

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. M. J. Lohse

**Posttranslationale Modifikation von Phosducin durch den  
small ubiquitin-related modifier „SUMO“**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
an der Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

**vorgelegt von**

**Johann Christoph Klenk**

**aus Gießen**

**Würzburg, Februar 2006**



Referent: Prof. Dr. med. Martin J. Lohse

Koreferent: Prof. Dr. med. Hermann Koepsell

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 2006

Der Promovend ist Arzt.



# *Inhaltsverzeichnis*

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.	Signaltransduktion	1
2.	G-Protein vermittelte Signaltransduktion	1
3.	Modulation G-Protein vermittelter Signaltransduktion	5
4.	Posttranslationale Modifikation	13
5.	Zielsetzung	20
<b>II.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
1.	Material	21
2.	Methoden	26
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
1.	Identifizierung einer 33 kDa und 47 kDa Form von Phd in boviner Retina	44
2.	SUMOylierung von Phd in transfizierten Zellen	48
3.	Identifizierung der SUMO-Modifikationsstelle in Phd	51
4.	In vitro SUMOylierung von rekombinatem Phd	54
5.	SUMOylierung von PhIP <sub>L</sub> wird durch Deletion von Gln 71 möglich	55
6.	Konsequenzen der SUMOylierung von Phd	57
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
1.	Signalkaskaden erfordern strenge Regulation	68
2.	Phosducin ist eine neues Zielprotein der SUMOylierung	69
3.	Vergleich mit anderen Vertretern der Phosducin-Familie	72
4.	Biologische Konsequenzen der SUMOylierung von Phd	74
5.	Strukturelle Aspekte	76
6.	Ausblick	79

<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>81</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>82</b>
<b>VII.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>93</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>94</b>

**DANKSAGUNG**

**LEBENS LAUF**

# *I. Einleitung*

## **1. Signaltransduktion**

Eine grundlegende Eigenschaft mehrzelliger Organismen ist die Fähigkeit zum Austausch von Informationen zwischen einzelnen Zellen. Dies ermöglicht das effektive Zusammenspiel der Zellen im Gesamtorganismus und ist essentiell in Hinblick auf Wachstum, Differenzierung und Metabolismus. Außer beim direkten Zell-zu-Zell-Kontakt wird dieser Informationsaustausch über Botenstoffe vermittelt. Hierbei handelt es sich um meist niedermolekulare Substanzen, die von Zellen sezerniert werden und durch lokale Diffusion oder über den Blutkreislauf an ihren Bestimmungsort gelangen. Dort binden sie an spezifische Rezeptoren, die das Signal in das Innere der Zelle übermitteln, was schließlich in einer zellulären Antwort resultiert. Ein Rezeptortyp kann nur durch einen bestimmten oder einige wenige Botenstoffe aktiviert werden. Diese Selektivität des Rezeptors in Bezug auf den Botenstoff stellt sicher, dass unter Tausenden von verschiedenen Signalmolekülen und Rezeptoren jeweils der richtige Effekt ausgelöst wird.

Es lassen sich vier verschiedene Rezeptorklassen unterscheiden: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, Rezeptoren mit intrinsischer enzymatischer Aktivität und nukleäre Rezeptoren.

## **2. G-Protein vermittelte Signaltransduktion**

### **2.1. G-Protein gekoppelte Rezeptoren**

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) bilden die größte Familie der Oberflächenrezeptoren (Wess 1997) und gehören zu den häufigsten Proteinen im menschlichen Organismus. Über 3% des menschlichen Genoms kodieren für diese Rezeptorenklasse. Dementsprechend existiert eine große Anzahl von Agonisten für die einzelnen Rezeptoren. Dazu zählen unter anderem diverse Geruchs- und Geschmacksstoffe, Neuropeptide und niedermolekulare Substanzen wie Acetylcholin oder Adrenalin bis hin zu einzelnen Photonen, die den retinalen G-Protein-gekoppelten Rezeptor Rhodopsin aktivieren können. Aufgrund ihrer Vielfalt und

großen Bedeutung in der interzellulären Kommunikation bilden GPCRs interessante Ziele für pharmakologische Beeinflussung, was zur Entwicklung einer Vielzahl von Medikamenten geführt hat, die in die G-Protein vermittelte Signaltransduktion eingreifen.

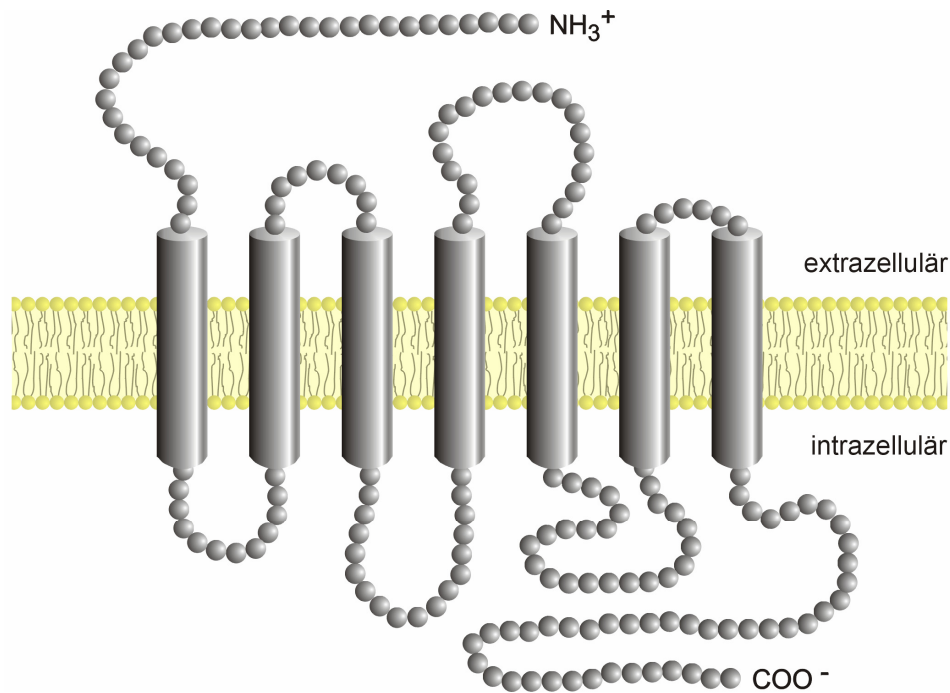


Abbildung 1 | **G-Protein-gekoppelter Rezeptor.** Die Grundstruktur des G-Protein-gekoppelten Rezeptors wird durch sieben  $\alpha$ -Helices gebildet, welche die Zellmembran durchspannen. Die Helices sind durch intra- und extrazytoplasmatische Schleifen miteinander verbunden. Das N-terminale Ende der Rezeptors befindet sich im Extrazellulärraum und bildet bei manchen Rezeptoren die Interaktionsstelle für Liganden. Der intrazelluläre C-Terminus des Rezeptors und Teile der intrazytoplasmatischen Schleifen stehen mit dem G-Protein in Kontakt. Durch die Bindung eines Agonisten erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors über die Plasmamembran hinweg, welche das G-Protein aktiviert.

Trotz der Vielfalt und unterschiedlichen Funktionen besitzen fast alle GPCRs ein gemeinsames Strukturmerkmal. Die Grundstruktur des Rezeptors wird in der Regel durch sieben hydrophobe Domänen gebildet, welche die Plasmamembran in Form von  $\alpha$ -Helices alternierend durchspannen. Verbunden sind die Helices durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen. Der N-Terminus befindet sich außerhalb der Zelle (Abb. 1). Die transmembranalen Helices und der N-terminale Teil des Rezeptors sind für die Bindung des Liganden verantwortlich. Der intrazelluläre C-Terminus und insbesondere die dritte zytoplasmatische Schleife vermitteln die Kopplung an G-Proteine, die für die Weiterleitung des Signals im Zellinneren verantwortlich sind (Strader, Fong et al. 1995; Wess 1997).



Die Besonderheit der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besteht darin, dass sie ihr Signal nicht direkt weitergeben, sondern dies über zwischengeschaltete, intrazelluläre Botenstoffe (sog. „second messengers“) erfolgt, welche durch Effektorenzyme oder Ionenkanäle bereitgestellt werden. Die Kommunikation zwischen Rezeptor und Effektor erfolgt hierbei meist durch heterotrimere G-Proteine, welche an den Rezeptor binden und nach Aktivierung das Signal an den Effektor weitergeben. Diese mehrstufige Signalkaskade ermöglicht es dem Organismus, durch die unterschiedliche Kombination einzelner weniger Komponenten eine größtmögliche Anzahl an verschiedenen Variationen des Signalwegs zu generieren. Weiterhin führt eine Signalkaskade zu einer enormen Verstärkung des ursprünglichen Signals. So kann ein einzelner Rezeptor im selben Zyklus mehrere G-Proteine aktivieren, die dann jeweils Effektorenzyme beeinflussen. Pro Aktivierungszyklus produziert so jeder Effektor einige tausend Moleküle eines „second messengers“, welche schließlich den gewünschten zellulären Effekt auslösen.

## **2.2. Der G-Protein Zyklus**

Das Bindeglied zwischen Sieben-Helix-Rezeptoren und nachgeschalteten Effektoren bilden die heterotrimeren G-Proteine, welche aus drei Proteinuntereinheiten bestehen: einer  $\alpha$ -Untereinheit (39-52 kDa), die Guaninnukleotide binden und GTP hydrolysieren kann, einer  $\beta$ -Untereinheit (35-37 kDa) und einer  $\gamma$ -Untereinheit (6-8 kDa). Die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Untereinheit bilden gemeinsam ein funktionelles Monomer, da sie sich nur unter denaturierenden Bedingungen von einander trennen lassen. Obwohl es viele verschiedene Genprodukte für jede Untereinheit gibt (über 20  $\alpha$ -, 6  $\beta$ - und 12  $\gamma$ -Genprodukte sind bekannt) und durch Kombination dieser Untereinheiten theoretisch entsprechend viele heterotrimere G-Proteine möglich sind, unterscheidet man grundsätzlich vier verschiedene Hauptgruppen von G-Proteinen:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}/G_{13}$ , die durch Unterschiede in der  $\alpha$ -Untereinheit determiniert werden und je nach Klasse spezifische Gewebeverteilung und verschiedene Effektoren besitzen (Gilman 1987; Hamm 1998).

G-Proteine sind molekulare Zeitschalter. Sie können von einem inaktiven Grundzustand durch einen Stimulus in den aktiven Zustand übergehen, der für eine bestimmte Zeitspanne beibehalten wird, um anschließend wieder in den inaktiven Zustand zu wechseln. Im inaktiven Zustand liegt die  $\alpha$ -Untereinheit GDP gebunden

vor und ist mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit assoziiert. Nach Stimulation des Rezeptors durch einen geeigneten Agonisten erfolgt eine transmembranäre Konformationsänderung des Rezeptors. Das G-Protein bindet an den Agonisten-Rezeptor-Komplex. Dies führt zur Freisetzung des von der  $\alpha$ -Untereinheit gebundenen GDP. Da GTP im Vergleich zu GDP intrazellulär in wesentlich höheren Konzentrationen vorliegt, kommt es zu einer raschen Bindung von GTP an  $G\alpha$ . Das G-Protein befindet sich nun im aktiven Zustand: die  $\alpha$ - und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziieren und können jeweils bestimmte Effektormoleküle beeinflussen. Gleichzeitig wird die Hydrolasefunktion der  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert, die GTP zu GDP spaltet, worauf  $G\alpha$  inaktiviert wird. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, der die Dauer der aktiven Phase des G-Proteins determiniert.  $G\alpha$  und  $G\beta\gamma$  reassoziieren anschließend und nehmen so den inaktiven Ausgangszustand wieder ein (Abb. 2) (Gilman 1987).

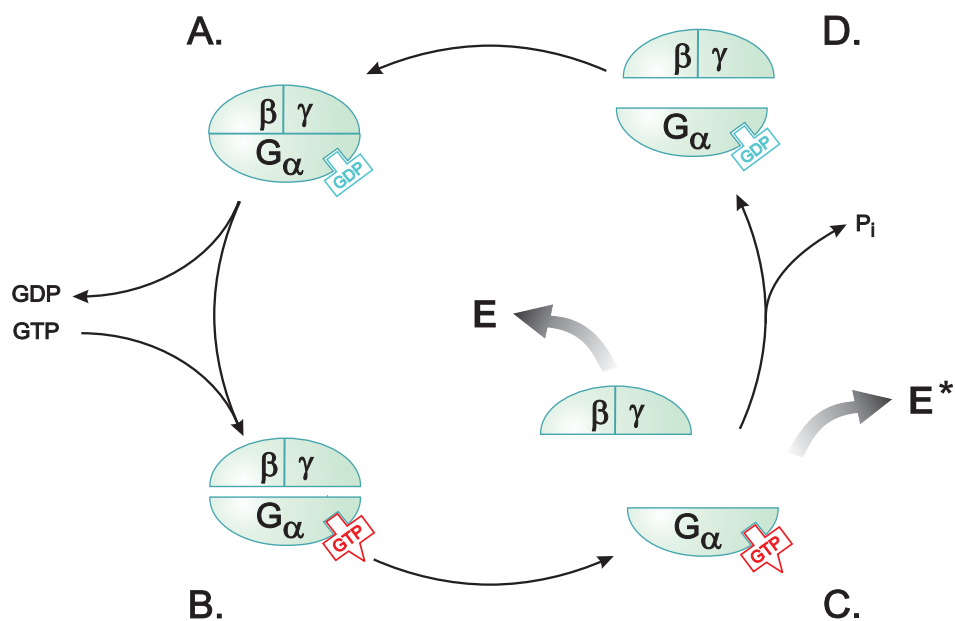


Abbildung 2 | **Schematischer Mechanismus der G-Protein vermittelten Signaltransduktion.** **A** | Im inaktiven Zustand liegt das G-Protein in der heterotrimeren Form ( $G\alpha\beta\gamma$ ) vor. **B** | Nachdem ein Agonist selektiv an seinen Rezeptor gebunden hat, wird das G-Protein durch Konformationsänderung des Rezeptors fest an diesen gebunden und es erfolgt die Aktivierung des G-Proteins. Dies hat den Austausch von GDP durch GTP und **C** | die anschließende Dissoziation von  $G\alpha$  und  $G\beta\gamma$  zur Folge, welche nun unabhängig voneinander Effektoren (E, E\*) beeinflussen können. **D** | Nach Hydrolyse von GTP durch die intrinsische  $G\alpha$ -GTPase erfolgt die Abschaltung von  $G\alpha$  und die Reassoziierung mit  $G\beta\gamma$ .

### **3. Modulation G-Protein vermittelter Signaltransduktion**

Je größer die Bedeutung der interzellulären Kommunikation bei wachsender Zellzahl des Organismus wird, desto schwerer wiegen Fehler, die in diesem Prozess auftreten. Dies wird an der großen Zahl von Erkrankungen deutlich, die aus Defekten in der Signaltransduktion resultieren. Dazu zählen beispielsweise die Entstehung von Tumoren, kardiovaskuläre Erkrankungen und Defekte des Immunsystems (Gärtner, Holzner et al. 1999; Lombardi, Kavelaars et al. 2002; Lohse, Engelhardt et al. 2003). Die strenge Regulation aller Einzelschritte in der Signalkaskade ist daher eine unabdingbare Voraussetzung für die Integrität der zellulären Funktion.

