Hypertrophie (Eckhart et al., 2002).

Nicht nur funktionsfähige Proteine lassen sich in gewebsspezifischer Weise überexprimieren, auch einzelne Teile von Proteinen können so künstlich in Geweben erzeugt werden. Es existiert eine Reihe von Untersuchungen, die den C-terminalen Teil der GRK2 (β ARK-ct) kardial überexprimieren, der die Bindedomäne für $G\beta\gamma$ -Untereinheiten enthält. Dies soll die Aktivierung der GRKs aus der GRK2-Unterfamilie durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten verhindern und so die Aktivität senken. Diese Mäuse zeigen eine basale, sowie nach Isoproterenolgabe verstärkte, kardiale Kontraktilität und β -Rezeptor-Signale (Koch et al., 1995). Inwieweit dies durch eine spezifische Hemmung der GRK2 (und GRK3) oder durch Beeinflussung anderer Signale hervorgerufen wird, die durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt werden, wird noch diskutiert.

Interessanterweise zeigte einen ähnlichen Phänotyp auch eine Mauslinie, die den N-Terminus der GRK2 von Aminosäure 50 bis 145 (β ARK-nt) kardial überexprimiert (Keys et al., 2003). Erstaunlicherweise zeigten die Mäuse zwar eine herzspezifische Hypertrophie, ohne dass sich dabei jedoch Anzeichen von Fibrose entwickelten, im Gegensatz zu den β ARK-ct TG-Mäusen. Es kam auch zu einer verringerten Downregulation von β -adrenergen Rezeptoren, trotz einer erhöhten Membranlokalisation der GRK2. Die Autoren erklären sich diesen Widerspruch mit einer gestörten Internalisierungsmaschinerie durch die Überexpression des β ARK-nt und die erhöhte Membranlokalisation endogener GRK2 als sekundären Effekt der daraus resultierenden erhöhten β -adrenergen Aktivität des Herzens.

3.10 Inhibitoren der GRKs

Wie sich aus den beschriebenen pathophysiologischen Prozessen und den Versuchen mit genetisch veränderten Mäusen erkennen lässt, sind GRKs ein interessantes Ziel neuer Therapien. Speziell stellen die beobachteten Spezifitäten für diverse Rezeptoren und/oder Gewebe einen für die Entwicklung selektiver Inhibitoren und damit auch spezifischer Therapien interessanten Mechanismus dar. So könnte die Desensibilisierung von Rezeptoren und damit die Signalabschaltung gezielt in den gewünschten Geweben bzw. bei den gewünschten Rezeptorpopulationen beeinflusst werden.

Erste Versuche, Inhibitoren für die GRKs zu finden, wurden bereits Ende der 80er Jahre unternommen. Dabei wurde die Gruppe der Polyanionen und Polykationen als Inhibitor der GRK-Aktivität entdeckt (Benovic et al., 1987; Palczewski et al., 1988; Benovic et al., 1989; Palczewski et al., 1989). Es scheint sich dabei um einen Ionenstärkeneffekt zu handeln, der die Assoziation der Kinase mit der Membran stört (Garcia-Higuera und Mayor, 1992). Zur Gruppe der Polyanionen gehören Substanzen wie das Heparin, Dextransulfat, etc. Die Spezifität variiert dabei stark zwischen den einzelnen Mitgliedern der GRK-Familie, wobei sich folgende Reihenfolge der Inhibition aufstellen lässt: GRK5 > GRK6 > GRK2/3 > GRK1 (Sterne-Marr und Benovic, 1995). Wahrscheinlich durch die starke Heterogenität der Inhibitoren werden vor allem für Heparin sehr unterschiedliche IC_{50} -Werte berichtet, die von 50 nM (Lohse et al., 1989) bis zu 1 μ M (Kim et al., 1993) schwanken.

Polykationen zeigen eine noch stärker differierende Aktivität gegenüber den verschiedenen GRKs. So hemmen Polylysin, Spermin und Spermidin zwar die GRK2, sie sind aber für GRK1, GRK5 und GRK6 Aktivatoren (Benovic et al., 1989; Palczewski et al., 1989; Kunapuli et al., 1994b; Loudon und Benovic, 1994). Selektivität für GRK1 zeigen die von Palczewski et al. gefundenen Nucleosid- und Nucleotid-Analoga (Palczewski et al., 1990). Sie hemmen die GRK1 mit einem IC_{50} von 180 nM, wohingegen die mittlere Hemmkonzentration für GRK2/3 um zwei bis drei Zehnerpotenzen höher liegen.

Einen anderen Mechanismus bei der Inhibition der GRKs als die bis jetzt beschriebenen Inhibitoren, die alle die katalytische Aktivität der Kinase beeinträchtigen, haben Peptide aus den intrazellulären Schleifen verschiedener GPCR. Sie hemmen selektiv die Phosphorylierung von membranständigen Rezeptorsubstraten, was auf eine gestörte GRK-Rezeptor-Interaktion schließen lässt. Dabei haben sich vor allem Peptide aus der ersten intrazellulären Schleife des β_2 -adrenergen Rezeptors als inhibitorisch aktiv erwiesen (Benovic et al., 1990). Die Mutationsanalyse dieser Peptide zeigte, dass ein großer negativ geladener Glutamat-Rest für den inhibitorischen Effekt bedeutsam ist (Rainer Winstel, persönliche Mitteilung).

In jüngerer Zeit wurde mit RKIP, dem Raf-1-kinase-Inhibitorprotein, ein neuer potenter Inhibitor der GRK2 gefunden, durch dessen bekannte Struktur sich vielleicht neue Leitstrukturen für niedermolekulare Inhibitoren entwickeln lassen.

Solche niedermolekularen Inhibitoren sind das Ziel der therapeutischen Forschung, da sie sich im Gegensatz zu Peptiden oder anderen hochmolekularen Stoffen leichter verabreichen lassen oder zellpermeabel sind, um ihre Targets, die GRKs, zu erreichen. Zwei solcher Substanzen wurden in den letzten Jahren von kommerziellen Anbietern beschrieben (*Patent WO-00218350* und Iino et al., 2002). Allerdings ist ihre Potenz im mikromolaren Bereich noch nicht ausreichend für eine therapeutische Anwendung. Eine andere Gruppe hat auf Grund von Sequenzhomologie und Modellvergleichen zwischen GRK2 und PKA verschiedene bekannte Substanzen auf ihre GRK-Inhibition untersucht (Kassack et al., 2000). Die gefundenen inhibitorischen Potenzen aller positiv getesteten Substanzen lagen im Bereich von 30-60 μ M (getestet wurden unter anderem: Trifluoperazin, Tamoxifen, Chlorpromazin und Suramin).

Zu den neuesten Ansätzen der Therapie mit GRK-Inhibitoren gehören Überlegungen über den gentherapeutischen Einsatz der im Mausmodell getesteten GRK-Inhibitoren β ARK-ct und β ARK-nt. So ließ sich, wie bereits beschrieben, der Phänotyp einer herzinsuffizienten Maus mit gesteigerter GRK-Aktivität (einem Merkmal der Herzinsuffizienz) mit der kardialen Überexpression des β ARK-ct therapieren (Iaccarino und Koch, 2003).

In anderen pathologischen Prozessen, bei denen ein verlängertes Rezeptorsignal förderlich wäre (Tokolyse, Asthmatherapie), könnte eine gezielte Überexpression dieser GRK-Domänen ebenfalls therapeutisch günstig sein.

4 Zielsetzung

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen sind die wichtigsten Regulatoren der durch die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelten Signale. Allerdings war über die Regulation der GRKs selbst wenig bekannt. Zu Beginn dieser Arbeit konnte mit der Proteinkinase C eine Kinase identifiziert werden, die die GRK2 zu phosphorylieren vermag. Die Phosphorylierungsstelle konnte mit Hilfe von Radiopeptidkartierung und HPLC-MS auf Serin 39 im N-Terminus der GRK2 bestimmt werden.

Ziel dieser Arbeit war es nun, den Effekt der Phosphorylierung auf die GRK2 herauszufinden. Dabei sollte zu einen die Bedeutung auf die funktionelle Aktivität der GRK2 bestimmt werden. Dieses Ziel sollte vor allem mit Methoden der Zellkultur und Expression sowie anschließender Funktionsbestimmung erreicht werden. Daneben sollten in einem weiteren Teil der Arbeit die Mechanismen, die zu dem Einfluß der Phosphorylierung auf die Aktivität der GRK2 führen, erforscht werden. Diese Ziele sollen mit den Methoden der Molekularbiologie oder Proteinchemie erzielt werden. Dazu zählen neben der Bestimmung weiterer an der Regulation beteiligter Proteine auch die Ermittlung von Parametern wie die Affinitäten der beteiligten Proteine oder die Kartierung der Bindungsstellen, um so in späteren Arbeiten eventuelle niedermolekulare Inhibitoren der GRK2 zu generieren.

II Materialien und Methoden

1 Materialien

In allen Fällen, in denen nicht explizit eine Angabe zu Herstellern oder Typus von Materialien in diesem oder in anderen Abschnitten erfolgt, wurden handelsübliche in ihrer Qualität den Bedürfnissen entsprechende Güter oder Verbrauchsmaterialien verwendet.

1.1 Bakterienstämme

Bei allen Bakterienstämmen handelt es sich um gängige Stämme, die von verschiedenen Firmen bezogen werden können (Ausnahmen sind besonders gekennzeichnet).

Zur Klonierung:

E. coli JM109 *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proA⁺B⁺, lacI^q, Δ(lacZ)M15]* (Yanisch-Perron et al., 1985)

Zur Proteinexpression

E. coli BL21 F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (Phillips et al., 1984)

Zur Generierung von Baculoviren (Bakterien von Invitrogen, Carlsbad, Calif. USA)

DH10Bac F⁻ *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK κ rpsL nupG /bMON14272 / pMON7124*

DH5α F⁻ *f80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r_K⁻,m_K⁺) phoA supE44 κ thi-1 gyrA96 relA1*

1.2 Eukaryontische Zelllinien

HEK293 humane embryonale Nierenzellen (Robinson und Goochee, 1991)

COS-7 SV40-transformierte Nierenzellen des „African green monkey“ (Gluzman, 1981)

Sf9 Insektenzelllinie aus *Spodoptera frugiperda* (Vaughn et al., 1977)

1.3 Plasmidvektoren

pcDNA3	Expressionsvektor für Säugetierzellen mit Neomycin- und Ampicillinresistenz	(Invitrogen)
pFastBac1	zur Herstellung von Baculoviren	(Invitrogen)
pGEX1 λ T	zur Expression von GST-Fusionsproteinen und Expression von GST	(Amersham)
pchuGRK2	pcDNA3 mit humaner GRK2	(Winstel et al., 1996)
pchuGRK2CFP	pcDNA3 mit humaner GRK2 und C-terminalem CFP	(diese Arbeit)
pchuGRK2YFP	pcDNA3 mit humaner GRK2 und C-terminalem YFP	(diese Arbeit)
pchuGRK2S29D	pcDNA3 mit humaner GRK2 mit Punktmutation Ser29 zu Asp	(diese Arbeit)
pchuGRK2S29A	pcDNA3 mit humaner GRK2 mit Punktmutation Ser29 zu Ala	(Krasel et al., 2001)
pcCaM-CFP	pcDNA3 mit humanem Calmodulin und C-terminalem CFP	(diese Arbeit)
pcCaM-YFP	pcDNA3 mit humanem Calmodulin und C-terminalem YFP	(diese Arbeit)
pcCFP-CaM	pcDNA3 mit humanem Calmodulin und N-terminalem CFP	(diese Arbeit)
pcYFP-CaM	pcDNA3 mit humanem Calmodulin und N-terminalem YFP	(diese Arbeit)
pc β 2AR-YFP	pcDNA3 mit humanem β 2-Adrenorezeptor und C-terminalem YFP	(Cornelius Krasel, persönliche Mitteilung)
pc β 2AR-CFP	pcDNA3 mit humanem β 2-Adrenorezeptor und C-terminalem CFP	(Cornelius Krasel, persönliche Mitteilung)
pc β Arr2-CFP	pcDNA3 mit humanem β Arrestin2 und C-terminalem CFP	(Villardaga et al., 2003)
pc β Arr2-YFP	pcDNA3 mit humanem β Arrestin2 und C-terminalem YFP	(Villardaga et al., 2003)
pcFTub β 3	pcDNA3 mit humanem Tubulin β 3 mit N-terminalem Flag-Tag	(diese Arbeit)
pcFTub β 3 S444A	pcDNA3 mit humanem Tubulin β 3 mit N-terminalem Flag-Tag und Punktmutation Ser444 zu Ala	(diese Arbeit)
pMTH PKC δ	pMTH mit humaner PKC δ	(Mischak et al., 1993)
pGEXhbn	zur Expression von GST humaner GRK2 1-185	(Krasel et al., 2001)
pGEX-PH2	zur Expression von GST humaner GRK2 553-689	(Winstel et al., 1996)

pGEXGRK2 1-53	zur Expression von GST humaner GRK2 1-53 (Eichmann et al., 2003)
pGEXGRK2 1-53 S29D	zur Expression von GST humaner GRK2 1-53 mit Punktmutation Ser29 zu Asp (diese Arbeit)
pGEXGRK2 54-185	zur Expression von GST humaner GRK2 54-185 (Eichmann et al., 2003)
pFastBac huGRK2S29D	zur Generierung von Baculoviren mit humaner GRK2 mit Punktmutation Ser29 zu Asp (diese Arbeit)

1.4 Proteine, Antikörper und Peptide

1.4.1 Proteine

Außer den in dieser Arbeit beschriebenen aufgereinigten, rekombinanten Proteinen wurden folgende Proteine verwendet:

PKC α und PKC δ , rekombinant	von H.Mischak (Hannover)
Calmodulin, Rinderhirn	kommerziell von Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Caseinkinase II, human rekombinant	kommerziell von Calbiochem (Darmstadt)
Tubulin, Schweinehirn	von J. Müller und E. Mandelkow (Hamburg)

1.4.2 Antikörper

Primäre Antikörper

Anti-Proteinkinase C (PKC) α und δ aus Sampler gegen PKC-Isoformen von Transduction Laboratories (Lexington)
Anti-GRK2 polyklonal Kaninchen (Winstel et al., 1996)
Anti-GST monoklonal, Santa Cruz
Anti-His(6) monoklonal, Qiagen
Anti-Calmodulin monoklonal, Sigma
Anti-Flag M2 monoklonal, Sigma

Sekundäre Antikörper

Peroxidase-markierter Ziege Anti-Kaninchen	Dianova
Peroxidase-markierter Ziege Anti-Maus	Dianova

1.5 Substanzen und allgemeine Puffer

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die Chemikalien von Appllichem, Sigma oder Merck bezogen. Die Reinheit entsprach mindestens der Stufe „pro analysi“ (p.a.).

1.5.1 Lösungen und Puffer

Alle Standardlösungen wurden entsprechend den Vorschriften (Sambrook et al., 1989) hergestellt. Im Normalfall wurde vollentsalztes und pyrogenfreies Reinstwasser aus einer Barnstead-Reversed-Osmose-Anlage verwendet. Puffer für unkritische Schritte (SDS-PAGE-Laufpuffer, Westernblot-Transferpuffer, Färbe- und Fixierlösungen) wurden mit vollentsalztem Wasser aus einer Ionentauschanlage hergestellt. Wird im folgenden Text nichts anderes erwähnt, so bezeichnet Wasser solches aus der schon erwähnten Barnstead-Anlage.

Sind durch den Hersteller oder Lieferanten von Substanzen spezielle Lösungsmittel empfohlen worden, so wurden diese verwendet und damit möglichst lang haltbare Stammlösung in einer der Verwendung entsprechenden Verdünnung hergestellt.

Kennzeichnung der Pufferlösungen:

Soweit im Text nicht anders angegeben handelt es sich bei Pufferlösungen immer um Tris-gepufferte Systeme, die bei 20°C auf den jeweils angegebenen pH eingestellt wurden. Die Tris-Puffer enthalten üblicherweise Zusätze an EDTA und DTT, deren Konzentrationen im Namen folgendermaßen angegeben wurden:

20/5/2 pH 7,6 bedeutet: 20 mM Tris-HCl / 5 mM EDTA / 2 mM DTT bei pH 7,6

Eine "0" in der Bezeichnung deutet das Fehlen der entsprechenden Komponente im Puffer an. Weitere Komponenten werden namentlich und mit enthaltener Konzentration erwähnt.

1.5.2 Medien

1.5.2.1 Medien für prokaryontische Zellen

LB (Luria-Bertani) Medium	1%	Trypton
	0,5%	Hefeextrakt
	1%	NaCl

Zur Herstellung von festen Nährböden wurde zusätzlich 1,5% Agar zugesetzt. Bei Bedarf wurde dem Medium nach dem Autoklavieren ein Selektionsantibiotikum zugesetzt. Für Dosierungen und Stammlösungen siehe Sambrook et al. (1989).

1.5.2.2 Medien für eukaryontischen Zellen

DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) mit 1,0 g/l Glucose		(Pan)
Pro 500 ml mit Zusatz von	50 ml fetalem Kälberserum	(Invitrogen)
	5 ml Penicillin (10 kU/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	(Pan)
	5 ml Glutamin (200 mM in 0,85% NaCl)	(Pan)
TC100 insect medium		(Biochrom)
Pro 500 ml mit Zusatz von	25-50 ml fetalem Kälberserum	(Invitrogen)
	5 ml Penicillin (10 kU/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	(Pan)
	10 ml Glutamin (200 mM in 0,85% NaCl)	(Pan)
für Infektionen zusätzlich	1% Lipid Medium	(Sigma)

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Reinigung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmid DNA aus Bakterienkulturen erfolgte mit Kits der Firma Qiagen nach den entsprechenden Protokollen. Diese beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Anionenaustauschchromatographie. Die Säulengröße wurde nach benötigten DNA-Mengen, Plasmidart (high vs. low copy Plasmid) und des Kulturvolumens aus den Angaben des Herstellers gewählt. Nach Aufreinigung auf der Anionenaustauschersäule erfolgte eine Präzipitation der DNA mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol und anschließender Zentrifugation (45 min bei 45000 rpm und 4°C). Das Pellet wurde in Wasser gelöst und die DNA nochmals mit 2,5 Volumenteilen Ethanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min bei 15000 rpm) wurde das Pellet wiederum in Wasser gelöst und auf einen DNA-Gehalt von 1 µg/µl eingestellt.

Bei der Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Minikulturen (< 2 ml) wurde auf den Schritt der Anionenaustauschchromatographie sowie der anschließenden Isopropanolfällung verzichtet und die durch alkalische Lyse gewonnene DNA-Lösung direkt mit 2,5 Volumenteilen Ethanol gefällt. Das durch Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in 20 µl Wasser aufgenommen.

2.1.1.1 Mengen- und Reinheitsbestimmung von DNA und Oligonukleotiden

Die Mengen- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Absorptionmessung bei 260 und 280 nm. Als Berechnungsgrundlage für die Quantifizierung galt eine Absorption von 1 bei 50 µg/µl DNA oder 33 µg/µl Oligo.

Zur Reinheitsbestimmung wurde der Quotient aus der Absorption bei 260/280 nm gebildet. Er sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen, um Verunreinigungen mit Proteinen auszuschließen, die bei 280 nm mit erfasst werden.

2.1.1.2 Entfernen von verschiedenen Kontaminationen in DNA-Lösungen

Phenol/Chloroform-Extraktion

Wurde entsprechend den Protokollen der Standardwerke (Ausubel et al., 1987, Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

Ethanol-fällung

Wurde entsprechend den Protokollen der Standardwerke (Ausubel et al., 1987, Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

Isopropanolfällung

Wurde entsprechend den Protokollen der Standardwerke (Ausubel et al., 1987, Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

2.1.2 Klonierung in Plasmide

2.1.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien und die Transformation (Einschleusen von Plasmid-DNA in Bakterien) erfolgte nach dem Protokoll von Chung et al. (1989).

Verwendete Puffer

TSB	LB-Medium 10 % (G/V) Polyethylenglycol 3000 5 % (V/V) Dimethylsulfoxid (DMSO) 20 mM MgSO ₄ pH 6,1
5fach KCM	500 mM KCl 150 mM CaCl ₂ 250 mM MgCl ₂

Zur Gewinnung von kompetenten Zellen wurde eine entsprechende Bakterienkultur mit 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,3–0,6 bei 600 nm herangezogen. Die Bakterien wurden bei 4°C und 5000 rpm für 10 min in einem JA14 Rotor pelletiert und das Pellet anschließend in eiskaltem TSB resuspendiert. Die Suspension wurde in 400 µl Fraktionen in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

2.1.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut (Dauer 1-2 h). Pro Transformationsansatz wurden 100 µl Bakteriensuspension mit 100 µl 1fach KCM Puffer und 0,5 µl (ca. 100 pg) DNA vorsichtig gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte eine zehnmünütige Adaptionphase bei RT und Zugabe von 1 ml LB ohne Selektionsantibiotikum. Zur Expression der Antibiotikumsresistenz wurde der Ansatz am Ende 50 min bei 37°C geschüttelt und dann 50-100 µl auf eine LB-Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen.

2.1.2.3 Restriktionsanalyse gereinigter DNA

Der Verdau gereinigter DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte zum einen zur Kontrolle neu klonierter bzw. schon vorhandener Plasmide an Hand von Restriktionskarten und zum anderen zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten für Ligationen. Hierbei wurden jeweils die vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Puffer verwendet und die angegebenen Temperaturbedingungen beachtet. Eine vollständige Restriktion von Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von 2-10 Enzymeinheiten pro µg DNA in 1-2 h durchgeführt. Das Ergebnis wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.1.2.4) kontrolliert.

2.1.2.4 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente aus Restriktionsverdau oder PCR-Reaktionen wurden in horizontalen Gelsystemen in 1% (G/V) Agarose mit 8 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) in TAE und TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Zum Auftragen wurden die Proben mit ¼ Volumenteilen eines 5fach DNA-Auftragspuffers versetzt. Die DNA-Banden konnten dann in UV-Licht bei 254 nm durch die Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids identifiziert werden.

2.1.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

Ultrafree-DA Spincolumns

Bei hochkonzentrierten DNA-Fragmenten und kleinen Banden (niedrige Auftragsvolumina) wurden die Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und direkt in ein Ultrafree-DA Säulchen gegeben. Bei anschließender Zentrifugation nach Herstellerangaben wurde das Agarosegelgerüst in einem Filter zurückgehalten und nur die DNA-Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß abgetrennt. Bei dieser Methode ist zu beachten, dass für die Herstellung des Agarosegels TAE-Puffer mit niedrigem EDTA-Gehalt (< 0,1 mM) verwendet wird.

QIAquick Gelextraction

Bei großen Agarosegelfragmenten und niedrig konzentrierten DNA-Lösungen wurde diese Methode nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde das Agarosegelfragment mit der DNA in einem Puffer gelöst und durch Zentrifugation auf einen Filter aufgebracht, von dem es mit Wasser oder Niedrigsalzpuffer in 1,5 ml Reaktionsgefäße eluiert werden konnte.

2.1.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten und Vektor-DNA

Die Verknüpfung von DNA-Molekülen mit T4-Ligase wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: In einem möglichst kleinen Endvolumen (10-20 µl) wurde das einzuführende Fragment mit linearisierter Vektor-DNA im molekularen Verhältnis 2-10:1 zusammengebracht. In diesen Ansatz befanden sich des weiteren 1/10 Endvolumen des vom jeweiligen Hersteller mitgelieferten 10fach Ligasepuffers und fünf Enzymeinheiten T4-DNA-Ligase. Je nach Bedarf wurde 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C verknüpft. Der Ligationsansatz wurde dann direkt zur Transformation (2.1.2.2) verwendet.

Gegebenenfalls wurde die Plasmid-DNA vorher mit Hilfe von Shrimp-alkaline-phosphatase für 30 min bei 30°C dephosphoryliert. Die Phosphatase wurde anschließend und vor dem Ligationsansatz bei 65°C für 15 min inaktiviert.

2.1.3 Amplifizierung von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) wurde nach folgendem Schema durchgeführt: In einen 100 µl-Ansatz wurden je 0,5 µM Primer, je 200 µM Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs), 1/10 10fach Ligasepuffer (AccuTaq-Puffer, Sigma), 0,5 µg Template-DNA und 2 µL DMSO gegeben und mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde gut durchmischt und in einen PCR-Cycler mit einem auf 105°C vorgeheizten Deckel (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) für 5 min bei 95°C gegeben. Danach erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) und 0,1 µl Pfu-Polymerase (5 U/µl). Die Amplifizierung der DNA wurde in 25 Zyklen mit je 30 Sekunden 95°C (Denaturierung), 30 Sekunden 45-65°C (Annealing, abhängig von den jeweils verwendeten Primern) und 2-5 Minuten 72°C (Elongation, abhängig von der Länge des Produktes) durchgeführt. Im abschließenden 26. Zyklus wurde der Elongationsschritt auf 10 Minuten verlängert, um eventuell fehlerhafte Produkte zu reparieren.

Die PCR-Produkte wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.1.4 Subklonierung der PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden zur Subklonierung gegebenenfalls über Agarosegelelektrophorese (2.1.2.4) aufgetrennt, gereinigt (2.1.2.5) und mit dem benötigten Restriktionsenzym verdaut (2.1.2.3). Anschließend erfolgte eine erneute Auftrennung über ein Agarosegel mit nachfolgender Reinigung und Ligation mit dem linearisierten Zielvektor. Der erfolgreiche Einbau und die richtige Orientierung in den Zielvektor wurden aus Mini-DNA-Kulturen (2.1.1) mittels Restriktionsverdau (2.1.2.3) überprüft. Bei Klonierungen mit PCR-Produkten wurde das eingeführte Insert im Vektor stets noch einmal mit einer Sequenzierung bestätigt.

In Problemfällen wurde das PCR-Produkt direkt nach erfolgter PCR einem Proteinase K-Verdau unterzogen (Crowe et al., 1991). Dieser diente der Entfernung vor allem der Polymeraseenzyme. Dabei wurde dem PCR-Ansatz 2,5 µl Proteinase K (2 mg/ml) und 5 µl 10 % (G/V) SDS zugegeben und für 30 min bei 37°C geschüttelt. Die Reaktion wurde durch zehnminütiges Erhitzen auf 65°C abgestoppt und weiter verfahren wie oben beschrieben.

2.1.5 Herstellung von Baculoviren für die Insektenzellkultur

Zur Herstellung von Baculoviren für die Insektenzellkultur wurde auf das Bac-to-Bac-System der Firma Invitrogen zurückgegriffen. In den Ausgangsvektor pFastBac wurde mittels Klonierung mit Restriktionsendonucleasen die gewünschte DNA eingefügt und in *E. coli* DH10Bac transformiert. Mini-DNA-Präparationen daraus (die auf positive Transformation mittels X-Gal-Färbung getestet wurden) wurden zum Transfizieren von Sf9 Zellen verwendet. Die Virusamplifikation und Proteingewinnung erfolgten nach der vom Hersteller mitgelieferten Arbeitsanweisungen.

2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.1 Proteinbestimmung

Alle notwendigen Proteinbestimmungen wurden mit Hilfe des Bradford Protein Assay von Bio-Rad bzw. der identischen Rotiquant-Lösung von Roth durchgeführt. Der Nachweis beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums (465 nach 595 nm) saurer Coomassie-Brilliant Blau G-250-Lösungen bei Bindung von Proteinen an den Farbstoff. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes ist über mindestens eine Zehnerpotenz gegenüber einer Konzentrationsänderung konstant und so gilt in diesem Bereich das Lambert-Beersche-Gesetz. Zu jeder Bestimmung wurde eine aus mindestens vier Werten bestehende Standardkurve mit Rinderserumalbumin angefertigt. Die einzelnen Werte wurden dabei mindestens doppelt bestimmt. Die Auswertung der Kurve erfolgte mittels eines auf Microsoft Excel basierenden Analyseprogramms.

2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen und Durchführung der SDS-PAGE wurden Minigelapparaturen der Firma Bio-Rad verwendet.

Als Stammlösungen dienten folgende Lösungen:

4fach Trenngelpuffer	SDS	4,0 g	
	3 M Tris-HCl pH 8,8	500 ml	(oder 181,7 g Tris)
	Wasser	ad 1000 ml	
4fach Sammelgelpuffer	SDS	2,0 g	
	1 M Tris-HCl pH 6,8	250 ml	(oder 30,8 g Tris)
	Wasser	ad 500 ml	

Acrylamid 30%/ Bisacrylamid 0,8% (AA/Bis) als Fertiglösung von Roth (Rotiphorese 30)

Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10% (G/V)

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

10fach Laufpuffer	Tris	30,3 g	
	Glyzin	144,0 g	
	SDS	10,0 g	
	Wasser	ad 1000 ml	
pH von etwa 8,3 stellt sich von selbst ein			
5fach Auftragspuffer	1 M Tris-HCl pH 6,8	50,0 ml	
	SDS	10,0 g	
	Dithiothreitol (DTT)	0,1 g	
	Glyzerin 87%	114 ml	
	Wasser	35 ml	
	Bromphenolblau	0,01 g	

Standardmäßig wurden 12,5-prozentige SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Zur Auftrennung von besonders großen bzw. besonders kleinen Proteinen wurden 10- bzw. 15-prozentige Gele verwendet. Zur Herstellung wurden die entsprechenden Mengen an AA/Bis-Lösung, Trenn- bzw. Sammelgelpuffer und Wasser zusammengegeben. Zum Starten der Polymerisation wurden gleichzeitig pro Trenngel 2,5 µl TEMED und 32,5 µl APS-Lösung dazugegeben. Um eine glatte Trennfläche zu gewährleisten, wurde auf das Gel beim Aushärten eine dünne Schicht butanolgesättigtes Wasser aufgetragen und nach dem Aushärten wieder entfernt.

Das Sammelgel wurde unabhängig von der Konzentration des Trenngels aus folgenden Komponenten hergestellt:

4fach Sammelgelpuffer	2,0 ml
AA/Bis	1,0 ml
Wasser	5,0 ml
TEMED	8 µl
APS	80 µl

Zuvor wurde der entsprechende Kamm für die gewünschte Taschenanzahl und -größe ausgewählt und die Polymerisation wiederum durch Zugabe von TEMED und APS gestartet. Die Gele sind bei 4°C gegen Austrocknen geschützt 4-5 Wochen lagerbar.

Das Gel wurde in eine Laufkammer eingespannt, die im Anoden- und Kathodenreservoir jeweils den einfachen Laufpuffer enthielten. Die Proben wurden mit Hilfe des 5fach Auftragspuffers in die Geltaschen hineinpipettiert. Danach wurden die Proteine bei konstanter Spannung von 150 V voneinander getrennt. Ein Lauf dauerte ca. 90 Minuten.

2.2.3 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

2.2.3.1 Coomassie-Brilliant Blau-Färbung

Um die aufgetrennten Proteine zu fixieren und sichtbar zu machen, wurde das Gel mit einer Coomassie-Brilliant Blau-Lösung mindestens 20 Minuten gefärbt.

Färbelösung	Serva Blue G	0,175% (G/V)
	Essigsäure	10 % (V/V)
	Methanol	45% (V/V)
	Wasser	ad 100%

Zum Entfärben wurde die Färbelösung gegen eine Entfärbelösung ausgetauscht, die 7,5% (V/V) Essigsäure und 5 % (V/V) Methanol in Wasser enthielt. Zum effizienteren Entfärben wurden noch ein bis zwei kleine Schaumstoffstücke dazugegeben und über Nacht entfärbt.

Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 50-100 ng Protein pro Bande.

2.2.3.2 Kupferchlorid-Färbung

Da die Färbung mit Coomassie-Brilliant Blau erst nach längerem Entfärben klare Ergebnisse bringt, wurde zur schnellen Detektion z.B. von gereinigten Proteinen in Elutionsfraktionen die Färbemethode mittels Kupferchlorid vorgeschaltet (Lee et al., 1987).

Dabei wird das Gel in eine 0,3 M CuCl_2 -Lösung eingelegt und 10-20 min leicht geschüttelt. Die Proteinbanden sind als transparentes Negativbild im Kontrast zum türkisfarbenen Hintergrund des Gels sichtbar. Die Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode zwar um ein Vielfaches höher als bei der Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung, allerdings hat dies bei der Detektion von konzentrierten Elutionsfraktionen keine Nachteile und bringt so deutlich schneller Ergebnisse. Eine Coomassie-Brilliant Blau-Färbung kann anschließend noch nach oben beschriebenen Protokoll zur Fixierung der Proteinbanden durchgeführt werden.

2.2.4 „Western“-Blot von Proteinen

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe von Spannung auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) transferiert. Um die sehr hydrophobe Membran zu aktivieren, wurde sie vor der Benutzung in Methanol getränkt. Anschließend wurde sie sehr gründlich mit fließendem VE-Wasser gewaschen, bis eine der beiden Seiten durch vollständige Benetzung hervortrat. Zum Transfer wurden Gel und Membran in eine Naßblotapparatur der Firma Bio-Rad eingespannt. Dabei wurde folgender Aufbau in einer Schale mit Transferpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,3, 150 mM Glyzin, 20% (V/V) Methanol) gefüllt und blasenfrei aufeinander gelegt: Drei Lagen 3MM-Whatman-Papier, Gel (10 min in Transferpuffer inkubiert), aktivierte Membran mit der aktivierten Seite zum Gel, drei Lagen 3MM-Whatman-Papier. Dieses „Sandwich“ wurde in einen Halter eingespannt und mit der Membran zur Anode und dem Gel zur Kathode in die Kammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 300 mA in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer.

Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers wurde die Membran kurz (< 1 min) mit Ponceau-S-Lösung bedeckt und mit Wasser wieder gewaschen. Der Proteinmarker und die in größerer Menge vorhandenen Proteine wurden so sichtbar. Die Position des Markers und die der Auftragsspuren mit sichtbaren Proteinen wurden mit Kugelschreiber oder Bleistift seitlich auf der Membran markiert, um eine spätere Referenz zu ermöglichen.

2.2.5 Immundetektion immobilisierter Proteine auf Membranen

Zur Immundetektion wurde die Membran (Blot) mindestens zwei Stunden, meist jedoch über Nacht, in einer Blocklösung (je 2% (G/V) Magermilchpulver und Ovalbumin in PBS) inkubiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen für Antikörper abzusättigen. Danach wurde der Blot mit erstem Antikörper, der sich gegen das nachzuweisende Protein richtet, in einer geeigneten Verdünnung in Blocklösung überschichtet und für 1 h geschüttelt. Nach Entfernung der Antikörperlösung wurde der Blot viermal für je 10-15 min mit PBS-T (PBS mit 0,1% (G/V) Tween 20) gewaschen. Entsprechend der Herkunftspecies des ersten Antikörpers wurde ein passender Zweitantikörper gewählt, der mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt war. Die Verdünnung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubations- und Waschbedingungen

waren identisch mit denen des Erstantikörpers. Zur Detektion wurden gleiche Mengen (pro Blot je 5 ml) folgender Lösungen gemischt und der Blot darin mindestens fünf Minuten inkubiert:

Lösung A	90 mM p-Cumarsäurelösung in DMSO	22 µl
	250 mM Luminollösung in DMSO	50 µl
	100 mM Tris-HCl pH 8,3	ad 5 ml
Lösung B	Perhydrol (H ₂ O ₂ -Lösung, 30%)	3 µl
	100 mM Tris-HCl pH 8,3	ad 5 ml

Da diese Lösungen nur eine begrenzte Leuchtkraft und –dauer haben, wurde bei schlechter detektierbaren Banden auf die SuperSignal-West-Pico-Lösungen der Firma Pierce zurückgegriffen. Zur Detektion der jeweils entstehenden Chemolumineszenz wurde ein Fuji LAS-1000 System verwendet. Alternativ wurde das entstehende Licht über einen Kodak Biomax Light Film detektiert.

Um den gleichen Blot mit einem anderen primären Antikörper detektieren zu können, d.h. ein anderes Protein nachweisen zu können, wurde der Blot in 0,2 M Glyzin pH 2,5 für 30 Minuten bei 30°C geschüttelt (“Strippen”) und nach Waschen die oben beschriebenen Schritte inklusive erneutem Blockieren wiederholt.

2.2.6 Präparation von Zellzytosolen

Die verwendeten Zellen wurden entsprechend dem Versuchsziel vorbehandelt. Nach dem Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05/0,02% in PBS, PAN) wurden sie von der Schale in ein Schraubdeckelgefäß überführt und bei 1000 rpm für fünf min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert und der Überstand wieder entfernt. Nach insgesamt dreimaligem Waschen wurden die Zellen zum Lysieren in 500 µl 2/2/0 pH 7,4 resuspendiert und anschließend dreimal mit einer 1 ml Spritze und einer 0,45 x 12 mm Nadel aufgezogen.

Das Lysat wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 280.000xg von zellulären Bestandteilen getrennt. Aus dem Überstand wurde der Proteingehalt nach Bradford bestimmt (2.2.1) und für spätere Versuche verwendet.

2.2.7 Quervernetzen von Zellzytosolen

Sollte Zytosol für Quervernetzungsversuche (“Crosslinking”) aus Zellen gewonnen werden, so wurde zur Herstellung des Zytosols nach obigem Protokoll verfahren. Es wurde allerdings statt eines 2/2/0 Puffers zum Lysieren ein 10 mM Phosphatpuffer pH 7,5 verwendet, da die Puffersubstanz Tris den Crosslinker inaktivieren würde. Nach eventuellen Phosphorylierungsreaktionen (2.3) wurde je 500 µl Reaktions-/Lysatvolumen 20 µl einer 25 mM Dithiobis(succinimidylpropionat)-Lösung (DSP) in DMSO zugegeben und der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion (Inaktivierung des überschüssigen DSP) wurden 25 µl einer 1 M Tris-HCl pH 8,0 Lösung hinzu pipettiert und das Lysat den nachfolgenden Anforderungen entsprechend weiterverarbeitet (z.B. Immunpräzipitation 2.2.8). Danach konnten die Disulfidbrücken, die die Proteine quervernetzen, gegebenenfalls durch Zugabe von 25 mM DTT wieder gespalten werden.

2.2.8 Immunpräzipitation aus Zellzytosolen

Zu dem nach Absatz 2.2.6 gewonnenen Zytosol wurde ca. 10% (V/V) an Protein A-Sepharose (Amersham) zugegeben. Die Protein A-Sepharose wurde vorher dreimal mit 20/2/0 pH 7,4 gewaschen. Der Ansatz wurde 1 h bei 4°C rotiert und anschließend für 2 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird nun mit dem primären Antikörper versetzt und erneut 2 h bei 4°C rotiert. Danach werden über Nacht wiederum 10% (V/V) Protein A-Sepharose zugegeben. Das Pellet wurde nun fünfmal mit 20/2/0 pH 7,4 gewaschen und anschließend in 50 µl 5fach Proteinauftragspuffer (Sambrook et al., 1989) resuspendiert. Damit wurden zur weiteren Analyse eine SDS-PAGE, ein „Western“-Blot und eine Immundetektion durchgeführt.

2.2.9 Proteinreinigung

2.2.9.1 Reinigung von GRK2 aus Sf9 Zellen

Zur Reinigung humaner GRK2 und humaner GRK2 S29A bzw. S29D wurden Pellets aus Sf9-Insektenzellen verwendet. Ein Pellet entspricht dabei der durch Zentrifugation gewonnenen Menge an Sf9 Zellen aus zweimal 200 ml Schüttelkultur. Alle Schritte der Aufreinigung fanden bei 4°C im Kühlraum statt.

Pro Pellet wurden 30 ml eines 20/5/0 pH 7,2 Puffers mit 20 mM NaCl, 3 mM Benzamidin und 3 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) verwendet. Das Pellet wurde darin homogenisiert, zwei- bis dreimal mal mit einem Ultra-Turrax behandelt und kurz sonifiziert. Anschließend wurde das Homogenat bei einer Zentrifugation bei 165.000xg für 40 min von den zellulären Überresten befreit und mit 20/5/0 pH 7,2 und 1 M NaCl auf 300 ml und 50 mM NaCl gebracht. Diese 300 ml wurden auf eine gegen 20/5/0 pH 7,2 äquilibrierte SP-Sepharose-Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/2-3 min aufgetragen und anschließend die Säule wieder mit 20/5/0 pH 7,2 gewaschen. Zur Elution wurden 100 ml eines Gradienten in 20/5/0 pH 7,2 von 50 bis 400 mM NaCl verwendet bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/2-3 min und einer Fraktionsgröße von ca. 2 ml. Die Fraktionen wurden mit einem Aktivitätstest (2.3.1) und an Hand eines SDS-Polyacrylamidgels ausgewertet.

Die vereinigten Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden mit 20/5/0 pH 7,2 1:10 bis 1:20 auf ca. 500 ml verdünnt und auf eine Reactive-Yellow-86-Säule aufgetragen (Fließbedingungen siehe oben). Nach dem Waschen mit 20/5/0 pH 7,2 wurde das Protein mit 100 ml eines Gradienten mit 20/5/0 pH 7,2 und 0-400 mM NaCl und gleichbleibenden Fließbedingungen (siehe oben) eluiert und wiederum ca. 2 ml große Fraktionen gesammelt. Wiederum wurden die Fraktionen auf Aktivität und im Gel getestet und die aktivsten gepoolt. Die gepoolten Fraktionen wurden mit 20/5/0 pH 7,2 und 5 M NaCl Lösung auf 200-250 ml mit einem Salzgehalt von 100 mM verdünnt. Unter den schon beschriebenen Fließbedingungen wurden sie anschließend auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen.

Die Elution erfolgte mit 100 ml einer 20/5/0 pH 7,2 Lösung bei einem Salzgradienten von 100 bis 1000 mM NaCl. Die Fraktionen wurden wiederum zu 2 ml gesammelt und auf Reinheit im Gel und auf Aktivität getestet. Diese Methode erbrachte in den reinsten und aktivsten Fraktionen Reinheiten von 85-95%. Diese wurden zur kurzzeitigen Lagerung bei 4°C aufbewahrt oder mit 50% Glycerin bei -80°C eingefroren.

2.2.9.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Rekombinante Proteine, als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert, lassen sich sehr einfach reinigen. Dieses Verfahren eignet sich insbesondere für die Expression von Proteindomänen, da diese meist andere physikalische Eigenschaften als das Holoprotein aufweisen und so kein spezielles Reinigungsprotokoll erstellt werden muss.

Zur Expression wurden 500 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in einem 2 l Schikanekolben mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD_{600nm} von 0,6-0,8 wurde mit 0,2-1,0 mM Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG) für weitere 4-7 h induziert. Die optimalen Kulturbedingungen mussten für jedes Fusionsprotein neu ermittelt werden. So erwies es sich für den N-Terminus der GRK2 als sinnvoll, die Induktion bei Raumtemperatur bzw. maximal 30°C für nicht mehr als 4 h durchzuführen. In allen Fällen wurden BL21 (Novagen) als Bakterienstämme verwendet, da diese eine niedrige Proteaseaktivität zeigen.

Nach der Induktion wurden die Bakteriensuspensionen abzentrifugiert und in 10 ml Aufschlusspuffer (20/1/2 pH 7,6 mit 100 mM NaCl) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur Lyse wieder aufgetaut. Zur vollständigen Lyse wurden sie anschließend kurz ultraschallbehandelt und der zelluläre Anteil per Zentrifugation (160.000xg für 45 min bei 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine Glutathion-Agarose-Säule (Amersham) aufgetragen und die Säule mit Waschpuffer (20/1/2 pH 7,6 mit 200 mM NaCl) gewaschen, bis die Absorption, gemessen durch einen UV-Detektor, wieder auf Ausgangsniveau zurückfiel.

Zur Elution wurde ein dem Waschpuffer ähnlicher Puffer eingesetzt, der zusätzlich noch 10 mM reduziertes Glutathion enthielt. Zur Entfernung des Glutathions wurde die Elutionsfraktion anschließend gegen den Zielpuffer dialysiert und falls nötig mittels Amicon Ultra (Millipore) konzentriert.

2.2.9.3 Präparation von Rhodopsin aus Rinderretinae

Die Reinigung von Rhodopsin-haltigen Stäbchenaußensegmenten (Rod Outer Segments; ROS) erfolgte nach Vorschriften von Shichi und Somers, 1978 sowie Wilden und Kühn, 1982. Hier das Protokoll in Kürze:

Verwendete Puffer und Lösungen:

Puffer A	100 mM	NaH_2PO_4	pH 6,5
	2 mM	$MgCl_2$	
	0,1 mM	EDTA	
40% Saccharosepuffer	400 g	Saccharose	
	ad 1000 g	Puffer A	
26% Saccharosepuffer	1000 ml	40% Saccharosepuffer	
	500 ml	Puffer A	
20% Saccharosepuffer	500 ml	40% Saccharosepuffer	
	500 ml	Puffer A	

Harnstoffpuffer	50 mM	Tris-HCl pH 7,4
	5 mM	EDTA
	5 M	Harnstoff

Die gesamte Reinigung erfolgte auf Eis unter schwachem Rotlicht. 50 Retinae wurden in 50 ml 40% Saccharosepuffer aufgenommen und kräftig geschüttelt, um das Abbrechen der Außensegmente zu erreichen. Anschließend wurde fünf Minuten bei 5000 rpm im JA25.50 zentrifugiert, der Überstand abgenommen und über Mull filtriert. Das Filtrat wurde mit dem gleichen Volumen Puffer A verdünnt, geschüttelt und zehn Minuten bei 1000 rpm im JA25.50 zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2,5 ml 20% Saccharosepuffer resuspendiert, durch eine dünne Kanüle (0,45 x 12 mm) gepresst und so homogenisiert und auf einen Saccharosegradienten (5 ml 40% Saccharosepuffer, 50 ml 26% Saccharosepuffer und 2 ml 20% Saccharosepuffer) gegeben. Der Gradient wurde im JA25.50 20 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Die Rhodopsin enthaltende Bande, die sich zwischen 40% und 26% sammelt, wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, danach mit Puffer A 1:2 verdünnt und im JA25.50 (10000 rpm, 4°C, 15 min) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml Harnstoffpuffer resuspendiert und 4 Minuten sonifiziert (Branson Sonifier, Output 30-40). Die Suspension wurde zum Waschen 1:3 mit 50 mM Tris-HCl pH 7,4 verdünnt und im JA25.50 bei 19000 rpm bei 4°C für 40 min zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch dreimal wiederholt und die Membranen am Ende durch eine Kanüle homogenisiert. Nach Einstellung der gewünschten Verdünnung (meist 10 pmol/µl Rhodopsin) wurden die Membranen bei -80°C gelagert.

2.3 Phosphorylierungsversuche

2.3.1 Phosphorylierung von Rhodopsin durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sehr verschiedene Bedingungen für die Rhodopsin-phosphorylierung durch GRKs ausgetestet und routinemäßig angewandt. Die exakten Reaktionsbedingungen sind entweder in den folgenden Abschnitten des Methodenteils oder im Ergebnisteil aufgeführt. An dieser Stelle sind nur die Standardbedingungen erwähnt, unter denen ein Großteil der Versuche stattfand und die auch zur Validierung der GRK-Reinigungen dienten.

In 50 bis 100 µl Endvolumen befanden sich:

20 mM	Tris-HCl pH 7,4
2 mM	EDTA
8 mM	MgCl ₂
75 µM	ATP
0,1-0,5 cpm/fmol	spezifische Aktivität des [³² P]ATP
50 nM	GRK2
300 nM	Gβγ-Untereinheiten
2-4 µM	Rhodopsin (als ROS)

Je nach Versuchsansatz standen 5 bis 40 µl des Endvolumens für Proben zur Verfügung. Wurden Substanzen auf inhibitorische oder aktivierende Effekte untersucht, so wurden die übrigen oben genannten Komponenten in zwei Mischungen hinzugefügt. Zum einen der Mix mit Puffer, MgCl₂, ATP, Gβγ-Untereinheiten und gegebenenfalls dem radioaktiven Tracer (falls nicht der Effekt der Vorphosphorylierung der GRK2 untersucht werden sollte) und zum anderen das Rhodopsin. Nach Zugabe des Rhodopsins unter Rotlicht wurde für 10-15 Minuten bei Weißlicht bei 30°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von fünffach Proteinauftragspuffer abgestoppt. Anschließend wurden die Proben über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels eines Phosphoimagers (Fuji FLA 3000) ausgewertet.

Wurde Calmodulin dem Versuch zugegeben, so geschah dies, wenn nichts anderes angegeben ist, zusätzlich noch in Gegenwart einer Endkonzentration von 1 mM Calciumchlorid.

2.3.2 Phosphorylierung von Rhodopsin durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen aus Zellzytosolen

Zur Untersuchung der GRK2-Aktivität im Zytosol von transfizierten Zellen wurde das Zytosol der Zellen, die den Versuchsbedingungen entsprechend vorbehandelt waren, wie unter 2.2.6 besprochen, gewonnen und der Proteingehalt festgestellt. Dem unter 2.3.1 angegebenen Ansatz wurde die Menge Zytosol hinzugefügt, die im Endvolumen einer Konzentration von 50 nM GRK2 entsprach unter der Annahme, dass 1% des Gesamtproteins im Zytosol GRK2 war. Die Bestimmung der GRK2-Aktivität erfolgte dann analog zu den unter 2.3.1 beschriebenen Schritten.

2.3.3 Phosphorylierung von Rhodopsin durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen bei vorhergehender Phosphorylierung der GRKs durch PKC

Um die Aktivität von PKC-phosphorylierter GRK2 zu untersuchen, wurde zuerst GRK2 nach oben angegebenen Phosphorylierungsbedingungen in der Gegenwart von 3 pmol PKC δ , 4 μ g Phosphatidylcholinvesikeln (0,175 mg/ml Asolectin in 20/0,1/0,1 mit 20 mM NaCl pH 7,2), 1 μ M Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), 50 μ M CaCl₂ und ohne radioaktiv markierten Tracer für 30 min bei 30°C phosphoryliert. Anschließend wurden unter Lichtausschluß Rhodopsin, G $\beta\gamma$ -Untereinheiten und radioaktiv markierter Tracer zugegeben und die Reaktion für 10-15 Minuten unter Weißlicht komplettiert. Die Phosphorylierung wurde durch Zugabe von fünffach Proteinauftragspuffer abgestoppt, die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji FLA 3000) ausgewertet.

2.3.4 Phosphorylierung von Tubulin durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen

Für die Phosphorylierung von 4 μ M Tubulin aus Schweinehirn (Jens Müller, Hamburg) wurde prinzipiell der gleiche Ansatz verwendet wie für die Phosphorylierung von Rhodopsin (2.3.1). Der Unterschied lag nur im Fehlen der G $\beta\gamma$ -Untereinheiten (bis auf die Bestimmung der G $\beta\gamma$ -Abhängigkeit) und der Phosphorylierung bei 30°C für 30 Minuten. Auftrennung und Detektion der phosphorylierten Proteine erfolgte analog.

2.3.5 Bestimmung der Phosphorylierungsstellen durch GRK2/5 auf Tubulin

Zur Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von GRK2/5 auf Tubulin wurden 4 μ M Tubulin mit 50 nM GRK2 oder GRK5 nach den in Absatz 2.3.4 beschriebenen Bedingungen phosphoryliert. Zur Erhöhung der eingebauten Radioaktivitätsmenge, welche eine leichtere Detektion der phosphorylierten Peptide erlaubte, wurden statt 75 μ M ATP nur 10 μ M ATP zugesetzt. Der Ansatz inkubierte 30 Minuten bei 30°C und wurde anschließend einem Verdau in Lösung unterzogen: Zum Abstoppen der Phosphorylierungsreaktion wurde der Ansatz fünf Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend mit 100 mM Tris-HCl pH 7,8 und 10 mM CaCl₂ Lösung 1:1 verdünnt. Für einen Trypsinverdau wurden von dem Ansatz 20 μ l mit 100 μ l 50 mM Essigsäure verdünnt und Trypsin in einer Ratio von ca. 1:50 (G/G) dem Ansatz hinzugefügt. Bei Chymotrypsinverdau wurden 25 μ l Phosphorylierungsansatz mit 100 μ l einer 1 mM HCl Lösung verdünnt und Chymotrypsin ebenfalls ca. 1:50 (G/G) zugegeben. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 25°C.

Als Kontrolle wurde die gleiche Menge Tubulin mit Caseinkinase II phosphoryliert und ebenfalls verdaut. Die Proben wurden anschließend auf einem Tris/Tricin-Gel nach Schägger und Jagow (1987) aufgetrennt und mittels Phosphoimager (Fuji FLA 3000) ausgewertet.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung verschiedener Zelllinien

Die verschiedenen Säugetierzelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einem mit Kupfer beschlagenem CO₂-Begasungsbrutschrank kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium einer ca. 80% konfluenten Kultur abgesaugt. Die Zellen wurden mit Trypsin-Lösung (Pan) abgelöst, wobei die Einwirkdauer je nach Zelltyp zwischen 1 und 10 Minuten betrug. Zum Entfernen des Trypsinhaltigen Mediums wurde die Suspension in ein steriles Schraubdeckelgefäß überführt und kurz zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer der Verdünnung entsprechenden Menge Medium aufgenommen und auf neue Kulturschalen verteilt. Üblicherweise wurden die Zellen bei 80% Konfluenz (nach 2-3 Tagen) 1:5 gesplittet. Die Gefäße für die Kultivierung der Zellen waren von Nunc oder Falcon.

2.4.2 Einfrieren von Zellen

Zum Lagern der Zellen wurden diese in Einfriermedium (90% FCS und 10% DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen entsprechend den Angaben in 2.4.1 von der Kulturschale gelöst, zentrifugiert und mit eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde in Nunc-Cryoröhrchen gefüllt und für 3 h bei -20°C gehalten. Anschließend kamen sie über Nacht in -80°C, um dann für die längere Lagerung in flüssigem Stickstoff gehalten zu werden.

Zum Auftauen wurde ein Cryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in 100% Ethanol aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit einer sterilen Gilsonpipette entnommen und in das vorgelegte Medium in einer Kulturschale getropft. Nach dem Anheften der Zellen (je nach Zelltyp 1-4 Stunden) wurde das Medium durch frisches ersetzt, um das DMSO zu entfernen.

2.4.3 Splitten von Zellen auf Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen

Um Zellen unter dem Mikroskop anschauen zu können, müssen diese auf Deckgläschen wachsen. Dazu werden die entsprechenden Deckgläschen kurz in 70%-igem Ethanol desinfiziert und mit sterilem Wasser abgewaschen. Auf die Deckgläschen, die entweder in Kulturschalen oder in 6-well Platten gelegt wurden, wurden 1-2 Tropfen einer sterilen Poly-D-Lysinlösung (0,1 mg/ml) getropft. Nach mindestens 2 Stunden wurde die Lösung wieder entfernt und die Deckgläschen kurz mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde Medium auf die Deckgläschen vorgelegt und die transfizierten Zellen entsprechend der Angaben 2.4.1 darauf gesplittet. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank anhaften gelassen.

2.4.4 Transfektion von DNA in Säugetierzellen

2.4.4.1 Calciumphosphatmethode

Zur Transfektion von HEK293-Zellen, die nicht unter dem Mikroskop angeschaut werden sollen, eignet sich am besten eine modifizierte Methode nach Chen (Chen und Okayama, 1987). Dabei wurden maximal 80% konfluente Zellen nach folgendem Protokoll transfiziert:

Benötigte Lösungen:

Steriles Wasser

2,5 M CaCl₂-Lösung

2fach BBS:	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	1,5 mM
(N,N-bis-[2-Hydroxyethyl])-2-aminethansulfonsäure (BES)		50 mM
		pH 6,5

Pro 10 cm Schale wurden folgende Mengen verwendet:

Plasmid-DNA (1µg/µl)	20 µl
Wasser	450 µl
CaCl ₂ 2,5 M	50 µl
2fach BBS	500 µl

Die Lösungen wurden in einem sterilen Reaktionsgefäß zusammenpipettiert, gut durchmischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde die Mischung auf die Zellen gegeben, vorsichtig durchmischt und über Nacht bei 3% CO₂ inkubiert. Dabei bildet sich ein DNA-Calciumphosphatniederschlag, der von den Zellen phagozytiert wird. Bei hoher Transfektionsrate hatten sich deutlich sichtbare Kristalle gebildet und die Zellen hafteten nicht mehr fest an den Schalen. Am nächsten Morgen wurde sehr vorsichtig das Medium gewechselt und für weitere 24 h bei 7,5% CO₂ inkubiert. Danach wurden mit den Zellen die entsprechenden Versuche durchgeführt.

2.4.4.2 DEAE-Dextran Methode

Diese Methode eignet sich besonders zur Transfektion von COS Zellen.

Verwendete Lösungen:

TBS	Tris-HCl pH 7,4	1,5 g
	NaCl	4,0 g
	KCl	0,1 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	50,83 mg
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	51,46 mg
	Na ₂ HPO ₄	42,59 mg
	Wasser	ad 500 ml
		und autoklavieren
Chloroquin-Lösung		60 µg/ml in DMEM komplett
DMSO-Medium		DMEM komplett mit 10% DMSO
DEAE-Dextran		1,0 mg/ml DEAE-Dextran in TBS

Die zu 80% konfluenten Zellen wurden einmal mit 5 ml TBS in der Kulturschale gewaschen. Pro 10 cm Kulturschale wurden 9 µg DNA in 1,5 ml TBS gelöst und sterilfiltriert. Anschließend wurde 1,5 ml DEAE-Dextran Lösung dazugegeben und der Ansatz gut durchmischt. Die so hergestellte Lösung wurde auf die gewaschenen Zellen gegeben und 15 Minuten bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 7,7 ml Chloroquin-Lösung zu den Zellen gegeben und der Ansatz für 3 h im Brutschrank bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert.

Nach Absaugen des Mediums wurden 10 ml DMSO-Medium für 1 Minute zupipettiert und anschließend gründlich abgesaugt.

Nach Zugabe von 10 ml frischem DMEM-Komplettmedium wurden die Zellen weitere 48-72 h bei 7,5% CO₂ im Inkubator bei 37°C gehalten.

2.4.4.3 Lipofektion

Sollten die Zellen für mikroskopische Untersuchungen verwendet werden, so wurden HEK293-Zellen nicht mit der unter 2.4.4.1 beschriebenen Calciumphosphatmethode sondern per Lipofektion transfiziert. Dies hatte eine deutlich bessere Form der Zellen zur Folge.

Als Transfektionsreagenz wurde Effektene (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers verwendet.

2.4.5 Zellkultur von Insektenzellen

Zur Proteinreinigung rekombinanter Rezeptorkinase und deren Mutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit vielfach infizierte Insektenzellen (Sf9) verwendet. Sie erfolgte durchweg nach O'Reilly et al. (1992) und den entsprechenden Angaben in Müller et al. (1995).

2.5 Methoden der Protein-Protein-Interaktionsmessung

2.5.1 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR, Biacore)

Bei der Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Surface-Plasmon-Resonance, SPR) wird sich die Änderung des Brechungswinkels in Abhängigkeit der Masse zu Nutze gemacht. Dabei wird auf einen dünnen Goldfilm das zu untersuchende Protein z.B. mittels Biotin-Streptavidin-Kopplung aufgebracht. Als Messgröße wird der Brechungswinkel von polarisiertem Licht herangezogen. Dieser ist direkt proportional zur Masse auf dem Goldfilm. Wird nun die Untersuchungslösung über den mit Protein beschichteten Goldfilm gespült, so kommt es im Falle einer Interaktion zwischen den beiden Bindungspartnern zu einer Änderung der Masse und damit zu einer Änderung der Brechungsindices, diese wird in „resonance units“ ausgegeben.

Die Messungen wurden an einem BiacoreX-System mit einem Sensorchip CM5 durchgeführt. Dabei wurde GRK2 mit Hilfe von EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Pierce) an Biotin gekoppelt. Anschließend wurde der Überschuss an freiem Biotin mit einer PD10 Säule abgetrennt. Der Erfolg der Kopplungsreaktion wurde mittels Immunreaktion mit einem Peroxidase-gekoppelten Streptavidin überprüft.

Die Chipoberfläche wurde gemäß Herstellerangaben aktiviert und mit Streptavidin beschichtet. Die Kopplungsreaktion zwischen Streptavidin beschichtetem Chip und biotinylierter GRK2 wurde direkt im BiacoreX-System durchgeführt und konnte so online verfolgt werden.

2.5.2 Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)

Bei der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie handelt es sich um eine Methode, Protein-Protein-Interaktionen in Lösung zu beobachten. FCS beruht auf dem Prinzip der Abnahme der Diffusionsgeschwindigkeit durch Massenzunahme. Vereinfacht wird dabei die Diffusionszeit eines fluoreszierenden Partikels durch ein sehr kleines Anregungsvolumen beobachtet. Abhängig von der Interaktion mit anderen, nicht fluoreszierenden Proteinen, ändert sich die Diffusionszeit. Anhand der Anzahl von interagierenden und freien Partikeln über einen gewissen Messzeitraum lassen sich Aussagen über die Kinetik und Affinität der Interaktion machen.

Die Messungen in dieser Arbeit wurden an einem ConfoCor1 der Firma Zeiss durchgeführt, das am Beginn des jeweiligen Messtages entsprechend der Herstellerangaben geeicht wurde.

Als Fluorophor diente Alexa Fluor 488-gelabeltes Calmodulin von Molecular Probes. Die Anregung erfolgte dabei bei 488 nm. Zur Detektion nach Trennung der Anregungs- und Emissionsstrahlung mittels dichroischem Spiegel, wurde eine Avalanche Einzelphotonzählkammer (SPCM-AQ Series, EG&G Optoelectronics Canada Inc.) und ein digitaler Hardwarekorrelator (ALV-5000, ALV Langen) verwendet. Die Messungen wurden über einen Zeitraum von 30 Sekunden durchgeführt, danach waren in der Regel die erhaltenen Autokorrelationskurven stabil. Die Messungen wurden in Objektträgerkammern der Firma Nunc (Art.-Nr. 155411) durchgeführt mit 20/0/2 pH 7,4 als Puffer, dem die entsprechenden Calcium- bzw. EGTA-Konzentrationen zugesetzt waren. Die Daten wurden mittels der von Zeiss mitgelieferten Software ausgewertet und mit Microsoft Excel zusammengefasst.

2.5.3 Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

Die Methode der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfermessung beruht auf dem strahlungslosen Übergang von Energie von einem Fluorophor auf ein anderes. Voraussetzung dafür ist, dass die beiden Fluorophore zum einen sehr nahe beieinander sind ($<100 \text{ \AA}$), die richtige Orientierung zueinander haben und sich zum anderen das Emissionsspektrum des einen Fluorophors mit dem Exzitatorionsspektrum des anderen Fluorophors überschneidet. Ein gängiges Fluorophorpaar, das die Eigenschaften der überlappenden Spektren erfüllt, sind Mutanten des Green-fluorescent-protein (GFP). Das Emissionsspektrum des Cyan-fluorescent-protein (CFP) überlappt mit dem Exzitatorionsspektrum des Yellow-fluorescent-protein (YFP). Als Folge des FRET kommt es zu einer Abnahme des Emissionspeaks des CFPs und zu einer Zunahme des Emissionspeaks des YFPs. Dies wird im Allgemeinen als Verhältnis der Emission von CFP zu YFP ausgedrückt.

2.5.3.1 Messung in Lösung/Zellzytosol

Zur Messung von FRET zwischen CFP- und YFP-getaggten Proteinen, die transient in HEK293-Zellen transfiziert waren, wurde das Zytosol nach 2.2.6 präpariert. Die Messung wurde in einem PerkinElmer LS50B Fluorimeter in einer 2 ml Fluoreszenzküvette durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 436 nm bei einer Spaltbreite von 10 nm. Die Fluoreszenz wurde als Spektrum zwischen 450 bis 550 nm aufgenommen, wobei die Spaltbreite ebenfalls 10 nm betrug. Zur Auswertung wurde die Ratio der Fluoreszenz bei 475 nm (CFP) und 535 nm (YFP) gebildet.

2.5.3.2 Messung in intakten Zellen

Die Messungen wurden an einem Zeiss Axiovert135 Mikroskop mit einem 63fach Ölimmersionsobjektiv durchgeführt. Zur Detektion der Fluoreszenz wurde ein Dualemissions-photometriesystem der Firma Till Photonics benutzt. Die Anregung erfolgte mittels eines Polychrome IV von Till Photonics. Um Bleicheffekte zu minimieren, wurde jeweils nur für 5 ms bei $436 \pm 10 \text{ nm}$ mit einer Frequenz zwischen 1 und 75 Hz angeregt. Bei der Anregung wurde ein Strahlungsteiler DCLP 460 nm verwendet. FRET wurde als Ratio der Emission von YFP zu CFP bei $535 \pm 15 \text{ nm}$ bzw. $480 \pm 20 \text{ nm}$ mittels eines Strahlungsteilers DCLP 505 nm gemessen. Zur Applikation der verschiedenen Agonistenlösungen wurde eine magnetventilkontrollierte Superfusionsanlage (ALA-VM8; ALA Scientific Instruments) mit einer Lösungsmittelaustauschzeit von 5-10 ms benutzt. Die Signale wurden mittels eines Avalanche Photodiodendetektors empfangen und mit einem AD Converter (Digidata 322A, Axon Instruments) zur weiteren Bearbeitung in einem PC digitalisiert.

2.5.4 Dansylfluoreszenz

Diese Methode nutzt die Eigenschaft des Fluorophors Dansyl, sein Fluoreszenzmaximum und seine Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Solvathülle zu ändern. Dabei wurde Dansylchlorid bei pH 9,0 selektiv an basische Aminosäuren (Lysin) des Calmodulins gekoppelt. Durch Bindung eines Proteins an dansyliertes Calmodulin kam es zur Änderung der Solvation des Proteinkomplexes, welcher zu einer leichten Linksverschiebung und starken Zunahme der Fluoreszenz des Dansyls führte.

In eine 2 ml Fluoreszenzküvette mit Rühroption wurde 0,9 mM dansyliertes Calmodulin in 20/0/2 pH 7,4 mit 1 mM Calciumchlorid oder 5 mM EGTA vorgelegt und die zu untersuchenden Proteine schrittweise hinzupipettiert. Die Messungen wurden an einem PerkinElmer LS50B Fluorimeter durchgeführt. Dabei wurde bei 338 nm mit einer Spaltbreite von 5 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 486 nm ebenfalls bei einer Spaltbreite von 5 nm gemessen. Es wurde kontinuierlich über 600 Sekunden alle 0,02 Sekunden ein Wert bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels Origin und Microsoft Excel, wobei jeweils um die durch Proteinzugabe entstandene Verdünnung korrigiert wurde und die Fluoreszenzzunahme in Bezug auf die Basalfluoreszenz mit 1 mM Calciumchlorid oder 5 mM EGTA dargestellt wurde.

2.5.4.1 Markieren von Calmodulin mit Dansylchlorid

Zum Koppeln von Dansylchlorid an Calmodulin wurde ein modifiziertes Protokoll von Martinez et al. (2003) verwendet. Dabei wurden zu 600 µl Calmodulin (1,5 mg/ml in 0,2 M NaHCO₃ pH 9,0) unter starkem Schütteln 20 µl Dansylchloridlösung (10 mg/ml in Dimethyl-formamid) gegeben. Die Mischung wurde 1 h auf Eis inkubiert und das Lösungsmittel anschließend über eine PD10-Säule (Amersham) gegen Wasser ausgetauscht.

2.6 Datenanalyse

Die Darstellung der Daten mit Angabe der Mittelwerte (mean) folgt den allgemeinen statistischen Regeln für biologische Daten (TDV Swinscow, Statistics at Square one, Ninth Edition, BMJ, 1997). Die Auswertung der statistischen Signifikanz wurde mit nicht normierten Originaldaten durchgeführt. Dabei wurde die statistische Signifikanz je nach Versuchsaufbau mithilfe des zweiseitigen t-Tests oder mithilfe von ANOVA nach den Angaben von H. J. Motulsky (The InStat Guide to choosing and interpreting statistical tests, 1998) ermittelt. Als Post-hoc Test wurde dabei der Bonferroni-Test eingesetzt. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Für eine einheitliche Darstellung, und um die gemessenen Effekte zwischen den einzelnen Versuchsansätzen und den verschiedenen biologischen Systemen vergleichen zu können, wurden in den Abbildungen oft die Daten auf den in der Legende definierten Kontrollwert (=100 %) normiert und die Mittelwerte (\pm SEM) graphisch dargestellt. Ein SEM-Wert für die Kontrolle kann bei dieser Art der Darstellung nicht angegeben werden, da alle Daten einer Versuchsreihe auf den jeweiligen Kontrollwert normiert sind. Die Normierung von Daten ist gerade bei biologischen Daten sinnvoll: "Proportional changes are generally more important than absolute changes in biological data" (J. Pevsner, Bioinformatics and functional Genomics, Wiley 2003). Die statistische Auswertung erfolgte nach Empfehlung von Roman Lutz (Statistikberatung, ETH Zürich).

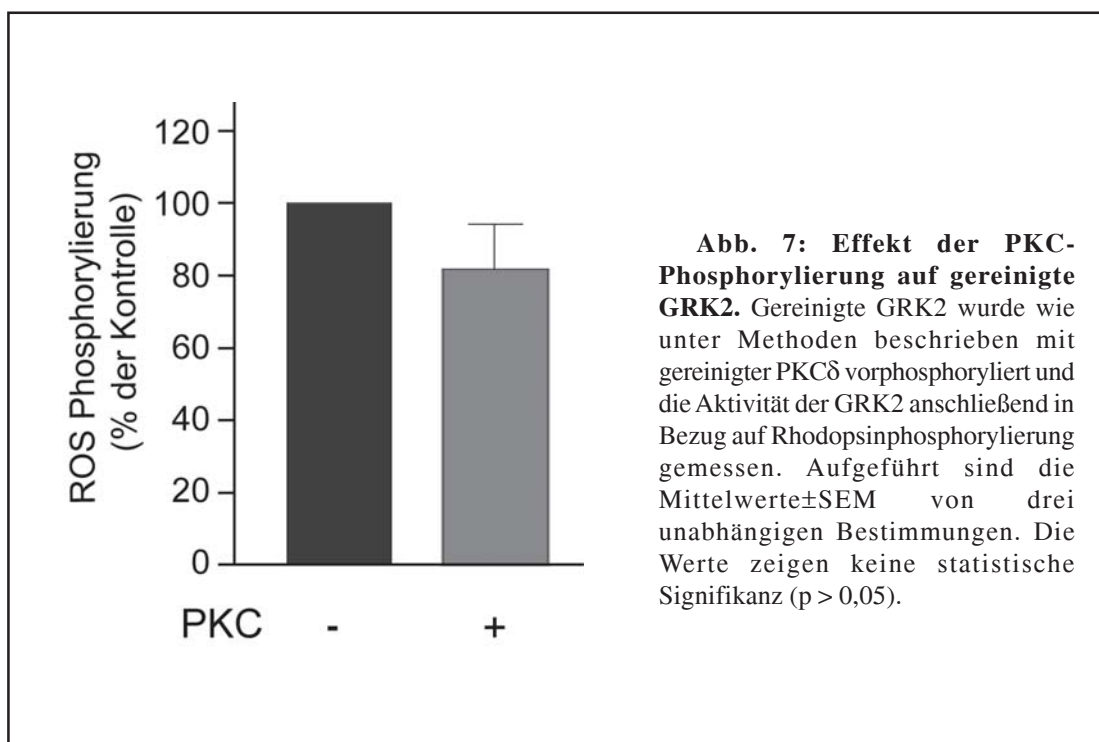
III Ergebnisse

Regulation der GRK2 durch Proteinkinase C und Calmodulin

Enzymaktivität kann auf vielfältige Weise reguliert werden. Zu den gängigsten Regulationsmechanismen gehören dabei die Regulation durch Phosphorylierung oder Interaktion mit anderen Proteinen. Auch im Fall der GRK2 sind eine Vielzahl solcher Regulationsmechanismen bekannt, wie sie bereits in der Einleitung unter 3.7 beschrieben wurden. Die folgenden Arbeiten legen ein besonderes Augenmerk auf die Mechanismen und das Zusammenspiel von zwei Arten dieser Regulation. Zum einen die Phosphorylierung der GRK2 durch die Proteinkinase C und zum anderen die Interaktion von GRK2 mit dem Calcium-bindenden Protein Calmodulin.

1 Phosphorylierung der GRK2 durch Proteinkinase C

Bereits vor Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Proteinkinase C (PKC) die GRK2 zu phosphorylieren vermag (Winstel et al., 1996). Bei einem Vergleich der Isoformen zeigte sich, dass besonders die Isoformen α und δ der PKC-Familie die GRK2 zu phosphorylieren vermögen. Mittels HPLC/MS konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung bei allen Isoformen an Serin²⁹ im N-terminalen Teil der GRK2 stattfindet (Krasel et al., 2001).

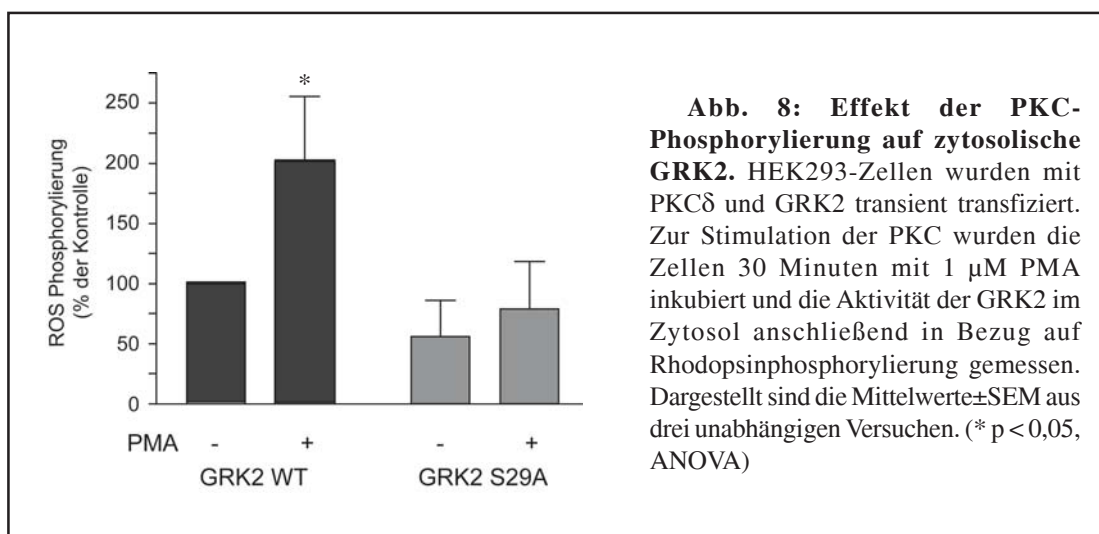


1.1 Einfluß der Phosphorylierung auf gereinigte GRK2

Um die funktionelle Bedeutung der PKC Phosphorylierung auf die Aktivität der GRK2 herauszufinden, wurden zuerst Versuche mit gereinigten Proteinen unternommen. Wie bereits unter 2.3.3. beschrieben, wurde dabei zuerst humane GRK2 aus Sf9-Zellen mit gereinigter PKC, die freundlicherweise von H. Mischak, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt wurde, phosphoryliert. Dabei wurden entweder die α - oder δ - Isoformen der PKC verwendet, da diese die höchste Effizienz in der Phosphorylierung zeigten (Krasel et al., 2001). Anschließend wurde die Aktivität der phosphorylierten GRK2 auf Rhodopsinphosphorylierung getestet. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der gereinigten GRK2. Sowohl die native als auch die durch PKC phosphorylierte GRK2 waren gleich potent in der Phosphorylierung von lichtaktiviertem Rhodopsin (Abb. 7). Die PKC-Präparationen alleine vermochten Rhodopsin nicht zu phosphorylieren. Ein Unterschied zwischen den PKC-Isoformen war ebenfalls nicht zu erkennen.