Tatsächlich existieren eine Reihe von wirkungsvollen Mechanismen, die in die Dynamik der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion eingreifen. Der modulare Aufbau dieses Signaltransduktionssystems durch Rezeptoren, G-Proteine, „second messenger“ und Effektoren ermöglicht dabei eine individuelle Kontrolle der einzelnen Komponenten. Darunter fallen in erster Linie regulative Prozesse, die auf Rezeptorebene stattfinden, sowie Prozesse, welche die G-Protein Funktion beeinflussen.

Die wiederholte oder langandauernde Stimulierung eines Rezeptors führt zu einer Abschwächung der zellulären Antwort (Desensibilisierung). Diese erfolgt einerseits durch Verminderung der Rezeptorendichte an der Zelloberfläche (Downregulation), welche durch Änderung der Rezeptorsynthese und -abbaurate erzielt wird, oder andererseits durch Inaktivierung der Rezeptorfunktion (Entkopplung) und Internalisierung. Während die Downregulation von Rezeptoren ein Prozess über mehrere Stunden ist, erfolgt die funktionelle Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein innerhalb weniger Sekunden bis Minuten und wird durch Phosphorylierung des aktivierten Rezeptors vermittelt. Hierfür sind einige Effektorenzyme der G-Protein vermittelten Signaltransduktion, wie die Proteinkinasen A und C, sowie spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs), zu denen beispielsweise die  $\beta$ -adrenerge Rezeptorkinase ( $\beta$ ARK) und die Rhodopsinkinase zählen, verantwortlich (Lohse 1993; Pippig, Andexinger et al. 1993).

Auf Ebene des G-Proteins stellen sowohl die  $G\alpha$ - als auch die  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten Angriffspunkte zur Regulation des Signals dar. Für die Aktivität des G-Proteins ist der Komplex von  $G\alpha$  mit GTP entscheidend, welcher durch die intrinsische GTPase Funktion von  $G\alpha$  durch Hydrolyse von GTP zu GDP begrenzt wird. Verschiedene  $G\alpha$ -Effektormoleküle, wie die Phospholipase  $C\beta 1$  (Berstein, Blank et al. 1992) oder

die  $\gamma$ -Untereinheit der cGMP-Phosphodiesterase (Arshavsky, Dumke et al. 1992), haben neben der Signalweiterleitung ebenfalls Einfluss auf die GTPase-Aktivität von  $G\alpha$ . Diese GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) beschleunigen die Hydrolyse von GTP an  $G\alpha$  und begrenzen so durch negative Rückkopplung die eigene Aktivierung. Darüber hinaus wurde eine Reihe weiterer  $G\alpha$ -interagierender Proteine identifiziert, die Einfluss auf die G-Protein vermittelte Signaltransduktion haben (sog. RGS: regulator of G-protein signaling). Diese Gruppe von Proteinen zeigt eine weite Verbreitung in vielen eukaryotischen Spezies (Chan und Otte 1982; Lee und Adams 1994). Ihnen gemein ist eine ca. 130 Aminosäuren lange konservierte Region (RGS-Box), welche das RGS-Protein zur Interaktion mit den  $\alpha$ -Untereinheiten bestimmter G-Proteine befähigt und damit die GTPase-Aktivität von  $G\alpha$  beschleunigt (Berman, Wilkie et al. 1996; Chen, Wieland et al. 1996; Watson, Linder et al. 1996). Darüber hinaus scheinen einige RGS-Proteine  $G\alpha$ -Effektoren direkt zu inhibieren, indem sie an den  $G\alpha$ -GTP-Komplex binden und damit die Interaktion von  $G\alpha$  und dem Effektorenzym verhindern (Hepler, Berman et al. 1997).

### **3.1. Modulierung des G-Protein-Signals durch Phosducin**

Während für die  $\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine eine Reihe von Effektoren gefunden wurde und zentrale Regulationsmechanismen bekannt sind, blieb die Funktion der  $\beta\gamma$ -Untereinheit lange unklar. Nahm man anfänglich an, die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit sei ausschließlich Sequestrationspartner von  $G\alpha$ , um die inaktive heterotrimere Form des G-Proteins wiederherzustellen, so sind inzwischen eine Vielzahl an Effektorfunktionen der  $G\beta\gamma$  Untereinheit identifiziert. Die stetig wachsende Liste der  $G\beta\gamma$ -Effektoren umfasst dabei unter anderem Ionenkanäle, Phospholipasen, Adenylatzyklasen sowie diverse Kinasen (Clapham und Neer 1997). Aufgrund dieser neu gewonnenen Bedeutung der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit ist es nicht weiter verwunderlich, dass auch für diesen Signalweg eigene Regulationsmechanismen bestehen. Als bekanntester Vertreter hierfür wurde Phosducin gefunden.

Phosducin (Phd) ist ein zytosolisches Phosphoprotein von 33 kDa Molekulargewicht, das erstmalig in den Photorezeptorzellen der Retina identifiziert werden konnte (Lolley, Brown et al. 1977; Lee, Lieberman et al. 1987; Lee, Lieberman et al. 1990). Dort stellt es eines der am höchsten exprimierten Proteine dar (Lolley, Brown et al. 1977; Reig, Yu et al. 1990). Ebenfalls konnte es in hohen Konzentrationen in der

phylogenetisch verwandten Zirbeldrüse (Corpus pineale) nachgewiesen werden (Reig, Yu et al. 1990; Craft, Lolley et al. 1991; Lohse, Blüml et al. 1996). Zudem wurde in einer Reihe von Organen mRNA von Phosducin isoliert, was auf ein ubiquitäres Vorkommen dieses Proteins schließen lässt (Danner und Lohse 1996).

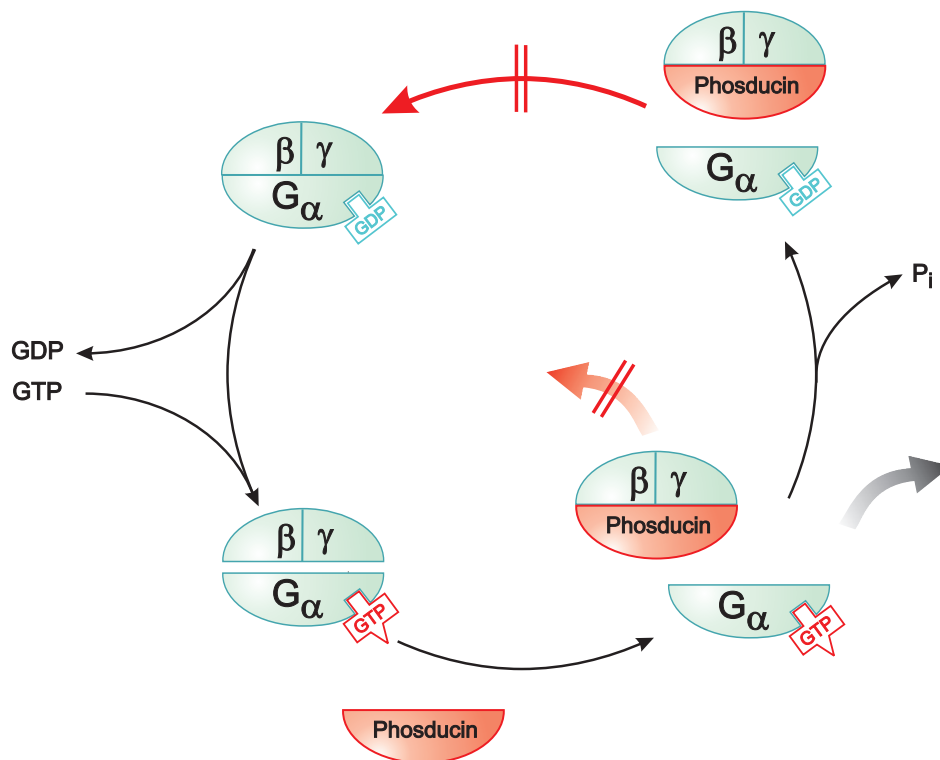


Abbildung 3. | **Mechanismus der G-Protein Inhibition durch Phosducin.** Phosducin bindet die freien Gβγ-Untereinheiten des aktivierten G-Proteins. Dies führt zu einer Inhibition des Gβγ-vermittelten Signals. Gleichzeitig erfolgt auch die Dämpfung des Gα-vermittelten Signals, da die von Phosducin gebundenen Gβγ-Untereinheiten nicht mit Gα reassoziieren können, und somit die Gesamtmenge an funktionellen heterotrimeren G-Proteinen reduziert wird.

Phosducin ist ein Modulator der G-Protein vermittelten Signaltransduktion. Es bindet Gβγ-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine und verhindert so die Reassoziierung mit Gα. Durch das Abfangen der βγ-Untereinheit werden einerseits Gβγ-vermittelte Effekte direkt inhibiert. Gleichzeitig erfolgt aber auch eine indirekte Abschwächung des Gα-Signalwegs, da durch das Fehlen der Gβγ-Untereinheit die Reassoziierung des Gαβγ-Trimers nicht stattfinden kann und so das Reservoir an aktiven G-Proteinen reduziert wird (Bauer, Müller et al. 1992) (Abb. 3).

Phosducin selbst ist einer phosphorylierungsabhängigen Regulation unterworfen (Lee, Lieberman et al. 1987; Lee, Lieberman et al. 1990; Reig, Yu et al. 1990). Während die dephosphorylierte Form eine starke Bindung mit  $G\beta\gamma$  eingeht, führt die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) an Serin 73 von Phosducin (Abb. 4) zum Verlust seiner inhibitorischen Effekte gegenüber G-Proteinen (Bauer, Müller et al. 1992; Hawes, Touhara et al. 1994; Yoshida, Willardson et al. 1994). Dieser Effekt wird offenbar nicht durch direkte Interferenz des Phosphatrestes mit der  $G\beta\gamma$ -Bindungsregion von Phosducin erzielt, da der Serinrest 73 keinen direkten räumlichen Bezug dazu aufweist. Vielmehr scheint die Phosphorylierung von Phosducin zu einer Konformationsänderung des Moleküls zu führen, welche die Bindungsfähigkeit an  $G\beta\gamma$  drastisch reduziert (Gaudet, Bohm et al. 1996). Darüberhinaus wird Phosducin an Serin 54 durch die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin abhängige Kinase II (CaMKII) phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt ebenfalls zu einer dramatischen Abschwächung der  $G\beta\gamma$ -Bindung von Phosducin und ermöglicht zudem die Bindung von Calcium-bindenden 14-3-3 Proteinen an Phosducin. Die Funktion dieser zusätzlichen Protein-Protein-Interaktion ist bisher unbekannt (Thulin, Savage et al. 2001).

Die Struktur Phosducins ist im Komplex mit  $G_i\beta\gamma$  durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden (Gaudet, Bohm et al. 1996) (Abb. 4). Danach besteht Phosducin aus zwei strukturell verschiedene Domänen. Der polare N-Terminus wird hauptsächlich aus Helix 1 gebildet, welche durch zwei weitere  $\alpha$ -Helices und flexible Bereiche umgeben wird. Diese Flexibilität mag erklären, warum die  $G\beta\gamma$ -Bindung durch die aminoternale Domäne erfolgt. Vor allem die ersten 65 Aminosäuren des Phosducins sind für die feste Bindung der  $G\beta$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine von besonderer Bedeutung (Loew, Ho et al. 1998). Tryptophan 29 in Phosducin scheint dabei den sonst sehr flexiblen N-Terminus teilweise zu stabilisieren (Gaudet, Bohm et al. 1996) und ist von entscheidender Bedeutung für die Bindung von  $G\beta\gamma$  (Xu, Wu et al. 1995). Die Bindung an Phosducin führt zu Änderungen der Konformation von  $G\beta$ , was die Dissoziation des  $G\beta\gamma$ -Komplexes von der Zellmembran zur Folge hat. Darüber hinaus findet sich die für die  $G\beta\gamma$ -Bindung regulative Phosphorylierungsstelle an Serin 73 ebenfalls im N-terminalen Bereich Phosducins. Diese Aminosäure liegt am äußeren Rand des Proteins und ist somit gut für die Proteinkinase A erreichbar. Der C-Terminus des Phosducins besteht aus vier

$\beta$ -Faltblättern, welche von drei  $\alpha$ -Helices umgeben werden. Diese im Vergleich zum N-Terminus relativ stabile Formation hat große strukturelle Ähnlichkeit zu Thioredoxin, einem Cystein-interagierenden Protein. Allerdings scheinen keine funktionelle Ähnlichkeiten zu bestehen (Gaudet, Bohm et al. 1996). Zwar besitzt der C-Terminus ebenfalls  $G\beta\gamma$ -bindende Eigenschaften (Blüml, Schnepf et al. 1997), jedoch befinden sich für die Funktion von Phosducin regulative Abschnitte nur in der N-terminalen Domäne, was durch die relative Flexibilität des N-Terminus im Vergleich zu der Thioredoxin-Domäne erklärt werden kann.