1.2 Einfluss der Phosphorylierung auf GRK2-Aktivität im Zellzytosol

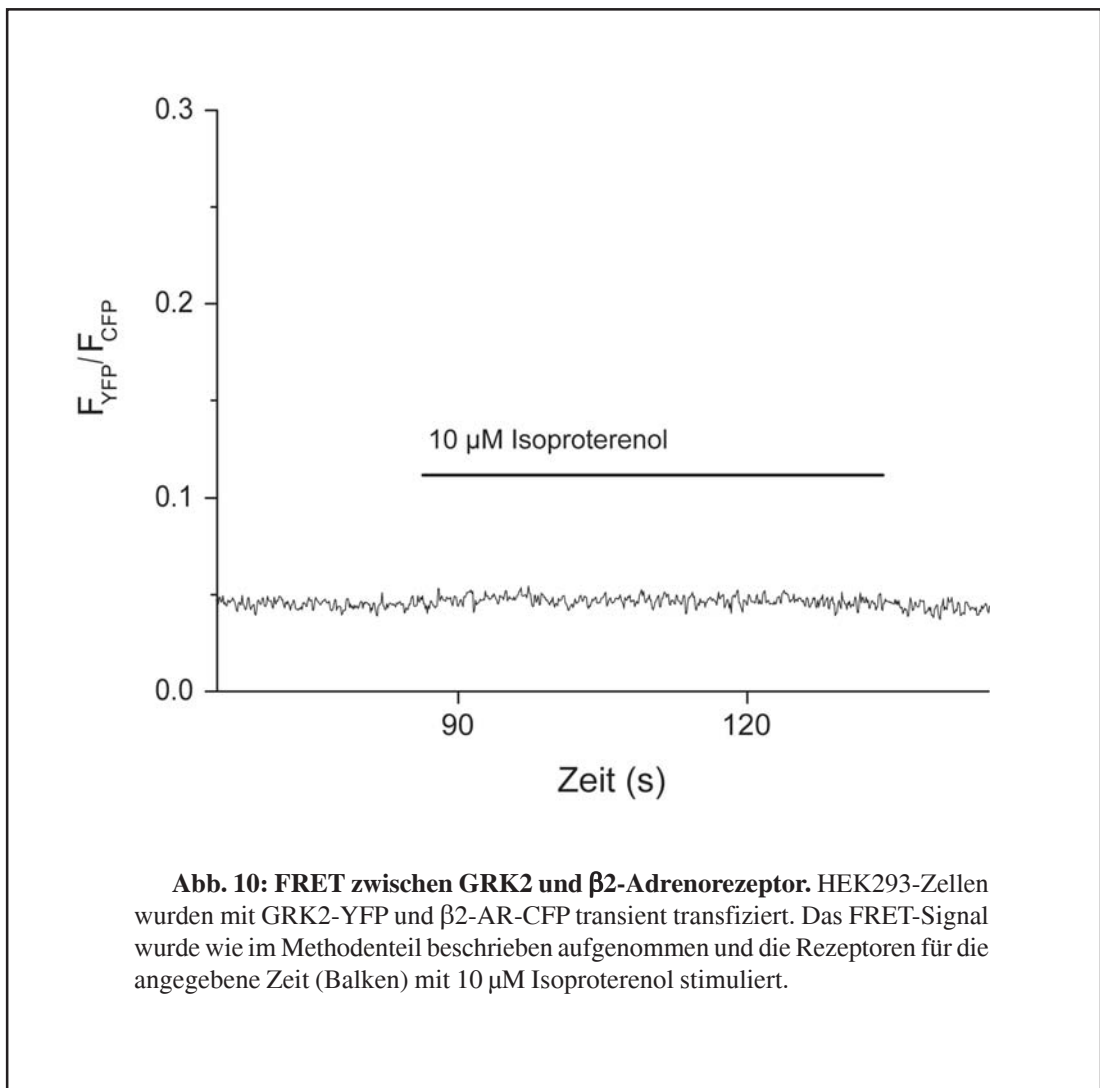
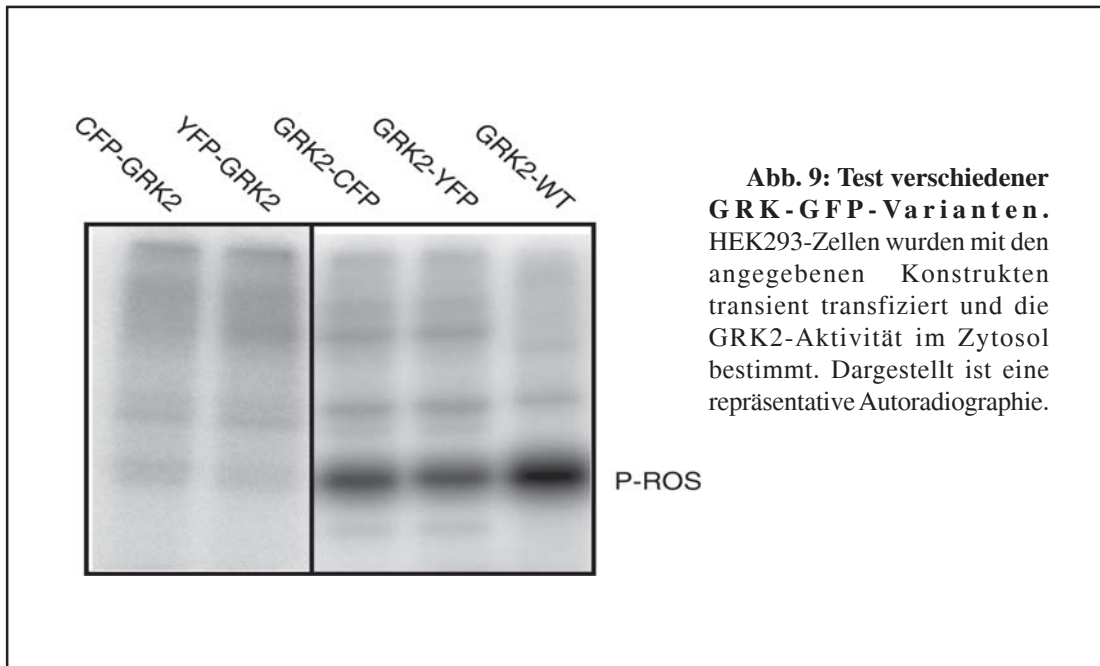
Nachdem auf der Ebene von gereinigten Proteinen die Phosphorylierung der GRK2 durch PKC keinen Effekt auf die GRK2-Aktivität gezeigt hat, wurde nun untersucht, ob sich im zellulären Umfeld Unterschiede zeigten. Zu diesem Zweck wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293) transient mit humaner GRK2 und PKC δ transfiziert. Zur PKC-Stimulation wurden die Zellen 30 Minuten mit 1 μ M PMA bzw. entsprechender Menge an DMSO als Kontrolle behandelt. Die Aktivitätsbestimmung der GRK2 im Zytosol nach 2.3.2 ergab eine signifikant höhere GRK2-Aktivität nach PKC Stimulation. Da die PKC-Phosphorylierung per se keinen Einfluß auf die GRK2-Aktivität zeigte, muss es sich hierbei um sekundäre Effekte handeln, denen entweder eine Hemmung eines inhibitorischen Einflusses oder eine Stimulation durch einen weiteren Partner zugrunde liegt. Um unspezifische PKC-Effekte auszuschließen, wie sie z.B. durch Phosphorylierung anderer, die GRK2-Aktivität beeinflussender Proteine entstehen könnten, wurde der Versuch analog mit einer GRK2-Mutante durchgeführt, bei der die Phosphorylierungsstelle für PKC, Serin²⁹, durch Alanin ersetzt wurde. Die so nicht mehr von PKC phosphorylierbare GRK2 S29A zeigte auch nach Stimulation von PKC keinen Anstieg in der GRK2-Aktivität, so dass man von einem direkten Phosphorylierungseffekt der PKC auf die GRK2 ausgehen kann (Abb. 8).



1.3 Einfluss der Phosphorylierung auf die GRK2-Rezeptorinteraktion

Da die Phosphorylierung der GRK2 durch PKC zu einer verstärkten Aktivität der GRK2 im Zytosol führt, sollte nun untersucht werden, ob die Phosphorylierung auch Auswirkungen auf die Translokation der GRK2 an die Membran der Zelle hat. Als Messmethode wurde der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) verwendet. Dieser beruht auf dem strahlungslosen Übergang von Energie, die durch Anregung von einem Fluorophor ausgesendet wird und dabei von einem zweiten Fluorophor, das sich in unmittelbarer Nähe und in einer korrekten Orientierung zum ersten befinden muss, aufgenommen wird. Stimmt die Emissionswellenlänge des abgegebenen Lichtes mit der Exzitationswellenlänge des zweiten Fluorophors überein, so emittiert dieses wiederum Licht seiner Emissionswellenlänge. Als Messgröße dient dabei dann das Verhältnis zwischen den Intensitäten der ersten und der zweiten Emissionswellenlänge. Kommt es zum Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer, so nimmt die Intensität der ersten Emissionswellenlänge ab und die der zweiten zu.

Als Fluorophore wurden Varianten des "green-fluorescent-protein" (GFP) genutzt, die in ihren spektralen Eigenschaften den Anforderungen des FRET genügen. Es handelt sich um das "cyan-fluorescent-protein" (CFP), das als FRET-Donor (erste Emissionswellenlänge) dient und das "yellow-fluorescent-protein" (YFP), das als FRET-Akzeptor (zweite Emissionswellenlänge) fungiert. Jeweils eins dieser Proteine wurde mittels PCR-Mutagenese (2.1.3) C-terminal an GRK2 kloniert (die N-terminale Fusion erzeugte ein GRK2-Fusionsprotein, das gegenüber GPCRs katalytisch inaktiv war) und die Funktionsfähigkeit des Fusionsproteins bezüglich GPCR-Phosphorylierung getestet (Abb. 9).



Als FRET-Partner wurde das entsprechende zweite Fluorophor an einen GPCR kloniert (Cornelius Krasel, persönliche Mitteilung). Als Modelle wurden hierbei zum einen der PTH-Rezeptor verwendet, der zu einer Aktivierung der PKC führt und zum anderen der β_2 -adrenerge Rezeptor, nach dessen Aktivierung es zu einer Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentrationen kommt.

HEK293-Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert (2.4.4.3) und anschließend auf poly-D-Lysin-beschichtete Deckgläschen umgesetzt (2.4.3). Die Messungen erfolgten wie unter 2.5.3.2 beschrieben. In Abbildung 10 ist beispielhaft der Versuch mit CFP getagtem β_2 -Adrenorezeptor gezeigt. Bei keinem der getesteten Paare ließ sich nach Agonistenapplikation eine Zunahme der FRET-Intensität feststellen. Dies wäre zu erwarten gewesen, wenn die GRK2 nach Agonistengabe an die Zellmembran transloziert und dort mit dem Rezeptor einen Komplex bildet. Somit ließ sich mit diesem System der Einfluss der PKC-Phosphorylierung auf die GRK2-Translokation nicht testen. Eine Erklärung der fehlenden FRET-Änderung könnte die sehr transiente Assoziation der Kinase mit dem Rezeptor sein.

2 Inhibition der GRK2 durch Calmodulin

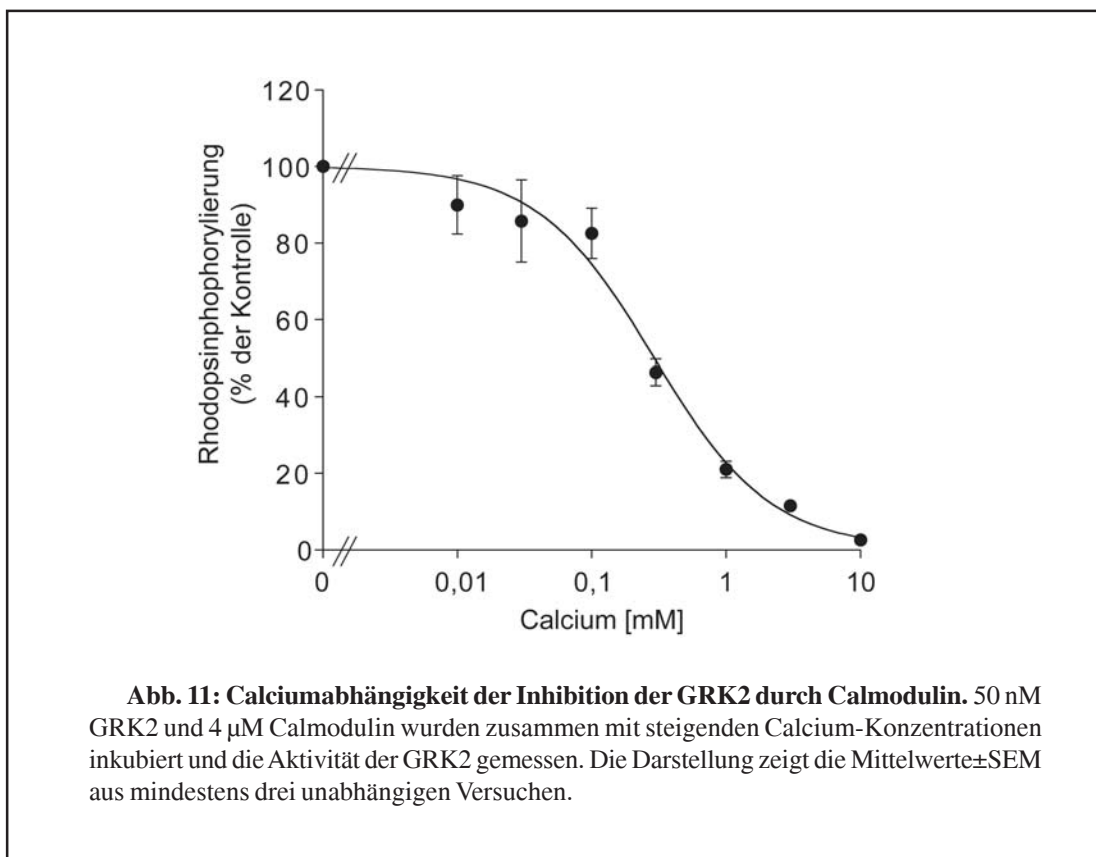
Bereits in der Einleitung wurde auf den inhibitorischen Effekt von Calmodulin auf verschiedene Mitglieder der GRK-Familie hingewiesen (3.7.2). Bei Calmodulin handelt es sich um ein ca. 16,7 kDa großes Calcium-bindendes Protein. Es wird ubiquitär im Körper exprimiert und vermag dank seiner vier sogenannten EF-Hände, die paarweise an den Enden des Moleküls sitzen, vier Ionen Calcium zu binden. Aufgrund der Bindung von Calcium kommt es zu einer starken konformationellen Änderung im Molekül. Die Verbindung zwischen den beiden EF-Handmotiven strukturiert sich zu einer α -Helix um und verdeckt so die hydrophoben Reste des Moleküls.

Der inhibitorische Effekt von Calmodulin auf die GRKs wurde bereits mehrfach in der Literatur erwähnt (Chuang et al., 1996; Haga et al., 1997; Levay et al., 1998).

2.1 Calciumabhängigkeit

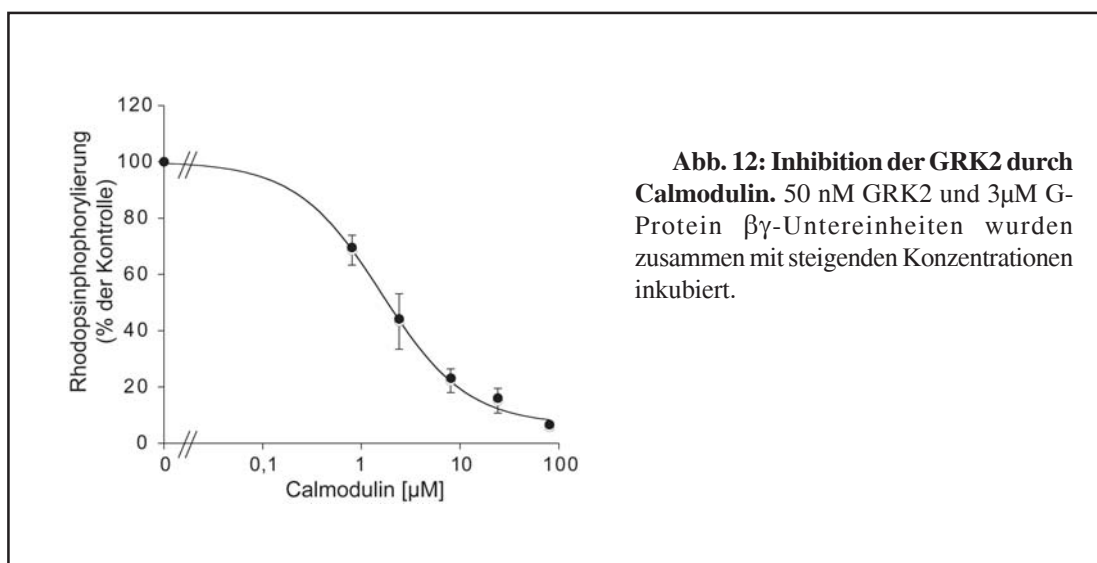
Schon länger ist bekannt, dass Calmodulin seinen hemmenden Effekt auf die Mitglieder der GRK-Familie nur in Anwesenheit von Calcium ausüben kann. Um genaueres über die Calciumabhängigkeit dieser Inhibition zu erfahren, wurden in einem *in-vitro*-Phosphorylierungsassay (2.3.1) zu einer fixen Konzentration von Calmodulin steigende Konzentrationen an Calcium gegeben. In Abbildung 11 wird der Verlauf der so erhaltenen Kurve der GRK2-Aktivität in Abhängigkeit der Calciumkonzentration dargestellt. Für die halbmaximale Aktivierung ergab sich eine Calciumkonzentration von $290 \pm 51 \mu\text{M}$. Dies entspricht allerdings nicht der Konzentration an freiem Calcium im Versuchsaufbau. Die Bestimmung des freien Calciums erwies sich als technisch sehr schwierig, da durch die Zusätze im Aktivitätstest (ATP, Magnesiumchlorid, EDTA und auch Membranen der Rhodopsinpräparationen) eine nicht näher bestimmbare Menge an Calcium

komplexiert wird und so die Konzentration an freiem Calcium deutlich unter der gemessenen Konzentration an Gesamt-Calcium liegen sollte. Verschiedene Beobachtungen lassen vermuten, dass die Konzentration an freiem Calcium mindestens 100 μM unter der des Gesamt-Calciums liegt. In Abwesenheit bzw. durch Zugabe des Calcium-komplexierenden Chelatbildners EGTA konnte der inhibierende Effekt des Calmodulins komplett aufgehoben werden.



2.2 Bestimmung der inhibitorischen Potenz

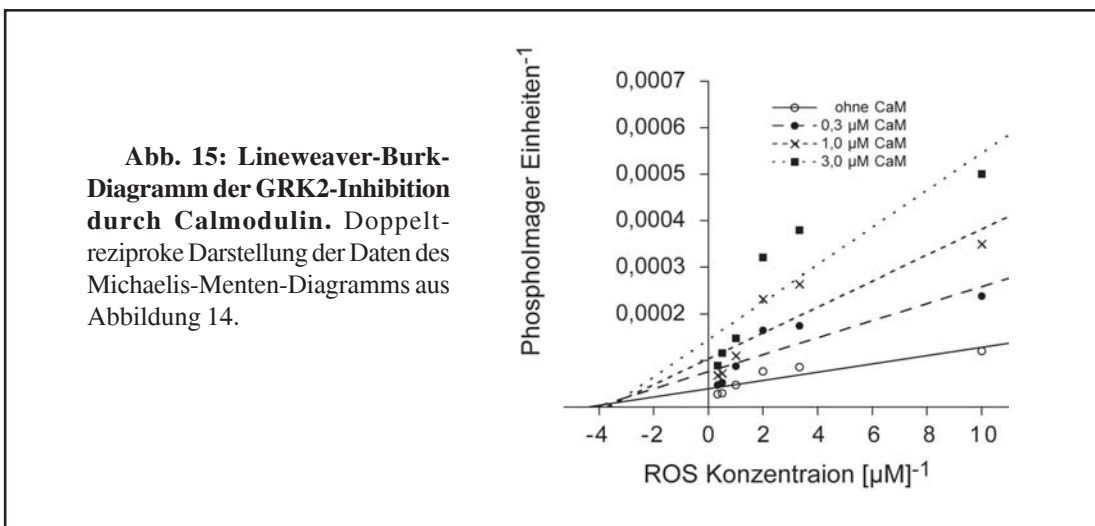
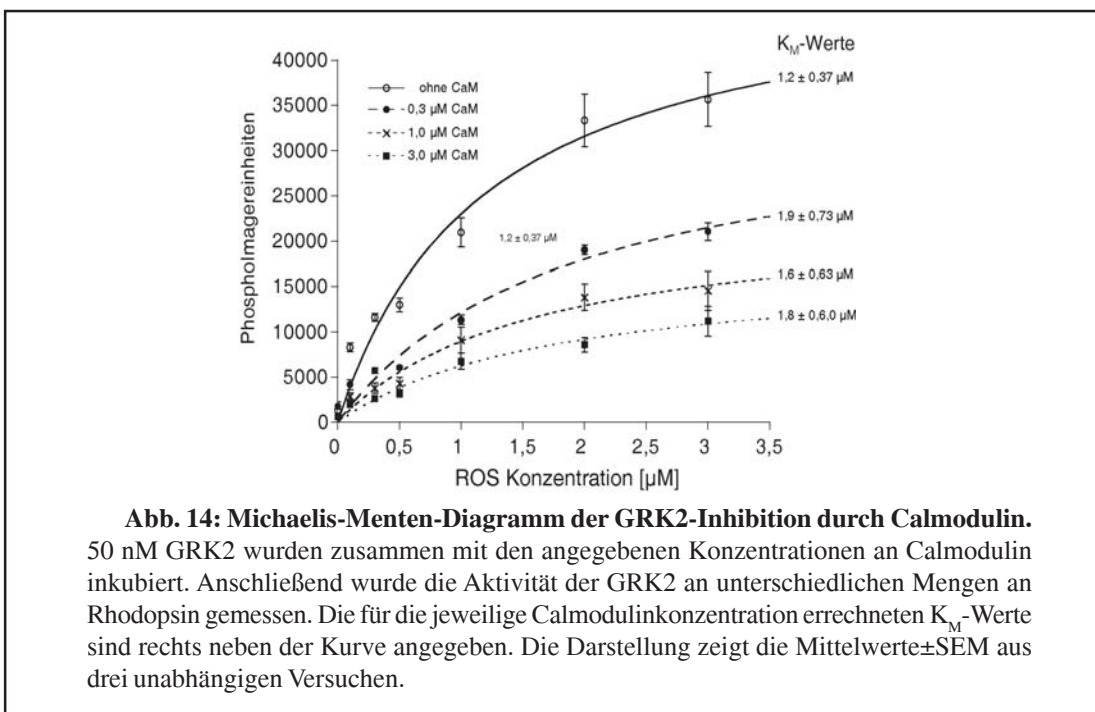
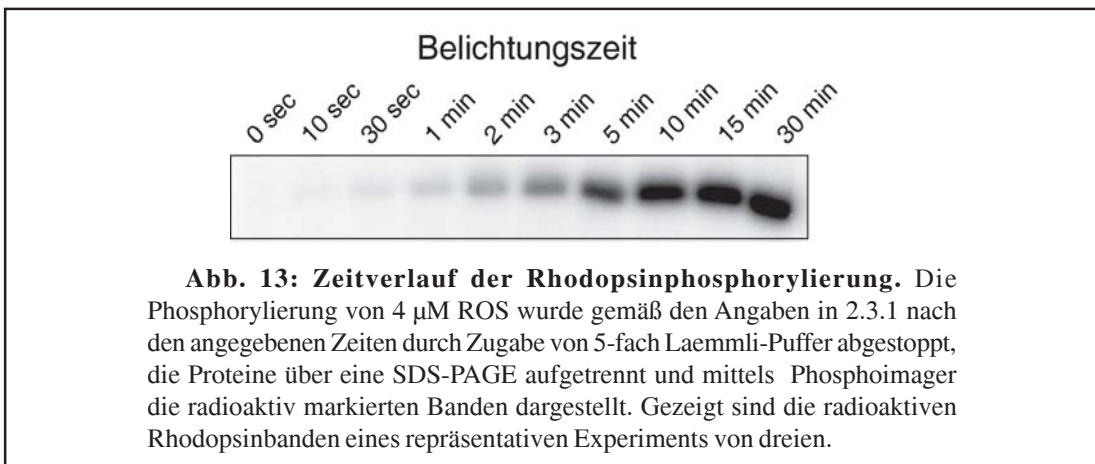
Analog zur Bestimmung der Calciumabhängigkeit von Calmodulin bei der Inhibition der GRK2 lässt sich auch die inhibitorische Potenz von Calmodulin bestimmen. Hierzu werden zu einer fixen Menge GRK2 (50 nM) und G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten (3 μM) steigende Mengen an Calmodulin in Gegenwart von 100 μM Calcium gegeben. Aus der so erhaltenen Konzentrations-Wirkungskurve lässt sich der IC_{50} -Wert direkt ablesen. Dieser beträgt für die in Abbildung 12 dargestellte Konzentrations-Wirkungskurve für die Inhibition der GRK2 durch Calmodulin 1,6 μM . In der Literatur wird dieser Wert bis heute nur näherungsweise beschrieben, liegt dabei aber unabhängig von den Autoren immer zwischen 1-3 μM (Chuang et al., 1996; Haga et al., 1997; Pronin et al., 1997). Ausgehend von dieser Übereinstimmung mit den bereits näherungsweise publizierten Daten, lässt sich schließen, dass das System der Inhibition von GRK2 durch Calmodulin mit den bereits Beschriebenen übereinstimmt.



2.3 Michaelis-Menten-Kinetik

Inhibitorischen Effekten liegen oft sehr unterschiedliche Mechanismen zugrunde, die sich prinzipiell in zwei große Klassen einteilen lassen. Zum einen handelt es sich um kompetitive Effekte, bei denen die hemmende Wirkung durch direkte Verhinderung einer Aktivierung zustande kommt. Zum Beispiel indem der Inhibitor direkt in das aktive Zentrum des Enzyms bindet und so eine Enzym-Substrat-Interaktion verhindert. In solch einem Fall kann die Hemmung durch steigende Konzentrationen an Substrat abgeschwächt werden. Zum anderen kann die Hemmung aber auch nicht kompetitive Ursachen haben, zum Beispiel durch Abschwächung der Aktivierbarkeit (meist ausgelöst durch konformationelle Änderungen auf Grund der Bindung eines Inhibitors). Eine Steigerung der Substratkonzentration hat hierbei keine Auswirkung auf die Stärke der Inhibition. Eine einfache Möglichkeit, zwischen diesen beiden Hauptinhibitionsarten zu unterscheiden, ist die Darstellung nach Michaelis-Menten bzw. deren doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk.

Zuerst muss bei dieser Darstellung darauf geachtet werden, dass alle Werte in einem Bereich der Enzymaktivität erhoben werden, bei dem sich das System noch nicht in der Sättigung, sondern im vorderen, linear ansteigenden Teil der Reaktion befindet. Im Fall der GRK2 bedeutet dies, dass die Belichtungszeit zur Phosphorylierung von Rhodopsin so gewählt werden muss, dass die Reaktion noch nicht die Sättigung erreicht hat. Dazu wurden Vorversuche durchgeführt, bei denen bei festem GRK2-Rhodopsin-Verhältnis unterschiedliche Belichtungszeiten ausgewählt wurden und diese dann in Abhängigkeit des Phosphateinbaus aufgetragen wurden. Hierbei wurde gefunden, dass ab einer Belichtungszeit von 20 Minuten das System in die Sättigung übergeht (Abb. 13). Aus diesem Grund wurde für alle nachfolgenden Versuche eine Belichtungszeit von 10 Minuten gewählt, bei der die Reaktion zwar noch nicht in der Sättigung war, sich aber dennoch eine genügend starke Phosphorylierung zur zeitlich noch akzeptablen Auswertung am Phosphoimager ergab.



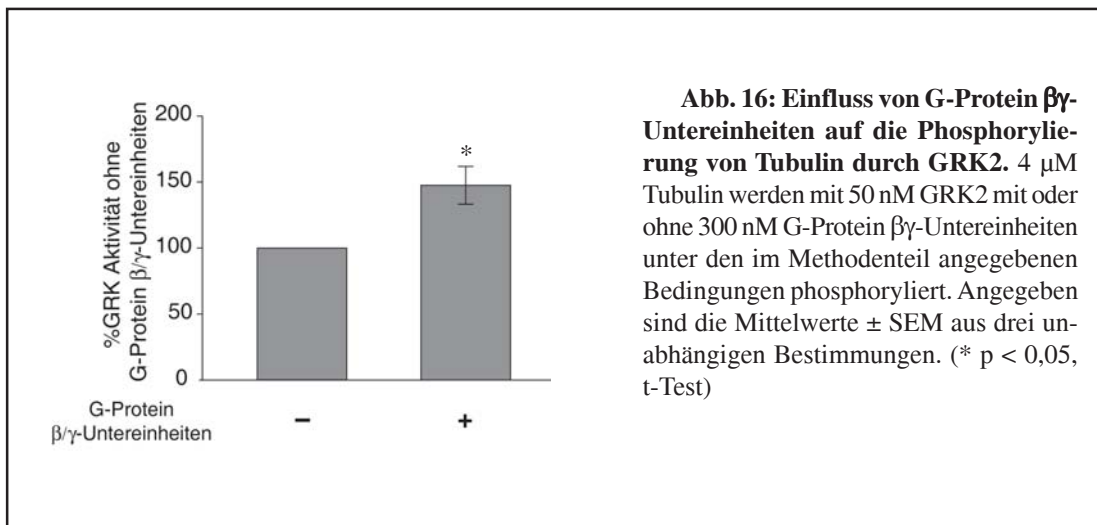
In Abbildung 14 sind die nach Michaelis-Menten ausgewerteten Versuchsergebnisse dargestellt. Zwar steigt die Gesamtphosphorylierung erwartungsgemäß mit steigender Rhodopsin- und sinkender Calmodulin-Konzentration an, die Reaktionskonstante K_M blieb jedoch auch bei steigender InhibitorKonzentration im Bereich von 1-2 μM . Dies ist ein erster Hinweis auf die fehlende Kompetition der Hemmung. Trägt man die erhaltenen Werte nun nach der Lineweaver-Burk-Methode im doppelt reziproem Stil auf, so schneiden die erhaltenen Regressionsgeraden die x-Achse alle in einem Punkt. Dies ist ein weiteres Charakteristikum für eine nicht-kompetitive Hemmung (Abb. 15).

2.4 Rezeptorspezifität

Neben Agonist-aktivierten GPCRs können GRKs noch weitere, meist lösliche Proteine im Zytosol von Zellen phosphorylieren. Für die meisten dieser löslichen Substrate ist zwar die Phosphorylierung beschrieben, über deren Funktion ist aber meist wenig bekannt. Ein Beispiel für ein lösliches Substrat der GRK2 ist Tubulin (Carman et al., 1998; Haga et al., 1998; Pitcher et al., 1998). So konnte gezeigt werden, dass die GRK2 sowohl polymerisiertes als auch unpolymerisiertes Tubulin im gleichen Ausmaß phosphorylieren kann. Allerdings wusste man nicht, welche Auswirkung die Phosphorylierung auf Tubulin hat. Die Eigenschaft von Tubulin zu polymerisieren wurde von der Phosphorylierung durch GRK2 nicht beeinflusst (Haga et al., 1998). In immunohistochemischen und Immunfluoreszenzversuchen konnte eine intrazelluläre KoloKalisation von microtubulären Filamenten und GRK2 gezeigt werden. Da Tubulin in deutlich größerer Menge als die GRK2 in der Zelle vorkommt und beide Proteine auch *in vitro* miteinander interagieren, kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil des intrazellulären Pools der GRK2 an Mikrotubuli assoziiert vorliegt. Die Phosphorylierung von Tubulin durch GRK2 unterscheidet sich deutlich von der Phosphorylierung von GPCRs. Deshalb sollte nun der Einfluß von Calmodulin auf die Phosphorylierung von Tubulin durch GRK2 untersucht werden, um so Rückschlüsse auf den Mechanismus der Hemmung der GRK2 durch Calmodulin zu erlangen. Zuerst einmal wurde dabei allerdings die Phosphorylierung von Tubulin durch GRK2 eingehender untersucht.

2.4.1 Abhängigkeit der Tubulinphosphorylierung von G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten

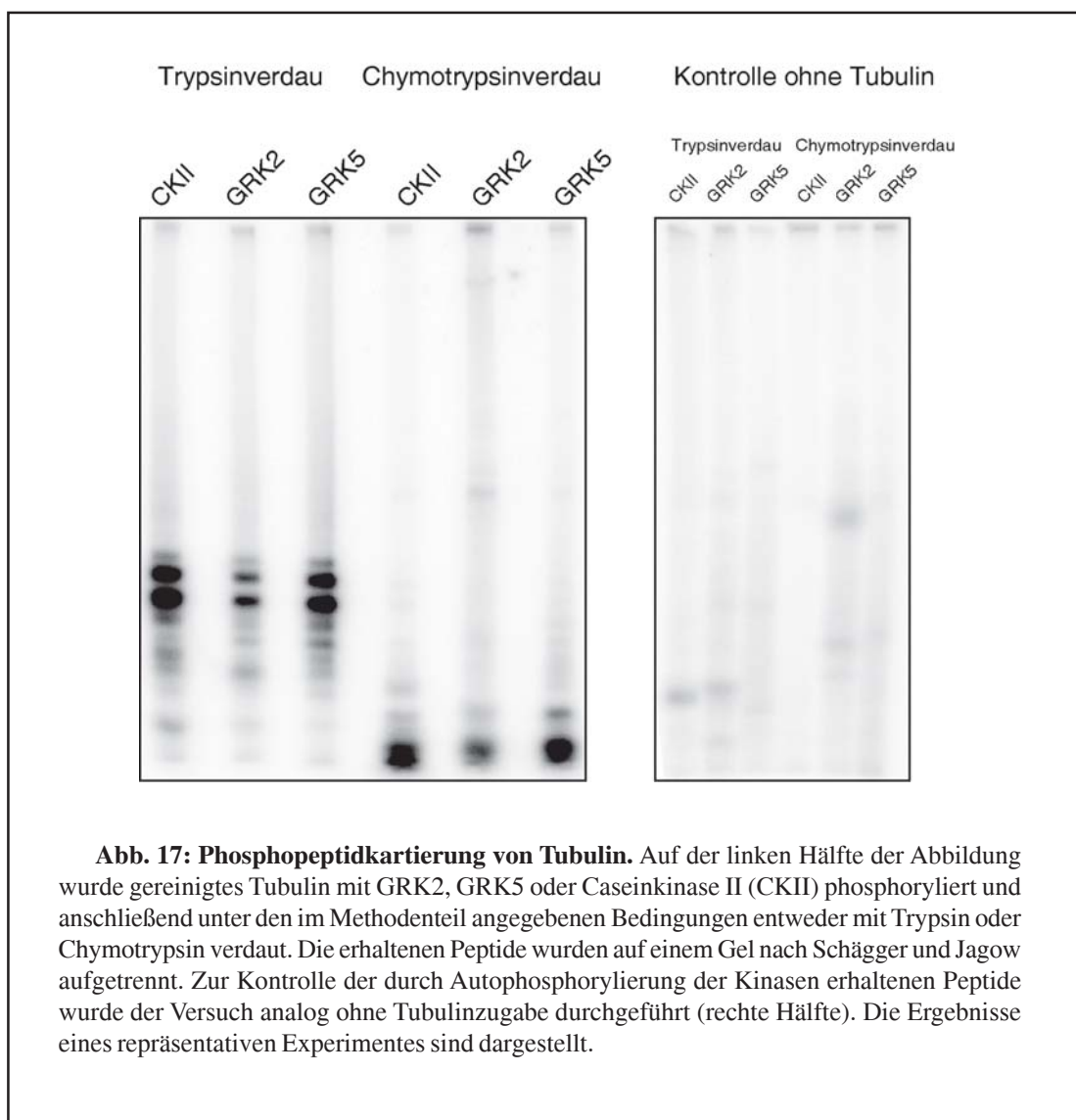
Um etwas genauer den Mechanismus der Interaktion zwischen Tubulin und GRK2 zu verstehen, wurde als erstes die Abhängigkeit der GRK2-vermittelten Tubulinphosphorylierung von G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten untersucht. Dazu wurden 4 μM gereinigtes Tubulin mit 50 nM gereinigter humaner GRK2 mit oder ohne G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten für 30 Minuten bei 30°C inkubiert und das Gemisch auf einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe auch 2.3.4). Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten zwar die Phosphorylierung um ca. 50% steigern kann, aber auch ohne G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermag die GRK2 Tubulin zu einem deutlichen Anteil zu phosphorylieren (Abb. 16). Bei membranständigen GPCRs als Substrat kommt es ohne die Zugabe von membranverankernden G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu keiner nennenswerten Phosphorylierung des Rezeptors, so dass man im Fall der Tubulinphosphorylierung von einem G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten-unabhängigen Mechanismus sprechen kann, der lediglich durch die Zugabe von G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten verstärkt wird.



2.4.2 Kartierung der Phosphorylierungsstelle durch enzymatischen Verdau

Tubulin wird neben der GRK2 auch durch viele andere Kinasen phosphoryliert. Eine dieser Kinasen ist die Caseinkinase II, deren Phosphorylierung ähnliche Eigenschaften wie die der GRK2 aufweist. So ist auch sie unabhängig vom Polymerisationsstatus des Tubulin, und auch durch Caseinkinase II phosphoryliertes Tubulin zeigt keine veränderten Polymerisationseigenschaften (MacRae, 1997). Für Caseinkinase II konnte die Phosphorylierungsstelle auf Tubulin β 3 kartiert werden. Sie befindet sich nahe des C-Terminus an Serin⁴⁴⁴ (Diaz-Nido et al., 1990). In direkter Umgebung dieses Serins befinden sich mehrere saure Aminosäuren, wie sie auch bei der Substraterkennungssequenz der GRK2 vorkommen. Aus diesem Grund war es naheliegend anzunehmen, dass auch GRK2 an Serin⁴⁴⁴ Tubulin phosphorylieren kann. Darum wurde Tubulin mit ATP hoher spezifischer Radioaktivität (10 μ M ATP statt 75 μ M ATP, was den Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat erhöht) sowohl mit Caseinkinase II als auch mit GRK2 phosphoryliert und nach den Vorschriften aus 2.3.5 behandelt. Gleichzeitig wurde auch GRK5 zur Phosphorylierung benutzt, da auch GRK5 Tubulin zu phosphorylieren vermag und ebenfalls präferenziell in der Umgebung von sauren Aminosäuren Serine und Threonine als Substrate erkennt.

Zur genaueren Kartierung der Phosphorylierungsstellen wurden die Ansätze entweder mit Trypsin oder mit Chymotrypsin verdaut. Die erhaltenen Phosphopeptide waren sowohl beim tryptischen Verdau als auch beim chymotryptischen Verdau identisch zwischen GRK2 und GRK5 und stimmten ebenfalls mit der als Kontrolle eingesetzten Caseinkinase-II-Phosphorylierung überein (Abb. 17). Eine genaue Bestimmung der Größe der erhaltenen Peptide ist in einem Gel nach Schägger und Jagow nicht möglich, da sich die phosphorylierten Peptide durch die negative Ladung der Phosphatgruppe nicht mehr wie in einer SDS-PAGE streng der Größe nach auftrennen. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass sowohl GRK2 und GRK5 als auch Caseinkinase II die selben Stellen (Serin⁴⁴⁴) in Tubulin phosphorylieren.

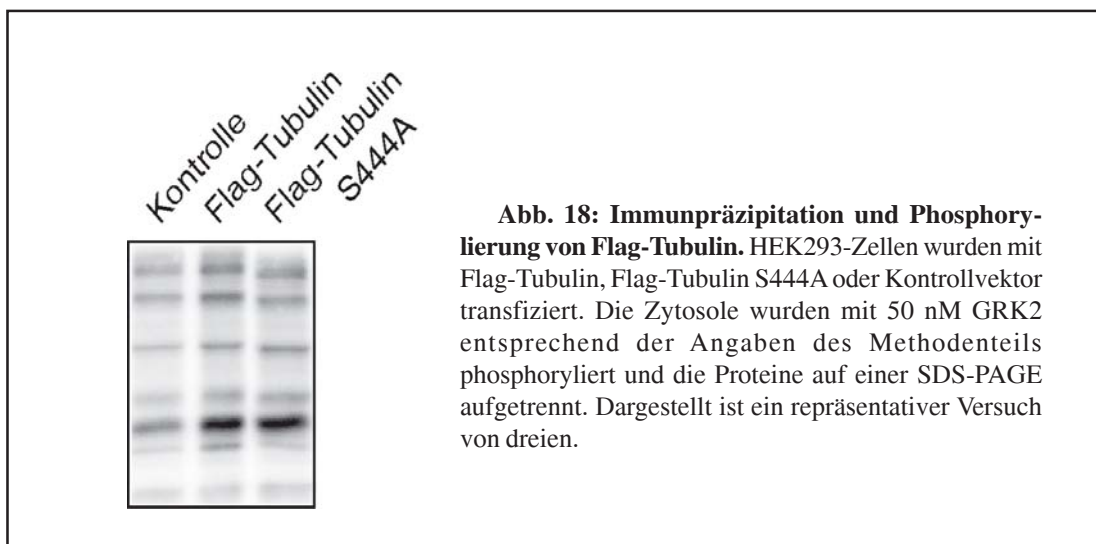


2.4.3 Herstellung phosphorylierungsdefizienter Tubulinmutanten

Um zu testen, ob auch *in vivo* in HEK293-Zellen Serin⁴⁴⁴ die bevorzugte Phosphorylierungsstelle der GRK2 auf Tubulin β 3 ist, wurde eine Mutante des Tubulins mittels PCR-Mutagenese in pcDNA3 (Invitrogen) als Transfektionsvektor kloniert (2.1.2-2.1.4), bei der Serin an Position 444 durch Alanin ersetzt wurde und diese so an dieser Position nicht mehr von GRK2 oder Caseinkinase-II phosphoryliert werden kann. Gleichzeitig wurde N-terminal über direkte Ligation der Primer in den Zielvektor eine kurze Erkennungssequenz für den M2-monoklonalen Antikörper (Sigma) eingeführt (Flag-Tag; (M)DYKDDDDK). Dieser sollte es später ermöglichen, selektiv die transfizierte Tubulinmutante aus dem Zellzytosol durch Immunpräzipitation herauszuholen und auf Phosphorylierung im Vergleich zum Flag-getaggen Wildtyp zu untersuchen.

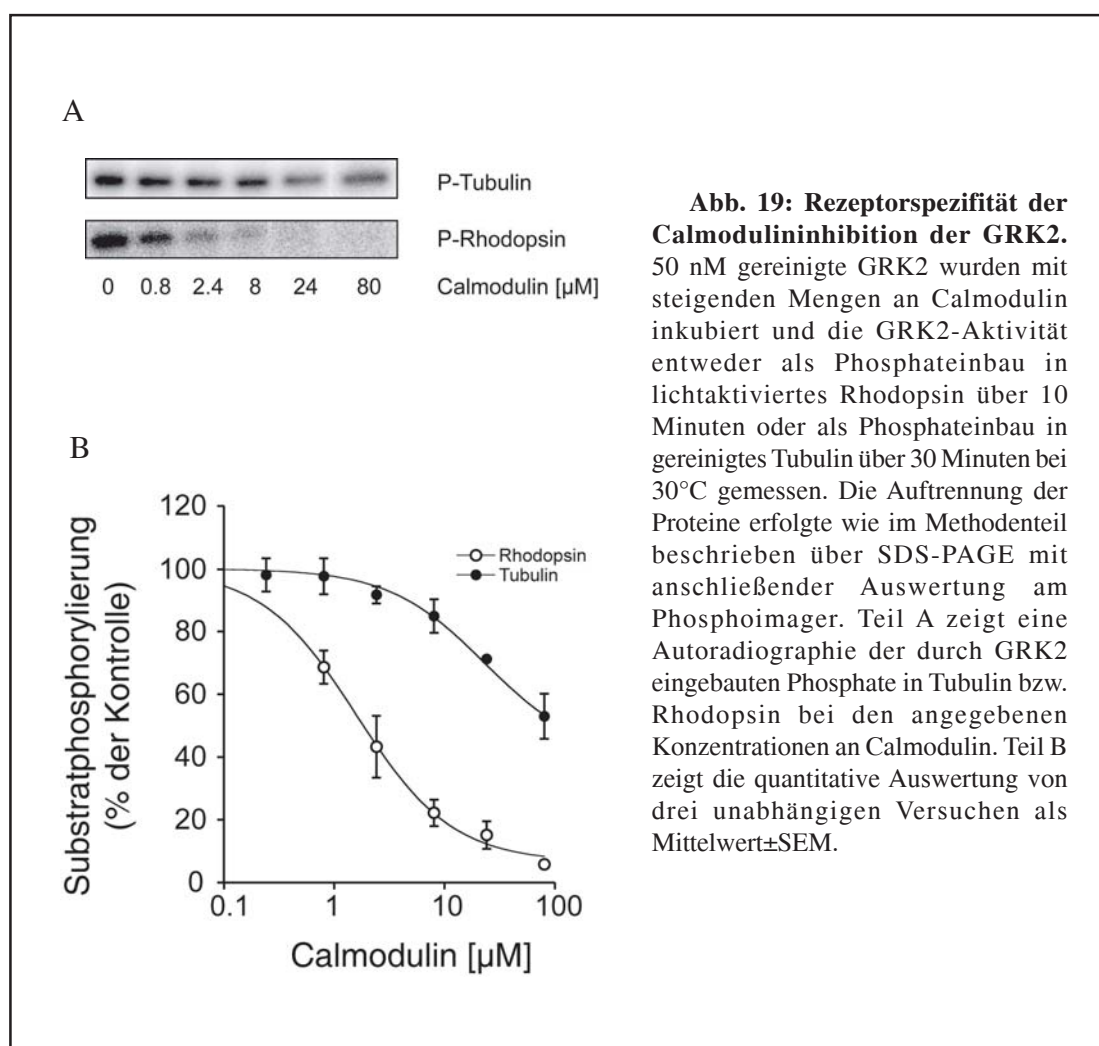
Die so erhaltenen Konstrukte (pcFTub β 3 S444A und pcFTub β 3) wurden in HEK293-Zellen transfiziert (2.4.4.1). Als Kontrolle diente eine Transfektion mit leerem Transfektionsvektor (pcDNA3). Aus den Zytosolen der Zellen wurden mittels M2-Antikörper die transfizierten Proteine immunpräzipitiert (2.2.8) und anschließend nach Standardprotokoll mit GRK2 phosphoryliert. In der Autoradiographie der SDS-Polyacrylamidgele zeigte sich eine Vielzahl von phosphorylierten Banden, die zum einen durch unspezifische Interaktionen des Antikörpers bei der Immunpräzipitation entstanden sein können, da auch die mit Leervektor transfizierte Kontrolle, die eigentlich keine immunologisch aktive Flag-Sequenz exprimieren sollte, ein deutliches Bandenmuster zeigt. Zum anderen können polymerisierte Tubuline Banden in verschiedenen Größen hervorrufen (Abb. 18).

Um dieses Problem zu umgehen, wurde versucht, die Polymerisation der Tubuline nach Standardprotokoll (Sambrook et al., 1989) zu verhindern. Dabei wird abwechselnd die Polymerisation gefördert, Kontaminanten durch Zentrifugation entfernt und die Polymerisate in Kälte wieder vereinzelt. Diese Prozedur sollte auch gleichzeitig durch unspezifische Immunreaktion erhaltene Kontaminationen entfernen. Leider erwies sich die Menge an Flag-Tubulin, das durch Transfektion von HEK293-Zellen erhalten wurde, als zu gering, um die doch sehr verlustreiche Prozedur der Polymerisations-/Depolymerisationszyklen zu durchlaufen. Zur selben Zeit wurde eine Untersuchung der Gruppe von Tatsuya Haga veröffentlicht, in der die Phosphorylierungsstellen der GRK2 auf verschiedenen β -Tubulinen mittels Verdau und HPLC Analyse mit anschließender Sequenzierung der Peptide sowie Mutagenese bestimmt wurden (Yoshida et al., 2003). Die Autoren konnten Threonin⁴⁰⁹ sowie Serin⁴²⁰ auf allen β -Tubulinen als Phosphorylierungsstellen bestimmen und Serin⁴⁴⁴ als zusätzliche Phosphorylierungsstelle auf Tubulin β 3 bestätigen.



2.4.4 Einfluß von Calmodulin auf die Tubulinphosphorylierung

Um genauere Informationen auf die GRK2-Calmodulin-Interaktion zu erhalten, sollte der Einfluss des Calmodulins auf die Tubulinphosphorylierung durch GRK2 untersucht werden. Hierzu wurden vergleichbare Mengen an Tubulin bzw. Rhodopsin mit GRK2 gemäß 2.3.4 bzw. 2.3.1 in Gegenwart steigender Konzentrationen von Calmodulin phosphoryliert. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse als Konzentrationswirkungskurven graphisch dargestellt. Calmodulin vermochte auch in relativ hohen Konzentrationen von 100 μM die Phosphorylierung von Tubulin durch GRK2 nur teilweise zu inhibieren. Zusammen mit den Ergebnissen der Auswertung nach Michaelis-Menten (3.2.3) kann man daraus schließen, dass Calmodulin die Aktivität nicht durch direkten Angriff am katalytischen Zentrum der Kinase beeinflusst. Als mögliche Mechanismen der Hemmung wäre zum einen eine Hemmung der Aktivierbarkeit der Kinase denkbar, zum anderen könnte auch eine gestörte Substraterkennung in Bezug auf membranständige Substrate als Erklärung dienen.



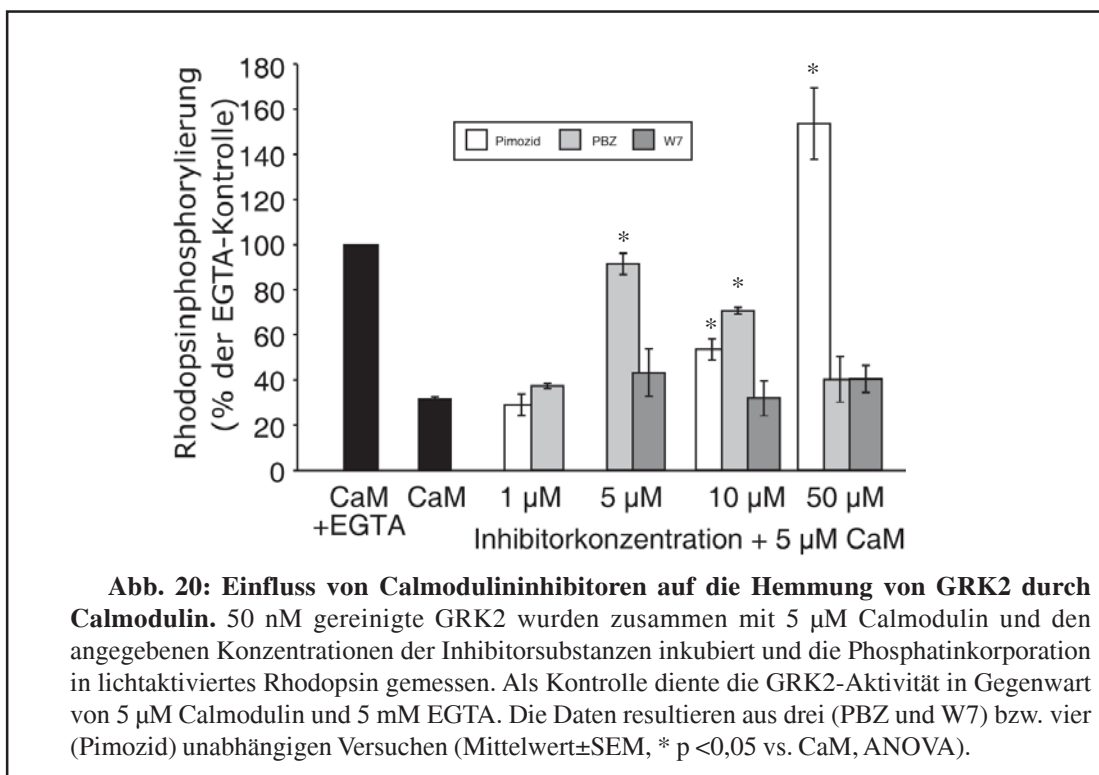
2.5 Versuche mit Calmodulinantagonisten

Eine gängige Methode zur Klärung von Hemmmechanismen ist die Verwendung von Inhibitoren der entsprechenden Enzymhemmstoffe. Hierbei werden Informationen vor allem auf der Ebene des zu untersuchenden Hemmstoffes erwartet. Für Calmodulin selbst sind eine Reihe von teils relativ potenten Inhibitoren bekannt. Für die folgenden Versuche wurden drei Inhibitoren ausgewählt.

Das auch unter dem Namen W7 bekannte N-(6-Aminoheptyl)-5-chloro-1-naphthalensulfonamid inhibiert die Aktivierung von Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Phosphodiesterasen (PDE) mit einer halbmaximalen Effektivität (IC_{50}) von $28 \mu\text{M}$ (Hidaka et al., 1981) und die Aktivierung der Myosin-leichte-Kettekinase (MLCK) mit einem IC_{50} von $51 \mu\text{M}$ (Itoh et al., 1984). Beide Inhibitionseffekte sind kompetitiv und damit reversibel.

Anders sieht es beim zweiten verwendeten Calmodulininhibitor aus. Phenoxybenzamin ist ein irreversibler Hemmstoff, der eine kovalente Bindung zu seinem Substrat eingeht. Allerdings wirkt es durch die recht unspezifische Hemmung auch auf andere Proteine. So hemmt es ebenfalls kovalent den α_1 -adrenergen Rezeptor (Salles et al., 1994 und Merck Index 13, 7340) und wurde deshalb therapeutisch bei Phäochromozytom eingesetzt.

Als dritter und letzter Inhibitor wurde Pimozid verwendet. Pimozid ist ebenfalls ein kompetitiver, reversibler Inhibitor von Calmodulin, der ebenfalls eine Vielzahl anderer Proteine hemmen kann. Auch hier stehen vor allem GPCRs im Vordergrund. So hemmt Pimozid den Dopamin D2-Rezeptor und den Serotonin 5-HT₇-Rezeptor (Roth et al., 1994 und Merck Index 12, 7589). Deshalb liegt sein therapeutischer Einsatz auf dem Gebiet der Behandlung der chronischen Schizophrenie und des Tourette-Syndroms. Des Weiteren gibt es Berichte, die Pimozid eine Hemmung von Calciumkanälen zuweisen.



In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Versuche zusammengefasst. Dabei wurde entsprechend 2.3.1 eine fixe Konzentration von GRK2 (50 nM) mit 5 μ M Calmodulin und steigenden Konzentrationen des entsprechenden Calmodulinantagonisten versetzt. Die Effekte der Inhibitoren waren sehr unterschiedlich. So zeigte Phenoxybenzamin zwar in Konzentrationen von 5 μ M eine deutlich hemmende Wirkung auf die Calmodulininhibition der GRK2, in höheren Konzentrationen wirkte es aber direkt inhibierend auf GRK2 (Daten nicht gezeigt). Pimozid dagegen konnte die Inhibition der GRK2 durch Calmodulin zwar erst in Konzentrationen über 10 μ M deutlich aufheben, wirkte aber selbst in einer Konzentration von 50 μ M nicht inhibierend auf GRK2 selbst. W7 zeigte in keiner der getesteten Konzentrationen einen Einfluss auf die Calmodulin-GRK2-Hemmung, wobei auch die GRK2 nicht direkt durch W7 inhibiert wurde. Der fehlende Effekt von W7 deutet auf einen Mechanismus der Calmodulin-GRK2-Interaktion hin, der sich von dem der PDE-Aktivierung durch Calmodulin im Angriffspunkt auf Calmodulin unterscheidet.

Da sich Pimozid hier als effektiver Calmodulinantagonist erwiesen hat, ohne die GRK2 direkt zu beeinflussen, sollte im folgenden sein Effekt auf die GRK2-Aktivität im Zellsystem untersucht werden. Dazu wurde ein System zu Hilfe genommen, das auf der Interaktion von GPCR (hier humanem PTH-Rezeptor) und Arrestin beruht. Als Folge einer PTH-Rezeptorstimulation kommt es erwartungsgemäß zu einer GRK-vermittelten Phosphorylierung des Rezeptors. Diese wird gefolgt von einer Arrestintranslokation aus dem Zytosol an den membranständigen Rezeptor. Die Geschwindigkeit der Arrestintranslokation ist dabei abhängig von der Aktivität der GRK2. Je aktiver die Kinase, desto schneller transloziert Arrestin an die Membran. Als Indikator wurde Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen Rezeptor und Arrestin gewählt. Als Fluorophore wurden jeweils Mutanten des GFPs verwendet. Arrestin wurde in einer CFP-getaggten Form als FRET-Donor und der PTH-Rezeptor in einer YFP-getaggten Form als FRET-Akzeptor verwendet (Villardaga et al., 2003). Diese Konstrukte wurden zusammen mit GRK2 transient in HEK293-Zellen transfiziert und die Änderung des FRET-Signals nach Zugabe des Agonisten PTH in dem unter 2.5.3 beschriebenen Aufbau aufgenommen. Nach den Erwartungen sollte die Geschwindigkeit der

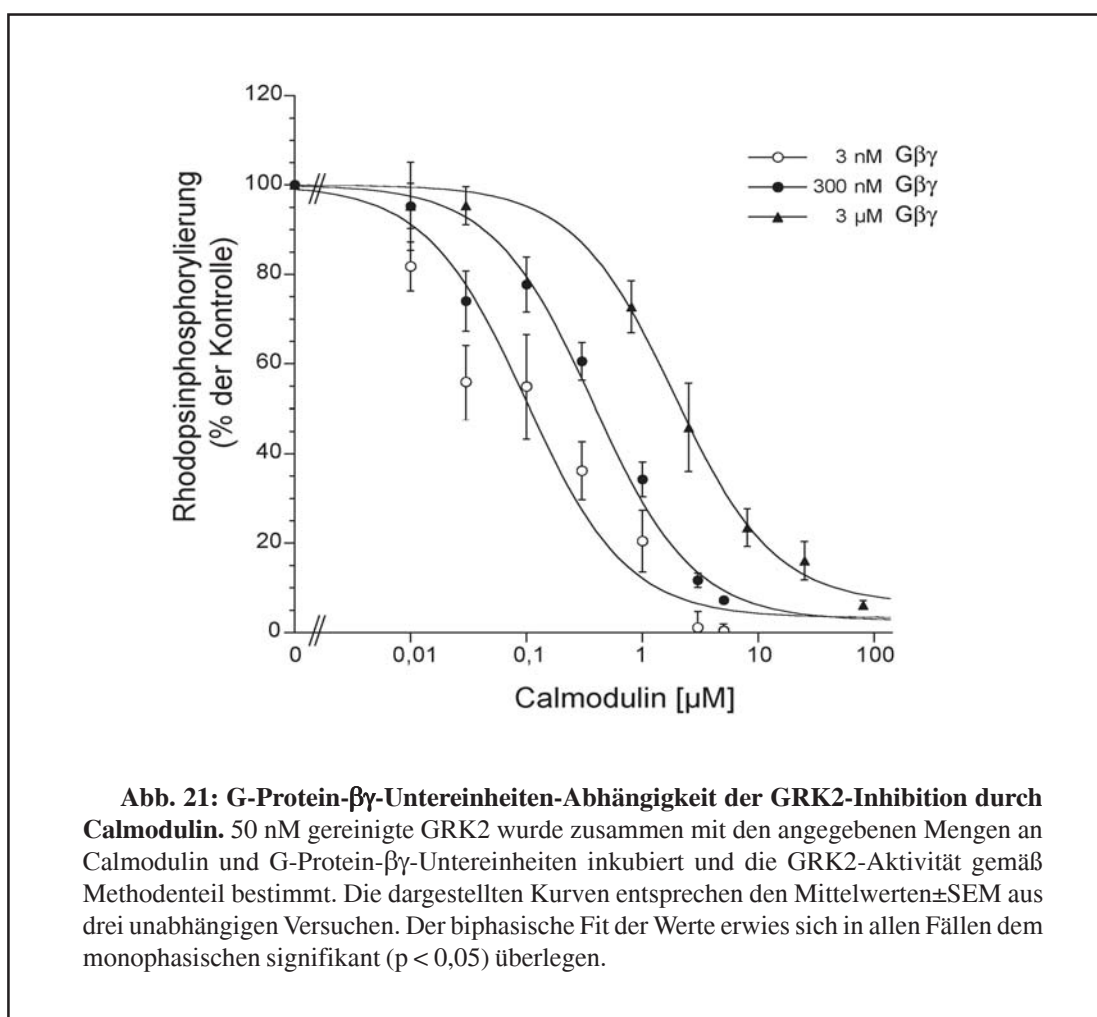
	ohne Pimozid	mit 30 μ M Pimozid
ohne GRK2	151,3 \pm 24,50 s	130,7 \pm 34,74 s
mit GRK2	68,6 \pm 6,05 s	61,9 \pm 6,62 s

Tab. 3: Arrestintranslokation an PTH-Rezeptor unter Pimozid. HEK293-Zellen wurden transient mit Arrestin2-CFP und PTH-Rezeptor-YFP und eventuell GRK2 transfiziert. Einzelne Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben mit 100 nM PTH-Lösung angespült und die Zunahme der FRET-Ratio zeitabhängig gemessen. Dargestellt ist eine Auflistung der gemessenen Zeiten bis zum halbmaximalen FRET-Signal der Arrestin-Translokation. Die Zellen wurden vorher entweder 30 Minuten mit 30 μ M Pimozid oder DMSO als Kontrolle behandelt. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen dar. Die Werte einer Zeile sind jeweils nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$, t-Test).

Arrestintranslokation an die Zellmembran nach 30-minütiger Vorinkubation der Zellen mit 30 μM Pimozid zunehmen, da die GRK2 in den Zellen weniger durch Calmodulin inhibiert sein sollte und somit aktiver vorliegen sollte. Tabelle 3 zeigt, dass sich die Zeiten bis zur halbmaximalen Signaländerung nicht unterschieden. Diese Hypothese ließ sich deshalb mit diesem experimentellen Ansatz nicht beweisen.

2.6 G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten-Abhängigkeit der Inhibition

Aus den bisherigen Untersuchungen zur Inhibition der GRK2 durch Calmodulin lässt sich ablesen, dass Calmodulin nicht direkt die katalytischen Eigenschaften der Kinase beeinflusst, also nicht direkt im katalytischen Zentrum der Kinase angreift. Als mögliche Angriffspunkte könnte zum einen die Substraterkennung durch die Calmodulin-GRK2-Interaktion gestört sein. Dies würde bedeuten, dass Calmodulin die Interaktion zwischen Rezeptor und GRK2 verhindert, die zwischen löslichen Substraten und GRK2 aber unbeeinflusst bleibt. Es ist bereits bekannt, dass sowohl der extreme N-terminale Teil als auch der frühe distale Abschnitt des C-Terminus der GRK2 wichtig für die Rezeptorinteraktion sind. Für die Phosphorylierung löslicher Substrate dagegen spielen sie keine Rolle (Yu et al., 1999; Gan et al., 2000). Eine zweite Erklärungsmöglichkeit wäre eine gestörte Aktivierbarkeit der Kinase. Da GRK2 als zytosolisches Enzym vorliegt, muss es, um effektiv membranständige GPCRs phosphorylieren zu können, eine Translokation an die Zellmembran durchführen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind dafür die $\beta\gamma$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine von entscheidender Bedeutung. Die Interaktion der GRK2 mit den $\beta\gamma$ -Untereinheiten führt zu einer Anreicherung der Kinasen der Membran in räumlicher Nähe zu ihren Substraten, den GPCRs. Durch diesen Übergang eines dreidimensionalen in ein scheinbar zweidimensionales System kommt es gleichzeitig zu einer massiven Konzentrationserhöhung der Kinase. Um den Einfluss der Konzentration an $\beta\gamma$ -Untereinheiten auf die Calmodulin-GRK2-Interaktion zu untersuchen, wurden zu der Bestimmung der GRK2-Aktivität nach 2.3.1 steigende Konzentrationen an Calmodulin in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten gegeben. Abbildung 21 zeigt die daraus resultierenden Konzentrations-Wirkungskurven. Der Anstieg der Konzentration an G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten führt zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der Kurve und somit zu einer Abnahme der inhibitorischen Potenz von Calmodulin in Bezug auf die Hemmung der GRK2. Die ermittelten halbmaximalen Hemmkonzentrationen ergaben für 3 nM G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten einen Wert von $96 \pm 27,5$ nM Calmodulin, für 300 nM G-Protein- γ -Untereinheiten 410 ± 82 nM Calmodulin und für 3 μM G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten ergab sich eine halbmaximale Hemmung bei $2 \pm 0,2$ μM Calmodulin.



3 Interaktion von Calmodulin mit GRK2

Bis jetzt zielten die Untersuchungen hauptsächlich auf die Charakterisierung der Inhibition von GRK2 durch Calmodulin ab. Im Folgenden soll das Augenmerk dagegen mehr auf die Interaktion zwischen den beiden Proteinen gelegt werden. In der Literatur findet sich zwar schon eine Beschreibung der direkten Interaktion zwischen GRK2 und Calmodulin, die mittels der Oberflächen-Plasmonresonanzmethode (Biacore) untersucht wurde (Levay et al., 1998), allerdings weichen die dort gemessenen Affinitäten deutlich von den im Funktionsassay bestimmten halbmaximalen Hemmkonzentrationen ab (Chuang et al., 1996). Eine bereits vorgestellte Methode zur Messung von Protein-Protein-Interaktion ist FRET.

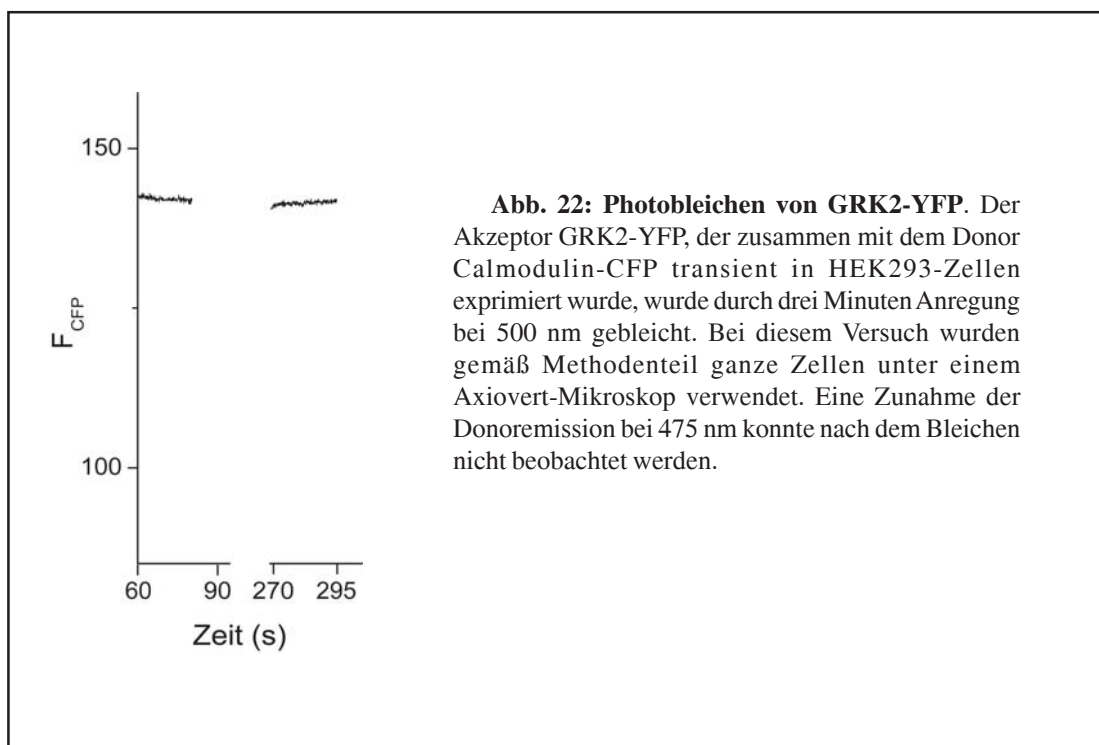
3.1 Messung mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Anders als bei der Messung von FRET in transfizierten, lebenden Zellen sollte die Interaktion zwischen Calmodulin und GRK2 in Zytosolen von transfizierten Zellen gemessen werden (2.5.3.1). Als FRET-Donor diente wiederum die cyane Variante des GFP (CFP), als Akzeptor die gelbe Form (YFP). Die Fluorophore wurden entweder C-terminal an GRK2 oder N- bzw. C-terminal an Calmodulin fusioniert und anschließend transient in HEK293-Zellen exprimiert. Die Gewinnung der Zytosole erfolgte gemäß 2.2.6. In Tabelle 4 ist ein Vergleich der Verhältnisse zwischen den Emissionen bei 535 nm und 475 nm dargestellt. Erwartungsgemäß hätte sich nach Calciumzugabe der Komplex aus GRK2 und Calmodulin ausbilden sollen, was zu einer Zunahme der Emission bei 535 nm und zu einer Abnahme der Emission bei 475 nm führten sollte, da durch die räumliche Nähe das Auftreten des FRET begünstigt sein sollte. Generell ist zwar eine leichte Zunahme des Verhältnisses nach Zugabe von 1 mM Calcium zu erkennen, bedeutender ist jedoch die Abnahme nach Zugabe des Calciumkomplexbildners EGTA. Die Abnahme deutet auf eine konstitutiv im Zytosol vorhandene Interaktion zwischen GRK2 und Calmodulin hin. Erklärbar wäre diese auch durch im Zytosol und den verwendeten Puffern vorhandenen Spuren an Calcium, die für eine basale Interaktion ausreichend sein könnten. In Zellen konnte dagegen FRET zwischen GRK2 und Calmodulin nicht gezeigt werden. Anders als in zytosolischen Präparationen kann man in Zellen die Calciumkonzentration und damit das FRET-Signal nicht durch Zugabe von externem Calcium oder EGTA verändern. Deshalb muss hier zur Verifizierung des erhaltenen konstitutiven Signals eine andere Methode gewählt werden.

Fluorophor	basal	1 mM Ca ²⁺	5 mM EGTA
GRK-YFP CaM-CFP	0,3321 100%	0,3430 103,28%	0,3352 100,93%
GRK-YFP CFP-CaM	0,4393 100%	n.b.	0,4250 96,75%
GRK-CFP YFP-CaM	0,2286 100%	0,2347 102,67%	0,2287 100,07%
GRK-CFP CaM-YFP	0,2294 100%	0,2360 102,86%	0,2322 101,20%

Tab. 4: FRET zwischen GRK2 und Calmodulin. Zytosolische Präparationen von HEK293-Zellen, die mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert wurden, wurden entweder in der Gegenwart von 1mM CaCl₂ oder 5 mM EGTA unter den im Materialien und Methodenteil beschriebenen Bedingungen in einem PerkinElmer Fluoreszenz-Photometer LS50B vermessen. Als Bezugswert wurde das Verhältnis der Emission bei 535nm und bei 475nm (CFP/YFP) auf 100% gesetzt. „n.b.“ steht für „nicht bestimmt“.

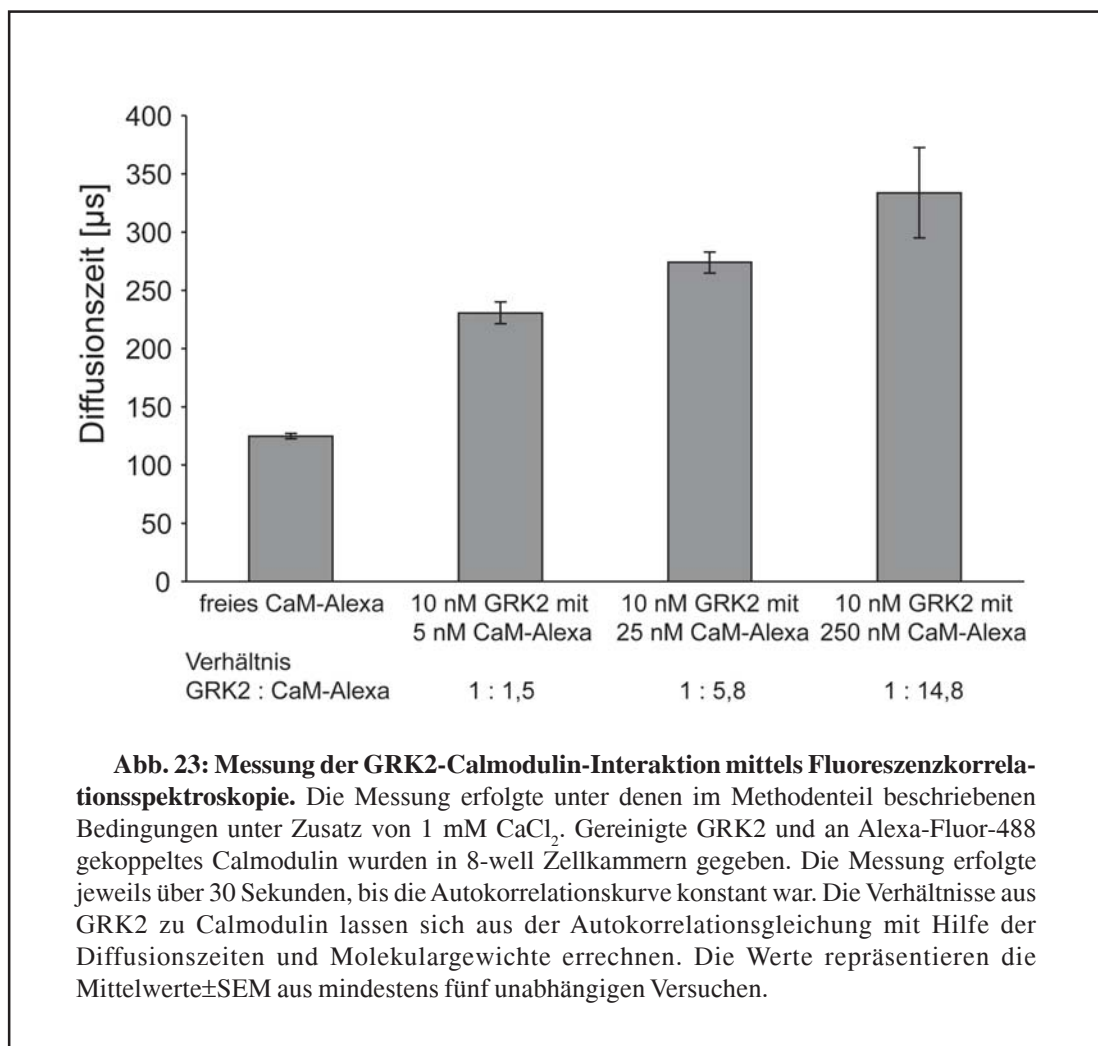
Man bedient sich dabei der Methode des Fotobleichens. Dabei versucht man, den Akzeptor durch intensive Bestrahlung bei seiner Anregungswellenlänge zu bleichen, sodass kein FRET zwischen Donor und Akzeptor mehr möglich ist. Als Folge des Bleichens sollte im Falle eines vorher vorhandenen FRET die Fluoreszenz des Donors ansteigen, da nun die Emissionsenergie des Donors nicht mehr auf den Akzeptor übergehen kann und so das Emissionsignal des Donors abschwächt. Das FRET-Signal zwischen GRK2-YFP und Calmodulin-CFP konnte nicht durch Fotobleichen verändert werden (Abb. 22). Mit dieser Methode ließ sich deshalb die Interaktion zwischen GRK2 und Calmodulin in Zellen nicht messen.



3.2 Messung mittels Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS)

Eine weitere Methode zur Messung von Protein-Protein-Interaktionen stellt die Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie dar. Grundlage dieser Methode ist die Änderung der freien Diffusion nach Interaktion mit anderen Proteinen und der damit verbundenen Massenzunahme. Bei der FCS wird ein Bindungspartner Fluoreszenz-markiert und seine Diffusion durch ein möglichst klein gewähltes Volumen gemessen. Voraussetzung ist außerdem, dass das fluoreszierende Molekül in einer starken Verdünnung vorliegt. Würde es in höheren Konzentrationen vorliegen, wäre die Beobachtung der Diffusionszeit unmöglich, da sich statistisch gesehen immer eine konstante Anzahl an Partikeln im Messvolumen aufhalten würde und es so zu kleinen Fluktuationen der Fluoreszenz käme. Das äußerst kleine Messvolumen im unteren Femtoliter-Bereich erreicht man durch Benutzung eines konfokalen Lasermikroskopes (ConFocor1, Firma Zeiss). Kommt es nun zu einer Interaktion zwischen dem gelabelten Protein und einem zweiten ungelabelten Protein, so vergrößert sich die Diffusionszeit des gelabelten Partners durch das Messvolumen durch die scheinbare Massenzunahme. Aus der Messung der so genannten Autokorrelationskurve lassen sich die Affinität und die Kinetik der Interaktion berechnen.

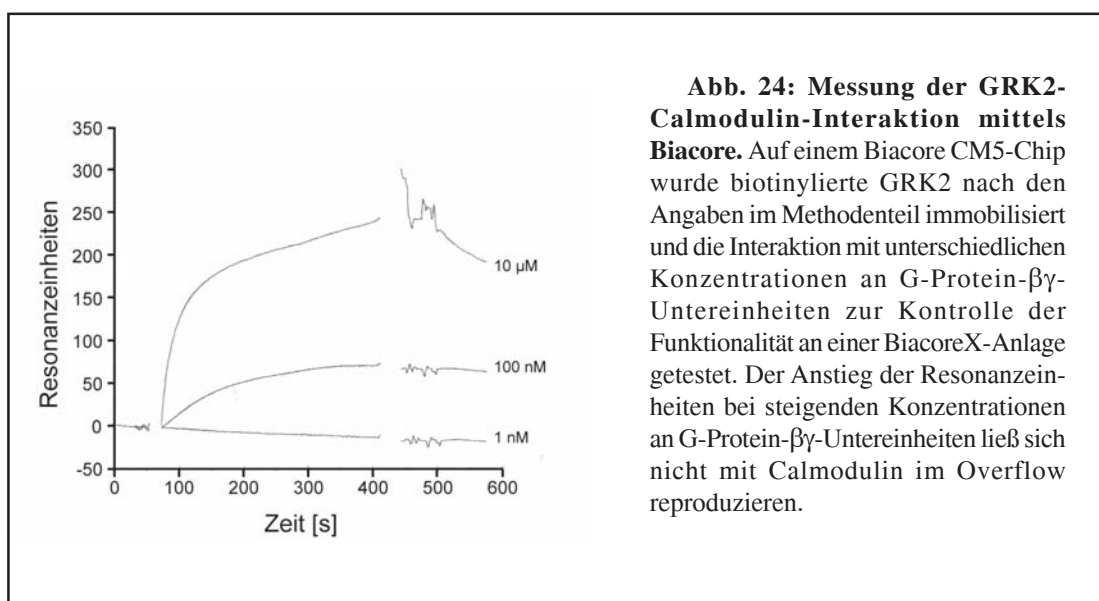
Als fluoreszenzmarkiertes Protein wurde Alexa-Fluor-488-markiertes Calmodulin (Molecular Probes) verwendet. Zuerst wurde als Kalibrierungsschritt die Diffusion des freien Farbstoffes gemessen, anschließend die des freien Calmodulin-Alexa-488-Konstruktes in einer Konzentration von 5 nM. Nun konnten durch Zugabe ansteigender Konzentrationen von GRK2 der Einfluss von GRK2 auf die freie Diffusion des gelabelten Calmodulins überprüft werden (Abb. 23). Aus der gemessenen Diffusionskonstante des freien Calmodulin-Alexa lässt sich über das Molekulargewicht eine theoretische Diffusionskonstante für den 1:1-Komplex aus GRK2 und Calmodulin errechnen. In niedrigen GRK2-Konzentrationen von 10 nM stimmen die gemessenen und errechneten



Diffusionszeiten relativ gut überein. Die gemessene Diffusionszeit würde einem 1:1,5-Komplex aus GRK2 und Calmodulin entsprechen. Erhöht man allerdings die Calmodulinkonzentration, so erhöht sich auch die Diffusionszeit des Komplexes, was auf eine unspezifische Agglomeratbildung schließen lässt. Unglücklicherweise zeigte Calmodulin auch eine sehr starke Affinität zu den Wänden des Untersuchungsgefäßes. Dies hatte zur Folge, dass die exakte Calmodulinkonzentration in der Lösung nicht genau bekannt ist. Versuche mit verschiedenen Materialien (diverse NUNC 8-well-Zellkammern), Coatingsubstanzen oder Detergentien führten entweder zu keiner Abnahme der unspezifischen Bindung an die Gefäßwand (Sigmacoat, poly-D-Lysin) oder verhinderten gleichzeitig eine GRK2-Calmodulin-Interaktion (Triton-X 100, Tween 20).