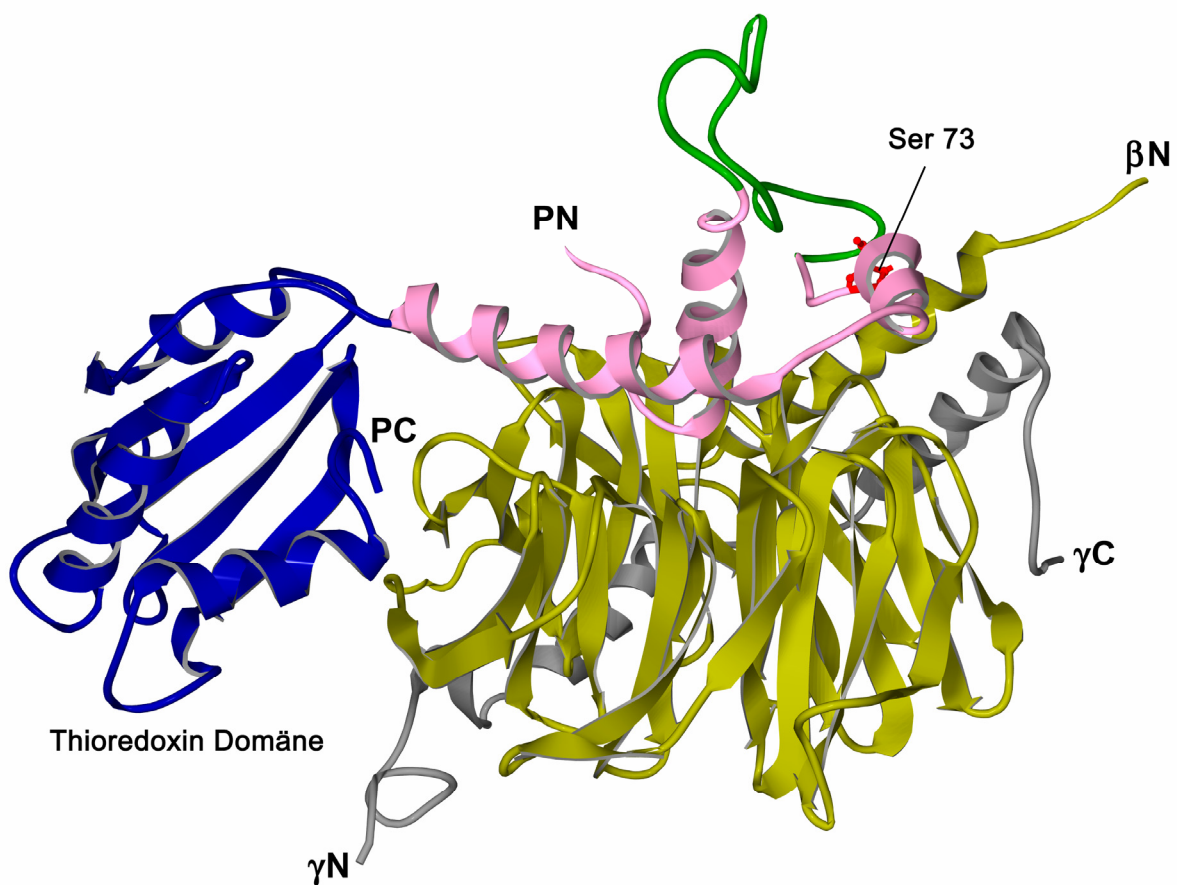


Abbildung 4. | **Kristallstruktur von Phosducin und  $G\beta\gamma$ .** Das Diagramm zeigt die Struktur Phosducins im Komplex mit der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit von Transducin. Der C- und der N-Terminus der einzelnen Moleküle sind angegeben (P=Phosducin,  $\gamma$ = $G\gamma$ -Untereinheit,  $\beta$ = $G\beta$ -Untereinheit). Es lassen sich zwei Domänen unterscheiden: Der N-Terminus des Phosducins (PN, rosa/grün) besteht aus den Helices 1-3 und ist durch hohe Flexibilität gekennzeichnet. In dieser Domäne befindet sich die Phosphorylierungsstelle an Position Ser 73 (rot). Die C-terminale Domäne (PC, blau) wird durch ein 5-faches  $\beta$ -Faltblatt gebildet, welches von drei Helices umgeben ist. Dieser Bereich des Phosducins zeigt große Homologie mit Thioredoxin. Der grün gefärbte Bereich (As 37-66) im N-Terminus konnte nicht exakt kristallisiert werden (mod. nach Gaudet, Bohm et al. 1996;  $\beta N$ : N-Terminus von  $G\beta$ ,  $\beta C$ : C-Terminus von  $G\beta$ ,  $\gamma N$ : N-Terminus von  $G\gamma$ ,  $\gamma C$ : C-Terminus von  $G\gamma$ ).

Die Modulation des G-Protein-Signals durch Phosducin scheint eine bedeutende Rolle bei der Hell-Dunkel Adaptation des Auges zu spielen. Hier findet sich Phosducin in hohen Konzentrationen in den äußeren Segmenten der Sehzellen (rod outer segment = ROS). Die Belichtung des Farbstoffs Rhodopsin in den Stäbchenzellen führt zur Aktivierung des G-Proteins Transducin ( $G_t$ ) und der daran gekoppelten cGMP-Phosphodiesterase, welche über cGMP-gesteuerte Kanäle das Membranpotential reguliert (Stryer 1991). Im dunkel-adaptierten Auge liegt Phosducin hauptsächlich in der phosphorylierten inaktiven Form vor (Lee, Brown et al. 1984). Im licht-adaptierten Auge hingegen wird Phosducin dephosphoryliert, worauf es mit hoher Affinität  $G\beta\gamma$ -Dimere bindet. Dies führt zu einer Abschwächung des  $G_t$  vermittelten Signals und mittelbar zu einem reduziertem Rezeptorpotential (Lee, Brown et al. 1984; Lee, Whelan et al. 1988; Lee, Ting et al. 1992; Yoshida, Willardson et al. 1994; Wilkins, Bitensky et al. 1996).

Darüber hinaus inhibiert Phosducin allerdings nicht nur die Funktion von  $G_t$  (Lee, Ting et al. 1992), sondern in gleichem Ausmaß auch die von  $G_s$ ,  $G_i$  und  $G_o$  (Bauer, Müller et al. 1992; Bauer und Lohse 1998). Weiterhin lassen sich durch Phosducin auch von der Phototransduktion unabhängige  $G\beta\gamma$ -vermittelte Effekte unterdrücken, so etwa die Translokation der GRK2 an die Zellmembran, welche die Phosphorylierung und Inaktivierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors katalysiert (Hekman, Bauer et al. 1994), oder die Stimulation der Phospholipase C (Hawes, Touhara et al. 1994). Die daraus abgeleitete Vermutung einer generellen regulatorischen Funktion erhärtete sich auch durch den Befund, dass Phosducin, abgesehen von einer etwas höheren Affinität für Transducin- $\beta\gamma$ , keine Selektivität für bestimmte  $G\beta\gamma$ -Kombinationen aufweist (Müller, Straub et al. 1996).

Aufgrund seiner Interferenz mit den  $G\beta\gamma$ - und  $G\alpha$ -Signalwege stellt Phosducin einen wichtigen Modulator eines Postrezeptor-Signalsystems dar.

### **3.2. Phosducin-ähnliche Proteine**

Neben Phosducin, das in einer Reihe verschiedener Vertebraten nachgewiesen werden konnte, wurden aus Rattenhirn die cDNAs von zwei Proteinen kloniert, die große Homologie mit der Sequenz von Phosducin aufwiesen (Miles, Barhite et al. 1993). Demzufolge wurden die korrespondierenden Proteine „Phosducin-ähnliche Proteine“ (Phosducin-like Protein, PhLP) genannt. Es existieren eine kurze, aus 218



Aminosäuren bestehende Variante (PhIP short, PhIP<sub>S</sub>) und eine lange Variante (PhIP long, PhIP<sub>L</sub>). Beide Proteine unterscheiden sich lediglich durch einen um 79 Aminosäuren verlängerten N-Terminus von PhIP<sub>L</sub> (vgl. Anhang 1). Beide PhIP-Isoformen weisen hohe Homologie mit den zentralen und C-terminalen Regionen von Phosducin auf, unterscheiden sich aber in dem für die G $\beta\gamma$ -Bindung verantwortlichen N-Terminus. Auch fehlt die für die Regulation von Phosducin wichtige PKA-Phosphorylierungsstelle. Dennoch konnte gezeigt werden, dass beide PhIP-Formen G $\beta\gamma$ -Untereinheiten binden können und somit ebenfalls zu den Regulatoren G-Protein vermittelter Signaltransduktion gezählt werden können (Schröder und Lohse 1996; Schröder, Blüml et al. 1997). Wurde PhIP zunächst nur im Gehirn und im Auge identifiziert, so zeigten weitere Studien, dass PhIP wie Phosducin eine breite Gewebeverteilung aufweist (Miles, Barhite et al. 1993; Schröder und Lohse 2000). Aus neueren Studien geht hervor, dass PhIP Einfluss auf die korrekte Faltung von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten und anderen Proteinen bei deren Synthese hat. Diese Befunde werfen ein völlig neues Licht auf die Familie der Phosducin-ähnlichen Proteine (Humrich, Bermel et al. 2005; Lukov, Hu et al. 2005).

Neben den G $\beta\gamma$ -bindenden Formen wurden zwei weitere Phosducin-ähnliche Proteine in der Retina entdeckt, welche keinen Einfluss auf die G-Protein Funktion zu haben scheinen. PhIOP1 und PhIOP2 (Phosducin-like Orphan Protein) sind trotz großer Homologie zu Phosducin nicht zur G $\beta\gamma$ -Bindung befähigt. Studien zur intrazellulären Verteilung zeigten, dass PhIOP in hoher Konzentration im Zellkern vorliegt. Durch Yeast-two-hybrid screens konnte die Interaktion von PhIOP1 sowie Phosducin mit dem Retina- und Pinealozyten-spezifischen Transkriptionsfaktor CRX (Zhu und Craft 2000) sowie mit der proteasomalen Untereinheit und putativen Transkriptionsfaktor SUG1 (Zhu und Craft 1998) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass einige Phosducin-Isoformen eine Funktion in der Transkriptionsregulation besitzen.

Neben diesen Phd-ähnlichen Proteinen in höheren Organismen existieren eine Reihe weiterer Phosducin-ähnlicher Proteine in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Flanary, DiBello et al. 2000), dem Pilz *Cryphonectria parasitica* (Kasahara, Wang et al. 2000) sowie in verschiedenen Pflanzen (Holm, Hardtke et al. 2001; Blaauw, Knol et al. 2003).

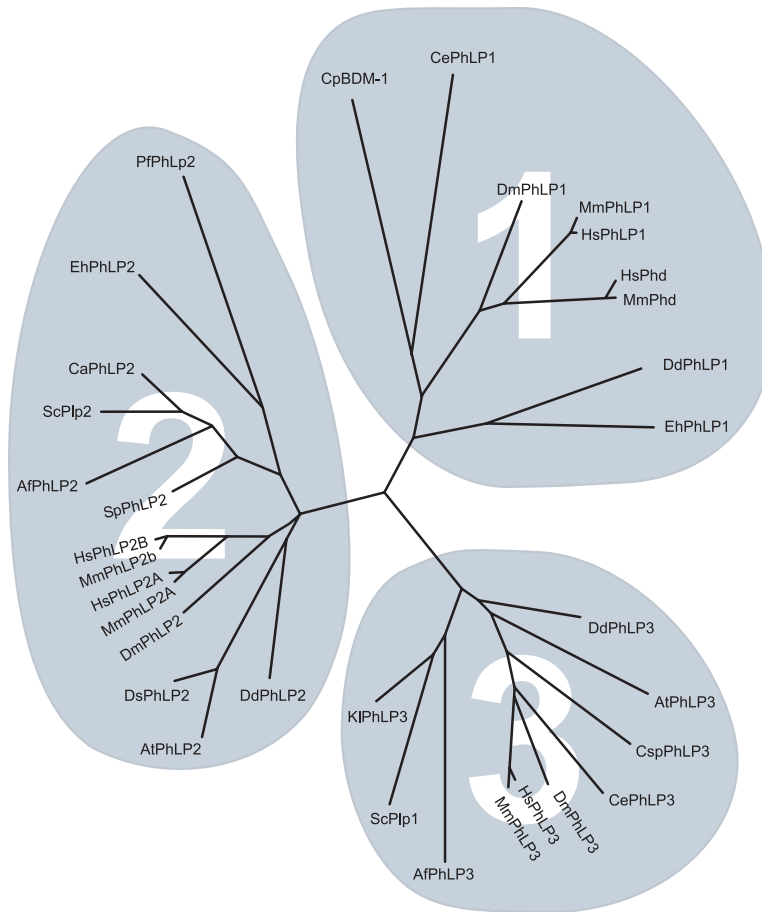


Abbildung 5. | **Phylogenetischer Vergleich der Phosducin-Familie aus verschiedenen Organismen.** 33 verschiedene Proteine wurden durch multiple Alignments verglichen. Es lassen sich drei Gruppen unterscheiden.

(Af=*Aspergillus fumigatus*, At=*Arabidopsis thaliana*, Ca=*Candida albicans*, Ce=*Caenorhabditis elegans*, Cp=*Cryptosporidium parvum*, Dd=*Dictyostelium discoideum*, Dm=*Drosophila melanogaster*, Eh=*Entamoeba histolytica*, Hs=*Homo sapiens*, Kl=*Kluyveromyces lactis*, Mm=*Mus musculus*, Os=*Oryza sativa*, Pf=*Plasmodium falciparum*, Sc=*Saccharomyces cerevisiae*, Sp=*Schizosaccharomyces pombe*). Mod. nach Blaauw, Knol et al 2003.

Kürzlich haben Blaauw et al. drei weitere Vertreter Phosducin-ähnlicher Proteine in *Dictyostelium discoideum* entdeckt. Der phylogenetische Vergleich dieser Proteine mit 30 weiteren Proteinen der Phd-Familie aus verschiedenen Eukaryonten und Pflanzen zeigte, dass sich Phosducin und die Phosducin-ähnlichen Proteine in drei Gruppen einteilen lassen (Blaauw, Knol et al. 2003). Zur Gruppe 1 zählen u.a. das retinale Phosducin und das humane PhIP<sub>L</sub>. Alle Mitglieder dieser Gruppe besitzen das hochkonservierte Gβγ-Bindemotiv TGPKG<sub>L</sub>VINDWRK von Phosducin (Gaudet, Bohm et al. 1996) und scheinen zur Gβγ-Interaktion befähigt zu sein. Den Vertretern der Gruppe 2 fehlt ein Teil des aminoterminalen Endes der Gruppe-1-Proteine. Diese

Proteine sind vor allem in niederen Eukaryonten und Pflanzen zu finden. Den Gruppe-3-Proteinen fehlt beinahe der komplette N-Terminus, so dass eine G $\beta$  $\gamma$ -Interaktion unwahrscheinlich zu sein scheint (Blaauw, Knol et al. 2003).

## **4. Posttranslationale Modifikation**

Die posttranslationale Modifikation ist einer der wichtigsten Mechanismen, um die Funktion, Aktivität oder Lokalisation von Proteinen nach deren Synthese zu beeinflussen. Meist werden niedermolekulare Substanzen, wie Zucker, Phosphatgruppen oder Lipide durch kovalente Bindungen an Aminosäureseitenketten des Zielproteins angehängt. Diese nachträglichen Eingriffe in die Struktur des Proteins führen zu Änderungen der Konformation oder der Oberflächenladung, was direkte Auswirkungen auf die Funktionalität des Proteins haben kann, oder es wird hierdurch die Bindung weiterer koregulativer Proteine ermöglicht. Ubiquitin und seine verwandten Proteine nehmen eine Sonderstellung unter den Proteinmodifikatoren ein, da es sich hierbei selber um Polypeptide handelt, die an Lysingruppen anderer Proteine gebunden werden.

### **4.1. Ubiquitin**

Ubiquitin war lange Zeit das einzig bekannte Beispiel posttranslationaler Modifikation durch ein Polypeptid. Das Ubiquitinsystem spielt als einer der regulatorischen Schlüsselmechanismen eine bedeutende Rolle bei vielen essentiellen Funktionen der Zelle, wie der Beeinflussung des Zellzyklus, der Signalübertragung, der Antigenpräsentation und dem Abbau von zellulären Bestandteilen (Hochstrasser 1996; Ciechanover 1998; Hershko und Ciechanover 1998).