3.3 Messung mittels Oberflächen-Plasmonresonanz (Biacore)

Wie schon bereits unter 3.3 erwähnt wurde, gab es schon vor Beginn dieser Arbeiten Berichte über eine direkte Interaktion zwischen GRK2 und Calmodulin. In der Arbeit von Levay et al. (1998) wurde bereits versucht, die Interaktion von Calmodulin mit verschiedenen Vertretern aus der Familie der GRKs qualitativ mittels Biacore zu erfassen; außerdem versuchten die Autoren mit Hilfe von Fragmenten die Bindungsstelle von Calmodulin auf den GRKs genauer zu kartieren. Bei der Interaktionsbestimmung nach der Methode der Oberflächen-Plasmonresonanz wird als Messparameter eine Änderung des Brechungswinkels in Abhängigkeit der Masse auf einer dünnen Goldfolie herangezogen. Dabei wird der eine Bindungspartner auf der Oberfläche der Goldfolie fixiert (meist mittels Streptavidin-Biotin-Kopplung). Der andere Bindungspartner fließt über die beschichtete Oberfläche. Im Falle einer Interaktion zwischen den zwei Bindungspartnern kommt es zu einer Zunahme der auf der Oberfläche gebundenen Masse. Diese ist direkt proportional der Änderung des Brechungsindex, so dass ein auf die Goldoberfläche einfallender Lichtstrahl in einem veränderten Winkel reflektiert wird. Auch diese Methode erlaubt Aussagen zur Affinität der beiden Bindungspartner zueinander und über die Kinetik dieser Interaktion. Erstaunlicherweise fanden die Autoren relativ hohe Affinitäten, die den funktionellen Hemmkonzentrationen weit überlegen waren.

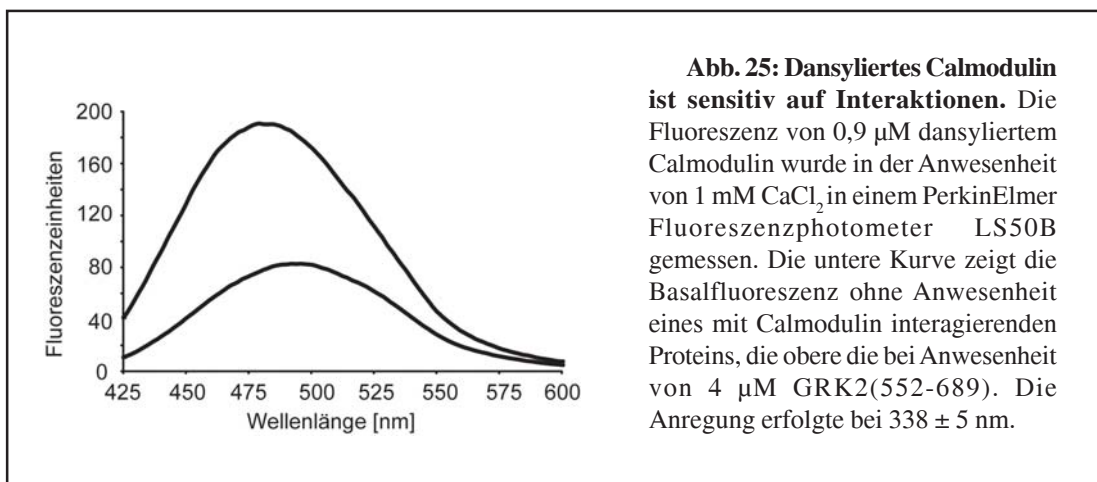


In dieser Arbeit sollte nun versucht werden, zum einen diese Daten zu reproduzieren und zum anderen sollte auch anhand verschiedener Konstrukte versucht werden, die Bindungsstelle von Calmodulin auf der GRK2 genauer zu untersuchen. Ein weiterer Aspekt, der mit diesem Versuchsaufbau zu klären versucht werden sollte, war die Bedeutung der Phosphorylierung der GRK2 durch PKC auf die Calmodulininhibition.

Unglücklicherweise gelang es nicht, eine ausreichende Menge von GRK2 auf den Messchip zu fixieren. Dies hatte zur Folge, dass die erforderliche Messgenauigkeit nicht erreicht werden konnte, da die Massenzunahme durch Bindung des nur 16,7 kDa großen Calmodulins nicht ausreichend groß war, um Bindung vom Hintergrundrauschen deutlich unterscheiden zu können. Die generelle Funktionalität des Messsystems konnte aber in einem Versuch mit den bekannten GRK2-Interaktionspartnern, G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten gezeigt werden (Abb. 24).

3.4 Messung mittels dansylmarkiertem Calmodulin

Die schon beschriebenen Schwächen des Biacore-Systems liegen möglicherweise in der Zweidimensionalität des Systems. Dabei könnte die Interaktion zwischen GRK2 und Calmodulin durch verhinderte Drehbarkeit oder Unzugänglichkeit von Bindungsstellen gestört sein. Deshalb wurde eine weitere Methode gewählt, bei der die Interaktionspartner sich in Lösung befinden. Bei dieser Methode, der Messung der Dansyl-Fluoreszenz, wird ein Interaktionspartner kovalent mit einem relativ kleinen (im Verhältnis zu den großen GFP-Varianten) Fluorophor, dem Dansylchlorid, markiert. Dansyl hat die Eigenschaft, dass seine Fluoreszenz sowohl von der Intensität als auch vom Maximum abhängig von der umgebenden Solvathülle ist. Aufgrund einer Interaktion zwischen dem markierten Calmodulin und GRK2 sollte sich die Solvathülle verändern und somit die Fluoreszenz des Dansyls zunehmen. Diese Zunahme wird später als Vielfaches der Basalfluoreszenz bei 486 nm ausgedrückt (Anregung bei 338 nm). In Abbildung 25 ist der Vergleich zwischen zwei Emissionsspektren gezeigt. Die untere Kurve zeigt dabei die Basalfluoreszenz, wohingegen die obere eine Emission nach Interaktion mit GRK2 zeigt. Dabei musste allerdings zuerst die Spezifität der Interaktion und des als Indikator gewählten Fluoreszenzanstiegs überprüft werden. In den nachfolgenden Versuchen wurden überwiegend Proteine verwendet, die als GST-Fusionsproteine exprimiert wurden. Deshalb wurde mit GST ein Kontrollprotein ausgewählt, von dem bekannt war, dass es nicht mit Calmodulin interagiert und so die Fluoreszenz des dansylmarkierten Calmodulins nicht verändern sollte. Die Durchführung der nachfolgenden Experimente ist unter 2.5.4 beschrieben. Steigende Konzentrationen an GST führen dabei zu keiner Zunahme der Fluoreszenz (Abb. 26). Bei der Zugabe von gereinigter humaner GRK2 zu dansylmarkiertem Calmodulin konnte jedoch eine



abhängig von der GRK2-Konzentration erhöhte Fluoreszenz gemessen werden (Abb. 27), wobei die aus der Kurve berechnete Affinität bei $2,3 \mu\text{M}$ lag. Dieser Wert deckt sich sehr gut mit der funktionell ermittelten halbmaximalen Hemmkonzentration von $1,6 \mu\text{M}$. Es zeigte sich aber auch in Abwesenheit von Calcium (durch Zugabe von 5 mM EGTA) eine abgeschwächte, aber dennoch deutliche Interaktion zwischen GRK2 und Calmodulin mit einer Affinität von ca. $4 \mu\text{M}$, obwohl die Inhibition strikt calcium-abhängig verläuft (siehe Abb. 11). Dieser Befund deutete auf zumindest zwei auch funktionell unterschiedliche Bindungsstellen von Calmodulin auf der GRK2 hin. Die Interaktion selbst scheint aber aus bereits beschriebenen Gründen nicht am katalytischen Bereich der GRK2 stattzufinden. Deshalb wurden im Folgenden Fragmente der GRK2 aus ihrem N- bzw. C-Terminus als GST-Fusionsproteine hergestellt und diese auf Interaktion mit Calmodulin untersucht. Dazu wurden zuerst verschiedene Abschnitte des N-Terminus als GST-Fusionsproteine gereinigt (2.2.9.2) und auf Interaktion mit dansyliertem Calmodulin untersucht. Für den distalen Abschnitt des N-Terminus, der die Aminosäuren 54 bis 185 umfasst, konnte keine Interaktion mit Calmodulin gefunden werden, weder in der Anwesenheit noch in der Abwesenheit von Calcium (Abb. 28A). Der komplementäre Teil des N-Terminus von dessen Anfang bis zu Aminosäure 53 dagegen zeigt eine deutliche Interaktion mit Calmodulin, die nur in Gegenwart von Calcium zu finden ist. Die Affinität liegt dabei bei $9,9 \mu\text{M}$ (Abb. 28B). Eine weitere Verkürzung des N-Terminus auf die ersten 36 Aminosäuren führt zum vollständigen Verlust der Interaktion (Daten nicht gezeigt). Inwieweit diese fehlende Interaktion durch eine falsche Faltung des Proteins oder eine Unzugänglichkeit der Bindungsstelle durch den relativ großen GST-Tag hervorgerufen wurde, lässt sich zu diesem Zeitpunkt leider noch nicht sagen. Analoge Experimente wurden auch mit dem C-Terminus der GRK2

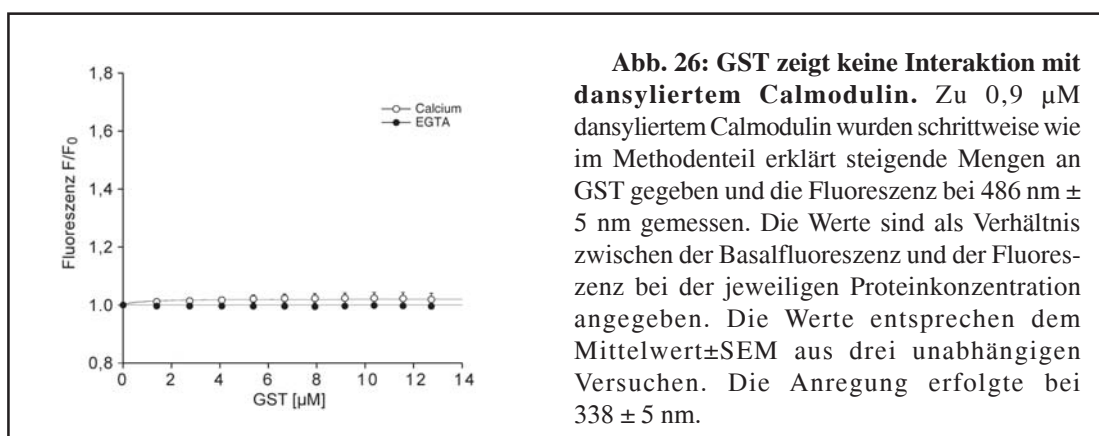


Abb. 26: GST zeigt keine Interaktion mit dansyliertem Calmodulin. Zu $0,9 \mu\text{M}$ dansyliertem Calmodulin wurden schrittweise wie im Methodenteil erklärt steigende Mengen an GST gegeben und die Fluoreszenz bei $486 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ gemessen. Die Werte sind als Verhältnis zwischen der Basalfluoreszenz und der Fluoreszenz bei der jeweiligen Proteinkonzentration angegeben. Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen. Die Anregung erfolgte bei $338 \pm 5 \text{ nm}$.

durchgeführt. Das verwendete GST-Fusionsprotein bestand aus den Aminosäuren 552 bis 689 der GRK2, bei denen zwar der proximale Teil des C-Terminus fehlt, aber die bereits in der Einführung erwähnte Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) enthalten ist. Die Interaktion mit Calmodulin in der Gegenwart von Calcium zeigte eine Affinität von $4,6 \mu\text{M}$ (Abb. 28C). Die bei der nativen GRK2 beobachtete Calcium-unabhängige Interaktion mit Calmodulin konnte auch bei dem C-terminalen Konstrukt gezeigt werden. Auch in Abwesenheit von Calcium zeigte es eine Bindung an Calmodulin mit einer Affinität von $7,8 \mu\text{M}$.

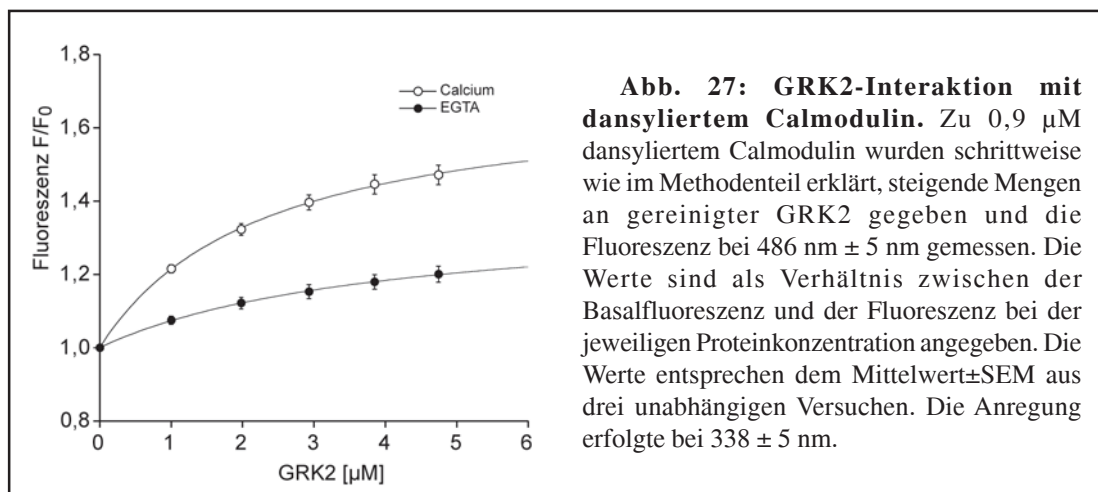
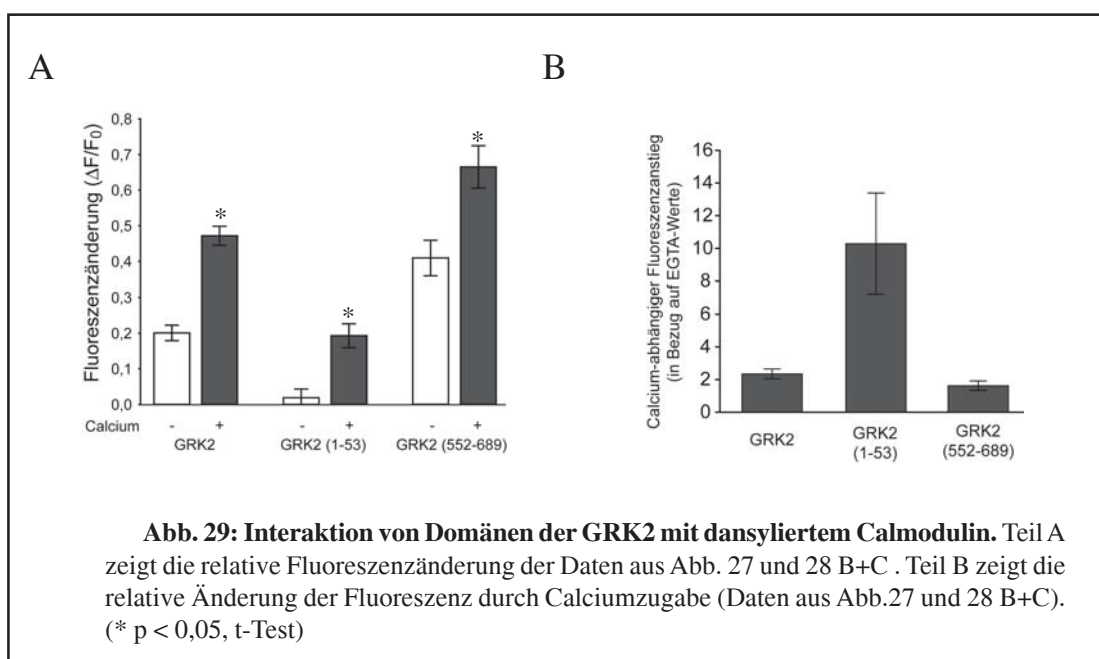
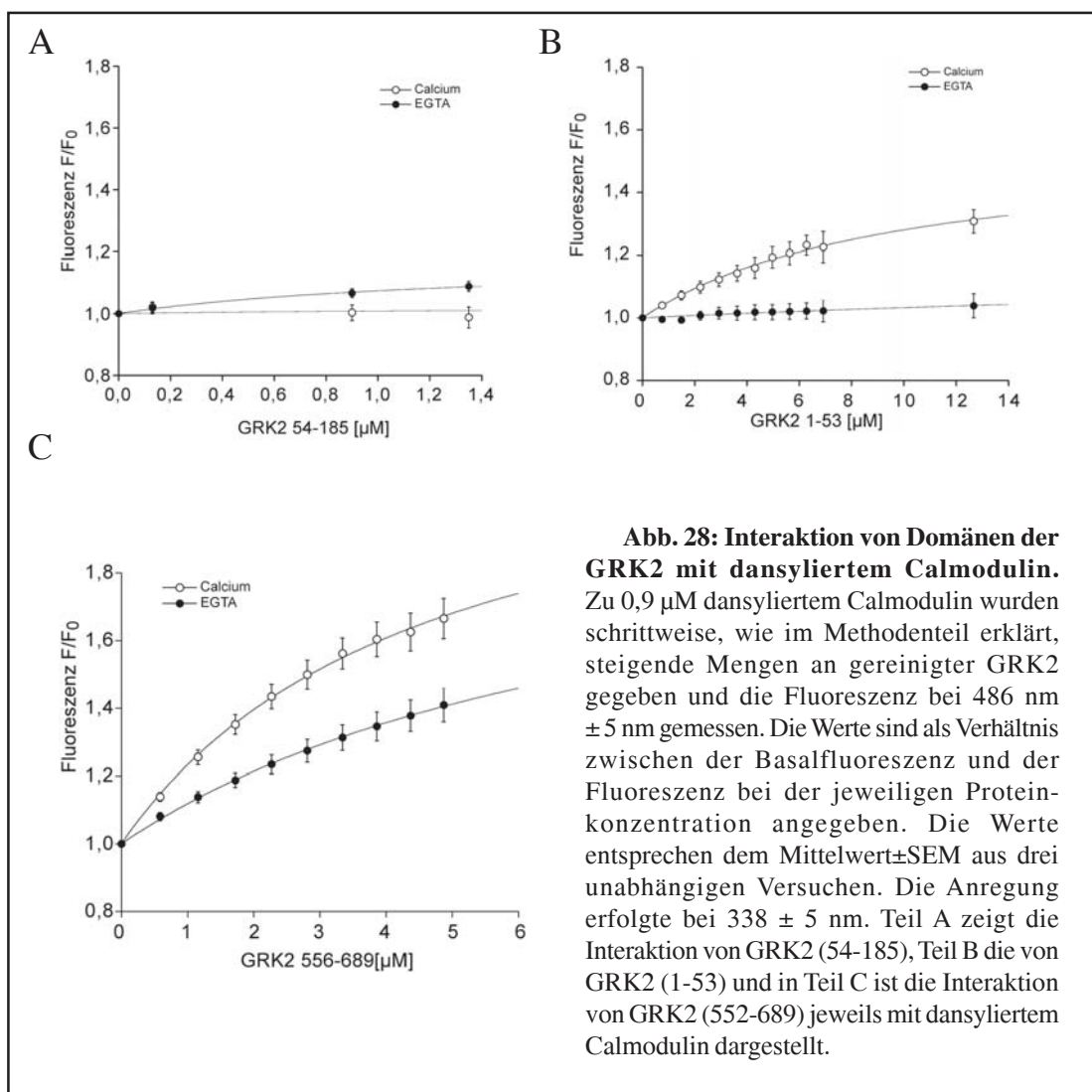


Abb. 27: GRK2-Interaktion mit dansyliertem Calmodulin. Zu 0,9 μM dansyliertem Calmodulin wurden schrittweise wie im Methodenteil erklärt, steigende Mengen an gereinigter GRK2 gegeben und die Fluoreszenz bei $486 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ gemessen. Die Werte sind als Verhältnis zwischen der Basalfluoreszenz und der Fluoreszenz bei der jeweiligen Proteinkonzentration angegeben. Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen. Die Anregung erfolgte bei $338 \pm 5 \text{ nm}$.

In Abbildung 29A sind die Ergebnisse der Interaktionsmessungen bei einer Proteinkonzentration von 5 μM noch einmal vergleichend dargestellt. Dabei wurde nur der Calcium-vermittelte Anstieg der Fluoreszenz dargestellt. Es wird dabei deutlich, dass sowohl die native GRK2 als auch das C-terminale GST-Fusionsprotein Calcium-unabhängig mit Calmodulin interagieren können. Der extreme N-Terminus der GRK2 dagegen zeigt nur in Gegenwart von Ca^{2+} /Calmodulin eine signifikante Interaktion.

Da der Anstieg der Fluoreszenz sehr stark vom Interaktionspartner abhängt, lassen sich aus den absoluten Fluoreszenzwerten keine Aussagen über die Affinität der Interaktion ableiten. Deshalb ist in Abbildung 29B der calcium-vermittelte Effekt der Interaktion zwischen den einzelnen GST-Fusionsproteinen und dansyliertem Calmodulin dargestellt. Hier wird deutlich, dass die Interaktion zwischen N-Terminus und Calmodulin die weitaus größte Calciumabhängigkeit zeigt. Auf Grund der Tatsache, dass die Inhibition der GRK2 durch Calmodulin strikt Calcium-abhängig verläuft, lässt sich schließen, dass die Interaktion mit dem N-Terminus dafür maßgeblich verantwortlich ist.

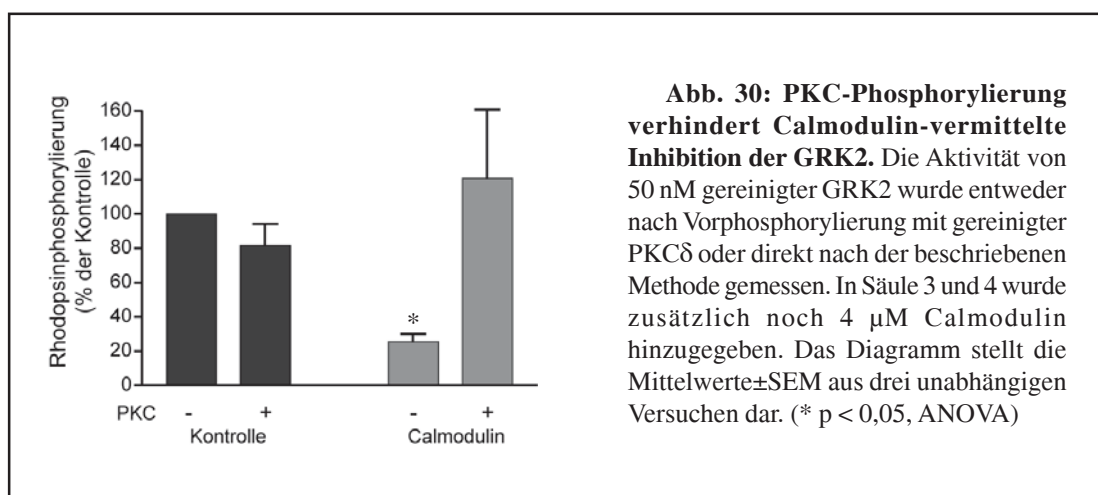


4 Einfluss der Phosphorylierung der GRK2 durch PKC auf die Inhibition mit Calmodulin

Bereits unter 3.1 wurde beschrieben, dass die Proteinkinase C die GRK2 an Position Serin²⁹ zu phosphorylieren vermag. Für die Funktionsfähigkeit des gereinigten Proteins konnte aber keine Veränderung nach Phosphorylierung beobachtet werden (3.1.1). Wurde GRK2 in HEK293-Zellen exprimiert, so zeigte sich nach PKC-Stimulation eine Erhöhung der zytosolischen GRK-Aktivität. Da dieser Anstieg aber nicht bei einer phosphorylierungsdefizienten Mutante beobachtet werden konnte, kann von einem direkten Phosphorylierungseinfluss auf die GRK2 ausgegangen werden. Scheinbar verhindert die Phosphorylierung durch PKC eine tonische Hemmung der GRK2 in HEK293-Zellen. Ein Kandidat, der für diese Hemmung verantwortlich sein könnte, ist Calmodulin.

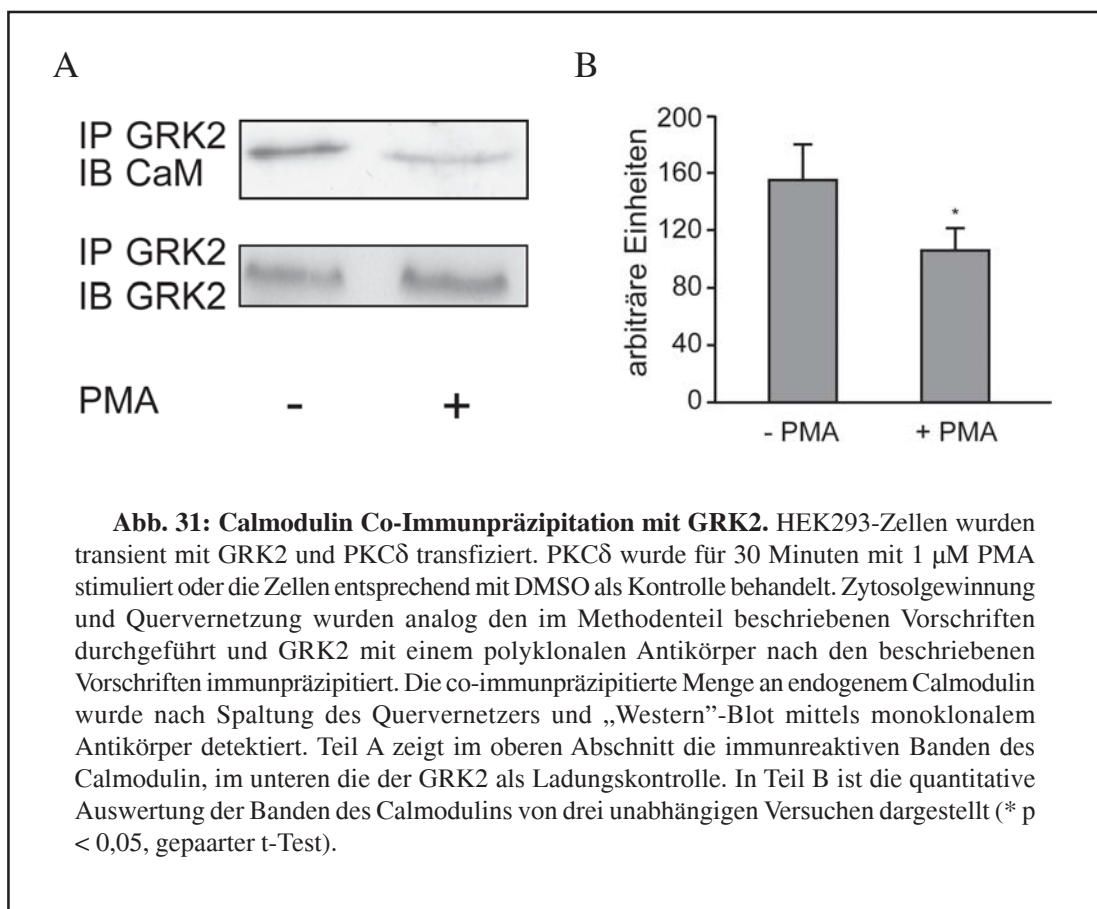
4.1 GRK2-Aktivität mit gereinigten Proteinen

Um einen Zusammenhang zwischen der Calmodulininhibition und der PKC-Phosphorylierung zumindest mit gereinigten Proteinen zeigen zu können, wurde aus Sf9-Zellen gereinigte humane GRK2 (2.2.9.1) zuerst mit PKC phosphoryliert (2.3.3) und anschließend mit Calmodulin gehemmt. Erwartungsgemäß hatte die Phosphorylierung der GRK2 durch PKC keinen direkten Einfluss auf die Aktivität der GRK2, und auch Calmodulin konnte die unphosphorylierte GRK2 wie erwartet hemmen. Im Falle der PKC-phosphorylierten GRK2 wurde aber keine Hemmung durch Calmodulin beobachtet (Abb. 30). Zumindest auf der Ebene der gereinigten Proteine konnte so gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der GRK2 durch PKC zwar nicht die Aktivität der Kinase selbst beeinflusst, sie aber vor einer Inhibition durch Calmodulin schützt. Ob Calmodulin auch den inhibitorischen Faktor in HEK293-Zellen darstellt, sollte in den folgenden Versuchen geklärt werden.



4.2 Co-Immünpräzipitation von GRK2 und Calmodulin

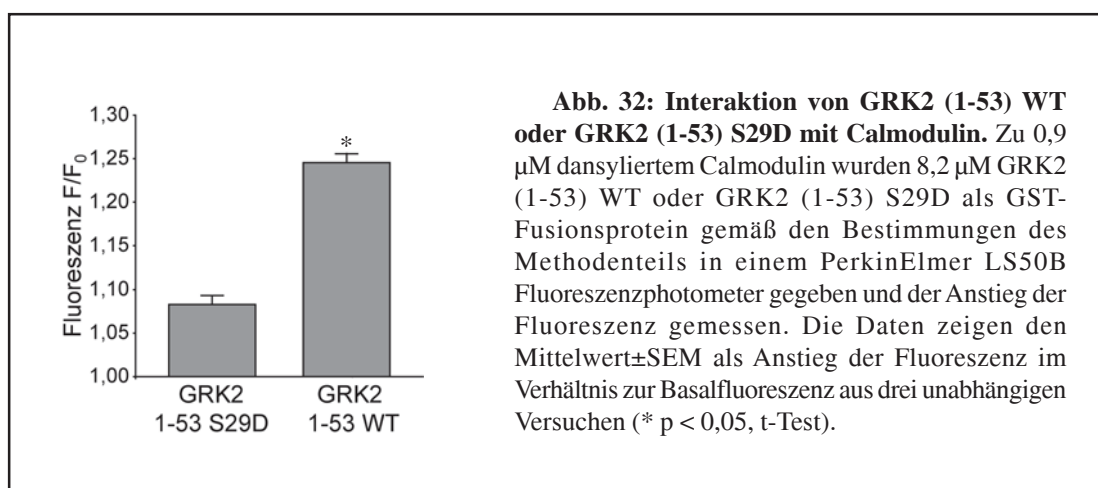
Eine gängige Methode, um direkte Interaktion zwischen zwei Proteinen in zellulärem Umfeld zu zeigen, ist die Co-Immünpräzipitation (2.2.8). Dabei wird das Zytosol von Zellen mit einem spezifisch gegen einen der beiden Interaktionspartner gerichteten Antikörper inkubiert und anschließend dieser Antikörper auf einer Protein-A-Sepharose immobilisiert. Die Interaktionspartner des Proteins, gegen welche der Antikörper gerichtet ist, sind darüber nun ebenfalls auf der Protein-A-Sepharose-Matrix immobilisiert und nach diversen Waschschröten von den übrigen zellulären Proteinen separiert. Als nächstes wird der Antigen-Antikörperkomplex durch Resuspendierung in SDS-Auftragspuffer zerstört und die Proteine mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.2). Nach dem sich anschließenden „Western“-Blot (2.2.4) kann der Interaktionspartner mittels Immundetektion (2.2.5) nachgewiesen werden. Die Interaktion zwischen GRK2 und Calmodulin scheint aber zumindest in Zellen zu schwach zu sein, um die eben beschriebene Prozedur als Komplex zum Nachweis zu überstehen (Levay et al., 1998). Aus diesem Grund wurden die beiden Proteine vor der Co-Immünpräzipitation mittels eines kleinen, später spaltbaren Moleküls kovalent miteinander verbunden. Dafür wurde DSP verwendet (2.2.7). Diese Bindung verhinderte ein Dissoziieren des Komplexes bei der Immünpräzipitation und den Waschschröten. Die Spaltung erfolgte simultan zur Resuspendierung und Zerstörung des Antigen-Antikörperkomplexes durch das im SDS-Auftragspuffer enthaltene DTT.



Im vorliegenden Fall wurden HEK293-Zellen transient mit GRK2 und PKC δ transfiziert und die PKC durch PMA-Behandlung der Zellen aktiviert (2.3.3). Als Kontrolle dienten transfizierte Zellen, die mit einer entsprechenden Menge an DMSO behandelt wurden. Aus dem Zytosol der so behandelten Zellen wurde mittels eines GRK2-Antikörpers (1.4.2) die GRK2 nach Crosslinken immunpräzipitiert und nach Spaltung und Auftrennung des Komplexes das co-immunpräzipitierte Calmodulin mittels spezifischem Antikörper nachgewiesen. Die immunreaktive Bande der Zellen, in denen PKC nicht stimuliert wurde, ist stärker als die vergleichbare Bande der PKC-stimulierten Zellen (Abb. 31). Dies lässt zum einen darauf schließen, dass GRK2 in HEK293-Zellen tonisch durch Calmodulin inhibiert vorliegt, da sich im basalen Zustand eine deutliche Interaktion zeigt. Zum anderen, dass diese Interaktion und die daraus folgende Hemmung durch Stimulation der PKC und anschließender Phosphorylierung der GRK2 reduziert werden kann. Diese Befunde bestärken die Vermutung, dass Calmodulin ein konstitutiver Inhibitor der GRK2 ist.

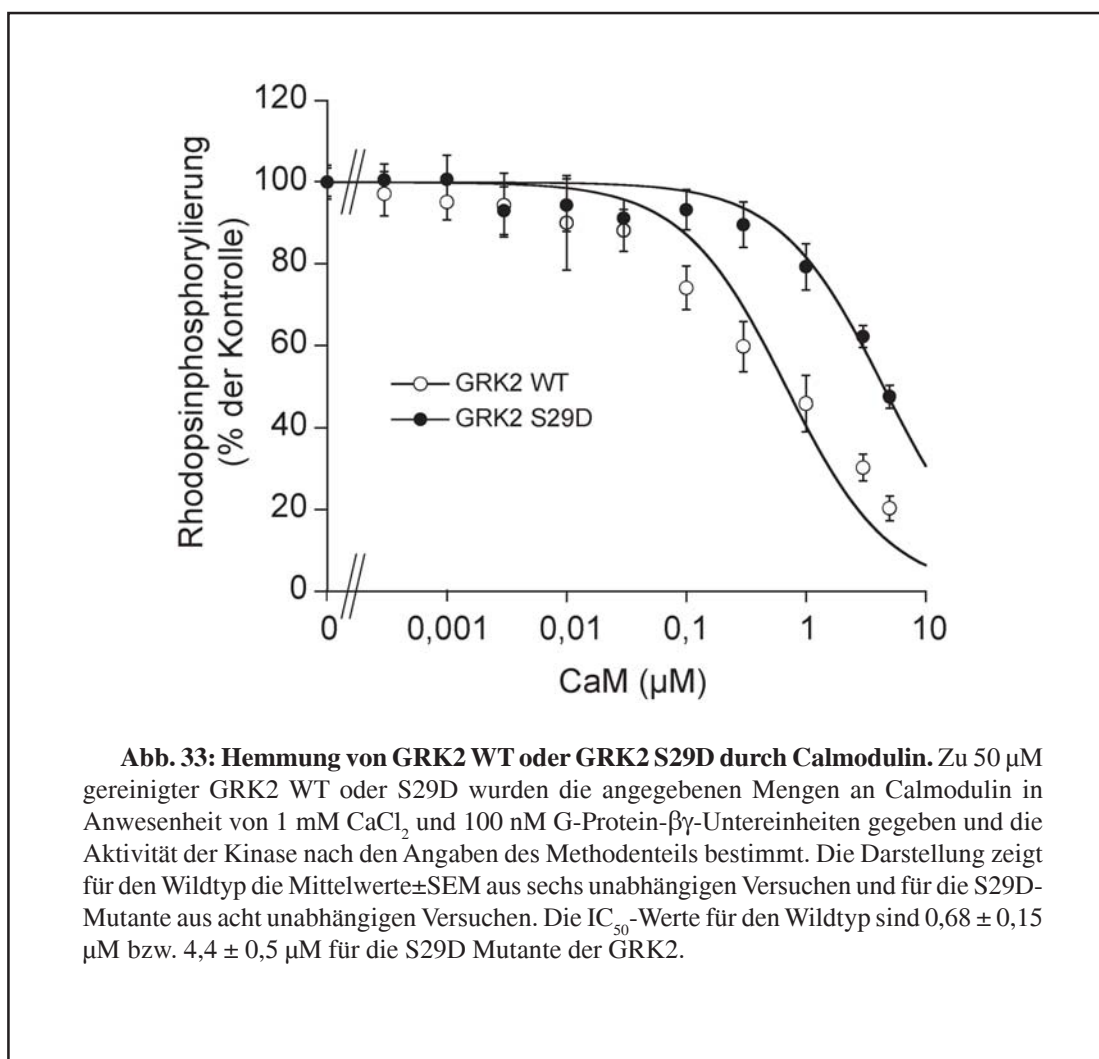
4.3 Interaktion von Calmodulin mit GRK(1-53) WT oder GRK(1-53) S29D

Aus den bisherigen Versuchen war bekannt, dass Calmodulin die GRK2 strikt Calcium-abhängig inhibiert und nur mit dem N-Terminus der GRK2 (Aminosäuren 1-53) Calcium-abhängig interagieren kann. Außerdem phosphoryliert PKC die GRK2 an Serin²⁹ in deren N-Terminus, was zu einem Verlust der Calmodulin-vermittelten Inhibition der GRK2 führt. Aus diesem Grund sollte nun die Interaktion des N-Terminus der GRK2 mit Calmodulin in Abhängigkeit der PKC-Phosphorylierung untersucht werden. Eine quantitative Phosphorylierung des GST-Fusionsproteins mit GRK2 (1-53) erwies sich als nicht durchführbar, weshalb mit Hilfe der PCR-Mutagenese ein Austausch des Serins an Position 29 durch Aspartat vorgenommen wurde. Dies soll durch seine große anionische Seitenkette das Phosphat der Phosphorylierung imitieren. Nach Expression und Reinigung der beiden GST-Proteine (2.2.9.2) GRK (1-53) WT und GRK(1-53) S29D wurde die Affinität der beiden Proteine zu dansyliertem Calmodulin gemäß 2.5.4 untersucht. Dabei zeigte die S29D-Mutante eine deutlich geringere Affinität zu Calmodulin als der WT (Abb. 32). In diesem Experiment sind die Fluoreszenzanstiege direkt vergleichbar, da sich die beiden Proteine nur in einer Aminosäure unterscheiden und so die Fluoreszenzänderung nicht von unterschiedlichen Solvationsausgangszuständen abhängig sein dürfte.