Ubiquitin ist ein 8 kDa großes Polypeptid, das mit nur drei Aminosäuren Unterschied zwischen Mensch und Hefe eines der evolutionär am höchsten konservierten Proteine ist. Ubiquitin wird durch einen energieabhängigen, dreistufigen Prozess auf ein Zielprotein übertragen. Der C-Terminus von Ubiquitin enthält einen konservierten Glycin-Rest, der ATP-abhängig aktiviert wird und so eine Thioesterbindung mit dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1 eingehen kann (Haas und Siepmann 1997). Das aktivierte Ubiquitin wird im folgenden auf ein Überträgerprotein E2 transferiert, mit dem es wiederum eine Thioesterbindung eingeht. Danach wird der C-Terminus von

Ubiquitin mit Hilfe einer Ligase oder eines Ligasekomplexes (E3) über eine  $\varepsilon$ -Isopeptidbindung kovalent an einen Lysinrest des Zielproteins gebunden (vgl. Abb. 6, S. 16). Lysinreste von Ubiquitin können selber als Akzeptorstelle für weitere Ubiquitinmoleküle dienen. So entstehen lange Poly-Ubiquitinketten, die als Erkennungssignal für das 26S-Proteasom dienen (Pickart 1997). Hier erfolgt schließlich der Abbau des Proteins. Die Ubiquitinketten werden durch spezifische Peptidasen in Monomere zerlegt und dem Ubiquitinpool der Zelle wieder zugeführt. Die Ubiquitinierung unterliegt sehr oft der Regulation durch Phosphorylierung des Zielproteins, welche als Startsignal wirkt, und andererseits der Regulation durch eine Reihe von deubiquitinierenden Enzymen, die Ubiquitinketten von Zielproteinen entfernen, bevor sie das Proteasom erreicht haben. Obwohl die proteasomale Degradation polyubiquitinerter Proteine die bei weitem wichtigste Funktion des Ubiquitins ist, scheinen Monoubiquitin-Modifikationen und verzweigte Ubiquitinketten an weiteren Prozessen wie der Membranlokalisation und der Endozytose, sowie der Knospung von Retroviren beteiligt zu sein (Hicke 1997). Wie die letzten Jahren gezeigt haben, spielt Ubiquitin aufgrund seiner breiten Gewebeverteilung und vielfältigen Interaktion mit zellulären Prozessen in der Genese einer Reihe von Erkrankungen eine entscheidende Rolle (Glickman und Ciechanover 2002).

## **4.2. SUMO**

### **4.2.1. Die SUMO Familie**

Vor einigen Jahren wurden verschiedene andere Polypeptide entdeckt, die in ihrer Struktur und Funktion dem Ubiquitin sehr ähnlich sind. Mittlerweile existieren fünf verschiedenen Typen dieser UBLs (Ubiquitin-like proteins), wovon der *Small Ubiquitin-related Modifier* SUMO der am besten untersuchte Vertreter ist. Wie Ubiquitin zählt auch SUMO zu den evolutionär hochkonservierten Proteinen. Während Invertebraten nur ein SUMO-Gen (SMT3) besitzen, sind für Wirbeltiere vier Mitglieder der Familie bekannt: SUMO-1 (auch PIC1, Ubl1, Sentrin, GMP1, Smt3c und hSmt3 genannt), SUMO-2 (bzw. Sentrin2 oder Smt3a) und SUMO-3 (bzw. Sentrin3 oder Smt3b) (Boddy, Howe et al. 1996; Matunis, Coutavas et al. 1996; Okura, Gong et al. 1996; Kamitani, Kito et al. 1998). Das kürzlich in der Niere entdeckte SUMO-4 erweitert die Familie der UBLs (Bohren, Nadkarni et al. 2004).

SUMO-1 ist ein 101-Aminosäure-Protein, welches zu 18% identisch und zu 48% homolog mit humanem Ubiquitin ist. Die Tertiärstruktur entspricht der Ubiquitin-typischen  $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Struktur (Bayer, Arndt et al. 1998) (vgl. Abb. 24, S. 76). SUMO-2 (95 As) und SUMO-3 (103 As) sind nur zu 46-48% identisch mit SUMO-1, weisen dafür aber mit 97% eine hohe Identität untereinander auf, so dass sie zusammen als eigene Subgruppe angesehen werden können (Kamitani, Kito et al. 1998; Saitoh und Hinchev 2000). Das erst kürzlich identifizierte SUMO-4 ähnelt am ehesten SUMO-2 (87% Homologie) und konnte im Gegensatz zu der ubiquitären Expression der anderen Familienvertreter hauptsächlich in der Niere nachgewiesen werden (Bohren, Nadkarni et al. 2004).

#### **4.2.2. Aktivierung und Konjugation**

Die Modifikation von Proteinen mit Vertretern der SUMO Familie erfolgt prinzipiell nach dem gleichen Mechanismus wie derjenige der Ubiquitinierung.

Analog zu Ubiquitin wird SUMO als Vorläuferprotein gebildet. Die aktive Form wird durch Prozessierung des C-Terminus durch eine Gruppe von SUMO-spezifischen Cysteinproteasen (SUSPs) gebildet. Hierdurch wird ein C-terminales Glycin-Glycin-Motiv freigesetzt, welches für die Isopeptidbindung an die Zielproteine nötig ist.

Ein heterodimeres E1-Enzym, welches aus den Untereinheiten AOS1 und UBA2 besteht (Johnson, Schwienhorst et al. 1997; Desterro, Rodriguez et al. 1999; Gong, Li et al. 1999; Okuma, Honda et al. 1999), bildet darauf eine Thioester-Bindung mit dem aktivierten SUMO. Das Dimer aus beiden Untereinheiten ist zwar dem Ubiquitin-E1-Enzym strukturell sehr ähnlich, allerdings kann Ubiquitin durch AOS1/UBA2 nicht aktiviert werden.

Im Gegensatz zu einer großen Zahl an Ubiquitin-E2-Enzymen ist UBC9 das einzige SUMO-E2-Enzym (Desterro, Thomson et al. 1997; Johnson und Blobel 1997; Lee, Melchior et al. 1998; Saitoh, Sparrow et al. 1998). UBC9 bildet Thioester-Bindungen mit allen SUMO-Vertretern, nicht aber mit Ubiquitin oder anderen Ubiquitin-ähnlichen Proteinen (Gong, Li et al. 1999). Weiterhin scheint UBC9 für die Substratbindung bei der SUMOylierung verantwortlich zu sein. Während zur Übertragung von Ubiquitin auf das Zielprotein zusätzlich E3-Enzyme (sog. Ubiquitin-Ligasen) benötigt werden, haben *in vitro* Studien gezeigt, dass für die Modifikation eines Proteins mit SUMO nur das E1- und das E2-Enzym notwendig sind (Desterro, Rodriguez et al. 1998; Okuma, Honda et al. 1999). Dennoch wurde die Existenz von SUMO E3-Proteinen lange Zeit

postuliert. Diese Vermutung wurde durch die Entdeckung einige RING-Finger-Domäne-Proteine bestätigt, die die SUMOylierung bestimmter Proteine *in vivo* verstärken können. In der Hefe vermitteln die RING-Finger Proteine Siz 1 und Siz 2 ca. 99% der SUMOylierung von Proteinen. In Säugerzellen wurden bisher die RING-Finger Proteine der PIAS Gruppe (protein inhibitor of activated stat) (Johnson und Gupta 2001; Takahashi, Kahyo et al. 2001) und Topors (Weger, Hammer et al. 2005) als SUMO-Ligasen identifiziert. Darüber hinaus besitzen das strukturell und funktionell verschiedene Ran-Bindeprotein 2 (RanBP2) (Pichler, Gast et al. 2002) und das Polycomb-Protein 2 (Pc2) (Kagey, Melhuish et al. 2003) ebenfalls E3-Ligasefunktion.

SUMO-1 besitzt keine Lysin-Gruppe, die mit dem für die Kettenbildung notwendigen Lysin 48 des Ubiquitinmoleküls vergleichbar wäre. Deshalb wird SUMO-1 ausschließlich als Monomer gebunden (Bayer, Arndt et al. 1998). Allerdings konnte gezeigt werden, dass SUMO-2 und -3 unter bestimmten Bedingungen zur Kettenbildung fähig sind. Deren Funktion ist aber bisher unklar (Tatham, Jaffray et al. 2001).

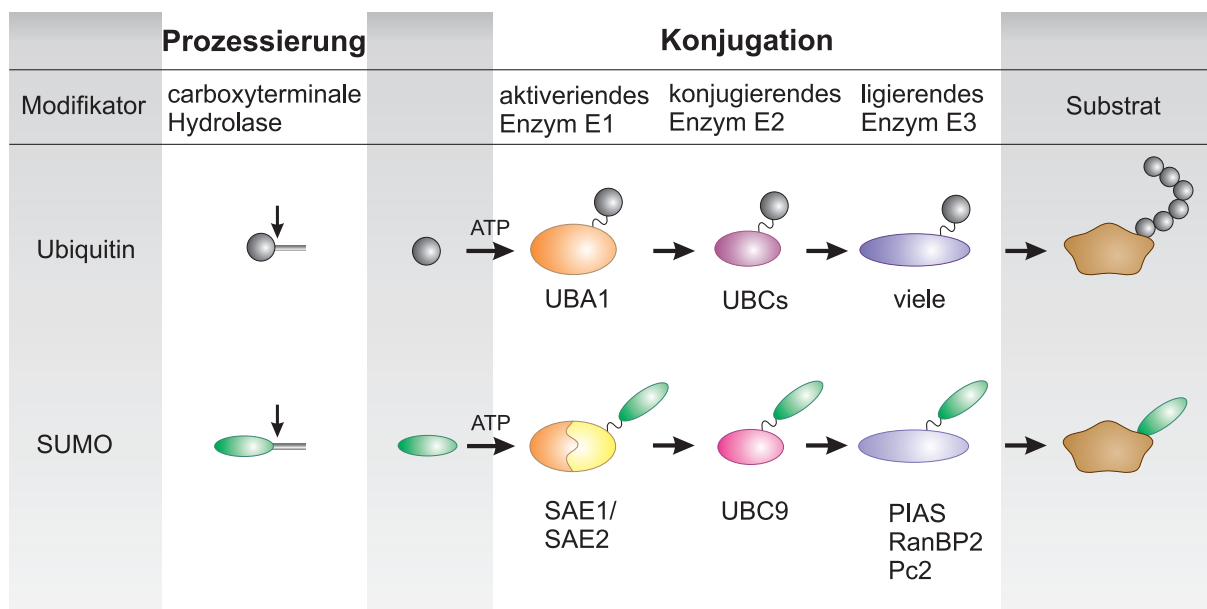


Abbildung 6. | **Vergleich der Aktivierung und Konjugation von Ubiquitin und SUMO.** Ubiquitin und SUMO werden als Vorläuferproteine synthetisiert und am C-Terminus durch Hydrolasen prozessiert (vertikale Pfeile). Anschließend werden sie in einer dreistufigen enzymatischen Kette (E1-E3) unter Bildung von Thioestergruppen mit dem E1- und E2-Enzym an ihr Substrat konjugiert. (mod. nach Müller, Hoegge et al. 2001)

### **4.2.3. Desumoylierung**

Obwohl aus Bindungsstudien mit UBC9 eine Reihe von Proteinen als potentielle Ziele für SUMOylierung hervorgingen, wurde die direkte Modifikation mit SUMO bisher nur für einen Bruchteil der Proteine gezeigt. Dies beruht nicht zuletzt auf der technisch relativ schweren Handhabbarkeit dieser Proteinmodifikation. Verantwortlich hierfür ist eine Gruppe von Cystein-Proteasen, die selektiv die  $\epsilon$ -Isopeptidbindung von SUMO und dem Zielprotein spalten. Diese Enzyme gehören wie die für die Reifung von SUMO benötigten Proteasen in die Gruppe der SUMO spezifischen Proteasen (SUSPs). In der Hefe wurden zuerst zwei dieser deSUMOylierenden Enzyme identifiziert (Li und Hochstrasser 1999), welche essentiell für den Übergang aus der G2- in die M-Phase des Hefe-Zellzyklus sind. Die Deletion eines dieser Enzyme führte zur Kumulation von SUMOylierten Proteinen und zum Tod der Zelle (Seufert, Futcher et al. 1995). Dies lässt auf eine grundlegende Funktion der SUMOylierung und DeSUMOylierung im Zellzyklus schließen. In eukaryotischen Zellen sind bisher sieben verschiedene Proteasen (SUSP I-VII) bestimmt worden (Yeh, Gong et al. 2000). Interessanterweise zeigen diese deSUMOylierenden Enzyme unterschiedliche subzelluläre Verteilungsmuster. Die DeSUMOylierung erfolgt demnach in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation eines Proteins (Gong, Millas et al. 2000). Darüber hinaus scheinen die einzelnen SUMO-Proteasen unterschiedliche Spezifität für die verschiedenen SUMO Isoformen aufzuweisen (Nishida, Tanaka et al. 2000). Zusammen deutet dies auf eine wesentlich höhere Bedeutung des Wechselspiels zwischen Modifikation und Demodifikation hin, als dies für Ubiquitin bekannt ist.

### **4.2.4. Effekte der SUMOylierung**

Obwohl der Mechanismus der SUMOylierung weitgehend aufgeklärt ist und mittlerweile eine Reihe von Zielproteinen bekannt ist, bleibt der eigentliche Effekt der SUMOylierung auf die Zielproteine bisher noch weitgehend unverstanden. Es wurden zwei grundlegende funktionelle Modelle postuliert (vgl. auch Tab. 1):

1. SUMO beeinflusst den subzellulären Proteintransport –

Am Beispiel des am nukleären Porenkomplex (NPC = nuclear pore complex) lokalisierten Proteins RanGAP1 (Ran GTPase-activating protein 1), welches ein

Regulator des Kerntransports ist, konnte demonstriert werden, dass SUMOylierung eine Voraussetzung ist, damit das zytosolische RanGAP1 mit dem Protein RanBP2 assoziieren kann, um eine funktionelle Einheit am nukleären Porenkomplex zu bilden (Matunis, Coutavas et al. 1996; Matunis, Wu et al. 1998). Dies zeigte erstmals, dass die Modifikation mit SUMO die Lokalisation bestimmter Zielproteine in der Zelle, insbesondere den Kerntransport, beeinflussen kann.

## 2. SUMO ist ein direkter Gegenspieler von Ubiquitin –

Ein anderes Modell wurde am Beispiel des NF- $\kappa$ B Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  vorgeschlagen. I $\kappa$ B $\alpha$  ist einer starken Metabolisierung über den Ubiquitinweg unterworfen. Desterro et al. konnten zeigen, dass an denselben Ubiquitin-bindenden Lysinrest ebenfalls SUMO gebunden werden kann (Desterro, Rodriguez et al. 1998). Dadurch wird der proteasomale Abbau unterbrochen und in Folge dessen die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B herabgesetzt. Ähnliche Effekte konnten ebenfalls für Mdm2 gezeigt werden (Buschmann, Fuchs et al. 2000).

Darüber hinaus werden eine Reihe weiterer Funktionen der SUMOylierung diskutiert. Viele der bisher identifizierten Zielproteine der SUMOylierung sind nukleäre Proteine, welche als Transkriptionsfaktoren wirken. SUMO scheint bei einigen dieser Proteine direkten Einfluss auf deren Bindung an DNA zu nehmen und vermag somit die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren zu regulieren (Gill 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass SUMO essentiell für die Integrität des Genoms der Hefe (Tanaka, Nishide et al. 1999) und deren Zellzyklus ist (Johnson und Blobel 1997). Außerdem spielt die SUMOylierung eine Rolle bei der Signaltransduktion (Sobko, Ma et al. 2002) und der Funktion einer Reihe von viralen Proteinen (Wilson und Rangasamy 2001).



Tabelle 1 | SUMO Substrate (mod. nach Müller, Hoege et al. 2001)

Protein	Funktion	Effekt der SUMOylierung
<b>Säuger</b>		
RanGAP1	Kerntransport	Interaktion mit RanBP2
PML	Tumor Suppressor	Kernkörperchen Formation
Sp100	Chromatin Reorganisation	Interaktion mit HP1
p53	Tumor Suppressor	Aktivierung von p53
p73	Tumor Suppressor	proteasomaler Abbau
HIPK2	Transkriptionsfaktor	Kernlokalisierung von HIPK2
TEL	Transkriptionsfaktor	Kernlokalisierung von TEL
c-jun	Transkriptionsfaktor	Verminderung der Transkriptionsaktivität
Androgen-Rezeptor	Transkriptionsfaktor	Verminderung der Transkriptionsaktivität
I $\kappa$ B $\alpha$	Signaltransduktion	Verhinderung der Ubiquitinierung von I $\kappa$ B $\alpha$
Mdm 2	E3 SUMO-Ligase	Verhinderung der Ubiquitinierung von Mdm2
Topo1	DNA Replikation	korrekte Chromatinorganisation
Topo2	DNA Replikation	korrekte Chromatinorganisation
RanBP2	E3 SUMO-Ligase	unbekannt
GLUT1	Glukosetransport	unbekannt
GLUT4	Glukosetransport	unbekannt
<b>Drosophila</b>		
Dorsal	Signaltransduktion	unbekannt
Ttk 69	Transkriptionsfaktor	Nukleäre Translokation von Dorsal
CaMK II	Proteinkinase	unbekannt
<b>Viren</b>		
Papilloma Virus E1	Virus Protein	Regulation des Kerntransports von E1
hCMV IE1	Virus Protein	unbekannt
hCMV IE2	Virus Protein	unbekannt

CaMK II, Calcium/Calmodulin abhängige Kinase II; hCMV, humanes Cytomegalie Virus; GLUT, Glukose-Transporter; RanGAP1, RanGTPase activating protein; IE, immediate-early; PML, Promyelozytenleukämie; RanBP2, Ran-bindendes Protein 2; Topo, Topoisomerase; Ttk, tramtrack.

## **5. Zielsetzung**

Zelluläre Signaltransduktion erfordert eine strenge Regulation der einzelnen Komponenten auf allen Ebenen des Signalwegs. Für die G-Protein vermittelte Signaltransduktion stellt Phosducin einen wichtigen Regulator auf Ebene des G-Proteins dar. Phosducin selber wird durch reversible Phosphorylierung deaktiviert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass weitere posttranslationale Modifikatoren, insbesondere Ubiquitin, Einfluss auf einzelne Komponenten der G-Protein vermittelten Signalkaskade haben. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der G-Protein-Regulator Phosducin direkt durch weitere posttranslationale Effekte beeinflusst wird. Von besonderem Interesse war dabei das Ubiquitin-ähnliche Protein SUMO.

## *II. Material und Methoden*

### **1. Material**

#### **1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

3MM-Whatmanpapier	Schleicher & Schüll
Acrylamid: Rotiphorese-Gel 30	Carl Roth
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma
Agarose, Elektrophoresegrad	Invitrogen
Cyclohexamid	Sigma
DNA-Längenstandards	New England Biolabs
Dulbecco's modified Eagle's Medium	PAN
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma
4-(2-Hydroxyethyl)piperazinethansulfonsäure (Hepes)	Applichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
PBS (steril, Zellkultur)	PAN
Penicillin/Streptomycin (Zellkultur)	PAN
Protein Assay-Reagenz Bradford	Bio-Rad
Protein A-Sepharose	GE Healthcare
Proteinlängenstandard	peQLab
PVDF-Membranen (ImmobilonP)	Millipore
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Silica-Säulen für die Plasmidpräparation	Qiagen
Select Agar	Invitrogen
Select Peptone 140	Invitrogen
Select Yeast Extract	Invitrogen
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck

Nicht aufgeführte Chemikalien stammten in der Regel von Merck, Carl Roth oder Sigma und waren von der Reinheit mindestens p.A..

## **1.2. Puffer und Medien**

### **1.2.1. Puffer für molekularbiologische Arbeiten**

10x DNA-Ladepuffer	100 mM EDTA 30% Glycerol 0,5% Bromphenolblau 0,5% Xylencyanol
--------------------	--

10x TAE	400 mM Tris-HCl 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 8,0
---------	--

### **1.2.2. Puffer für proteinchemische Arbeiten**

5x SDS-Laemmli-Puffer	250 mM Tris-HCl, pH 6.8 5% (g/v) SDS 1% (g/v) DTT 40% (g/v) Glycerol 0,005% Bromphenolblau
-----------------------	--

PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
-----	--

10x SDS Laufpuffer	248 mM Tris-HCl 1,92 M Glycin 1% (g/v) SDS pH 8,2
--------------------	--

Transferpuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,3 150 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
Blockpuffer	5% (w/v) Milchpulver 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 0,1% (v/v) Tween 20

### **1.2.3. Medien für Bakterien**

LB-Medium	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefe-Extrakt 1% NaCl pH 7,2
-----------	--

Bei der Herstellung von Agarplatten wurden dem LB-Medium 1,5% (g/v) Agar hinzugegeben.

### **1.2.4. Medien für eukaryotische Zellen**

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) – mit 1 g/l Glukose  
+ 10% fötales Kälberserum (FCS)  
+ 1% Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) – mit 1 g/l Glukose  
Methionin- und Cystein-frei  
+ 1% Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) – mit 1 g/l Glukose  
ohne Cystein/ Methionin

## 1.3. Biologisches Material

### 1.3.1. Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle	Orientierung
SM1_fwd	TCC CTC TAG AAG CTT ATG TCT GAC CAG GAG GCA AAA CTT	Hind III	vorwärts
SM1_rev	TGC CTC CCC CTC GAG CTA AAC TGT TGA ATG ACC CCC CGT	Xho I	rückwärts
Ubc_fwd	TCC CTC TAG AAG CTT ATG TCG GGG ATC GCC CTC AGC AGA	Hind III	vorwärts
Ubc_rev	TGC CTC CCC CTC GAG TTA TGA GGG CGC AAA CTT CTT GGC	Xho I	rückwärts
Phd_fwd	TCC CTC TAG AAG CTT ATG GAA AAA GCA AAA AGC CAA AGT	Hind III	vorwärts
Phd_rev	TGC CTC CCC CTC GAG TTA TTC CAT ATC CTC TTC CAT GTT	Xho I	rückwärts
Phd33r_fwd	AGA AAG TTT AGA TTG GAG AGT GAA GAT AGT		vorwärts
Phd33r_rev	ACT CTC CAA TCT AAA CTT TCT CCA ATC ATT		rückwärts
PhIPd71_fwd	CCG CTT CAA GTT GGA GAC AGA ACA GAG G	Bam HI	vorwärts
PhIPd71_rev	TGT CTC CAA CTT GAA GCG GCG CCA GT	Xba I	rückwärts
Phd_Myc	TGC CTC CCC CTC GAG TTA GAG GTC CTC CTC GCT GAT GAG CTT CTG CTC TTC CAT ATC CTC TTC CAT	Xho I	rückwärts
PhIP_Myc	GCA GCC GAA TTC TTA GAG GTC CTC CTC GCT GAT GAG CTT CTG CTC ATC TAT TTC TAG	Eco RI	rückwärts
Phd-pet_fwd	CTC CCT CTA GCC ATG GAA AAA GCA AAA AGC C	Nco I	vorwärts
Phd-pet_rev	TGC CTC CCC GGA TCC TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TTC CAT ATC CTC TTC CAT GTT	BamH I	rückwärts

### 1.3.2. Plasmidvektoren

Für die Expression von rekombinanten Proteinen in eukaryotischen Zellen wurde ausschließlich das pcDNA3-Vektorsystem benutzt.

Vektor	Eigenschaften	Bezugsquelle
pcDNA3	CMV-, T7-, SV40-, SP6-Promotor; Amp <sup>r</sup> ; Hind III, Kpn I, BamH I, BstX I, EcoR I, Not I, Xho I, Xba I, Apa I	Invitrogen
pET3d	T7-Promotor, Amp <sup>r</sup> , Nco I, BamH I	Novagen

### 1.3.3. **Plasmide**

cDNA	Beschreibung	Referenz
p3_SM1	pcDNA3 Vektor, der die codierende Sequenz von humanem SUMO-1 enthält	diese Arbeit
p3_Flag-SM1	pcDNA3 Vektor, der die 5'-terminale Flag-Tag-Sequenz enthält gefolgt von der codierenden Sequenz von humanem SUMO-1	Hofmann et al. 2000
p3_UBC9	pcDNA3 Vektor, der die codierende Sequenz von humanem UBC9 enthält	diese Arbeit
p3_PhD	pcDNA3 Vektor, der die codierende Sequenz von bovinem Phosducin enthält	diese Arbeit
p3_PhD_K33R	pcDNA3 Vektor, der die codierende Sequenz von bovinem Phosducin K33R enthält	diese Arbeit
p3_PhD-Myc	pcDNA3 Vektor, der die codierende Sequenz von bovinem Phosducin enthält gefolgt von der codierenden Sequenz von c-Myc	diese Arbeit
p3_PhD_K33R-Myc	pcDNA3 Vektor, der die codierende Sequenz von bovinem Phosducin K33R enthält gefolgt von der codierenden Sequenz von c-Myc	diese Arbeit
p3_PhIP	pcDNA3 Vektor, der die codierende Sequenz von PhIP long der Ratte enthält	J. Humrich
p3_PhIP_d71-Myc	pcDNA3 Vektor, der die codierende Sequenz von PhIP $\Delta$ 71 der Ratte enthält gefolgt von der codierenden Sequenz von c-Myc	diese Arbeit
p3_Flag-Ub	pcDNA3 Vektor, der die 5'-terminale Flag-Tag-Sequenz enthält gefolgt von der codierenden Sequenz von humanem Ubiquitin	Sourisseau et al. 2001
p3_Flag-Ub_K48R	pcDNA3 Vektor, der die 5'-terminale Flag-Tag-Sequenz enthält gefolgt von der codierenden Sequenz von humanem Ubiquitin K48R	Sourisseau et al. 2001
pET_PhD-H6	pET3d Vektor, der die codierende Sequenz von bovinem Phosducin enthält, gefolgt von einer 5'-terminalen His-Tag-Sequenz	J. Humrich
pET_PhD_K33R-H6	pET3d Vektor, der die codierende Sequenz von bovinem Phosducin K33R enthält, gefolgt von einer 5'-terminalen His-Tag-Sequenz	diese Arbeit

### 1.3.4. **Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XL1 blue	endA1, hsdR17 (rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ), supE44, lambda <sup>-</sup> , recA1, gyrA1, gyrA96, relA1, (lac <sup>-</sup> ), (F <sup>-</sup> , proAB, lac <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15, Tn10[tetR])	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLYsS	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal, dcm (DE3), pLysS (Cam <sup>r</sup> )	Novagen

### **1.3.5. Eukaryotische Zelllinien**

HEK-293	humane embryonale Nierenzellen
COS 7	SV40-transformierte Nierenzellen des „African green monkey“

### **1.3.6. Antikörper**

<b>Epitop</b>	<b>Spezies</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Bezugsquelle/ Referenz</b>
Flag M2	Maus	monoklonal	Sigma
Myc (9E10) Agarose Konjugat	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology
Myc (9B11)	Maus	monoklonal	Cell Signaling
Phosducin	Kaninchen	polyklonal	Marian Castro
Phosducin	Ziege	polyklonal	Marian Castro
SUMO-1	Maus	monoklonal	Zymed Laboratories
UBC9	Maus	polyklonal	BD Bioscience
c-SRC	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology

### **1.3.7. Enzyme**

<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase	Eppendorf
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	New England Biolabs

## **2. Methoden**

### **2.1. Zellkultur**

#### **2.1.1. Kultivierung von *E.coli***

*E.coli*-Kulturen wurden entweder direkt als Einzelkolonie oder als Vorkultur angeimpft.

Für den Ansatz einer Vorkultur wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 5 µl Ampicillin (100 mg/ml) zur Selektion angeimpft und ca. sechs Stunden in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert.



Die Einzelkolonie oder die Vorkultur wurde anschließend in 200 ml LB-Medium mit 200 µl Ampicillin in einem 1 l-Schüttelkolben bei 37°C in einem Rotationsschüttler über Nacht angezogen.

Agarplatten wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **2.1.2. Kultivierung von eukaryotischen Zellen**

HEK-293 und COS 7 wurden bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM, welches mit 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin versetzt worden war.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium von den konfluent gewachsenen Monolayern abgesaugt und die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA; Sigma) abgelöst. Die Reaktion wurde mit dem gleichen Volumen Medium beendet. Die abgelösten Zellen wurden resuspendiert und im gewünschten Verhältnis auf neue Kulturschalen (Nunc) verteilt.

Zur Weiterzucht wurden HEK-293 Zellen im Verhältnis 1:3 und COS 7 Zellen im Verhältnis 1:4 über zwei Tage passagiert.

## **2.2. Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion**

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode, die eine selektive, enzymatische Vermehrung von DNA-Fragmenten *in vitro* ermöglicht. Dabei geht man von einem DNA-Einzelstrang (ssDNA, single strand DNA) aus, der mit Hilfe eines Oligonukleotids, komplementär zur DNA („Primer“), und DNA-Polymerasen zum DNA-Doppelstrang (dsDNA) aufgefüllt wird. Durch Erhitzen der dsDNA wird diese in ssDNA überführt, die nach Absenken der Temperatur in Gegenwart eines zweiten Primers (komplementär zum 2. DNA-Strang) für eine weitere Auffüllreaktion zu Verfügung steht. Bei Verwendung einer hitzestabilen Polymerase kann diese Reaktion zyklisch wiederholt werden, wobei sich jeder Zyklus aus der Denaturierung der dsDNA (1. Schritt), dem nachfolgenden Annealing (Hybridisierung) des Oligonukleotids (Primer) an die ssDNA (2. Schritt) und der Polymerisation (3. Schritt) zusammensetzt. Die Annealingtemperatur errechnet sich aus der Länge und Zusammensetzung der verwendeten Primer nach der folgenden Formel:

$$T_M = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Bei der PCR wird die DNA-Polymerase eines thermophilen Bakteriums (*Thermus aquaticus*) eingesetzt, deren Aktivität bei etwa 70°C am höchsten ist, und die auch bei der Denaturierungstemperatur von 95°C noch nach mehreren Zyklen stabil ist. Durch die stetige Verdopplung gelingt es, von wenigen DNA-Molekülen ausgehend, nach 20-30 Zyklen genügend DNA zu erhalten, die nach Elektrophorese auf einem Agarosegel nachweisbar ist und für die Vermehrung in Bakterien verwendet werden kann.