4.4 Vergleich der Calmodulininhibition von GRK2 WT und GRK2 S29D

Wie bereits in Abschnitt 4.1 gezeigt werden konnte, ist die Hemmung der GRK2 durch Calmodulin sensitiv auf die Phosphorylierung der GRK2 durch PKC. Im Folgenden sollte nun der Einfluss der Phosphorylierung auf die Konzentrations-Wirkungskurve der Calmodulin-vermittelten Hemmung der GRK2 untersucht werden. Um eventuelle Schwankungen bei der dazu notwendigen quantitativen Vorphosphorylierung der GRK2 mit PKC zu umgehen, wurde die PKC-Phosphorylierung durch Austausch der phosphorylierten Aminosäure auf der GRK2 (Serin²⁹) zu Asparaginsäure imitiert. Analog zu den vorherigen Versuchen mit gereinigten Kinasen und Calmodulin wurden nach 2.3.1 steigende Mengen an Calmodulin zur Aktivitätsbestimmung der GRK2 oder ihrer Mutante zugesetzt. Wie in Abbildung 33 zu erkennen ist, zeigte sich dabei eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve im Falle der GRK2-Mutante (GRK2 S29D). Die ermittelten halbmaximalen Hemmkonzentrationen betragen für den Wildtyp der GRK2 $0,68 \pm 0,15 \mu\text{M}$ und für die S29D-Mutante $4,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$ Calmodulin.



IV Diskussion

Regulation der GRK2 durch Calmodulin und PKC

Für das Überleben von Zellen allein oder in Zellverbänden oder Geweben ist es besonders wichtig, die Signale, die sie von außen erhalten, nicht nur korrekt in intrazelluläre Signalwege umzuwandeln, sondern auch für eine geordnete Koordination verschiedenster Signale und ihrer Resultate zu sorgen. Ein Signalweg darf deshalb nie als gesonderter Mechanismus gesehen werden, sondern immer nur als Teil eines ganzen Netzwerkes verschiedener Faktoren.

Die meisten Signalwege sind Kombinationen von sekundären Botenstoffen, Proteinphosphorylierungen und -dephosphorylierungen sowie Protein-Protein-Interaktionen. Die Kombination kann dabei additive oder gar synergistische, aber auch inhibitorische Wirkung haben.

Viele Kinasen, die durch Phosphorylierungen andere Proteine regulieren, unterliegen dabei selbst solchen Mechanismen. So können sie durch Phosphorylierung andere Kinasen anschalten, wie es im Falle des MAP-Kinaseweges der Fall ist (Chong et al, 2003) oder auch die Substratspezifität der phosphorylierten Kinasen herabsetzen (MLCK-Phosphorylierung durch PKG (Walter et al, 1993)).

Für die GRKs sind allerdings mehr regulatorische Einflüsse durch Interaktionspartner als durch Phosphorylierung beschrieben.

1. Regulation der GRK2 durch Calmodulin

Zu Anfang dieser Arbeit war wenig über die Regulation der GRK2 durch Calmodulin bekannt. Zwar wusste man, dass dieses calciumbindende Protein verschiedene GRKs unterschiedlich effektiv hemmen kann, doch war über den Mechanismus und die Regulation dieser Interaktion wenig bekannt. In einigen Arbeiten wurde zwar die Calciumabhängigkeit der Hemmung gezeigt, doch wurden die dafür benötigten Calciumkonzentrationen nicht genauer untersucht. Deshalb wurde zu Anfang eine Bestimmung der optimalen Calciumkonzentrationen durchgeführt. Die Calciumkonzentration, bei der Calmodulin die GRK2 mit halbmaximaler Effektivität hemmen konnte, wurde als ca. 300 μM bestimmt. Auf Grund des experimentellen Aufbaus war es leider nicht möglich, die Konzentration an freiem Calcium zu bestimmen. Es ist wahrscheinlich, dass diese weit unter dem Wert für die absolute Konzentration liegt. Dies kann vor allem durch die calciumbindenden Zusätze wie EDTA oder aber auch zu einem geringeren Teil durch ATP begründet sein. Aber auch nicht abschätzbare Faktoren wie die Bindung von Calcium an die Membranen der Rhodopsin-enthaltenden Rod-outer-Segments verhindern eine genaue Bestimmung der freien Calciumkonzentration. Durch Versuche mit calciumsensitiven Farbstoffen wie z.B. X-rhod-N, das im Vergleich zu den meistens verwendeten calciumsensitiven Farbstoffen FURA oder FURA-2 eine deutlich geringere Affinität zu Calcium hat und so höhere Konzentrationen darstellen kann ($K_m \sim 300 \mu\text{M}$), konnte die Menge an freiem Calcium zwar auf ungefähr 100 μM unter Phosphorylierungsbedingungen (2.3.1 mit 1 mM CaCl_2)

ermittelt werden, eine genaue Erfassung war allerdings durch die große Schwankung der Messwerte nicht möglich. Auch Versuche mit Geräten, die zur Bestimmung von Calcium in klinischen Proben eingesetzt werden, brachten keine Erfolge.

Dass sich unter Versuchsbedingungen ein Puffer für etwa 100 μM Calcium einstellt, kann man auch der Kurve der Calciumabhängigkeit der Calmodulin-vermittelten GRK2-Inhibition entnehmen. Dort beginnt der inhibierende Effekt erst ab Konzentrationen über 100 μM . In Vorversuchen wurde außerdem beobachtet, dass bei niedrigeren Calciumkonzentrationen (100 μM) die Inhibition nur in einigen Fällen zu beobachten war. Die Inhibition zwischen GRK2 und Calmodulin scheint also auch bei niedrigen Spiegeln an freiem Calcium funktionelle Bedeutung zu haben. Physiologisch kann Calcium nach Aktivierung eine Konzentration von 1 μM im Zellzytosol erreichen (Clapham, 1995). Der experimentell beobachtete Anstieg der inhibitorischen Wirkung von Calmodulin bei totalen Calciumkonzentrationen von 100 μM im Versuchsaufbau und die Pufferwirkung von ebenfalls ca. 100 μM machen es möglich, dass die Interaktion bei solch niedrigen Konzentrationen zum Tragen kommt. Eine genaue quantitative Bestimmung der freien Calciumkonzentration wäre deshalb vorteilhaft.

Für die inhibitorische Potenz von Calmodulin in Bezug auf GRK2 fanden sich in der Literatur Werte von 1-3 μM . Diese stimmen mit der hier bestimmten halbmaximalen Hemmkonzentration von 1,6 μM sehr gut überein. Calmodulin ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das in großer Menge in den meisten Zellen vorkommt. Die Calmodulin-Konzentration in bestimmten Zellen kann bis zu 10 μM betragen (Kakiuchi et al, 1982; Holmes, 2000). Calmodulin ist dabei ein wichtiger Bestandteil vieler zellulärer Prozesse und bindet dabei an eine Vielzahl von Proteinen. Aus diesem Grund ist die freie Konzentration an Calmodulin in der Zelle geringer anzunehmen als die total gemessene. Genaue Zahlen liegen allerdings nicht vor (Slemmon et al, 2000; Gaertner et al, 2004).

Calmodulin hat als ubiquitär exprimiertes Protein eine Vielzahl von Aufgaben in der Zelle. So kann es neben der Aktivierung Calcium/Calmodulin-abhängiger Kinasen (CaM-Kinase) (Soderling, 1999) auch mit Ionenkanälen interagieren (Rodney et al, 2000) und spielt eine wichtige Rolle bei der Kontraktion von Muskelzellen (Webb, 2003).

Bis zu Beginn dieser Arbeit war wenig über den Mechanismus bekannt, mit dem Calmodulin die GRKs hemmt. Von einem einheitlichen Mechanismus kann dabei allerdings nicht ausgegangen werden. Zum einen wegen der sehr unterschiedlichen halbmaximalen Hemmkonzentrationen (für GRK5 ca. 50 nM vs. GRK2 ca. 1,6 μM) (Chuang et al, 1996; Pronin et al, 1997) und zum anderen wegen der stark unterschiedlichen Effekte der Inhibition auf die Kinasen. So erhöht Calmodulin bei GRK5 die Autophosphorylierung, was bei dieser Kinase noch einen weiteren inhibierenden Effekt hat (Pronin et al, 1997). Es wird vermutet, dass es so zu einer verlängerten inhibitorischen Wirkung des Calmodulins auf die GRK5 kommt, selbst dann, wenn die intrazellulären Calciumspiegel schon wieder soweit gesunken sind, dass es nicht mehr zu einer direkten Interaktion zwischen der Kinase und Calmodulin kommen kann.

Der hemmende Effekt von Calmodulin auf die GRK2 scheint dabei auch nicht direkt im katalytischen Zentrum der Kinase stattzufinden bzw. ihre katalytischen Eigenschaft an sich zu

inhibieren, sondern eher in einer gestörten Substraterkennung oder in einer gestörten Aktivierbarkeit zu liegen. Auch andere Gruppen konnten zeigen, dass Calmodulin nicht die Aktivität von GRK2 gegenüber einem artifiziellen Substratpeptid (einem GST-Fusionsprotein aus der dritten intrazellulären Schleife des muskarinischen M2-Rezeptors) hemmt (Haga et al, 1997). Hier war bereits bekannt, dass die GRK2 diese nicht über ihren N- bzw. C-Terminus erkennt, da Verkürzungen des N-Terminus keine Auswirkung auf die Substratphosphorylierung hatten (Yu et al, 1999; Gan et al, 2000). Da die Substrate allerdings keine natürlich vorkommenden Proteine sind, wurde in dieser Arbeit Tubulin als lösliches Substrat verwendet.

Tubuline lassen sich generell in zwei große Klassen einteilen, die α - und β -Tubuline. Dabei kommt Tubulin in zwei verschiedenen Formen vor: einem löslichen Anteil, der zytosolisch vorliegt und als Heterodimer aus je einer α - und einer β -Form besteht, und unlösliche Polymere aus vielen Tubulinmolekülen, die Mikrotubuli genannt werden. Zwischen diesen beiden Formen herrscht ein dynamisches Gleichgewicht, Tubulinmoleküle werden aus dem löslichen Pool in Mikrotubuli eingebaut und umgekehrt. Die Aufgabe der Mikrotubuli ist vielfältig, sie spielen wichtige Rollen in der Aufrechterhaltung des Zytoskellettes und somit der Form der Zelle, bei der Endo- und der Exocytose, dem vesikulären und zellulären Transport und auch bei der Zellteilung (Mandelkow und Mandelkow, 1990).

Die Arbeiten von Diaz-Nido (1990) konnten zeigen, dass neuronales β 3-Tubulin sehr effektiv *in vitro* wie *in vivo* durch die Caseinkinase II (CKII) phosphoryliert wurde. Durch *in vivo* Phosphomapping an Kaninchenhirnen wurde die Phosphorylierungsstelle der CKII bei der β 3-Untereinheit des Tubulins auf ein Serin nahe des C-Terminus kartiert (Serin⁴⁴⁴). Dieses Serin befindet sich in unmittelbarer Umgebung stark saurer Aminosäuren (EDDEESE). Auch die GRK2 bevorzugt Serinreste in saurer Umgebung als Substrate, weshalb die Vermutung nahe lag, dass Tubulin auch als Substrat für die GRK2 fungieren kann.

Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass GRK2 und GRK5 sehr effektiv Tubulin phosphorylieren können (Carman et al, 1998; Haga et al, 1998; Pitcher et al, 1998). Bis heute konnte aber kein funktioneller Aspekt dieser Phosphorylierung gefunden werden. Sowohl bei der Phosphorylierung durch CKII als auch bei der GRK-vermittelten Phosphorylierung ändern sich die Eigenschaften von Tubulin nicht: Die Polymerisationsfähigkeit und auch der Zyklus zwischen löslichem und unlöslichem Zustand bleiben unverändert. Des Weiteren unterscheiden die GRKs nicht zwischen polymerisiertem und unpolymertem Tubulin, sondern akzeptieren beide gleichermaßen als Substrate (Haga et al, 1998).

Tubulin liegt in großen Mengen im Vergleich zur GRK2 in der Zelle vor und ein substantieller Teil davon wiederum als lösliches Heterodimer. Immunfluoreszenzuntersuchungen konnten zeigen, dass GRK2 mit Tubulin im Zytosol co-lokalisiert, und *in vitro*-Interaktionsmessungen zeigten, dass beide Proteine auch direkt miteinander assoziieren können (Carman et al, 1998). Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass ein Großteil der GRK2 in der Zelle an Tubulin assoziiert vorliegt. Da die Kinase für eine Phosphorylierung folglich nicht mehr zu ihrem Substrat translozieren muss, sollten auch die für die Rezeptorphosphorylierung notwendigen Aktivierungs- und Translokations-schritte über G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten für die Tubulinphosphorylierung keine dominante Rolle

spielen. In der Literatur ist eine G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten-unabhängige Bindung von Tubulin an GRK2 beschrieben (Haga et al, 1998). Der in der vorliegenden Arbeit bestimmte Anstieg der Phosphorylierung von Tubulin durch GRK2 nach Zugabe von G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten um ca. 50% dürfte physiologisch keine gewichtige Rolle spielen. Deshalb kann die Phosphorylierung von Tubulin durch GRK2 als G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten-unabhängig angesehen werden.

Hier konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Tubulin durch GRK2 und GRK5 scheinbar auf dieselben Aminosäuren abzielt wie die durch Caseinkinase II. Yoshisa et al (2003) konnten zeigen, dass GRK2 vor allem drei Phosphorylierungsstellen im extremen C-Terminus von Tubulin phosphoryliert (Thr⁴⁰⁹, Ser⁴²⁰ und Ser⁴⁴⁴). Außerdem konnten die Autoren belegen, dass Tubulin in der Zelle zu einem Großteil phosphoryliert vorliegt. Da die Phosphorylierung von Tubulin durch die genannten Kinasen keine bis jetzt bekannten funktionellen Auswirkungen hat, liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um eine Art Puffer handelt, der die Zelle vor ungewollten Phosphorylierungen schützt. Trotzdem könnte die Zelle im Bedarfsfall auf einen großen Pool an einsatzbereiten Enzymen zurückgreifen. Der Beweis dieser Hypothese dürfte allerdings schwierig sein, da Tubulin endogen in großen Mengen exprimiert wird und so eine Überexpression von Mutanten, denen die Phosphorylierungsstellen fehlen (Serin zu Alanin- Mutation), keine dominante Rolle spielen werden. Eventuell wäre eine gleichzeitige Runterregulierung der endogenen Tubulinspiegel durch siRNA, die sich z.B. gegen 5'-untranslatierte Bereiche des Tubulins richtet, hilfreich. Da Tubuline wie bereits beschrieben nicht nur durch eine Kinase, sondern von vielen Kinasen auch an denselben Stellen phosphoryliert werden, wäre es auch möglich, eine dieser Kinasen durch Überexpression einer dominant-negativen Form zu unterdrücken und dann den Phosphorylierungsgrad von Tubulin zu untersuchen.

GRK2 benötigt bei der Phosphorylierung von Tubulin keine Aktivierung durch G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die fehlende Hemmung der Tubulinphosphorylierung der GRK2 durch Calmodulin deutet also ebenfalls darauf hin, dass Calmodulin nicht mit den katalytischen Eigenschaften der GRK2 interferiert, sondern eher in den Substraterkennungs- oder Aktivierungsprozeß eingreift. Wie sich aus der Bestimmung der Hemmeigenschaften über Michaelis-Menten ableiten lässt, folgt die Hemmung einem nicht kompetitiven Charakter. Dieser wäre aber für einen reversiblen Angriff im katalytischen Zentrum zu erwarten gewesen, wenn durch Zugabe von erhöhten Substratmengen der inhibitorische Effekt abgeschwächt werden könnte. Um genauere Aussagen zur Charakteristik der Calmodulin-vermittelten Inhibition zu erhalten, wurden verschiedene Calmodulin-Antagonisten eingesetzt. In der Literatur sind verschiedene Calmodulin-Antagonisten beschrieben, von denen auch teilweise der genaue Angriffspunkt durch Kristallstrukturen mit Calmodulin bekannt ist. Der wohl am besten untersuchte Antagonist ist dabei das W7. Erstaunlicherweise hatte dieser Inhibitor allerdings keinen Einfluss auf die Hemmung der GRK2, was auf einen anderen Mechanismus der Calmodulin-Interaktion als bei den „klassischen“ Calmodulin-Interaktionspartnern, wie der CaM-Kinase, schließen lässt, deren Calmodulin-vermittelte Aktivierung sehr gut durch W7 gehemmt wird. Andererseits zeigte der Calmodulininhibitor Pimozid zwar im *in-vitro*-Assay eine deutlich antagonistische Aktivität in bezug auf Calmodulin, dies ließ sich allerdings nicht in einem zellulär

basierten FRET-Versuch nachvollziehen, bei dem die GRK2-abhängige Geschwindigkeit der Rezeptor-Arrestin-Interaktion gemessen wurde. Als Ursache könnte eine zu geringe Membrangängigkeit des Antagonisten und damit eine zu geringe Konzentration in der Zelle in Betracht kommen. Außerdem ist es denkbar, dass die intrazelluläre Konzentration durch andere Bindungspartner abgesenkt wird. Pimozid ist kein reiner Calmodulin-Antagonist, sondern zeigt unter anderem auch eine Affinität zu verschiedenen GPCRs.

Die Messung der GRK2-Calmodulin-Interaktion erwies sich als außerordentlich schwierig. FRET, eine gängige Methode zur Interaktionsmessung von Proteinen, zeigte nur bei der Messung von Zytosolen, denen zusätzlich Calcium zugesetzt wurde, ein Signal. Messungen in transfizierten Zellen dagegen zeigten keine basale Interaktion bzw. ließ sich das Signal nicht verifizieren. Dies könnte mehrere Ursachen haben. Durch das Einführen von Varianten des green-fluorescent-Proteins, das eine Größe von ca. 30 kDa hat, könnte die Interaktion zwischen GRK2 und Calmodulin gestört werden. Dieses Phänomen lässt sich z.B. bei der GRK2 direkt beobachten, die ein GFP an ihrem C-Terminus zwar toleriert, das Einführen am N-Terminus aber zu katalytisch inaktiven Varianten führt. Dies scheint bei Calmodulin zumindest nicht sehr stark ausgeprägt zu sein, da GFP-markierte Varianten als Calciumsensoren dienen (Miyawaki et al, 1997). Die Kopplung an ein GFP kann durch die Größe des GFPs zwar leicht eine Protein-Protein-Interaktion stören, hat aber scheinbar keinen Einfluss auf die Bindung von Ionen. Des Weiteren könnte eine zu starke Überexpression des Donors zu einem missglückten Akzeptor-Photobleichen führen, und die Wahl des Filtersets der Apparatur spielt eine wichtige Rolle (zum Zeitpunkt der Messungen wurde noch bei 500 nm für YFP gebleicht, was bei dem verwendeten Filter allerdings ebenfalls zum Bleichen des Donors führen konnte und so den Anstieg der Donorfluoreszenz verschleiern könnte).

Auch die Methode der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie brachte keine verwertbaren Ergebnisse. Ein großer Nachteil dabei war die starke Assoziation von Alexa-Fluor-488-markiertem Calmodulin an die Oberfläche der Messkammern, die auch durch verschiedene Beschichtungsreagenzien oder Zusatz von Detergentien nicht aufgehoben werden konnte. So war zum einen die Bestimmung der wahren Calmodulin-Konzentration in der Kammer nicht möglich, zum anderen zeigte Calmodulin bei den Messungen die Tendenz zur Agglomeratbildung. Ein weiterer Nachteil dieser Methode bestand darin, dass die experimentellen Bedingungen, unter denen die inhibitorische Potenz von Calmodulin gemessen wurde, nicht nachgestellt werden konnte, da dafür zu große Mengen an fluoreszentelem Calmodulin notwendig gewesen wären, die das System in eine Sättigung brachten. Ein „Verdünnen“ des Messansatzes mit ungelabeltem Calmodulin verhinderte interessanterweise aber jegliche Assoziation zwischen GRK2 und Calmodulin.

Eine weitere gebräuchliche Methode der Interaktionsmessung ist die Methode der Oberflächenplasmonresonanz (Biacore). Hier bestand das Problem, dass der experimentelle Aufbau zwar funktionell zu sein schien, da die bekannte Interaktion von GRK2 mit G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten nachvollzogen werden konnte, das erhaltene Signal aber zu schwach war, um die Interaktion mit dem kleinen und niederaffinen Partner Calmodulin zu demonstrieren. Ein Grund für

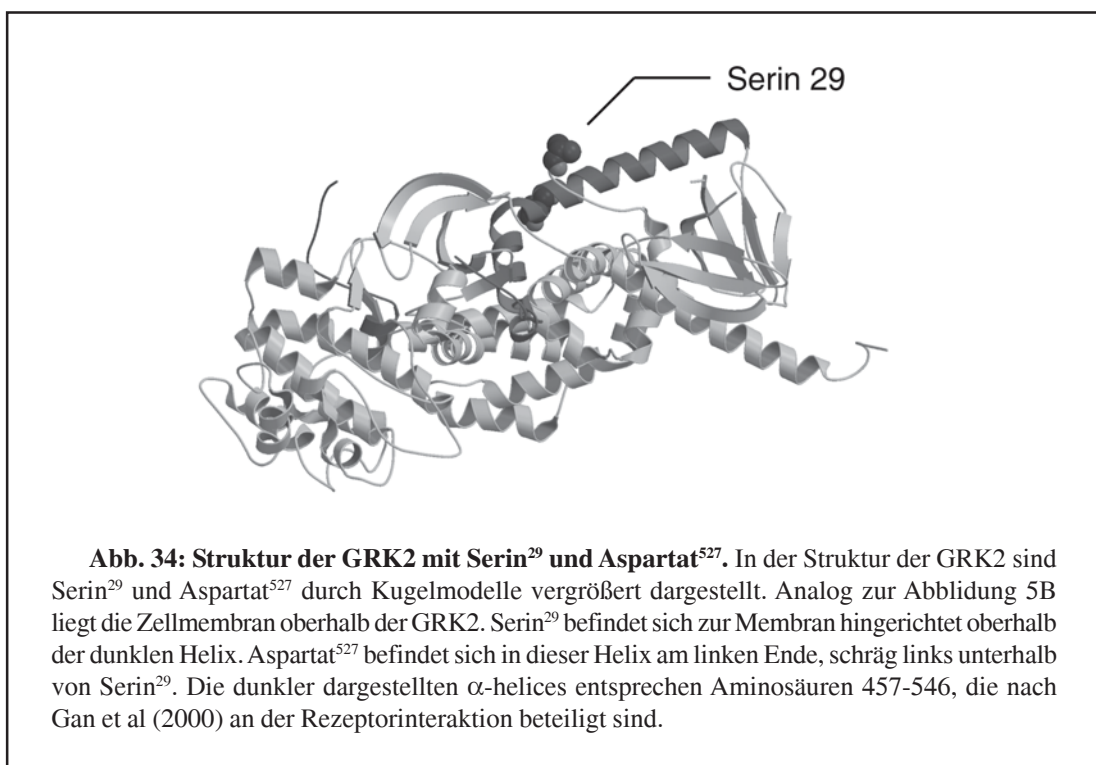
die geringe Signalstärke lag in der geringen Menge an GRK2, die sich spezifisch auf den Messchip koppeln ließ. Die umgekehrte Möglichkeit, direkt Calmodulin auf den Chip zu koppeln und so das Signal durch die wesentlich größere Massenzunahme zu verstärken, wurde bereits von Levay et al (1998) durchgeführt. Dabei wurden Affinitäten von 40 nM für die GRK2-Calmodulin-Interaktion gemessen, die sich deutlich von der halbmaximalen Hemmkonzentration von 1,6 μ M unterscheiden. Dies mag darin begründet sein, dass die Messung hier in einem zweidimensionalen, artifiziellen System stattfindet.

Bereits frühere Arbeiten zeigten, dass es zwei Bindungsstellen für Calmodulin auf der GRK2 gibt, die unabhängig voneinander sind (Levay et al, 1998). Ein Sequenzvergleich von GRK2 gegen bekannte Bindungsmotive von Calmodulin auf Proteinen ergab zwei mögliche Interaktionsstellen. Diese stimmen allerdings nicht mit den bekannten Bindungsmotiven überein, sondern beruhen auf Homologie zu nicht klassifizierten Bindungsstellen. Zum einen handelt es sich dabei um einen Bereich auf dem N-Terminus von Aminosäure 24-31, zum anderen um ein C-terminales Motiv, das die Aminosäuren 612-632 umfasst (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html> „Calmodulin Target Database“ (Yap et al, 2000)). Die Ergebnisse der Interaktionsmessung zwischen dansyliertem Calmodulin und GRK2 bestätigen diese Befunde. Sehr überraschend war dabei allerdings die Calcium-unabhängige Bindung von Calmodulin an den C-Terminus der GRK2, die sich auch im Holoenzym wieder findet. Da die Hemmung wie bereits erwähnt strikt calciumabhängig verläuft, scheint diese Interaktion per se keinen Einfluss auf die katalytische Funktion der GRK2 zu haben. Calmodulin unterliegt allerdings einer starken konformationellen Änderung nach Calciumbindung, so dass es durchaus möglich wäre, dass die C-terminale GRK2-Calmodulin-Interaktion erst nach Bindung an Calcium inhibitorisch bedeutsam wird. Dagegen spricht aber, dass die Affinitäten von Calmodulin für Calcium deutlich höher sind als die für die Inhibition benötigten Calciumkonzentrationen. Anders sieht es bei der N-terminalen Interaktion aus. Diese ist calciumabhängig und lässt sich auf den Bereich der ersten 53 Aminosäuren kartieren. Dies ist der gleiche Bereich, für den auch die Bindungsstelle des Recoverins auf der GRK1 kartiert werden konnte (Levay et al, 1998).

2 Regulation durch Phosphorylierung mit PKC

Ausgangspunkt dieses Teils der Arbeit war die Beobachtung, dass es nach Stimulation des G_q -gekoppelten α_{1B} -Adrenorezeptors zu einer verstärkten Aktivierung und Membrantranslokation der GRK2 kommt. Dieser Effekt ließ sich auch beobachten, wenn PKC im Zytosol von Zellen direkt durch Phorbolster stimuliert wurde (Winstel et al, 1996). GRK2 besitzt nach ihrer Sequenz ungefähr 28 Konsensusstellen für PKC-Phosphorylierung. PKCs lassen sich in drei Unterfamilien unterteilen: Die so genannten klassischen PKCs, zu denen α , γ und alle β -Isoformen gehören, lassen sich nur DAG- und calciumabhängig aktivieren, die „neuen“ PKCs (δ , ϵ , η , θ , μ) sind nur DAG-abhängig in ihrer Aktivierung und die atypischen PKCs, zu denen die Isoformen ξ und τ gehören, lassen sich weder von Calcium noch von DAG stimulieren. Die Isoformen sind allerdings nicht alle gleich in ihrer Eigenschaft, GRK2 zu phosphorylieren. Als kompetenteste Isoformen zeigten sich hierbei PKC α und δ (Winstel et al, 1996).

Durch HPLC-MS und zweidimensionales Phosphopeptidmapping konnte gezeigt werden, dass PKC nur eine einzige der möglichen Phosphorylierungsstellen auf nativer GRK2 zu phosphorylieren vermag. Diese Phosphorylierungsstelle konnte in diesen Vorarbeiten auf Serin²⁹ im N-Terminus der GRK2 lokalisiert werden (Krasel et al, 2001). Eine Darstellung der Phosphorylierungsstelle in der Struktur der GRK2 zeigt Abbildung 34. Frühere Befunde, bei denen von einer Phosphorylierungsstelle im C-Terminus der GRK2 ausgegangen wurde (Winstel et al, 1996), sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass dabei Phosphorylierungsversuche mit GST-Fusionsproteinen der einzelnen GRK2-Domänen unternommen wurden. Dabei kann es möglich sein, dass durch die Verkürzung und eine mögliche andere Faltung des Proteins eine PKC-Konsensusstelle für Phosphorylierungen freigelegt wird, die im Holoenzym für die Kinase nicht zugänglich ist.



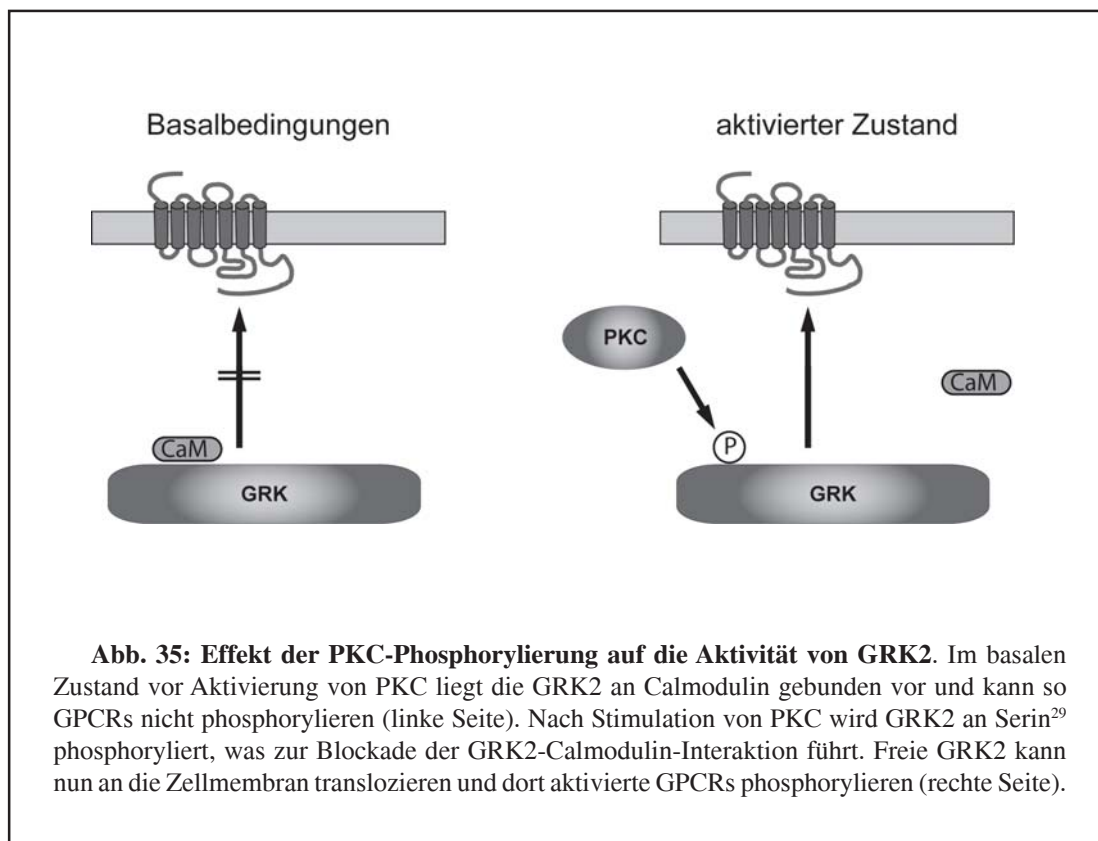
Versuche mit gereinigten Proteinen konnten die *in-vivo*-Befunde einer gesteigerten GRK2-Aktivität nicht bestätigen. Wurde GRK2 *in vitro* mit PKC phosphoryliert, so zeigte sich keine veränderte Aktivität gegenüber Rhodopsin als Substrat. Der Versuch, den Einfluss der Phosphorylierung auf die Aktivierung bzw. die Translokationsgeschwindigkeit mittels FRET zu messen, war leider nicht erfolgreich. Bei dieser Methode wäre es zusätzlich noch möglich gewesen, die Kinetik der GRK2-Rezeptorinteraktion zu studieren. Der Grund des fehlenden FRET-Signals bei der GRK2-Rezeptorpaarung könnte in der erwartungsgemäß recht kurzen Interaktionszeit der beiden Proteine liegen. Anders als bei der Arrestin-Rezeptorinteraktion sollte die GRK2 nur sehr kurz mit dem Rezeptor interagieren, um möglichst viele Rezeptoren pro Zeiteinheit phosphorylieren zu können. Hasbi et al (2004) konnten dieses Problem umgehen, indem sie statt des hier verwendeten FRET die verwandte Methode des Biolumineszenz-Resonanzenergietransfers (BRET) verwendeten. Dabei dient eine Variante des Renilla-Luziferase mit ihrem Substrat Coelenterazin als Donor und wiederum

YFP als Akzeptor. Der Vorteil dieser Methode gegenüber FRET ist, dass sie Interaktionen sensitiver nachweisen kann, da hierbei nicht einzelne Zellen, sondern gleich viele Zellen auf einmal vermessen werden. Außerdem trägt zur Erhöhung der Sensitivität die Tatsache bei, dass bei BRET im unassozierten Zustand der Partner keinerlei Signal gibt, so dass sich auch kleine Signale zweifelsfrei messen lassen. Der Nachteil ist die vergleichsweise geringe zeitliche Auflösung. So konnten die Autoren die Geschwindigkeit der Interaktion auf unter fünf Sekunden einschränken, aber keine exakte Aussage über die Geschwindigkeitskonstante machen. Dennoch liegt die gemessene Zeit im Rahmen der Erwartungen, da sie deutlich schneller als die Geschwindigkeitskonstante der rezeptorvermittelten Arrestintranslokation ist. Eine Möglichkeit, den Nachteil der fehlenden zeitlichen Genauigkeit zu umgehen, wäre eventuell der Versuch, bei der FRET-Messung statt der Wildtyp-GRK2 eine dominant-negative Variante einzusetzen, die durch Punktmutation nicht mehr mit ATP interagieren kann und so keine Phosphatgruppen mehr übertragen kann. Eine solche Mutante könnte womöglich länger mit dem Substrat (GPCR) interagieren und so die FRET-Detektion ermöglichen. Allerdings sind dann natürlich Dissoziationsmessungen nicht mehr möglich.

Als Ursachen der beobachteten zellulären Aktivitätssteigerung von GRK2 nach PKC-Aktivierung können demnach mehrere Mechanismen in Frage kommen. Da die Phosphorylierung der GRK2 durch PKC keinen direkten aktivitätssteigernden Effekt hatte, könnte sie die Affinität der Kinase für stimulierende Faktoren erhöhen oder für hemmende Faktoren senken. Außerdem ist auch eine Phosphorylierung von sekundären Stoffen durch die PKC denkbar, in deren Folge es zu einer gesteigerten Affinität oder einer verminderten Hemmung der GRK2 kommt.

Für Calmodulin als inhibitorischen Faktor konnte in dieser Arbeit als Interaktionsstelle mit der GRK2 ein Bereich in deren N-Terminus ausgemacht werden, in dem auch die gefundene Phosphorylierungsstelle der PKC auf GRK2 liegt. Einen weiteren Hinweis auf die Regulation der GRK2-Calmodulin-Interaktion durch PKC ergab sich aus der geringeren Menge an Calmodulin, die mit GRK2 assoziiert vorkam (Bestimmung durch Co-Immunpräzipitation), wenn PKC im Zellzytosol stimuliert wurde. Gereinigte GRK2, die mit PKC phosphoryliert worden war, konnte von Calmodulin nicht mehr gehemmt werden. So ist als wahrscheinlicher Mechanismus der Aktivitätssteigerung der GRK2 im Zytosol nach PKC-Phosphorylierung eine verminderte Hemmung der GRK2 durch Calmodulin anzusehen (siehe Abbildung 35). Ein ähnlicher Mechanismus der funktionellen Wechselwirkung zwischen PKC und Calmodulin konnte schon für Ras in Fibroblasten gefunden werden. Auch hier vermochte die Phosphorylierung durch PKC die Inhibition durch Calmodulin von Ras aufzuheben (Villalonga et al, 2002).

Die genannten Ergebnisse deuten auf die N-terminale Bindungsstelle für Calmodulin auf GRK2 als die funktionell wichtige Interaktionsstelle hin, da sich dort die Phosphorylierungsstelle für PKC befindet und nur der N-Terminus calciumabhängig mit Calmodulin interagiert. Weitere Befunde bestärken diese Vermutung. So vermag ein N-terminales GST-Fusionsprotein der GRK2, das die Aminosäuren 1-53 umfasst, wie gezeigt Calmodulin calciumabhängig zu binden. Ein homologes Protein, bei dem die PKC-Phosphorylierung durch Austausch von Serin²⁹ zu Aspartat imitiert wird, zeigt eine deutlich verminderte Calmodulinbindung. Generell lassen sich bei den Bindungsstudien



mit dansylierten Proteinen die Werte der relativen Anstiege der Fluoreszenz über Basalwerte nicht direkt mit Affinitäten gleichsetzen, da die Fluoreszenzänderung sehr stark von der Natur des interagierenden Proteins und damit der Änderung der Solvatumgebung abhängt. In diesem Fall unterscheiden sich die beiden Proteine aber nur in einer Aminosäure, so dass von gleich bleibenden Solvathüllen ausgegangen werden kann und die Fluoreszenzanstiege direkt miteinander verglichen werden können. Schaut man sich die Lage von Serin²⁹ in der Struktur der GRK2 an, so ist zu erkennen, dass es an der Grenzfläche zwischen GRK2 und Membran zu finden ist (siehe Abb. 34). Bei einer Bindung von Calmodulin an oder um diese Stelle ist es durchaus wahrscheinlich, dass die Kinase nicht korrekt an die Plasmamembran translozieren kann und so einer der Schritte für die Aktivierung der Kinase in bezug auf Rezeptoren fehlt. Die Phosphorylierung der GRK2 erzeugt einen relativ großen und voluminösen sauren Rest, der die Bindung des an sich sauren Proteins Calmodulin an diese Stelle zu stören scheint. Dies ist umso wahrscheinlicher, da einige der bevorzugten Bindungspartner von Calmodulin, die so genannten MARCKs, eine größere Anzahl an basischen Aminosäuren (Lysin) enthalten (Rhoads und Friedberg, 1997; Yamauchi et al, 2003).

Ein direkter Effekt der Bindung von Calmodulin an die GRK2 und somit ursächlich für die daraus resultierende Inhibition der Kinase könnte auch eine gestörte Interaktion der Calmodulin-gebundenen Form der GRK2 mit G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten sein. Als ein Beweis für diesen Mechanismus lässt sich die Beobachtung heranziehen, dass bei steigenden Konzentrationen an G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten die halbmaximale Hemmkonzentration an Calmodulin ansteigt, es kommt

zu einer Rechtsverschiebung der Inhibitionskurve (siehe Abbildung 21). Wie bereits erwähnt wurde, scheint die Phosphorylierung der GRK2 mit PKC die Interaktion zwischen Calmodulin und der GRK2 zu stören. In Abbildung 5 erkennt man, dass sowohl der N-Terminus der GRK2 mit der Phosphorylierungsstelle der PKC und der postulierten Calmodulin-Bindungsdomäne als auch der C-Terminus mit der Bindungsstelle für G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten zur Membran zeigen und sich in unmittelbarer räumlicher Nähe befinden. Außerdem konnte noch eine zweite Bindungsstelle für G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten auf dem N-Terminus der Kinase nachgewiesen werden (Eichmann et al, 2003). Eine Bindung eines Proteins wie Calmodulin in der Nähe dieser Motive kann wahrscheinlich die gleichzeitige Bindung von G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten stören, was eine gestörte Aktivierung der GRK2 in bezug auf membranständige Substrate und eine daraus resultierende verminderte Membrantranslokation der GRK2 zur Folge hat. Die Hemmung der GRK2 durch Calmodulin ist in dem geschilderten Fall nicht kompetitiv in bezug auf die Rezeptorphosphorylierung, da auch eine erhöhte Konzentration an Substrat nicht zu einer gesteigerten Aktivierung der GRK2 führt (siehe Abbildungen 14 und 15). Kompetitiv ist die Inhibition allerdings in bezug auf die Konzentration an G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten, da hier ein Anstieg der Konzentration Calmodulin aus der Bindung an die GRK2 verdrängt und so zu einer gesteigerten Aktivität der GRK2 führt.

Ein weiterer Nachweis für den dargelegten Mechanismus ist die in Abbildung 33 gezeigte deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve, wenn statt GRK2-Wildtyp eine Mutante der GRK2 verwendet wird, bei der die Phosphorylierung der GRK2 mit PKC imitiert wird (Austausch Serin²⁹ der GRK2 gegen Asparaginsäure). Dabei zeigt sich bei physiologischen Konzentrationen an Calmodulin (ca. 10 μ M) eine fast vollständige Hemmung des Wildtyps der GRK2, wohingegen die Mutante bei diesen Konzentrationen noch fast vollständig aktiv ist. Die in diesem Versuch vorliegenden Konzentrationen an G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten sind mit 100 nM relativ niedrig.

Funktionelle Bedeutung dürfte dieser Mechanismus vor allem in Zellen mit niedrigen Konzentrationen an G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten haben, da hier die Hemmung der GRK2 durch Calmodulin eine deutliche Auswirkung auf die Aktivität der Kinase haben dürfte. In Zellen mit hohen Konzentrationen an G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten dagegen könnte Calmodulin kompetitiv aus der Bindung an die GRK2 verdrängt werden und so nur noch eine geringe hemmende Wirkung haben. Zusätzlich würde die Regulation dieser Inhibition durch die Phosphorylierung der GRK2 mit PKC einer Art negativem Rückkopplungsmechanismus gleichkommen, da G_q -gekoppelte Rezeptoren die Aktivität der PKC erhöhen. Dies führt somit ebenfalls zu einer gesteigerten GRK2-Aktivität, was wiederum in einer verstärkten Desensibilisierung von Rezeptoren mündet. Beobachtet wurde dieser Effekt z.B. in T-Lymphozyten oder in mononukleären Leukozyten, bei denen jeweils nach Stimulation der PKC durch PMA eine verstärkte GRK2-Aktivität gemessen werden konnte (Chuang et al, 1995; De Blasi et al, 1995).

Eine weitere Möglichkeit der Inhibition der GRK2 durch Calmodulin ist die direkte Interaktion von Calmodulin mit G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten (Katada et al, 1987; Liu et al, 1997). Dadurch würden die zur Aktivierung der GRK2 benötigten G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten durch Calmodulin weggefangen, was ebenfalls zu einer Hemmung der GRK2 führen würde. Auch diese Hemmung wäre durch Erhöhung der Konzentration an G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten aufzuheben und spezifisch

für membranständige Substrate. Allerdings ist die beobachtete Regulation durch die Phosphorylierung mit PKC bei diesem Mechanismus nicht erklärbar. Liu et al (1997) haben versucht, Regionen und Aminosäuren auf den G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten genauer zu kartieren, die für die Interaktion mit Calmodulin verantwortlich sind. Erstaunlicherweise liegen alle für die Interaktion mit der G-Protein β -Untereinheit gefundenen Aminosäuren nicht in der Nähe der GRK2-G-Protein- β -Untereinheit-Bindungsstelle, was ebenfalls gegen eine direkte Interaktion von GRK2 und G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten als Ursache für die Calmodulin-vermittelte Hemmung der GRK2 sprechen würde. Allerdings wurden diese Versuche mit Mutanten aus *in-vitro*-Translationen durchgeführt, für die eine Funktionskontrolle fehlt.

Für die genauere Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Hemmung der GRK2 durch Calmodulin könnten Mutanten der GRK2 hilfreich sein, die nicht mehr an Calmodulin binden und so Veränderungen zum Wildtyp aufzeigen. Außerdem könnten Peptide zum Einsatz kommen, die Calmodulin durch Bindung inaktivieren. Ein Beispiel hierfür wäre das „calmodulin binding peptide“, das durch Bindung an Calmodulin eine Interaktion mit anderen Bindungspartnern verhindert. Dieses Peptid stellt die bekannte Bindungsstelle von Calmodulin auf der Myosin-leichte-Kettinkinase (MLCK) dar. Durch Überexpression und anschließender Untersuchung von GRK2-Aktivität oder GRK2-abhängigen Signalwegen ließen sich Aussagen zur Relevanz der calmodulinvermittelten Inhibition im jeweiligen Zelltyp oder Gewebe machen.

Des weiteren erscheint es von besonderem Interesse, die genaue Bindungsstelle von Calmodulin auf GRK2 zu kartieren. Dies könnte vor allem für die Entwicklung neuer Hemmstoffe der Kinase von Bedeutung sein. Stoffe, die ähnlich wie Calmodulin die GRK2 inhibieren, wären im Gegensatz zu allgemeinen Kinaseinhibitoren selektiv gegenüber der Phosphorylierung von GPCRs und würden somit gezielt die Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung beeinflussen. Außerdem könnten durch die stark unterschiedlichen Affinitäten der einzelnen GRKs eventuell subtypselektive Inhibitoren gefunden werden.

V Zusammenfassung

Die Signalwege in Zellen unterliegen vielfältigen Regulationen. So werden z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) nach Aktivierung wieder abgeschaltet. Dies geschieht im Falle der so genannten homologen Desensibilisierung durch spezifische Kinasen, den G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK). Diese vermögen nur die aktive Konformation des Rezeptors zu phosphorylieren, was die Affinität einer Proteinfamilie, den Arrestinen, an den Rezeptor erhöht. Durch Bindung von Arrestin an den Rezeptor kommt es zu einer Abschaltung des Rezeptorsignals.

In dieser Arbeit wurden dabei zwei Aspekte der GRK2-Regulation näher untersucht. Zum einen wurde die Inhibition der GRK2-Aktivität durch Calmodulin näher betrachtet, zum anderen die Regulation der GRK2 durch Phosphorylierung mit Proteinkinase C (PKC).

Den sieben bekannten Isoformen der GRKs stehen mehrere hundert verschiedene Rezeptoren gegenüber. Daher muss die Spezifität der Abschaltmechanismen noch durch weitere regulatorische Eingriffe gewährleistet sein. Eine weit verbreitete Möglichkeit der Regulation ist die Phosphorylierung, eine andere die Regulation durch Interaktion. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte für die GRK2 eine Phosphorylierung durch Proteinkinase C an Serin²⁹ bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung per se keinen Einfluss auf die Aktivität der Kinase hat, aber die Hemmung der GRK2 durch ein anderes Protein, Calmodulin, verhindern kann. Calmodulin hemmt die Aktivität der GRK2 calciumabhängig. GRK2 und Calmodulin liegen in der Zelle in einem Komplex vor, wie Co-Immunpräzipitationsversuche zeigen konnten. Dieser Komplex ist sensitiv auf die Aktivierung von PKC. Die Hemmung der GRK2 durch Calmodulin ist spezifisch für membranständige Substrate der GRK2 wie den GPCRs. Die Phosphorylierung eines löslichen Substrates, des Tubulins, wird durch Calmodulin nicht inhibiert. Die Phosphorylierung von Tubulin ist unabhängig von G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten und geschieht an denselben Stellen, die auch Caseinkinase II und GRK5 auf Tubulin phosphorylieren. Da die Phosphorylierung von Tubulin durch diese drei Kinasen keinen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften von Tubulin hat, scheint sie als eine Art Puffer zu fungieren, um die Zelle vor ungewollten Phosphorylierungen zu schützen.

Die Inhibition der GRK2 durch Calmodulin verläuft zwar auf funktioneller Ebene strikt calciumabhängig, dennoch können die beiden Proteine auch calciumunabhängig miteinander interagieren. Die calciumunabhängige Bindungsstelle für Calmodulin liegt dabei im C-Terminus der GRK2. Eine weitere Bindungsstelle für Calmodulin auf der GRK2 befindet sich dagegen in deren N-Terminus. Hier interagiert Calmodulin calciumabhängig.

Wird GRK2 durch PKC an Serin²⁹ phosphoryliert, so verliert die GRK2 an Affinität zu Calmodulin. Ein N-terminales Konstrukt der GRK2, das durch Austausch des Serin an Position 29 zu Asparaginsäure die Phosphorylierung mit PKC imitiert, zeigt eine deutlich geringere Interaktion mit Calmodulin.

Diese Beobachtung spiegelt sich auch auf funktioneller Ebene wider. Eine Mutante der GRK2, die ebenfalls die PKC-Phosphorylierung imitiert, zeigt eine rechtsverschobene Konzentrations-Wirkungskurve der Calmodulin-vermittelten Inhibition der Kinase.

Durch die Bindung von Calmodulin an die GRK2 kommt es zu einer gestörten Aktivierbarkeit der Kinase. Die Bindung von Calmodulin interferiert mit der zur Aktivierung der GRK2 benötigten G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Dies zeigt sich vor allem dadurch, dass steigende Mengen an G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten die Inhibition der GRK2 durch Calmodulin abschwächen können.

Gestützt auf diese Befunde und dass nur die N-terminale Bindungsstelle von Calmodulin auf der GRK2 wie die Inhibition selbst calciumabhängig ist, scheint die Bindung von Calmodulin an den N-Terminus der GRK2 verantwortlich für die Inhibition der Kinase zu sein. Mechanistisch liegt die Hemmung in einer gestörten Aktivierbarkeit der Kinase, die sich hauptsächlich auf eine verringerte Interaktion mit den für die Aktivierung notwendigen G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten zurückführen lässt. Da eine Aktivierung der PKC in Zellen u.a. durch G_q -gekoppelte Rezeptoren ausgelöst werden kann, ist der hier dargestellte Mechanismus vergleichbar mit einer negativen Rückkopplung, da es durch die GPCR-vermittelte gesteigerte PKC-Aktivität zu einer verstärkten GRK-Aktivität kommt. Auf Grund der Sensitivität der Inhibition auf G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten, dürfte sie vor allem in Zellen mit geringen Konzentrationen an G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten eine Rolle spielen.

VI Summary

Signalling pathways in cells are subject to various regulatory mechanisms. For example the deactivation of G-protein-coupled receptors (GPCR) after agonist exposure is triggered by two families of kinases. G-protein-coupled receptor kinases (GRK) are responsible for the homologous desensitization of GPCRs. These kinases only phosphorylate GPCRs in the agonist-activated conformation. After phosphorylation the binding-affinity of the receptor to another class of proteins, arrestins, is increased. Through binding to arrestin the receptor becomes uncoupled from its G-protein and the signal is switched off.

Central to this work are two aspects of GRK activity and regulation. At first the inhibition of GRK2-activity by calmodulin was studied. After this the regulation of GRK2 by phosphorylation with protein kinase C (PKC) was investigated.

Even though the family of GPCRs consists of several hundreds of different receptors only seven isoforms of GRKs are identified. Therefore the deactivation has to underlie other regulatory mechanisms to guarantee specificity for various receptors and signals. A common possibility of such regulation is phosphorylation, a second is regulation by interaction. Previous results could demonstrate that protein kinase C can phosphorylate GRK2 at serine²⁹. In this work it could be shown that this phosphorylation itself has no effect on the activity of GRK2 rather than prevents GRK2 to be inhibited by another protein, calmodulin. The inhibitory effect of calmodulin towards GRKs is calcium-dependent. By co-immunoprecipitation it could be shown that GRK2 and calmodulin form a complex in cells and that this complex is sensitive to PKC activation. Inhibition of GRK2 by calmodulin is specific for membrane-bound substrates like GPCRs. Therefore phosphorylation of a soluble substrate of GRK2, tubulin, is not inhibited by calmodulin. Phosphorylation of tubulin by GRK2 is independent of G-protein- $\beta\gamma$ -subunits and occurs at the same site which is also used by casein kinase II and GRK5 to phosphorylate tubulin. As the phosphorylation by either kinase has no effect on the functional properties of tubulin, it is likely that it acts as a buffer to protect the cell against random phosphorylation by these kinases.

Although the inhibition of GRK2 by calmodulin is strictly calcium-dependent on the functional basis, both proteins could also interact in a calcium-independent manner. Two binding sites for calmodulin on GRK2 could be identified. The calcium-independent binding site is on the C-terminus of the kinase. In contrast, the N-terminal binding site interacts strictly calcium-dependent.

As a result of the phosphorylation by PKC at serine²⁹ GRK2 loses its affinity towards calmodulin. This is demonstrated by a N-terminal construct of GRK2 that shows a markedly reduced interaction with calmodulin after replacing serine²⁹ with aspartic acid to mimic PKC-phosphorylation. The same mutation placed in the full-length GRK2 results in a right shift of the concentration-response-curve of the calmodulin-mediated inhibition of GRK2.

Binding of calmodulin to GRK2 leads to an impaired activation of the kinase, as binding of calmodulin interferes with the binding of G-protein- $\beta\gamma$ -subunits, which are necessary for proper activation of GRK2 towards membrane-bound substrates. This is supported by the fact that increasing amounts of G-protein- $\beta\gamma$ -subunits attenuate calmodulin-mediated inhibition of GRK2.

Based on these observations and the fact that only the N-terminal binding site of calmodulin on GRK2, like the inhibition itself depends on the presents of calcium, the functional relevant binding site of calmodulin on GRK2 seems to be the one at the N-terminus. Mechanistically, this is due to an impaired activation of the kinase, mainly because of a reduced interaction with G-protein- $\beta\gamma$ -subunits. As the activation of PKC in cells is triggered for instance by G_q -coupled receptors, the mechanism of GRK2-regulation shown here can be compared with a negative feedback loop. The activation of PKC by GPCRs results in an increased activation of GRK2 which in turn desensitizes the receptor. This mechanism might play a role mainly in cells with low levels of G-protein- $\beta\gamma$ -subunits as the inhibition is sensitive to increasing concentrations of G-protein- $\beta\gamma$ -subunits.

Anhang A: Abkürzungsverzeichnis

AA/Bis	Mischung aus Acrylamid und Bis-Acrylamid
AC	Adenylylcyase
AR	Adrenorezeptor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β -ARK1	β -adrenerge Rezeptorkinase1, GRK2
β -ARK2	β -adrenerge Rezeptorkinase2, GRK3
β -Arr	β -Arrestin
BBS	BES-gepufferte Salzlösung (BES buffered saline)
BES	(N,N-bis-[2-Hydroxyethyl])-2-aminethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenzresonanzenergietransfer
BSA	bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	zu einer Boten-RNA komplementäres DNA-Stück (complementary DNA)
CFP	cyan fluoreszierendes Protein (cyan fluorescent protein)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO-Zellen	Zellen aus den Ovarien des chinesischen Hamsters(chinese hamster ovary cells)
COS-Zellen	CV1 Origin SV40 (Affennierenzelllinie CV1, die mit dem SV40-Virus transformiert wurde)
C-Terminus	Carboxyterminales Ende eines Proteins
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate (Mischung der vier verschiedenen Nucleotide dATP, dCTP, dGTP, dUTP)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylentetraessigsäure, Dinatriumsalz
EGTA	[Ethylen-bis(oxyethylennitrilo)]tetraessigsäure, Dinatriumsalz
ERK1/2	extrazellulär-regulierte Proteinkinase 1/2 (extracellular regulated protein kinase)
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
Flag	Flag-Tag, Tag mit der Sequenz DYKDDDDK
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
g	Zentrifugalkraft (Erdbeschleunigung, gravity)
G_s , G_q , G_i	verschiedene Subtypen der G-Protein α -Untereinheit
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
G-Proteine	Guanosintriphosphat-bindende Proteine
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (G-protein-coupled receptor)
GPRK	GRK aus <i>Drosophila melanogaster</i>

GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GRK2	humane GRK2
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
HIS (6)	HIS-Tag, sechs Histidine in Reihenfolge
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography) mit einer Massenspektrometrie als Detektor
Hsp90	Hitzeschockprotein 90 (heat shock protein 90)
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, bei der die Aktivität des gehemmten Proteins nur noch die Hälfte des Maximalwertes erreicht
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Konstante
KO-Maus	Knockout-Maus; Mäuse, denen ein Gen funktionell zerstört wurde
MAPkinase	Mitogenaktivierte Proteinkinase (mitogen activated protein kinase)
MLCK	Myosin-leichte-Kettekinase (myosin light chain kinase)
mRNA	Boten-RNS (messenger RNA)
N-Terminus	Aminoende eines Proteins
OD	optische Dichte, Lichtdurchlässigkeit einer Bakterienkultur bei 600 nm
PBS(-T)	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline) (- mit Zusatz von Tween 20)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PTH	Parathormon
PTHR	Parathormonrezeptor
RGS	Regulator des G-Proteinsignals (regulator of G-protein signalling)
RK	Rhodopsinkinase (GRK1)
RKIP	Raf-Kinaseinhibitorprotein (Raf-kinase inhibitor protein)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	Stäbchenaußensegmente (rod outer segments)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	mittlerer Standardfehler (standard error or mean)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG-Maus	transgene Maus; Mäuse, die ein Gen künstlich überexprimieren
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	untranslatierte Region
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)

Anhang B: Molekulare Eigenschaften der GRKs

Molekulare Eigenschaften der GRKs

Eigenschaft	GRK1	GRK2	GRK3	GRK4	GRK5	GRK6	GRK7
Molekulargewicht ¹	62933	79463	79803	66464	67786	66074	62211
Aminosäuren	561	689	688	578	590	576	548
N-Terminus ²	186	190	190	186 (154)	185	185	190
katalytische Domäne	266	263	263	264	263	263	264
C-Terminus ²	109	236	235	128 (82)	142	128	94
Peptidsubstrat	N-terminal sauer	N-terminal sauer	N-terminal sauer	?	neutral > sauer	neutral > sauer	?
Autophosphorylierung	+++ ³	+	+	?	+++ ⁴	+	?
kovalente Modifizierung	Farnesylierung	?	?	Palmitoylierung	?	Palmitoylierung	Farnesylierung
Aktivatoren/Kofaktoren	Polykationen	G β γ Untereinheiten, PIP ₂ , PS, PA, PG, PI, PE	G β γ Untereinheiten, PIP ₂ , PS, PA, PG, PI, PE	PIP ₂	Polykationen, PIP ₂	Polykationen, PIP ₂	Polykationen?
Chromosomale Lokalisation ⁵	13q34	11q13	22q11	4p16.3	10q24-qter	13pter-q21 3p35	3q21

¹längste Spliceform mit Ausnahme der GRK6. Hier gibt es eine 589 AS lange und 67093 kDa große Spliceform, die aber noch nicht näher charakterisiert wurde.

²in Klammern sind die Domänen der publizierten Spliceformen angegeben.

³Die Autophosphorylierung scheint die Stabilität der aktiven Form der GRK1 zu beeinflussen. Nach Mutation der Autophosphorylierungsstellen beginnt die Rho-Phosphorylierung an anderen AS. Von Palczewski und Koatoren wird vermutet, daß die Autophosphorylierung die Dissoziation (k_{off}) von Rho*-P und GRK1 erleichtern soll.

⁴Die GRK5 zeigt eine autophosphorylierungsabhängige Aktivität. Substitution von S⁴⁶⁴ und T⁴⁸⁵ durch Alanin beseitigt nicht nur die Auto- sondern auch die Rezeptor-phosphorylierung.

⁵Siehe die Arbeiten von (Ambrose et al., 1993; Benovic et al., 1991; Bullrich et al., 1995; Calabrese et al., 1994; Haribabu und Synderman, 1993; Khani et al., 1996; Chen et al., 2001). Für GRK6 konnte ein prozessiertes Pseudogen gefunden werden, das auf Chromosom 13 lokalisiert ist (Gagnon und Benovic, 1997).

Bibliographie

Ambrose, C., M. James, G. Barnes, C. Lin, G. Bates, M. Altherr, M. Duyao, N. Groot, D. Church, J. J. Wasmuth and et al. (1992). "A novel G protein-coupled receptor kinase gene cloned from 4p16.3." *Hum Mol Genet* 1, 697-703.

Arriza, J. L., T. M. Dawson, R. B. Simerly, L. J. Martin, M. G. Caron, S. H. Snyder and R. J. Lefkowitz (1992). "The G-protein-coupled receptor kinases beta ARK1 and beta ARK2 are widely distributed at synapses in rat brain." *J Neurosci* 12, 4045-55.

Barrett, T. B., R. L. Hauger, J. L. Kennedy, A. D. Sadovnick, R. A. Remick, P. E. Keck, S. L. McElroy, M. Alexander, S. H. Shaw and J. R. Kelsoe (2003). "Evidence that a single nucleotide polymorphism in the promoter of the G protein receptor kinase 3 gene is associated with bipolar disorder." *Mol Psychiatry* 8, 546-57.

Benovic, J. L., A. DeBlasi, W. C. Stone, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1989b). "Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family." *Science* 246, 235-40

Benovic, J. L. and J. Gomez (1993). "Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family." *J Biol Chem* 268, 19521-7.

Benovic, J. L., F. Mayor, Jr., R. L. Somers, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1986a). "Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by beta-adrenergic receptor kinase." *Nature* 321, 869-72.

Benovic, J. L., F. Mayor, Jr., C. Staniszewski, R. J. Lefkowitz and M. G. Caron (1987). "Purification and characterization of the beta-adrenergic receptor kinase." *J Biol Chem* 262, 9026-32.

Benovic, J. L., J. Onorato, M. J. Lohse, H. G. Dohlman, C. Staniszewski, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1990). "Synthetic peptides of the hamster beta 2-adrenoceptor as substrates and inhibitors of the beta-adrenoceptor kinase." *Br J Clin Pharmacol* 30 Suppl 1, 3S-12S.

Benovic, J. L., J. J. Onorato, J. L. Arriza, W. C. Stone, M. Lohse, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1991). "Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family." *J Biol Chem* 266, 14939-46.

Benovic, J. L., L. J. Pike, R. A. Cerione, C. Staniszewski, T. Yoshimasa, J. Codina, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (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, 7094-101.

Benovic, J. L., W. C. Stone, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1989). "Inhibition of the beta-adrenergic receptor kinase by polyanions." *J Biol Chem* 264, 6707-10.

Benovic, J. L., R. H. Strasser, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1986b). "Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2797-801.

Bhatnagar, A., D. L. Willins, J. A. Gray, J. Woods, J. L. Benovic and B. L. Roth (2001). "The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT_{2A} receptors during endocytosis." *J Biol Chem* 276, 8269-77.

Boekhoff, I., J. Inglese, S. Schleicher, W. J. Koch, R. J. Lefkowitz and H. Breer (1994). "Olfactory desensitization requires membrane targeting of receptor kinase mediated by beta gamma-subunits of heterotrimeric G proteins." *J Biol Chem* 269, 37-40.

Boekhoff, I., S. Schleicher, J. Strotmann and H. Breer (1992). "Odor-induced phosphorylation of olfactory cilia proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11983-7.

Boekhoff, I., K. Touhara, S. Danner, J. Inglese, M. J. Lohse, H. Breer and R. J. Lefkowitz (1997). "Phosducin, potential role in modulation of olfactory signaling." *J Biol Chem* 272, 4606-12.

Bouvier, M., S. Collins, B. F. O'Dowd, P. T. Campbell, A. de Blasi, B. K. Kobilka, C. MacGregor, G. P. Irons, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1989). "Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level." *J Biol Chem* 264, 16786-92.

Brodde, O. E. (1993). "Beta-adrenoceptors in cardiac disease." *Pharmacol Ther* 60, 405-30.

Brown, N. G., C. Fowles, R. Sharma and M. Akhtar (1992). "Mechanistic studies on rhodopsin kinase. Light-dependent phosphorylation of C-terminal peptides of rhodopsin." *Eur J Biochem* 208, 659-67.

Buczylko, J., C. Gutmann and K. Palczewski (1991). "Regulation of rhodopsin kinase by autophosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2568-72.

Bullrich, F., T. Druck, P. Kunapuli, J. Gomez, K. W. Gripp, B. Schlegelberger, J. Lasota, M. Aronson, L. A. Cannizzaro, K. Huebner and et al. (1995). "Chromosomal mapping of the genes GPRK5 and GPRK6 encoding G protein-coupled receptor kinases GRK5 and GRK6." *Cytogenet Cell Genet* 70, 250-4.

Bünemann, M., M. Frank and M. J. Lohse (2003). "Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 16077-82.

Calabrese, G., M. Sallese, A. Stornaiuolo, E. Morizio, G. Palka and A. De Blasi (1994a). "Assignment of the beta-arrestin 1 gene (ARRB1) to human chromosome 11q13." *Genomics* 24, 169-71.

Calabrese, G., M. Sallese, A. Stornaiuolo, L. Stuppia, G. Palka and A. De Blasi (1994b). "Chromosome mapping of the human arrestin (SAG), beta-arrestin 2 (ARRB2), and beta-adrenergic receptor kinase 2 (ADRBK2) genes." *Genomics* 23, 286-8.

Cao, T. T., H. W. Deacon, D. Reczek, A. Bretscher and M. von Zastrow (1999). "A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor." *Nature* 401, 286-90.

Carman, C. V., M. P. Lisanti and J. L. Benovic (1999a). "Regulation of G protein-coupled receptor kinases by caveolin." *J Biol Chem* 274, 8858-64.

Carman, C. V., J. L. Parent, P. W. Day, A. N. Pronin, P. M. Sternweis, P. B. Wedegaertner, A. G. Gilman, J. L. Benovic and T. Kozasa (1999b). "Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2." *J Biol Chem* 274, 34483-92.

Carman, C. V., T. Som, C. M. Kim and J. L. Benovic (1998). "Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases." *J Biol Chem* 273, 20308-16.

Casas-Gonzalez, P., A. Ruiz-Martinez and J. A. Garcia-Sainz (2003). "Lysophosphatidic acid induces alpha1B-adrenergic receptor phosphorylation through G beta gamma, phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C and epidermal growth factor receptor transactivation." *Biochim Biophys Acta* 1633, 75-83.

Cassill, J. A., M. Whitney, C. A. Joazeiro, A. Becker and C. S. Zuker (1991). "Isolation of *Drosophila* genes encoding G protein-coupled receptor kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11067-70.

Chen, C. and H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol Cell Biol* 7, 2745-52.

Chen, C. K., M. E. Burns, M. Spencer, G. A. Niemi, J. Chen, J. B. Hurley, D. A. Baylor and M. I. Simon (1999). "Abnormal photoresponses and light-induced apoptosis in rods lacking rhodopsin kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3718-22.

Chen, C. K., J. Inglese, R. J. Lefkowitz and J. B. Hurley (1995). "Ca(2+)-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase." *J Biol Chem* 270, 18060-6.

Chen, C. K., K. Zhang, J. Church-Kopish, W. Huang, H. Zhang, Y. J. Chen, J. M. Frederick and W. Baehr (2001). "Characterization of human GRK7 as a potential cone opsin kinase." *Mol Vis* 7, 305-13.

Chen, C. Y., S. B. Dion, C. M. Kim and J. L. Benovic (1993). "Beta-adrenergic receptor kinase. Agonist-dependent receptor binding promotes kinase activation." *J Biol Chem* 268, 7825-31.

Chong, H., H. G. Vikis and K. L. Guan (2003). "Mechanisms of regulating the Raf kinase family." *Cell Signal* 15, 463-9.

Chuang, T. T., H. LeVine, 3rd and A. De Blasi (1995). "Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C." *J Biol Chem* 270, 18660-5.

Chuang, T. T., L. Paolucci and A. De Blasi (1996). "Inhibition of G protein-coupled receptor kinase subtypes by Ca²⁺/calmodulin." *J Biol Chem* 271, 28691-6.

Chuang, T. T., E. Pompili, L. Paolucci, M. Sallese, L. De Gioia, M. Salmona and A. De Blasi (1997). "Identification of a short sequence highly divergent between beta-adrenergic-receptor kinases 1 and 2 that determines the affinity of binding to betagamma subunits of heterotrimeric guanine-nucleotide-binding regulatory proteins." *Eur J Biochem* 245, 533-40.

Chung, C. T., S. L. Niemela and R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2172-5.

Clapham, D. E. (1995). "Calcium signaling." *Cell* 80, 259-68.

Cong, M., S. J. Perry, F. T. Lin, I. D. Fraser, L. A. Hu, W. Chen, J. A. Pitcher, J. D. Scott and R. J. Lefkowitz (2001). "Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79." *J Biol Chem* 276, 15192-9.

Cozier, G. E., J. Carlton, D. Bouyoucef and P. J. Cullen (2004). "Membrane targeting by pleckstrin homology domains." *Curr Top Microbiol Immunol* 282, 49-88.

Crowe, J. S., H. J. Cooper, M. A. Smith, M. J. Sims, D. Parker and D. Gewert (1991). "Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion." *Nucleic Acids Res* 19, 184.

Daaka, Y., L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz (1997a). "Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A." *Nature* 390, 88-91.

Daaka, Y., J. A. Pitcher, M. Richardson, R. H. Stoffel, J. D. Robishaw and R. J. Lefkowitz (1997b). "Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2180-5.

Danner, S., M. Frank and M. J. Lohse (1998). "Agonist regulation of human beta2-adrenergic receptor mRNA stability occurs via a specific AU-rich element." *J Biol Chem* 273, 3223-9.

Danner, S. and M. J. Lohse (1996). "Phosducin is a ubiquitous G-protein regulator." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10145-50.

Danner, S. and M. J. Lohse (1997). "Cell type-specific regulation of beta2-adrenoceptor mRNA by agonists." *Eur J Pharmacol* 331, 73-8.

De Blasi, A., G. Parruti and M. Sallese (1995). "Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. Selective increase of beta-adrenergic receptor kinase 1 and 2." *J Clin Invest* 95, 203-10.

Dean, K. R. and M. Akhtar (1996). "Novel mechanism for the activation of rhodopsin kinase: implications for other G protein-coupled receptor kinases (GRK's)." *Biochemistry* 35, 6164-72.

Dhami, G. K., P. H. Anborgh, L. B. Dale, R. Sterne-Marr and S. S. Ferguson (2002). "Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2." *J Biol Chem* 277, 25266-72.

Dhami, G. K., L. B. Dale, P. H. Anborgh, K. E. O'Connor-Halligan, R. Sterne-Marr and S. S. Ferguson (2004). "G Protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and Galphaq to attenuate signaling." *J Biol Chem* 279, 16614-20.

Diaz-Nido, J., L. Serrano, C. Lopez-Otin, J. Vandekerckhove and J. Avila (1990). "Phosphorylation of a neuronal-specific beta-tubulin isotype." *J Biol Chem* 265, 13949-54.

Dicker, F., U. QUITTERER, R. Winstel, K. Honold and M. J. Lohse (1999). "Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5476-81.

Diviani, D., A. L. Lattion and S. Cotecchia (1997). "Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor." *J Biol Chem* 272, 28712-9.

Eckhart, A. D., S. J. Duncan, R. B. Penn, J. L. Benovic, R. J. Lefkowitz and W. J. Koch (2000). "Hybrid transgenic mice reveal *in vivo* specificity of G protein-coupled receptor kinases in the heart." *Circ Res* 86, 43-50.

Eckhart, A. D., T. Ozaki, H. Tevæarai, H. A. Rockman and W. J. Koch (2002). "Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in transgenic mice attenuates beta-adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure." *Mol Pharmacol* 61, 749-58.

Eichmann, T., K. Lorenz, M. Hoffmann, J. Brockmann, C. Krasel, M. J. Lohse and U. QUITTERER (2003). "The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory Gbeta gamma binding site." *J Biol Chem* 278, 8052-7.

Elorza, A., P. Penela, S. Sarnago and F. Mayor, Jr. (2003). "MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2." *J Biol Chem* 278, 29164-73.

Fan, X., J. Zhang, X. Zhang, W. Yue and L. Ma (2002). "Acute and chronic morphine treatments and morphine withdrawal differentially regulate GRK2 and GRK5 gene expression in rat brain." *Neuropharmacology* 43, 809-16.

Flannery, P. J. and R. F. Spurney (2001). "Domains of the parathyroid hormone (PTH) receptor required for regulation by G protein-coupled receptor kinases (GRKs)." *Biochem Pharmacol* 62, 1047-58.

Fong, A. M., R. T. Premont, R. M. Richardson, Y. R. Yu, R. J. Lefkowitz and D. D. Patel (2002). "Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7478-83.

Freeman, J. L., P. Gonzalo, J. A. Pitcher, A. Claing, J. P. Lavergne, J. P. Reboud and R. J. Lefkowitz (2002). "Beta 2-adrenergic receptor stimulated, G protein-coupled receptor kinase 2 mediated, phosphorylation of ribosomal protein P2." *Biochemistry* 41, 12850-7.

Freeman, J. L., J. A. Pitcher, X. Li, V. Bennett and R. J. Lefkowitz (2000). "alpha-Actinin is a potent regulator of G protein-coupled receptor kinase activity and substrate specificity *in vitro*." *FEBS Lett* 473, 280-4.

Gaertner, T. R., J. A. Putkey and M. N. Waxham (2004). "RC3/Neurogranin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II produce opposing effects on the affinity of calmodulin for calcium." *J Biol Chem* 279, 39374-82.

Gagnon, A. W. and J. L. Benovic (1997). "Identification and chromosomal localization of a processed pseudogene of human GRK6." *Gene* 184, 13-9.

Gainetdinov, R. R., L. M. Bohn, T. D. Sotnikova, M. Cyr, A. Laakso, A. D. Macrae, G. E. Torres, K. M. Kim, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron and R. T. Premont (2003). "Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice." *Neuron* 38, 291-303.

Gainetdinov, R. R., L. M. Bohn, J. K. Walker, S. A. Laporte, A. D. Macrae, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and R. T. Premont (1999). "Muscarinic supersensitivity and impaired receptor desensitization in G protein-coupled receptor kinase 5-deficient mice." *Neuron* 24, 1029-36.

Gainetdinov, R. R., R. T. Premont, L. M. Bohn, R. J. Lefkowitz and M. G. Caron (2004). "Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions." *Annu Rev Neurosci* 27, 107-44.

Gainetdinov, R. R., R. T. Premont, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (2000). "Reply: receptor specificity of G-protein-coupled receptor kinases." *Trends Pharmacol Sci* 21, 366-7.

Gan, X. Q., J. Y. Wang, Q. H. Yang, Z. Li, F. Liu, G. Pei and L. Li (2000). "Interaction between the conserved region in the C-terminal domain of GRK2 and rhodopsin is necessary for GRK2 to catalyze receptor phosphorylation." *J Biol Chem* 275, 8469-74.

Gan, X. Q., J. Y. Wang, Q. H. Yang, Q. M. Yu, G. Pei and L. Li (1999). "Effects of Deleting the Amino-terminal Domain of GRK-2 on Its Function." *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 31, 648-652.

Garcia-Higuera, I. and F. Mayor, Jr. (1992). "Rapid agonist-induced beta-adrenergic receptor kinase translocation in C6 glioma cells." *FEBS Lett* 302, 61-4.

George, S. R., T. Fan, Z. Xie, R. Tse, V. Tam, G. Varghese and B. F. O'Dowd (2000). "Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties." *J Biol Chem* 275, 26128-35.

Gibbs, J. B. (1991). "Ras C-terminal processing enzymes—new drug targets?" *Cell* 65, 1-4.

Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." *Cell* 23, 175-82.

Grange-Midroit, M., J. A. Garcia-Sevilla, M. Ferrer-Alcon, R. La Harpe, P. Huguelet and J. Guimon (2003). "Regulation of GRK 2 and 6, beta-arrestin-2 and associated proteins in the prefrontal cortex of drug-free and antidepressant drug-treated subjects with major depression." *Brain Res Mol Brain Res* 111, 31-41.

Gros, R., J. L. Benovic, C. M. Tan and R. D. Feldman (1997). "G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension." *J Clin Invest* 99, 2087-93.

Haga, K. and T. Haga (1990). "Dual regulation by G proteins of agonist-dependent phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptors." *FEBS Lett* 268, 43-7.

Haga, K. and T. Haga (1992). "Activation by G protein beta gamma subunits of agonist- or light-dependent phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptors and rhodopsin." *J Biol Chem* 267, 2222-7.

Haga, K., H. Ogawa, T. Haga and H. Murofushi (1998). "GTP-binding-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) binds and phosphorylates tubulin." *Eur J Biochem* 255, 363-8.

Haga, K., H. Tsuga and T. Haga (1997). "Ca²⁺-dependent inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 by calmodulin." *Biochemistry* 36, 1315-21.

Hall, R. A., R. T. Premont, C. W. Chow, J. T. Blitzer, J. A. Pitcher, A. Claing, R. H. Stoffel, L. S. Barak, S. Shenolikar, E. J. Weinman, S. Grinstein and R. J. Lefkowitz (1998). "The beta₂-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange." *Nature* 392, 626-30.

Hanks, S. K. and T. Hunter (1995). "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification." *Faseb J* 9, 576-96.

Haribabu, B. and R. Snyderman (1993). "Identification of additional members of human G-protein-coupled receptor kinase multigene family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9398-402.

Hasbi, A., D. Devost, S. A. Laporte and H. H. Zingg (2004). "Real-time detection of interactions between the human oxytocin receptor and G protein-coupled receptor kinase-2." *Mol Endocrinol* 18, 1277-86.