100 µl Reaktionsansatz:

200 µM Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP)

0,5 µM der beiden Primer

10 µl Taq-Polymerasepuffer (10x)

2,5 U Taq-DNA-Polymerase

ad 100 µl H<sub>2</sub>O

Für die 25 Zyklen wurden die folgenden Temperaturen gewählt:

1. Zyklus:	4 min	94°C
	1 min	50°C
	2 min	72°C
2.-25. Zyklus:	1 min	94°C
	1 min	50°C
	2 min	72°C

### **2.2.2. Größenauftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Gelsystemen in 1%iger oder 1.5%iger Agarose in TAE bei konstanter Spannung (80-100 V) aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurden die Agarose-Gele mit 0,1‰ Ethidiumbromid versetzt. Zum Beladen wurden die Proben mit 10x DNA- Ladepuffer versetzt.

Die Darstellung der DNA-Fragmente erfolgte unter UV-Licht ( $\lambda=365$  nm) durch Fluoreszenz von interkaliertem Ethidiumbromid.

### **2.2.3. DNA-Extraktion mit QIAquick Gel Extraction Kit**

DNA wurde auf Agarosegelen der Größe nach aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden unter UV-Licht ausgeschnitten. Zur Extraktion wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) verwendet. Je 100 mg Gel wurden in 300  $\mu$ l Puffer QG (3 M NaI; 4 M NaClO<sub>4</sub>; 10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 10 mM Tris-HCl [pH 7,0]) bei 50°C solubilisiert. Die DNA wurde auf einer QIAEX-Silicagel-Membran durch Zentrifugation gebunden und nach einmaligem Waschen mit PE-Puffer in 30  $\mu$ l EB-Puffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,5]) eluiert. Das Eluat wurde direkt für weitere molekularbiologische Methoden verwendet.

### **2.2.4. Enzymatische Behandlung von DNA**

#### ***Restriktionsenzymverdau***

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer. Eine vollständige Restriktion von Plasmid-DNA wurde über 2 h bei 37°C mit 2-10 Enzymeinheiten pro  $\mu$ g DNA in wässriger Lösung durchgeführt.

#### ***Ligation von DNA-Fragmenten***

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase in wässriger Lösung entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden jeweils verschiedene Verhältnisse des Vektors zum Insert gewählt, um das optimale Ligationsverhältnis zu erhalten.

### **2.2.5. Transformation von *E.coli***

#### ***Transformation mit Hitzeschock***

100  $\mu$ l kompetenter Bakterien wurden mit 0,1  $\mu$ g DNA gemischt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 30 sec durchgeführt. Danach wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und mit 900  $\mu$ l LB-Medium 50 min lang bei 37°C inkubiert. 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurden auf Agarplatten mit geeigneter Antibiotikaresistenz ausplattiert.

### **Transformation mit KCM**

Puffer:

KCM	100 mM KCl
	30 mM CaCl <sub>2</sub>
	50 mM MgCl <sub>2</sub>

Ca. 100 pg DNA (in 10 µl H<sub>2</sub>O) wurden mit 90 µl KCM und 100 µl kompetenter Bakterien auf Eis gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis und 10 min Inkubation bei RT (Raumtemperatur) wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und 50 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die Zellen wurden 3 min bei 2.700 xg pelletiert und das Pellet auf Agarplatten mit geeigneter Antibiotikaresistenz ausplattiert.

#### **2.2.6. Isolation von Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen**

Für die Aufreinigung großer Mengen an Plasmid-DNA wurde das *Qiagen Midi/Maxi-Kit* der Firma Qiagen verwendet. Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender chromatographischer Reinigung über Anionenaustauschersäulen.

Für die Maxipräparation von Expressionsvektoren wurden *E.coli*-Stämme mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und die *E.coli*-Kulturen über Nacht in 200 ml LB/Amp-Medium herangezogen. Nach Zentrifugation bei 7.000 UpM im JA 14 Rotor (Beckman Coulter) für 5 Minuten bei 4°C wurde das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase) resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer P2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) hinzugegeben und 5 min bei RT lysiert. Dieser Vorgang wurde mit 10 ml Lösung P3 (3 M Kaliumacetat [pH 5,5]) beendet und das Lysat bei 17.000 UpM im JA 17 Rotor (Beckman Coulter) 30 min lang bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, so dass keine Schwebeteilchen enthalten waren und auf eine mit 10 ml QBT-Puffer (50 mM MOPS [pH 7,0]; 400 mM NaCl; 0,15% Triton X-100) äquilibrierte Qiagen-Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die Säule wurde dreimal mit 15 ml QC-Puffer (50 mM MOPS [pH 7,0]; 750 mM NaCl; 15% Ethanol) gewaschen und dann die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert (50 mM MOPS [pH 8,2]; 1,25 M NaCl; 15% Ethanol). Das Eluat wurde mit 70% (w/v) Isopropanol gefällt und einige Stunden oder über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurde 30 min lang bei 9.800 UpM im Rotor JA 17

(Beckman Coulter) zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal in 70% (w/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in ca. 300 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.2.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Eine OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht ca. 50 µg Doppelstrang-DNA.

Zur Reinheitskontrolle diente der OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> Quotient, der das Verhältnis von Nukleinsäure zu Protein wiedergibt und nach Möglichkeit größer als 1,8 sein sollte.

### **2.2.8. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen**

#### **Calciumphosphatpräzipitation**

Zur transienten Transfektion von HEK-293 Zellen eignet sich die Calciumphosphatpräzipitation nach Chen (Chen und Okayama 1987).

Zur optimalen Transfektion wurden Zellen 3-6 h vor Transfektion auf 10 cm<sup>2</sup>-Schalen oder 6-well-Platten gesplittet.

Zur Transfektion wurden folgende steril gefilterte Lösungen benötigt:

- Aqua bidest
- 2,5 M CaCl<sub>2</sub>
- 2x BBS (pH 6,95) 280 mM NaCl  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
50 mM BES

Es wurden folgende Transfektionsansätze benutzt:

	pro Loch einer 6-Lochplatte	pro 10 cm <sup>2</sup> -Schale
DNA	1-7µg	10-20 µg
Wasser	135 µl	450 µl
CaCl <sub>2</sub>	15 µl	50 µl
2x BBS	150 µl	500 µl

Der Ansatz wurde gut geschüttelt, um dadurch die Präzipitation von Calciumphosphat und Plasmid-DNA zu induzieren. Nach 10-20 min wurde der Ansatz gleichmäßig auf die Zellen pipettiert. Diese wurden 12 h lang bei 37°C und 3% CO<sub>2</sub> inkubiert. Während dieser Zeit werden die gebildeten DNA-Calciumphosphat-Kristalle von den Zellen phagozytiert. Danach wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen, mit neuem Medium versetzt und weitere 24 h bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **DEAE-Dextran Methode**

COS-Zellen wurden mit DEAE-Dextran transfiziert. Dazu wurden die Zellen 24 h vor Transfektion auf 10 cm<sup>2</sup>-Schalen oder 6-well Platten gesplittet.

Zur Transfektion wurden folgende steril gefilterte Lösungen benötigt:

TBS	25 mM Tris-HCl
	137 mM NaCl
	5 mM KCl
	0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,7 mM CaCl <sub>2</sub>
	0,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Chloroquin	in DMEM (+ 10% FCS; P/S)
1 mg/ml DEAE-Dextran	in TBS
10% DMSO	in DMEM

Es wurden folgende Transfektionsansätze benutzt:

	pro Loch einer 6-Lochplatte	pro 10 cm <sup>2</sup> -Schale
DNA	1-7 µg	10-20 µg
TBS	170 µl	1 ml
DEAE-Dextran	170 µl	1 ml

Die Zellen wurden mit TBS gewaschen und 15 min mit der Transfektionslösung bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen mit Chloroquin-Lösung für 3 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Um die Zellen kurzfristig permeabel für die DNA zu machen, wurden sie 1 min lang mit 10% DMSO inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit Medium versetzt und 36 h lang bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

## **2.3. Proteinchemische Methoden**

### **2.3.1. Quantifizierung von Protein nach Bradford**

Proteinkonzentrationen wurden photometrisch mit dem Protein-Assay-Kit (Bio-Rad) nach der Bradford-Methode (Bradford 1976) bestimmt. Die Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm bei Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blue G-250 an Proteine. Die Proteinmenge wurde anhand von Eichgeraden bestimmt, welche zuvor mit Rinderserumalbumin-Standardlösungen erstellt worden waren. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

### **2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

SDS-Gelelektrophorese wurde mit Polyacrylamidgelen nach Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Elektrophoresesystem SE600 der Firma Hoefer (Gelmaße 14 x 8 cm oder 14 x 16 cm) benutzt. Zu analysierende Proteinproben wurden mit SDS-Laemmli-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und nach Gelauftrag in vertikaler Laufkammer (SDS Laufpuffer als Kathoden- und Anodenpuffer) mit konstanter Stromstärke (70 mA pro Gel) aufgetrennt.

Sammelgel (4%): 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8)

0,05% (g/v) SDS

3,75% Rotiphorese 30 (Acrylamid/ Bisacrylamid 30% / 0,8% [g/v])

1‰ Temed

1‰ APS-Lösung

Trenngel (12.5%): 0,4 M Tris-HCl (pH 8,8)

0,1% (g/v) SDS

12% Rotiphorese 30 (Acrylamid/ Bisacrylamid 30%/ 0,8% [g/v])

1‰ Temed

1‰ APS-Lösung

### **2.3.3. Herstellung von Lysaten aus Zellverbänden**

#### ***Proteinpräparation aus boviner Retina***

Rinderaugen wurden 2 h auf Eis dunkel adaptiert. Die gesamte Präparation erfolgte bei Rotlicht auf Eis. Zur Präparation der Retina wurde das Auge an der Ora serata mit einem 270° Schnitt eröffnet, der Glaskörper entfernt und die Pars optica der Retina vorsichtig abgelöst.

Die Retina wurde in 20% Saccharose (in 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7,4]; 0,1 mM EDTA) ausgeschüttelt, und das Lysat wurde bei 1.200 xg vorgereinigt. Nachfolgend wurde bei 15.000 xg 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder direkt für weitere proteinchemische Versuche verwendet oder durch Ionenaustauscherchromatographie weiter aufgereinigt. Dazu wurde der Überstand auf einer DEAE-Sephacel-Säule (GE Healthcare) aufgetrennt. Nach einmaligem Waschen mit 5 mM Tris-HCl (pH 8,0) wurden die gebundenen Proteine in einem NaCl-Gradienten (0-500 mM, in 5 mM Tris-HCl [pH 8,0]) eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von jeweils 25 mM NaCl-Schritten gesammelt. Die Proteinkonzentration des Eluats wurde stufenlos photometrisch ermittelt und mit einem Schreiber grafisch dargestellt.

#### ***Lyse mit SDS***

Zum kompletten Aufschluß der Zellen wurden HEK oder COS Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einer eiskalten 1:3 Verdünnung aus Puffer I (5% SDS, 0,15 M Tris-HCl [pH 6,7]; 30% [v/v] Glycerol) und Puffer II (25 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 50 mM NaCl; 0,5% [w/v] NP40; 0,1% SDS; 0,5% [w/v] Natrium-Deoxycholat) lysiert. Der Lysispuffer wurde zusätzlich mit 1 mM PMSF, 10 mM NEM und einem Proteaseinhibitor-Mix (10 µg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, 30 µg/ml Benzamidin, 1 mg/ml Leupeptin; alle Sigma) versetzt.



Die Lysate wurden kurz sonifiziert (Sonikator Soniplus HD 200; Brandelin) und zusammen mit SDS-Laemmli-Probenpuffer 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben direkt durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese augetrennt.

#### **2.3.4. Proteinexpression in *E.coli***

Die Expression von Phd und Phd<sup>K33R</sup> erfolgte in Kulturen des *E.coli* Stammes BL21(DE3)pLysS. Es wurde das IPTG-induzierbare Vektorsystem pET 3d verwendet. Phd und Phd<sup>K33R</sup> wurden über PCR mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag versehen und in den Expressionsvektor pET3d kloniert. Von entsprechend transformierten BL21(DE3)pLysS Bakterienkolonien wurden Übernachtskulturen gezogen und diese in einer Verdünnung von 1:100 auf je 1 l LB/Amp Medium überimpft. Die Bakterien wurden ca. 4 h bei 37°C bei 170 UpM in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1 herangezogen. Die heterologe Genexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert, und die Bakterien wurden für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien im JA 14 Rotor (Beckman Coulter) pelletiert (5.000 UpM, 10 min, 4°C). Die Pellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### **2.3.5. Reinigung von His-Tag-Proteinen**

His-Tag-Proteine lassen sich unter Komplexierung eines Histidinhexamers an Ni-NTA reinigen. Ni<sup>2+</sup> wird dabei durch die Imidazoleseitenkette der Histidinreste oktaedrisch koordiniert. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt mit einem Überschuss an freiem Imidazol.

Bei -80°C gelagerte Bakterienpellets (s. 2.3.4) wurden in 20 ml Puffer X (20 mM Tris [pH 8,0]; 500 mM NaCl; 10 mM Mercaptoethanol; 20 mM Imidazol; 0,1 mM PMSF; Proteaseinhibitoren) resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Eis durch Ultraschallbehandlung im Sonikator (Soniplus HD 200, Brandelin) für 2x 5 min in kurzen Arbeitsimpulsen lysiert. Das Bakterienlysat wurde durch Zentrifugation in einem 70Ti Rotor (42.000 UpM, 60 min, 4°C, Beckman Coulter) von festen Bestandteilen befreit.

Zur Reinigung von Phd bzw. Phd<sup>K33R</sup> wurde zunächst je 1 ml Ni-NTA Sepharose (Qiagen) auf 10 ml Säulen (Bio-Rad) geschichtet und ausgiebig mit Puffer X gewaschen. Anschließend wurde das geklärte Bakterienlysat auf die Säulen geladen. Die Säulen wurden mit Puffer X gewaschen. Die fraktionierte Elution erfolgte in

Puffer X mit 200 mM Imidazol. Anschließend wurden die Peakfraktionen zusammengeführt und über Nacht in Dialyseschläuchen (Spectra/Por, MWCO 14.000, Spectrum Laboratories) gegen Dialysepuffer (20 mM Tris [pH 8,0]; 100 mM NaCl; 2 mM DTT; 1 mM EDTA) dialysiert. Die dialysierten Proteine wurden unter Zusatz von 15% (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert.