Haslam, R. J., H. B. Koide and B. A. Hemmings (1993). "Pleckstrin domain homology." *Nature* 363, 309-10.

Hekman, M., P. H. Bauer, P. Sohlemann and M. J. Lohse (1994). "Phosducin inhibits receptor phosphorylation by the beta-adrenergic receptor kinase in a PKA-regulated manner." *FEBS Lett* 343, 120-4.

Hidaka, H., Sasaki Y., Tanaka T., Endo T., Ohno S., Fuji Y. and Nagata T. (1981). "N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4354-7

Hisatomi, O., S. Matsuda, T. Satoh, S. Kotaka, Y. Imanishi and F. Tokunaga (1998). "A novel subtype of G-protein-coupled receptor kinase, GRK7, in teleost cone photoreceptors." *FEBS Lett* 424, 159-64.

Holmes, W. R. (2000). "Models of calmodulin trapping and CaM kinase II activation in a dendritic spine." *J Comput Neurosci* 8, 65-85.

Hu, L. A., W. Chen, R. T. Premont, M. Cong and R. J. Lefkowitz (2002). "G protein-coupled receptor kinase 5 regulates beta 1-adrenergic receptor association with PSD-95." *J Biol Chem* 277, 1607-13.

Iaccarino, G. and W. J. Koch (2003). "Transgenic mice targeting the heart unveil G protein-coupled receptor kinases as therapeutic targets." *Assay Drug Dev Technol* 1, 347-55.

Iaccarino, G., R. J. Lefkowitz and W. J. Koch (1999). "Myocardial G protein-coupled receptor kinases: implications for heart failure therapy." *Proc Assoc Am Physicians* 111, 399-405.

Iaccarino, G., H. A. Rockman, K. F. Shotwell, E. D. Tomhave and W. J. Koch (1998). "Myocardial overexpression of GRK3 in transgenic mice: evidence for *in vivo* selectivity of GRKs." *Am J Physiol* 275, H1298-306.

Iacovelli, L., L. Capobianco, M. Iula, V. Di Giorgi Gerevini, A. Picascia, J. Blahos, D. Melchiorri, F. Nicoletti and A. De Blasi (2004). "Regulation of mGlu4 metabotropic glutamate receptor signaling by type-2 G-protein coupled receptor kinase (GRK2)." *Mol Pharmacol* 65, 1103-10.

Iino, M., T. Furugohri, A. Fukuzawa and T. Shibano (1997). "Asp278 of human beta-adrenergic receptor kinase 1 is essential for phosphorylation activity." *Biochem Biophys Res Commun* 239, 548-51.

Iino, M., T. Furugori, T. Mori, S. Moriyama, A. Fukuzawa and T. Shibano (2002). "Rational design and evaluation of new lead compound structures for selective betaARK1 inhibitors." *J Med Chem* 45, 2150-9.

Iino, M. and T. Shibano (1996). "Substrate recognition mechanism of human beta-adrenergic receptor kinase 1 based on a three-dimensional model structure." *Drug Des Discov* 14, 145-55.

Inglese, J., J. F. Glickman, W. Lorenz, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1992a). "Isoprenylation of a protein kinase. Requirement of farnesylation/alpha-carboxyl methylation for full enzymatic activity of rhodopsin kinase." *J Biol Chem* 267, 1422-5.

Inglese, J., W. J. Koch, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1992b). "Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases." *Nature* 359, 147-50.

Ishii, M. and Y. Kurachi (2003). "Physiological actions of regulators of G-protein signaling (RGS) proteins." *Life Sci* 74, 163-71.

Itho H. and H. Hidaka (1984). "Direct interaction of calmodulin antagonists with Ca²⁺/calmodulin dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase." *J Biochem (Tokyo)* 96,1721-6

Jaber, M., W. J. Koch, H. Rockman, B. Smith, R. A. Bond, K. K. Sulik, J. Ross, Jr., R. J. Lefkowitz, M. G. Caron and B. Giros (1996). "Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12974-9.

Jockers, R., S. Angers, A. Da Silva, P. Benaroch, A. D. Strosberg, M. Bouvier and S. Marullo (1999). "Beta(2)-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis." *J Biol Chem* 274, 28900-8.

Jordan, B. A. and L. A. Devi (1999). "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function." *Nature* 399, 697-700.

Kavelaars, A., A. Vroon, R. P. Raatgever, A. M. Fong, R. T. Premont, D. D. Patel, R. J. Lefkowitz and C. J. Heijnen (2003). "Increased acute inflammation, leukotriene B₄-induced chemotaxis, and signaling in mice deficient for G protein-coupled receptor kinase 6." *J Immunol* 171, 6128-34.

Kakiuchi, S., S. Yasuda, R. Yamazaki, Y. Teshima, K. Kanda, R. Kakiuchi and K. Sobue (1982). "Quantitative determinations of calmodulin in the supernatant and particulate fractions of mammalian tissues." *J Biochem (Tokyo)* 92, 1041-8.

Kameyama, K., K. Haga, T. Haga, O. Moro and W. Sadee (1994). "Activation of a GTP-binding protein and a GTP-binding-protein-coupled receptor kinase (beta-adrenergic-receptor kinase-1) by a muscarinic receptor m2 mutant lacking phosphorylation sites." *Eur J Biochem* 226, 267-76.

Kassack, M. U., P. Hogger, D. A. Gschwend, K. Kameyama, T. Haga, R. C. Graul and W. Sadee (2000). "Molecular modeling of G-protein coupled receptor kinase 2: docking and biochemical evaluation of inhibitors." *AAPS PharmSci* 2, E2.

Katada, T., K. Kusakabe, M. Oinuma and M. Ui (1987). "A novel mechanism for the inhibition of adenylate cyclase via inhibitory GTP-binding proteins. Calmodulin-dependent inhibition of the cyclase catalyst by the beta gamma-subunits of GTP-binding proteins." *J Biol Chem* 262, 11897-900.

Keys, J. R., E. A. Greene, C. J. Cooper, S. V. Naga Prasad, H. A. Rockman and W. J. Koch (2003). "Cardiac hypertrophy and altered beta-adrenergic signaling in transgenic mice that express the amino terminus of beta-ARK1." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H2201-11.

- Khani, S. C., M. Abitbol, S. Yamamoto, I. Maravic-Magovcevic and T. P. Dryja (1996). "Characterization and chromosomal localization of the gene for human rhodopsin kinase." *Genomics* 35, 571-6.
- Kim, C. M., S. B. Dion and J. L. Benovic (1993a). "Mechanism of beta-adrenergic receptor kinase activation by G proteins." *J Biol Chem* 268, 15412-8.
- Kim, C. M., S. B. Dion, J. J. Onorato and J. L. Benovic (1993b). "Expression and characterization of two beta-adrenergic receptor kinase isoforms using the baculovirus expression system." *Receptor* 3, 39-55.
- Klenchin, V. A., P. D. Calvert and M. D. Bownds (1995). "Inhibition of rhodopsin kinase by recoverin. Further evidence for a negative feedback system in phototransduction." *J Biol Chem* 270, 16147-52.
- Koch, W. J., J. Inglese, W. C. Stone and R. J. Lefkowitz (1993). "The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase." *J Biol Chem* 268, 8256-60.
- Koch, W. J., H. A. Rockman, P. Samama, R. A. Hamilton, R. A. Bond, C. A. Milano and R. J. Lefkowitz (1995). "Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor." *Science* 268, 1350-3.
- Krasel, C., S. Dammeier, R. Winstel, J. Brockmann, H. Mischak and M. J. Lohse (2001). "Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin." *J Biol Chem* 276, 1911-5.
- Krueger, K. M., Y. Daaka, J. A. Pitcher and R. J. Lefkowitz (1997). "The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification." *J Biol Chem* 272, 5-8.
- Kühn, H. (1978). "Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes." *Biochemistry* 17, 4389-95.
- Kühn, H. and W. J. Dreyer (1972). "Light dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP." *FEBS Lett* 20, 1-6.
- Kunapuli, P. and J. L. Benovic (1993). "Cloning and expression of GRK5: a member of the G protein-coupled receptor kinase family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5588-92.
- Kunapuli, P., V. V. Gurevich and J. L. Benovic (1994a). "Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G protein-coupled receptor kinase GRK5." *J Biol Chem* 269, 10209-12.
- Kunapuli, P., J. J. Onorato, M. M. Hosey and J. L. Benovic (1994b). "Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK5." *J Biol Chem* 269, 1099-105.

Lee, C., A. Levin and D. Branton (1987). "Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels." *Anal Biochem* 166, 308-12.

Lee, R. H., B. M. Brown and R. N. Lolley (1982). "Autophosphorylation of rhodopsin kinase from retinal rod outer segments." *Biochemistry* 21, 3303-7.

Levay, K., D. K. Satpaev, A. N. Pronin, J. L. Benovic and V. Z. Slepak (1998). "Localization of the sites for Ca²⁺-binding proteins on G protein-coupled receptor kinases." *Biochemistry* 37, 13650-9.

Liu, M., B. Yu, O. Nakanishi, T. Wieland and M. Simon (1997). "The Ca²⁺-dependent binding of calmodulin to an N-terminal motif of the heterotrimeric G protein beta subunit." *J Biol Chem* 272, 18801-7.

Lodowski, D. T., J. A. Pitcher, W. D. Capel, R. J. Lefkowitz and J. J. Tesmer (2003). "Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma." *Science* 300, 1256-62.

Lohse, M. J. (1993). "Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization." *Biochim Biophys Acta* 1179, 171-88.

Lohse, M. J., S. Engelhardt, S. Danner and M. Bohm (1996). "Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization: from molecular biology to heart failure." *Basic Res Cardiol* 91 Suppl 2, 29-34.

Lohse, M. J., S. Engelhardt and T. Eschenhagen (2003). "What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?" *Circ Res* 93, 896-906.

Lohse, M. J., R. J. Lefkowitz, M. G. Caron and J. L. Benovic (1989). "Inhibition of beta-adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of beta 2-adrenergic receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3011-5.

Lombardi, M. S., A. Kavelaars, P. Penela, E. J. Scholtens, M. Roccio, R. E. Schmidt, M. Schedlowski, F. Mayor, Jr. and C. J. Heijnen (2002). "Oxidative stress decreases G protein-coupled receptor kinase 2 in lymphocytes via a calpain-dependent mechanism." *Mol Pharmacol* 62, 379-88.

Lorenz, K., M. J. Lohse and U. QUITTERER (2003). "Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2." *Nature* 426, 574-9.

Lorenz, W., J. Inglese, K. Palczewski, J. J. Onorato, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1991). "The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the beta-adrenergic receptor kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8715-9.

Loudon, R. P. and J. L. Benovic (1994). "Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK6." *J Biol Chem* 269, 22691-7.

Luo, J. and J. L. Benovic (2003). "G protein-coupled receptor kinase interaction with Hsp90 mediates kinase maturation." *J Biol Chem* 278, 50908-14.

Lyubarsky, A. L., C. Chen, M. I. Simon and E. N. Pugh, Jr. (2000). "Mice lacking G-protein receptor kinase 1 have profoundly slowed recovery of cone-driven retinal responses." *J Neurosci* 20, 2209-17.

MacRae, T. H. (1997). "Tubulin post-translational modifications—enzymes and their mechanisms of action." *Eur J Biochem* 244, 265-78.

Mak, J. C., T. T. Chuang, C. A. Harris and P. J. Barnes (2002). "Increased expression of G protein-coupled receptor kinases in cystic fibrosis lung." *Eur J Pharmacol* 436, 165-72.

Mandelkow, E. and E. M. Mandelkow (1990). "Microtubular structure and tubulin polymerization." *Curr Opin Cell Biol* 2, 3-9.

Martinez, J., I. Moeller, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and B. Lauring (2003). "Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is a calmodulin substrate." *J Biol Chem* 278, 17379-87.

Mayer, B. J., R. Ren, K. L. Clark and D. Baltimore (1993). "A putative modular domain present in diverse signaling proteins." *Cell* 73, 629-30.

Metaye, T., E. Menet, J. Guilhot and J. L. Kraimps (2002). "Expression and activity of g protein-coupled receptor kinases in differentiated thyroid carcinoma." *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3279-86.

Miller, W. E., D. A. Houtz, C. D. Nelson, P. E. Kolattukudy and R. J. Lefkowitz (2003). "G-protein-coupled receptor (GPCR) kinase phosphorylation and beta-arrestin recruitment regulate the constitutive signaling activity of the human cytomegalovirus US28 GPCR." *J Biol Chem* 278, 21663-71.

Milligan, G., M. Parenti and A. I. Magee (1995). "The dynamic role of palmitoylation in signal transduction." *Trends Biochem Sci* 20, 181-7.

Millman, E. E., J. L. Rosenfeld, D. J. Vaughan, J. Nguyen, W. Dai, E. Alpizar-Foster, R. B. Clark, B. J. Knoll and R. H. Moore (2004). "Endosome sorting of beta2-adrenoceptors is GRK5 independent." *Br J Pharmacol* 141, 277-84.

Miralles, A., V. J. Asensio and J. A. Garcia-Sevilla (2002). "Acute treatment with the cyclic antidepressant desipramine, but not fluoxetine, increases membrane-associated G protein-coupled receptor kinases 2/3 in rat brain." *Neuropharmacology* 43, 1249-57.

Mischak, H., J. H. Pierce, J. Goodnight, M. G. Kazanietz, P. M. Blumberg and J. F. Mushinski (1993). "Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and -delta and not by protein kinase C-beta II, -epsilon, -zeta, and -eta." *J Biol Chem* 268, 20110-5.

Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura and R. Y. Tsien (1997). "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin." *Nature* 388, 882-7.

Mochly-Rosen, D. (1995). "Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction." *Science* 268, 247-51.

Moepps, B., P. Vatter, R. Frodl, F. Waechter, C. Dixkens, H. Hameister and P. Gierschik (1999). "Alternative splicing produces transcripts encoding four variants of mouse G-protein-coupled receptor kinase 6." *Genomics* 60, 199-209.

Motulsky, H.J. (1998). "The InStat Guide to choosing and interpreting statistical tests." *GraphPad Software Inc.*

Müller, S. (1995). "Heterogenität und Funktion von G-Protein beta/gamma Untereinheiten" Dissertation am Institut für Pharmakologie. Universität Würzburg.

Müller, S., M. Hekman and M. J. Lohse (1993). "Specific enhancement of beta-adrenergic receptor kinase activity by defined G-protein beta and gamma subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10439-43.

Müller, S., A. Straub and M. J. Lohse (1997). "Selectivity of beta-adrenergic receptor kinase 2 for G protein betagamma subunits." *FEBS Lett* 401, 25-9.

Mundell, S. J., G. Pula, K. Carswell, P. J. Roberts and E. Kelly (2003). "Agonist-induced internalization of metabotropic glutamate receptor 1A: structural determinants for protein kinase C- and G protein-coupled receptor kinase-mediated internalization." *J Neurochem* 84, 294-304.

Murga, C., N. Esteban, A. Ruiz-Gomez and F. Mayor, Jr. (1997). "The basal subcellular distribution of beta-adrenergic receptor kinase is independent of G-protein beta gamma subunits." *FEBS Lett* 409, 24-8.

Musacchio, A., T. Gibson, P. Rice, J. Thompson and M. Saraste (1993). "The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins." *Trends Biochem Sci* 18, 343-8.

Olivares-Reyes, J. A., R. D. Smith, L. Hunyady, B. H. Shah and K. J. Catt (2001). "Agonist-induced signaling, desensitization, and internalization of a phosphorylation-deficient AT1A angiotensin receptor." *J Biol Chem* 276, 37761-8.

Onorato, J. J., K. Palczewski, J. W. Regan, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and J. L. Benovic (1991). "Role of acidic amino acids in peptide substrates of the beta-adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase." *Biochemistry* 30, 5118-25.

O'Reilly, D. R., Miller, L.K., Luckow, V.A. (1992). *Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual*. New York, W.H. Freeman and Company.

Palczewski, K., A. Arendt, J. H. McDowell and P. A. Hargrave (1989). "Substrate recognition determinants for rhodopsin kinase: studies with synthetic peptides, polyanions, and polycations." *Biochemistry* 28, 8764-70.

- Palczewski, K., J. Buczylo, M. W. Kaplan, A. S. Polans and J. W. Crabb (1991). "Mechanism of rhodopsin kinase activation." *J Biol Chem* 266, 12949-55.
- Palczewski, K., J. Buczylo, L. Lebioda, J. W. Crabb and A. S. Polans (1993). "Identification of the N-terminal region in rhodopsin kinase involved in its interaction with rhodopsin." *J Biol Chem* 268, 6004-13.
- Palczewski, K., J. Buczylo, P. Van Hooser, S. A. Carr, M. J. Huddleston and J. W. Crabb (1992). "Identification of the autophosphorylation sites in rhodopsin kinase." *J Biol Chem* 267, 18991-8.
- Palczewski, K., N. Kahn and P. A. Hargrave (1990). "Nucleoside inhibitors of rhodopsin kinase." *Biochemistry* 29, 6276-82.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." *Science* 289, 739-45.
- Palczewski, K., J. H. McDowell and P. A. Hargrave (1988). "Rhodopsin kinase: substrate specificity and factors that influence activity." *Biochemistry* 27, 2306-13.
- Palczewski, K., H. Ohguro, R. T. Premont and J. Inglese (1995). "Rhodopsin kinase autophosphorylation. Characterization of site-specific mutations." *J Biol Chem* 270, 15294-8.
- Park, S. J., D. J. Choi and C. W. Kim (2004). "Hypertensive left ventricular hypertrophy: relation to beta-adrenergic receptor kinase-1 (betaARK1) in peripheral lymphocytes." *J Hypertens* 22, 1025-32.
- Penela, P., A. Elorza, S. Sarnago and F. Mayor, Jr. (2001). "Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2." *Embo J* 20, 5129-38.
- Penn, R. B. and J. L. Benovic (1994). "Structure of the human gene encoding the beta-adrenergic receptor kinase." *J Biol Chem* 269, 14924-30.
- Peppel, K., I. Boekhoff, P. McDonald, H. Breer, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1997). "G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization." *J Biol Chem* 272, 25425-8.
- Pernalet, N., J. C. Garcia, C. R. Betts and K. J. Martin (1990). "Inhibitors of protein kinase-C modulate desensitization of the parathyroid hormone receptor-adenylate cyclase system in opossum kidney cells." *Endocrinology* 126, 407-13.
- Pevsner, J. (2003). "Bioinformatics and functional Genomics." *Wiley-VCH Verlag*
- Phillips, T. A., R. A. VanBogelen and F. C. Neidhardt (1984). "lon gene product of Escherichia coli is a heat-shock protein." *J Bacteriol* 159, 283-7.

Pitcher, J., M. J. Lohse, J. Codina, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (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, 3193-7.

Pitcher, J. A., Z. L. Fredericks, W. C. Stone, R. T. Premont, R. H. Stoffel, W. J. Koch and R. J. Lefkowitz (1996). "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies." *J Biol Chem* 271, 24907-13.

Pitcher, J. A., R. A. Hall, Y. Daaka, J. Zhang, S. S. Ferguson, S. Hester, S. Miller, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and L. S. Barak (1998). "The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin." *J Biol Chem* 273, 12316-24.

Pitcher, J. A., E. S. Payne, C. Csontos, A. A. DePaoli-Roach and R. J. Lefkowitz (1995a). "The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8343-7.

Pitcher, J. A., J. J. Tesmer, J. L. Freeman, W. D. Capel, W. C. Stone and R. J. Lefkowitz (1999). "Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases." *J Biol Chem* 274, 34531-4.

Pitcher, J. A., K. Touhara, E. S. Payne and R. J. Lefkowitz (1995b). "Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid." *J Biol Chem* 270, 11707-10.

Premont, R. T., A. Claing, N. Vitale, J. L. Freeman, J. A. Pitcher, W. A. Patton, J. Moss, M. Vaughan and R. J. Lefkowitz (1998). "beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14082-7.

Premont, R. T., W. J. Koch, J. Inglese and R. J. Lefkowitz (1994). "Identification, purification, and characterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases." *J Biol Chem* 269, 6832-41.

Premont, R. T., A. D. Macrae, R. H. Stoffel, N. Chung, J. A. Pitcher, C. Ambrose, J. Inglese, M. E. MacDonald and R. J. Lefkowitz (1996). "Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants." *J Biol Chem* 271, 6403-10.

Pronin, A. N., C. V. Carman and J. L. Benovic (1998). "Structure-function analysis of G protein-coupled receptor kinase-5. Role of the carboxyl terminus in kinase regulation." *J Biol Chem* 273, 31510-8.

Pronin, A. N., A. J. Morris, A. Surguchov and J. L. Benovic (2000). "Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases." *J Biol Chem* 275, 26515-22.

Pronin, A. N., D. K. Satpaev, V. Z. Slepak and J. L. Benovic (1997). "Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain." *J Biol Chem* 272, 18273-80.

Rapacciuolo, A., S. Suvarna, L. Barki-Harrington, L. M. Luttrell, M. Cong, R. J. Lefkowitz and H. A. Rockman (2003). "Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways." *J Biol Chem* 278, 35403-11.

Raymond, J. R. (1991). "Protein kinase C induces phosphorylation and desensitization of the human 5-HT_{1A} receptor." *J Biol Chem* 266, 14747-53.

Reiter, E., S. Marion, F. Robert, C. Troispoux, F. Boulay, F. Guillou and P. Crepieux (2001). "Kinase-inactive G-protein-coupled receptor kinases are able to attenuate follicle-stimulating hormone-induced signaling." *Biochem Biophys Res Commun* 282, 71-8.

Rhoads, A. R. and F. Friedberg (1997). "Sequence motifs for calmodulin recognition." *Faseb J* 11, 331-40.

Robinson, P. S. and C. F. Goochee (1991). "Kidney-specific enzyme expression by human kidney cell lines generated through oncogene transfection." *J Cell Physiol* 148, 54-9.

Rockman, H. A., D. J. Choi, S. A. Akhter, M. Jaber, B. Giros, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron and W. J. Koch (1998). "Control of myocardial contractile function by the level of beta-adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice." *J Biol Chem* 273, 18180-4.

Rockman, H. A., D. J. Choi, N. U. Rahman, S. A. Akhter, R. J. Lefkowitz and W. J. Koch (1996). "Receptor-specific *in vivo* desensitization by the G protein-coupled receptor kinase-5 in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9954-9.

Rodney, G. G., B. Y. Williams, G. M. Strasburg, K. Beckingham and S. L. Hamilton (2000). "Regulation of RYR1 activity by Ca(2+) and calmodulin." *Biochemistry* 39, 7807-12.

Roth B.L., S.L. Craigo, M.S. Choudhary, A. Uluer, F.J. Monsma jr., Y. Shen, H.Y. Meltzer and D.R. Sibley (1994). "Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 268, 1403-10

Roth, N. S., P. T. Campbell, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and M. J. Lohse (1991). "Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6201-4.

Ruiz-Gomez, A., J. Humrich, C. Murga, U. Quitterer, M. J. Lohse and F. Mayor, Jr. (2000). "Phosphorylation of phosphocollin and phosphocollin-like protein by G protein-coupled receptor kinase 2." *J Biol Chem* 275, 29724-30.

Salles J., S. Gascon, D. Ivorra and A. Badia (1994). "In vivo recovery of alpha(1)-adrenoreceptors in rat myocardial tissue after alkylation with phenoxybenzamine." *Eur J Pharmacol* 266, 35-42

Sallese, M., L. Iacovelli, A. Cumashi, L. Capobianco, L. Cuomo and A. De Blasi (2000). "Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins." *Biochim Biophys Acta* 1498, 112-21.

Sallese, M., S. Mariggio, G. Collodel, E. Moretti, P. Piomboni, B. Baccetti and A. De Blasi (1997). "G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells." *J Biol Chem* 272, 10188-95

Sarnago, S., A. Elorza and F. Mayor, Jr. (1999). "Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase." *J Biol Chem* 274, 34411-6.

Sarnago, S., R. Roca, A. de Blasi, A. Valencia, F. Mayor, Jr. and C. Murga (2003). "Involvement of intramolecular interactions in the regulation of G protein-coupled receptor kinase 2." *Mol Pharmacol* 64, 629-39.

Schägger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *Anal Biochem* 166, 368-79.

Schulz, K., S. Danner, P. Bauer, S. Schroder and M. J. Lohse (1996). "Expression of phosducin in a phosducin-negative cell line reveals functions of a Gbetagamma-binding protein." *J Biol Chem* 271, 22546-51.

Schulz, R., A. Wehmeyer and K. Schulz (2002a). "Opioid receptor types selectively cointernalize with G protein-coupled receptor kinases 2 and 3." *J Pharmacol Exp Ther* 300, 376-84.

Schulz, R., A. Wehmeyer and K. Schulz (2002b). "Visualizing preference of G protein-coupled receptor kinase 3 for the process of kappa-opioid receptor sequestration." *Mol Pharmacol* 61, 1444-52.

Shenoy, S. K., P. H. McDonald, T. A. Kohout and R. J. Lefkowitz (2001). "Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin." *Science* 294, 1307-13.

Shichi, H. and R. L. Somers (1978). "Light-dependent phosphorylation of rhodopsin. Purification and properties of rhodopsin kinase." *J Biol Chem* 253, 7040-6.

Shiina, T., K. Arai, S. Tanabe, N. Yoshida, T. Haga, T. Nagao and H. Kurose (2001). "Clathrin box in G protein-coupled receptor kinase 2." *J Biol Chem* 276, 33019-26.

Simon, V., S. Mhaouty-Kodja, C. Legrand and J. Cohen-Tannoudji (2001). "Concomitant increase of G protein-coupled receptor kinase activity and uncoupling of beta-adrenergic receptors in rat myometrium at parturition." *Endocrinology* 142, 1899-905.

Slemmon, J. R., B. Feng and J. A. Erhardt (2000). "Small proteins that modulate calmodulin-dependent signal transduction: effects of PEP-19, neuromodulin, and neurogranin on enzyme activation and cellular homeostasis." *Mol Neurobiol* 22, 99-113.

Soderling, T. R. (1999). "The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade." *Trends Biochem Sci* 24, 232-6.

Spurney, R. F., P. J. Flannery, S. C. Garner, K. Athirakul, S. Liu, F. Guilak and L. D. Quarles (2002). "Anabolic effects of a G protein-coupled receptor kinase inhibitor expressed in osteoblasts." *J Clin Invest* 109, 1361-71.

Srinivasan, V., M. D. Waterfield and T. L. Blundell (1996). "Comparative analysis of the regions binding beta gamma-subunits in Galpha and PH domains." *Biochem Biophys Res Commun* 220, 697-702.

Sterne-Marr, R. and J. L. Benovic (1995). "Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins." *Vitam Horm* 51, 193-234.

Stoffel, R. H., R. R. Randall, R. T. Premont, R. J. Lefkowitz and J. Inglese (1994). "Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family." *J Biol Chem* 269, 27791-4.

Strasser, R. H., J. L. Benovic, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1986). "Beta-agonist- and prostaglandin E1-induced translocation of the beta-adrenergic receptor kinase: evidence that the kinase may act on multiple adenylate cyclase-coupled receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6362-6.

Suo, Z., M. Wu, B. A. Citron, G. T. Wong and B. W. Festoff (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, 3444-52.

Swinscow, T.D.V. (1997). "Statistics at Square one" Ninth Edition, *BMJ Publishing Group*

Terman, G. W., W. Jin, Y. P. Cheong, J. Lowe, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and C. Chavkin (2004). "G-protein receptor kinase 3 (GRK3) influences opioid analgesic tolerance but not opioid withdrawal." *Br J Pharmacol* 141, 55-64.

Theilade, J., J. Lerche Hansen, S. Haunso and S. P. Sheikh (2002). "Extracellular signal-regulated kinases control expression of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)." *FEBS Lett* 518, 195-9.

Thiyagarajan, M. M., R. P. Stracquatano, A. N. Pronin, D. S. Evanko, J. L. Benovic and P. B. Wedegaertner (2004). "A predicted amphipathic helix mediates plasma membrane localization of GRK5." *J Biol Chem* 279, 17989-95.

Touhara, K., J. Inglese, J. A. Pitcher, G. Shaw and R. J. Lefkowitz (1994). "Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains." *J Biol Chem* 269, 10217-20.

Touhara, K., W. J. Koch, B. E. Hawes and R. J. Lefkowitz (1995). "Mutational analysis of the pleckstrin homology domain of the beta-adrenergic receptor kinase. Differential effects on G beta gamma and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding." *J Biol Chem* 270, 17000-5.

Ungerer, M., M. Bohm, J. S. Elce, E. Erdmann and M. J. Lohse (1993). "Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart." *Circulation* 87, 454-63.

Ungerer, M., K. Kessebohm, K. Kronsbein, M. J. Lohse and G. Richardt (1996). "Activation of beta-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia." *Circ Res* 79, 455-60.

Ungerer, M., G. Parruti, M. Bohm, M. Puzicha, A. DeBlasi, E. Erdmann and M. J. Lohse (1994). "Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart." *Circ Res* 74, 206-13.

Vaughn, J. L., R. H. Goodwin, G. J. Tompkins and P. McCawley (1977). "The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae)." *In Vitro* 13, 213-7.

Vazquez-Prado, J., L. C. Medina and J. A. Garcia-Sainz (1997). "Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts." *J Biol Chem* 272, 27330-7.

Villardaga, J. P., M. Bünemann, C. Krasel, M. Castro and M. J. Lohse (2003). "Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells." *Nat Biotechnol* 21, 807-12.

Villalonga, P., C. Lopez-Alcala, A. Chiloeches, J. Gil, R. Marais, O. Bachs and N. Agell (2002). "Calmodulin prevents activation of Ras by PKC in 3T3 fibroblasts." *J Biol Chem* 277, 37929-35.

Vinge, L. E., E. Oie, Y. Andersson, H. K. Groggaard, G. Andersen and H. Attramadal (2001). "Myocardial distribution and regulation of GRK and beta-arrestin isoforms in congestive heart failure in rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H2490-9.

Vroon, A., C. J. Heijnen, R. Raatgever, I. P. Touw, R. E. Ploemacher, R. T. Premont and A. Kavelaars (2004). "GRK6 deficiency is associated with enhanced CXCR4-mediated neutrophil chemotaxis *in vitro* and impaired responsiveness to G-CSF *in vivo*." *J Leukoc Biol* 75, 698-704.

Walker, J. K., R. R. Gainetdinov, D. S. Feldman, P. K. McFawn, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, R. T. Premont and J. T. Fisher (2004). "G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L312-9.

Walker, J. K., K. Peppel, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron and J. T. Fisher (1999). "Altered airway and cardiac responses in mice lacking G protein-coupled receptor kinase 3." *Am J Physiol* 276, R1214-21.

Walter, U., M. Eigenthaler, J. Geiger and M. Reinhard (1993). "Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets." *Adv Exp Med Biol* 344, 237-49.

Webb, R. C. (2003). "Smooth muscle contraction and relaxation." *Adv Physiol Educ* 27, 201-6.

Weiss, E. R., D. Raman, S. Shirakawa, M. H. Ducceschi, P. T. Bertram, F. Wong, T. W. Kraft and S. Osawa (1998). "The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas." *Mol Vis* 4, 27.

Werbonat, Y., N. Kleutges, K. H. Jakobs and C. J. van Koppen (2000). "Essential role of dynamin in internalization of M2 muscarinic acetylcholine and angiotensin AT1A receptors." *J Biol Chem* 275, 21969-74.

Wess, J. (2000). "Physiological roles of G-protein-coupled receptor kinases revealed by gene-targeting technology." *Trends Pharmacol Sci* 21, 364-7.

Whistler, J. L., J. Enquist, A. Marley, J. Fong, F. Gladher, P. Tsuruda, S. R. Murray and M. Von Zastrow (2002). "Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors." *Science* 297, 615-20.

Wilden, U. and H. Kühn (1982). "Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites." *Biochemistry* 21, 3014-22.

Willets, J. and E. Kelly (2001). "Desensitization of endogenously expressed delta-opioid receptors: no evidence for involvement of G protein-coupled receptor kinase 2." *Eur J Pharmacol* 431, 133-41.

Willets, J. M., R. A. Challiss, E. Kelly and S. R. Nahorski (2001). "G protein-coupled receptor kinases 3 and 6 use different pathways to desensitize the endogenous M3 muscarinic acetylcholine receptor in human SH-SY5Y cells." *Mol Pharmacol* 60, 321-30.

Winstel, R., S. Freund, C. Krasel, E. Hoppe and M. J. Lohse (1996). "Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2105-9.

Wise, A., S. C. Jupe and S. Rees (2004). "The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 43-66.

Yamamoto, S., K. C. Sippel, E. L. Berson and T. P. Dryja (1997). "Defects in the rhodopsin kinase gene in the Oguchi form of stationary night blindness." *Nat Genet* 15, 175-8.

Yamauchi, E., T. Nakatsu, M. Matsubara, H. Kato and H. Taniguchi (2003). "Crystal structure of a MARCKS peptide containing the calmodulin-binding domain in complex with Ca²⁺-calmodulin." *Nat Struct Biol* 10, 226-31.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." *Gene* 33, 103-19.

Yap, K. L., J. Kim, K. Truong, M. Sherman, T. Yuan and M. Ikura (2000). "Calmodulin target database." *J Struct Funct Genomics* 1, 8-14.

Yoshida, N., K. Haga and T. Haga (2003). "Identification of sites of phosphorylation by G-protein-coupled receptor kinase 2 in beta-tubulin." *Eur J Biochem* 270, 1154-63.

Yu, Q. M., Z. J. Cheng, X. Q. Gan, G. B. Bao, L. Li and G. Pei (1999). "The amino terminus with a conserved glutamic acid of G protein-coupled receptor kinases is indispensable for their ability to phosphorylate photoactivated rhodopsin." *J Neurochem* 73, 1222-7.

Yu, S. Y., S. Takahashi, T. Arinami, T. Ohkubo, Y. Nemoto, E. Tanabe, Y. Fukura, M. Matsuura, Y. H. Han, R. L. Zhou, Y. C. Shen, E. Matsushima and T. Kojima (2004). "Mutation screening and association study of the beta-adrenergic receptor kinase 2 gene in schizophrenia families." *Psychiatry Res* 125, 95-104.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Originalarbeiten

Krasel, C; Dammeier, S; Winstel, R; Brockmann, J; Mischak, H; Lohse, MJ: Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 1911-1915

Eichmann, T; Lorenz, K; Hoffmann, M; Brockmann, J; Krasel, C; Lohse, MJ; Quitterer, U: The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory G $\beta\gamma$ binding site. *J. Biol. Chem.* 276 (2003) 8052-8057

Konferenzbeiträge

Brockmann, J; Krasel, C; Dees, C; Lohse, MJ: GRK2 inhibition by calmodulin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 367 (Suppl), R58 (218) Frühjahrstagung der DGPhT 2003, Mainz

Brockmann, J; Krasel, C; Humrich, J; Dees, C; Lohse, MJ: GRK2 inhibition by Calmodulin selectively affects receptor substrates: implication for substrate recognition. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 365 (Suppl), R56 (209) Frühjahrstagung der DGPhT 2002, Mainz

Brockmann, J; Krasel, C; Dammeier, S; Winstel, R; Mischak, H; Lohse, MJ: GRK2 regulation by calmodulin and protein kinase C. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 363 (Suppl), R66 (251) Frühjahrstagung der DGPhT 2001, Mainz

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Jörg Brockmann
Geburtsdatum: 10. Dezember 1971
Geburtsort: Darmstadt
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Beruf: Apotheker

Schulbildung:

1978-1982 Bergwinkelgrundschule, Schlüchtern
1982-1991 Ulrich-von-Hutten Gymnasium, Schlüchtern

Berufsausbildung

1991-1994 Ausbildung zum pharmazeutisch-technischen Assistenten am
Stiftung Collegium Pharmaceuticum, Frankfurt/Main
1993-1994 Praktische Ausbildung: Lotichius Apotheke, Schlüchtern

Studium:

1994-1998 Studium der Pharmazie an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
1997 Auslandssemester: Arbeitskreise Dr. Paula A. Witt-Enderby und Dr.
Scott F. Long, Department of Pharmacology, School of Pharmacy,
Duquesne University, Pittsburgh, PA, USA
1996 erstes pharmazeutisches Staatsexamen
1998 zweites pharmazeutisches Staatsexamen
1998-1999 erste Hälfte des pharmazeutischen Praktikums in der Lotichius
Apotheke, Schlüchtern
1999 zweite Hälfte des pharmazeutischen Praktikums in der Arbeitsgruppe
Prof. Dr. Martin J. Lohse, Institut für Pharmakologie, Universität
Würzburg
1999 drittes pharmazeutisches Staatsexamen
17.12.1999 Approbation zum Apotheker
ab November 1999 Doktorarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Martin J. Lohse am
Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg

Danksagung

Für die Hilfe und Unterstützung in der Zeit der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich meinen Dank ausdrücken:

Herrn Prof. Dr. Martin J. Lohse für die Themenstellung, die Betreuung der Arbeit mit fachlich sehr fundierten Ratschlägen und Hilfestellungen in schwierigen Situationen sowie den Freiheiten bei der Umsetzung der Aufgabenstellung.

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrave für die Bereitschaft, diese Arbeit vor dem Fachbereich Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Dr. Cornelius Krasel für die direkte Betreuung bei der Umsetzung des Themas, die vielen anregenden Diskussionen, die sich ab und zu auch einmal um Wissenschaftliches drehten und die ständige Bereitschaft, den Versuchen durch neue Ideen frischen Schwung zu geben.

Herrn Prof. Dr. Walter Sebald und Dr. Joachim Nickel für die freundliche Unterstützung und die Hilfe bei den Versuchen am Biacoregerät.

Herrn Prof. Dr. Hanns Häberlein und Lars Prenner für die freundliche Aufnahme im Institut für physiologische Chemie der Universität Bonn und die Unterstützung bei den Versuchen am Fluoreszenzkorrelationspektroskopie-Mikroskop.

Dr. Moritz Bünemann für die Hilfe bei den zellulären FRET-Messungen.

Christian Dees für die Hilfe bei der Reinigung der GRK2, des Rhodopsins und der $\beta\gamma$ -Untereinheiten.

Martina Fischer für die Hilfe in der Zellkultur und bei der Durchführung der wirklich letzten Versuche.

Annette Hannawacker für die vielen angenehmen Augenblicke und Gespräche im Labor, die den Wunsch erbrachten, dass die Woche doch immer erst mittwochs beginnen sollte.

Monika Frank für die Erkenntnis, dass man auch über gleiche Meinungen stundenlang diskutieren und dabei die Zeit und die Tücken des Alltag vergessen kann.

Kristina Lorenz für ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft auch schon zu Studienzeiten.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie -aktuellen und ehemaligen- die durch die angenehme Atmosphäre und die Kollegialität die Zeit während der Anfertigung dieser Arbeit zu einer unvergesslichen Erfahrung gemacht haben.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mir auch während schwieriger Zeiten mit Rat und Tat beiseite standen und mir das alles erst ermöglicht haben.