### **2.3.6. Rhodopsinphosphorylierung durch GRK2**

Die Bindung von Gβγ durch Phd wurde anhand der Hemmung der Gβγ-abhängigen GRK2-Kinaseaktivität ermittelt. *In vivo* wird diese Rezeptorkinase von Gβγ-Untereinheiten aktiviert und phosphoryliert als Konsequenz aktivierte GPCRs, was zu einer Abschaltung des Rezeptors führt. Die Aktivierung der GRK2 ist durch Phd, welches Gβγ bindet, hemmbar. Als Substrat wurde hier der GPCR Rhodopsin gewählt, welcher durch Licht aktiviert wird. Die Quantifizierung der Rhodopsinphosphorylierung wurde durch Verwendung von radioaktivem [<sup>32</sup>P]ATP ermöglicht.

Gereinigtes Phd oder Phd<sup>K33R</sup> wurde in ansteigenden Mengen mit 20 nM GRK2 (aus SF9-Zellen gereinigt), 10 nM Gβγ-Untereinheiten (aus Rinderhirn gereinigt), 400 nM Rhodopsinmembranen (aus dunkel-adaptierter boviner Retina gereinigt) in Phosphorylierungspuffer (20 mM Hepes [pH 7,4], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 50 μM [<sup>32</sup>P]ATP) in einem Gesamtvolumen von 50 μl inkubiert. Die Phosphorylierungsreaktion wurde bei RT durch Licht initiiert, für 20 min fortgesetzt und durch Zugabe von SDS-Laemmli-Probenpuffer bei 40°C über 30 min beendet. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt und zur Exposition mit einer Imagingplatte 24-48 h gelagert. In einem Phosphoimager (FLA100, Fuji) wurden die Imagingplatten ausgelesen und mit der zugehörigen Software (Image Gauge, Fuji) quantitativ ausgewertet.

### **2.3.7. [<sup>35</sup>S] Markierung**

Die „Pulse-Chase“-Technik ermöglicht die Darstellung und Quantifizierung des Metabolismus von Proteinen. Hierbei macht man sich den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren in neu gebildete Proteine über einen kurzen Zeitraum zunutze. Für einen definierten Zeitraum werden Zellen in einem mit radioaktiv markierten Aminosäuren (meist [<sup>35</sup>S]-Methionin und [<sup>35</sup>S]-Cystein) versetzten Medium

kultiviert. Die Aminosäuren diffundieren schnell in das Zytosol und ersetzen den zellulären Aminosäurepool, so dass alle neu gebildeten Proteine radioaktiv markiert werden („Pulse“). Anschließend werden die radioaktiven Aminosäuren wieder aus dem Zellpool entfernt, indem die Zellen in normalem Medium kultiviert werden. Damit endet auch die Markierung der Proteine. Verfolgt man nun die radioaktiv markierte Menge eines bestimmten Proteins durch sequentielle Aufarbeitung und Immunpräzipitation zu bestimmten Zeitpunkten, lassen sich durch Bestimmung der verbleibenden Aktivität genaue Aussagen über den Metabolismus machen („Chase“). Dabei korreliert die Stärke des radioaktiven Signals direkt mit dem Anteil des in der Zelle noch vorhandenen Proteins, das während des „Pulse“ markiert worden ist.

### **Vorbereitung und „Aushungern“ der Zellen**

36 h vor dem Versuch wurden HEK-293 Zellen auf 6-Loch Platten gesplittet und mit den erforderlichen Plasmiden transfiziert.

Um einen schnellen Austausch des zellulären Pools mit radioaktiv markierten Aminosäuren zu erreichen, wurden die Zellen „ausgehungert“. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Methionin/Cystein-freiem DMEM-Medium über 2 h inkubiert.

### **„Pulse“**

Zur radioaktiven Markierung wurden die ausgehungerten Zellen für 30 min bei 37°C mit 800 µl Methionin/Cystein-freiem DMEM-Medium inkubiert, das zuvor mit [<sup>35</sup>S]-markiertem Methionin und Cystein versetzt worden war (*EXPRE [<sup>35</sup>S] protein labeling mix*, NEN). Pro Loch einer 6-Lochplatte wurden 200 µCi Aktivität verwendet.

### **„Chase“**

Nach dem Pulse wurde das Markierungsmedium entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Ein Teil der Zellen wurde zur Ermittlung der markierten Proteine zum Zeitpunkt  $t_0$  direkt in 1 ml eiskaltem Lysispuffer lysiert. Alle anderen Zellen wurden mit 1 ml warmem DMEM versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach 60 bzw. 120 min wurde das Medium ebenfalls entfernt und die Zellen in 1 ml Lysispuffer auf Eis lysiert. Die Lysate wurden abzentrifugiert, aus allen Proben wurde Phd immunpräzipitiert und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gele wurden in Coomassie-Blau

gefärbt und anschließend zur Exposition mit einer Imagingplatte mehrere Tage gelagert. In einem Phosphoimager (FLA100, Fuji) wurden die Imagingplatten ausgelesen und mit der zugehörigen Software (Image Gauge, Fuji) quantitativ ausgewertet.

### **2.3.8. *In vitro* SUMOylierung**

Die für SUMOylierung-Reaktion benötigten Proteine (SAE1/SAE2, UBC9, SUMO-1) entstammten dem „SUMOylation control kit“ von ImmunoKontakt. Je 500 ng gereinigtes rekombinantes Phd oder Phd<sup>K33R</sup> wurden mit 150 ng rekombinantem SAE1/SAE2, 1 µg rekombinantem UBC9 und 1 µg rekombinantem SUMO-1 in Reaktionspuffer (20 mM Hepes [pH 7,5]; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM ATP) in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h lang bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS-Laemmli-Probenpuffer beendet. Die Proben wurden 10 min lang bei 95°C erhitzt und mit SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf PVDF-Membranen gebロットet, und Phd wurde im Western Blot mit anti-Phd Antikörpern dargestellt.

### **2.3.9. *In vitro* Gβγ-Bindung**

Gβγ-Untereinheiten wurden aus bovinen Hirnmembranen wie beschrieben gereinigt (Sternweis und Robishaw 1984). Zur kovalenten Bindung an eine Agarose-Matrix wurde 1 ml Affi-Gel 15 (Bio-Rad) mit H<sub>2</sub>O gewaschen. 3,5 mg gereinigte Gβγ wurden für 4 h mit dem Affi-Gel inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 100 mM Hepes (pH 7,5) wurden verbleibende reaktive Gruppen mit 50 mM Tris (pH 7,5) über Nacht abgesättigt. Als Kontrolle wurde Affi-Gel 15 ohne vorherige Kopplung von Gβγ mit Tris abgesättigt.

Je 35 µl Trockenvolumen des Gβγ-Affi-Gels bzw. des Kontroll-Affi-Gels wurden mit 40 µg Protein aus bovinen Retinae in 500 µl 100 mM Hepes (pH 7,5) über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde aufgefangen und die Gelmatrix 5x mit 1 ml Waschpuffer (150 mM NaCl; 100 mM Hepes [pH 7,5]) gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine durch Kochen in SDS-Laemmli-Probenpuffer eluiert.

Äquivalente Mengen des eingesetzten Retinalysats, des Überstands und der eluierten Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Phd wurde im Western Blot mit anti-Phd Antikörpern dargestellt.

## **2.4. Immunchemische Methoden**

### **2.4.1. Western Blot**

#### ***Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran***

In SDS-Gelen aufgetrennte Proteine wurden durch elektrischen Strom auf PVDF-Membranen (Immobilon P, Millipore) transferiert. Dazu wurde ein Sandwich mit dem folgenden Aufbau verwendet:

- A.) 3 Lagen 3MM-Whatman Papier, in Transferpuffer getränkt
- B.) SDS-Gel, in Transferpuffer äquilibriert
- C.) PVDF-Membran, in Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert
- D.) 3 Lagen 3MM-Whatman Papier, in Transferpuffer getränkt

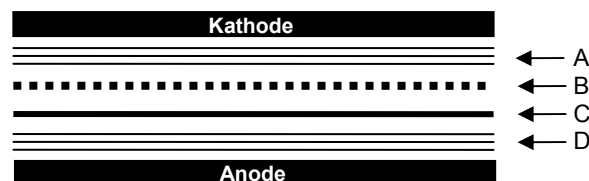


Abbildung 7. | Schematischer Aufbau eines Western Blots

Der Transfer wurde in einer Semidry-Apparatur der Firma Bio-Rad bei konstanter Spannung von 15 V durchgeführt. Die Transferzeit wurde abhängig von der Gelstärke und der Proteingröße gewählt und betrug in der Regel 70-90 min.

#### ***Immundetektion von immobilisierten Proteinen***

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen die PVDF-Membran für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht in Blockpuffer geschwenkt. Danach wurde der Primärantikörper in der geeigneten Ver-

dünnung (in Blockpuffer) zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS (+ 0,1% Tween 20) für jeweils 10-15 min wurde der in Blockpuffer verdünnte Sekundärantikörper zugegeben und wiederum eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen für jeweils 10-15 min in PBS (+ 0,1% Tween 20) entfernt.

### ***Nachweisreaktion mit Peroxidase-gekoppeltem Antikörper***

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper und dafür geeignete Detektionskits verwendet. Für den Nachweis mittels Chemolumineszenz wurde das Supersignal West Pico Chemoluminescent Kit (Pierce) oder ECL Plus (GE Healthcare) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion erfolgte entweder durch Belichtung von Biomax-ML-Filmen (Kodak) mit unterschiedlichen Belichtungszeiten oder mit einer CCD-Kamera (LAS1000, Fuji), die zusätzlich semiquantitative Bestimmungen ermöglichte (Raytest).

### ***Strippen von Membranen***

Um auf einer Western Blot-Membran mehrere verschiedene Proteine nachweisen zu können, wird der gebundene Sekundärantikörper von der PVDF-Membran entfernt, bzw. das Detektionsenzym deaktiviert und anschließend mit einer anderen Antikörperspezies inkubiert. Dazu wurde die Membran 30 min lang in Strippuffer inkubiert (25 mM Glycin-HCl [pH 2,5]; 0,1% [g/v] SDS). Nach zweimaligem Waschen in PBS (+ 0,1% Tween 20) wurde die Membran 1 h lang in Blockpuffer inkubiert und mit den gewünschten Antikörpern inkubiert wie oben beschrieben.

### ***2.4.2 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Sepharose-Matrix***

Um störende Kontamination von abgelöstem Antikörper bei der Immunpräzipitation zu vermeiden wurden anti-Phd Antikörper kovalent an eine Sepharose-Matrix (Affi-Gel, Bio-Rad) gebunden.

### ***Aufreinigung von IgG aus anti-Phd Serum***

Zur Reinigung von IgG aus Kaninchenserum wurde eine 10 ml-Säule (Bio-Rad) mit 1 ml Protein A-Sepharose (GE Healthcare) beladen und mit 20 ml 100 mM Hepes

(pH 7,5) gewaschen. Ein ml anti-Phd Serum wurden mit 100 mM Hepes 1:2 verdünnt und mit dem Säulenmaterial über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Säule mit 20 ml 100 mM Hepes (pH 7,5) gewaschen. Von dem anti-Phd Serum vor der Reinigung und dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt, um aus der Differenz die Menge an gebundenem IgG zu ermitteln. Im Folgenden wurde das gebundene IgG mit 100 mM Na-Citrat (pH 3,0) von der Säule eluiert und in Fraktionen zu 500 µl gesammelt. Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt.

### ***Kopplung von anti-Phd IgG an Affi-Gel***

Zur kovalenten Kopplung an eine Matrix eignet sich Affi-Gel (Bio-Rad). Hierbei handelt es sich um reaktive N-Hydroxysuccimidestergruppen auf Agarosegelbasis, die stabile Amidbindungen mit primären Aminogruppen eingehen. Zur kovalenten Kopplung von anti-Phd IgG wurde 1 ml Affi-Gel 10 3x mit 5 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Ein mg gereinigtes anti-Phd IgG wurde mit dem Affi-Gel 4h lang bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Affi-Gel 3x mit je 5 ml 100 mM Hepes (pH 7,5) gewaschen. Um überschüssige reaktive Gruppen abzusättigen, wurde das Gel mit 5 ml 50 mM Tris (pH 7,5) über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mehrmals mit 100 mM Hepes (pH 7,5) gewaschen. Vor und nach der Kopplung wurde jeweils die Proteinmenge bestimmt, um die Bindungseffizienz zu kontrollieren.

### ***2.4.3 Immunpräzipitation / Immunoaffinitätsreinigung***

Um spezifische Proteininteraktionen von Phd darstellen zu können, wurde retinales Phd mit polyklonalen Antikörpern, welche zuvor an Protein A-Sepharose gebunden wurden, präzipitiert. Anschließend wurden die interagierenden Proteine nach Western Blot-Transfer mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers identifiziert. Um Kreuzreaktion mit dem präzipitierenden Antikörper zu vermeiden, wurden für die Präzipitation und den Nachweis nach Möglichkeit unterschiedliche Antikörper-Spezies verwendet.

Je 20 µl eines 50% Protein A-Sepharose Gemischs wurden zunächst dreimal in 1 ml PBS gewaschen und dann mit je 5 µl Anti-Phd-Antikörper (Spezies 1) in PBS

(+ 0,01% Triton X-100) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Protein A-Sepharose viermal mit Waschpuffer (50 mM Tris [pH 7,4]; 300 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,1% Triton X-100) gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Sepharose-Beads zusätzlich mit einer 1%igen Lösung von Rinderserumalbumin gewaschen.

Für die Immuniaffinitätsreinigung wurde anstelle der Sepharose-IgG Kombination Antikörper verwendet, der zuvor kovalent an eine Affi-Gel-Matrix gekoppelt worden war (s.o.).

Die gereinigten Zellysate wurden einheitlich auf 30 µg/ml eingestellt und jeweils 1 ml des Lysats mit 20 µl der Antikörper-beladenen Protein A-Sepharose für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Immunkomplexe abzentrifugiert, viermal mit Waschpuffer und einmal mit PBS gewaschen. Die Eluation der gebundenen Proteine erfolgte mit SDS-Laemmli-Puffer über 10 min bei 95°C. Alternativ, um störende Kontamination des Eluats durch gelöstes IgG zu vermeiden, wurden die gebundenen Proteine 10 min lang in 100 mM Na-Citrat (pH 3,0) eluiert. Die Beads wurden abzentrifugiert und das Eluat mit 1 M NaOH neutralisiert.

Anschließend wurden die eluierten Proteine auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im Western Blot mit einem Antikörper einer anderen Spezies (Spezies 2) untersucht.

## **2.5. Sonstige Methoden**

### **2.5.1. Bioinformatik**

#### ***Multiple Alignments***

Die Anordnung mehrerer Proteinsequenzen nach homologen und identischen Abschnitten (Multiple Alignment) erfolgte mit Hilfe des Programmes CLUSTAL W (Thompson, Higgins et al. 1994). Dieses Programm arbeitet nach dem folgenden Algorithmus: 1. alle Sequenzen werden gegeneinander verglichen (paarweises Alignment); 2. anhand der paarweisen Vergleiche wird ein Dendrogramm erstellt, welches die ungefähre Gruppierung der Sequenzen nach ihrer Ähnlichkeit wiedergibt; 3. das abschließende Alignment wird mit Hilfe des Dendrogramms erstellt. Bestimmte Bereiche der Alignments wurden anschließend manuell korrigiert. Die



Ähnlichkeit nicht identischer Aminosäuren in korrespondierenden Sequenzabschnitten eines Alignments wurde mit Protein-Weight-Matrices erstellt, welche die evolutionäre Verwandtschaft verschiedener Aminosäuren untereinander widerspiegeln und somit Rückschlüsse auf den Verwandtschaftsgrad von Proteinen ermöglichen. Im vorliegenden Fall wurde die BLOSUM 62 Matrix (Henikoff und Henikoff 1992) verwendet.

### ***Dreidimensionale Strukturdarstellung von Proteinen***

Die Strukturdaten von Proteinen wurden aus der PDB-Datenbank erhalten (<http://www2.ebi.ac.uk/pdb/>). Die Darstellung der dreidimensionalen Struktur der Proteine sowie die grafische Umsetzung erfolgten mit Hilfe des Programmes DeepView 3.7 (<http://www.expasy.org/spdbv/>). Colorierung und Manipulationen einzelner Aminosäurereste wurden ebenfalls mit diesem Programm ausgeführt. Die endgültige dreidimensionale Darstellung erfolgte durch Rendering der Strukturen mit dem Programm PovRay 3.5 (<http://www.povray.org>).

### *III. Ergebnisse*

#### **1. Identifizierung einer 33 kDa und 47 kDa Form von Phd in boviner Retina**

##### **1.1. Untersuchung von endogenem Phd im Western Blot**

Phd kommt in großen Mengen in den äußeren Segmenten der Stäbchenzellen in der Retina vor (Lee, Whelan et al. 1988). Aufgrund ihrer Größe und daher guten Handhabbarkeit, haben sich Rinderaugen als geeignete Quelle zur Präparation von endogenem Phd bewährt.

Zur Untersuchung von endogenem Phd wurden bovine Retinae aus den Augen präpariert und in SDS-Laemmli Puffer lysiert. Das Lysat wurde abzentrifugiert, auf einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot mit gegen Phd gerichteten Antikörpern untersucht. Als Kontrolle diente 1 pmol rekombinantes Phd, welches zuvor in *E.coli* exprimiert und gereinigt worden war. Zur Validierung wurde dieser Western Blot doppelt angefertigt und mit zwei verschiedenen Phd-spezifischen Antikörpern (Kaninchen und Ziege) untersucht. In Abbildung 8 stellte sich bei beiden Antikörpern in der retinalen Fraktion bei 33 kDa eine Phd-reaktive Bande („R“) dar, die ein annähernd gleiches Molekulargewicht wie rekombinantes Phd aus *E.coli* („E“) aufwies (der geringe Größenunterschied zwischen beiden Formen ist durch den C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag des rekombinanten Phd aus *E.coli* zu erklären). Hierbei handelte es sich um die bekannte 33 kDa Form von Phd (Craft, Lolley et al. 1991). Zusätzlich zu der 33 kDa Form fand sich mit beiden Antikörpern in der Retina eine weitere Phd-reaktive Bande von ca. 47 kDa (p47), zu der es kein Korrelat des in *E.coli* exprimierten Phd gab. Dieses hochmolekulare Phd-reaktive Protein ist bisher noch nicht beschrieben worden.

Vielfach finden sich höhermolekulare Formen eines Proteins nach posttranslationaler Modifikation. In den häufigsten Fällen handelt es sich hierbei um Phosphorylierungen oder Glykosylierungen, welche eine scheinbare Massenzunahme von wenigen kDa bewirken. Im Western Blot spiegelt sich dies meist in einer diskreten Doppelbande wider. Eine Massenzunahme von 15 kDa lässt sich hiermit allerdings nicht erklären.

Im Gegensatz zu Ubiquitin findet bei einer anderen Gruppe von Ubiquitin-ähnlichen Proteinen in der Regel keine Kettenbildung statt, so dass pro Modifikationsstelle eines Proteins eine diskrete Massenzunahme zu beobachten ist. Die Familie der *Small Ubiquitin-related Modifier* (SUMO) gehört zu den häufigsten Vertreter dieser Ubiquitin-ähnlichen Proteine, deren Bindung pro Bindungsstelle eine Zunahme der Molekülmasse des Zielproteins von ca. 15 kDa zur Folge hat. Eine solche Massenzunahme korreliert sehr gut mit dem Massenunterschied der beiden hier identifizierten Phd Formen in der Retina von 33 kDa und 47 kDa.

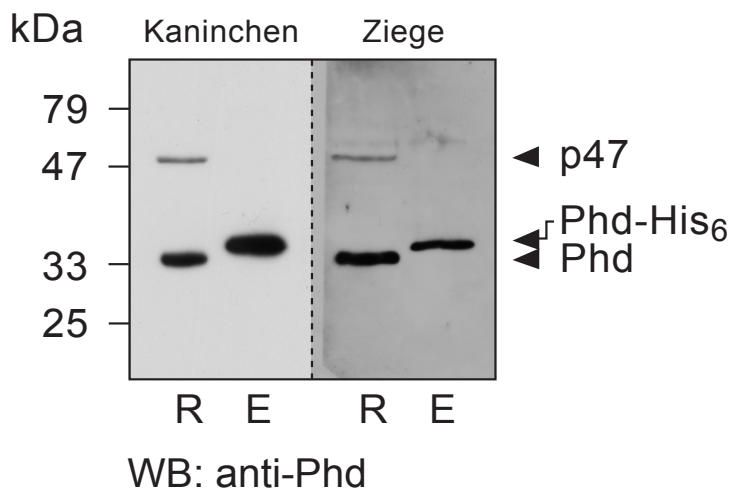


Abbildung 8 | **Identifizierung von p33- und p47-Isoformen in boviner Retina.** Bovine Retinae (R) wurde in 20% Sucrose ausgeschüttelt, 30 µg des Gesamtproteins durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Phd wurde mit zwei unterschiedlichen anti-Phd Antikörpern aus Kaninchen oder Ziege dargestellt. Als Kontrolle diente 1 pmol rekombinantes Phd, welches aus *E.coli* aufgereinigt worden war (E). Phd wurde mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Protein-größenstandards sind links angegeben.

## 1.2. Identifizierung der p33- und p47-Banden durch Immunaффinitätsreinigung

Zur weiteren Charakterisierung der 33 kDa und 47 kDa Formen von Phd wurde Phd aus bovinen Retinae immunpräzipitiert. Erste Versuche mit anti-Phd Antikörpern, die an Protein A-Sepharose nicht-kovalent gebunden waren, zeigten, dass bei der Western Blot Detektion der präzipitierten Proteine immer eine unspezifische Bande bei 50 kDa zu erkennen war. Hierbei handelte es sich um eine Kreuzreaktivität des präzipitierenden Antikörpers mit dem Sekundärantikörper der Western Blot Detektion. Die eindeutige Differenzierung der 47 kDa Bande von Phd wurde hierdurch erheblich erschwert (Daten nicht gezeigt).

Um diese Kreuzreaktion zu vermeiden, wurden die anti-Phd-Antikörper für die Proteinanreicherung zunächst kovalent an eine Affi-Gel-Matrix gekoppelt. Die anti-Phd-Matrix wurde auf eine Bio-Rad-Säule geladen, gut gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, und mit 40 mg Retinalysat über Nacht inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die gebundenen Proteine durch saure Elution in 100 mM Na-Citrat (pH 3,0) von der Säule gelöst und in Fraktionen aufgefangen. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Anschließend erfolgte die Immundetektion der aufgetrennten Proteine sowohl mit Phd-spezifischen Antikörpern als auch mit SUMO-1-spezifischen Antikörpern. Im Western Blot mit anti-Phd Antikörpern stellte sich die 33 kDa Bande von Phd deutlich dar. Zudem ließ sich ebenfalls die oben beschriebene höhermolekulare Form von Phd bei 47 kDa identifizieren (Abb. 9 A, linkes Bild). Eine Bande von 47 kDa ließ sich ebenfalls bei der Detektion mit anti-SUMO Antikörper darstellen, während hier keine 33 kDa Bande zu identifizieren war (Abb. 9 A, rechtes Bild).

Diese Versuche zeigen, dass neben der bekannten 33 kDa Form eine bisher unbekannte 47 kDa Form von Phd in der Retina existiert. Dieses höhermolekulare Protein ließ sich sowohl mit gegen Phd gerichteten Antikörpern anreichern als auch mit gegen SUMO-1 gerichteten Antikörpern im Western Blot nachweisen. Dieser Befund ist ein starker Hinweis darauf, dass es sich hierbei um SUMOyliertes Phd handelt.

Obwohl Phd in hohen Proteinmengen nur in der Retina und der Zirbeldrüse vorliegt, ist eine weite Verbreitung von Phd in einer Reihe von Geweben gezeigt worden (Danner und Lohse 1996). Um zu ergründen, ob die SUMOylierung von Phd ebenfalls in anderen Geweben vorkommt, wurden exemplarisch Cardiomyozyten untersucht. Cardiomyozyten wurden aus Rattenherzen isoliert und mit Lysispuffer lysiert. Hundert µg des Lysats wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurden 3 µg eines Retinalysats verwendet. Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen wurde die Immundetektion mit anti-Phd Antikörpern durchgeführt. In den Cardiomyozyten lässt sich bei 33 kDa eine Doppelbande identifizieren, die mit der 33 kDa Form von Phd aus der Retina korrespondiert. Die aufgrund der geringen Proteinmenge abgrenzbare Doppelbande setzt sich aller Wahrscheinlichkeit nach aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem Phd zusammen. Wie in der Retina findet sich in den Cardiomyozyten ebenfalls eine 47 kDa Form von Phd (Abb. 9 B, linkes Bild). Um sicherzustellen, dass es sich bei der

47 kDa Phd-immunoreaktiven Form in den Cardiomyozyten ebenfalls um SUMOyliertes Phd handelt, wurde Phd aus 1 mg Cardiomyozytenlysat mit kovalent gekoppelten anti-Phd Antikörpern angereichert. Als Kontrolle diente 1 mg Retinalysat. Die gebundenen Proteine wurden mit 100 mM Na-Citrat (pH 3,0) eluiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion mit anti-SUMO Antikörper zeigte sowohl in der Retina als auch in den Cardiomyozyten eine prominente Bande bei 47 kDa, die mit der 47 kDa Phd-immunoreaktiven Bande korrespondierte (Abb. 9B, rechtes Bild). Somit lässt sich feststellen, dass die SUMOylierung von Phd nicht ausschließlich auf die Retina beschränkt ist, sondern *in vivo* in verschiedenen Geweben vorkommt.

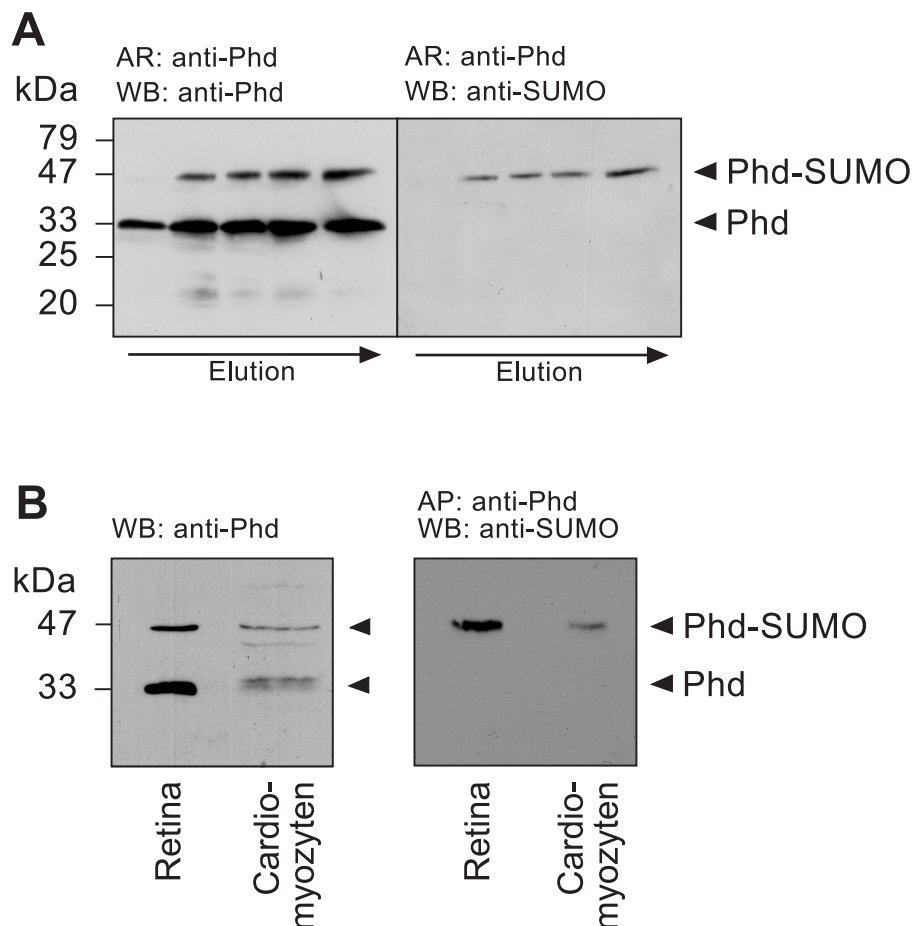


Abbildung 9 | **Immunaffinitätsreinigung von Phd aus Retina und Cardiomyozyten.** **A** | Phd wurde aus 40 mg bovinen Retinalysaten mit kovalent gebundenen Phd-spezifischen Antikörpern angereichert (AR: anti-Phd). Die gebundenen Proteine wurden mit 100 mM Na-Citrat (pH 3,0) eluiert und in Fraktionen gesammelt (Elution). Nach Auftrennung der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE und Transfer auf PVDF-Membranen wurden die angereicherten Proteine mit anti-Phd Antikörpern (linkes Bild) oder mit anti-SUMO Antikörper (rechtes Bild) im Western Blot (WB) identifiziert. **B** | Western Blot gegen Phd aus 3 µg Retinalysat und 100 µg Cardiomyozytenlysat (linkes Bild). Phd wurde aus 1 mg Retinalysat oder 1 mg Cardiomyozytenlysat mit kovalent gebundenen Phd-spezifischen Antikörpern angereichert. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Transfer auf PVDF-Membranen wurden die angereicherten Proteine mit anti-SUMO Antikörper im Western Blot identifiziert (rechtes Bild).

## **2. SUMOylierung von Phd in transfizierten Zellen**

Nach der Darstellung von SUMOyliertem Phd in der Retina und in Cardiomyozyten unter nativen Bedingungen sollte dieser Prozess zur Verifizierung in einem transfizierten Zellsystem durchgeführt werden, wobei durch transiente Transfektion von Phd und der entsprechenden Proteine, welche für die SUMOylierung erforderlich sind, die SUMOylierung induziert werden sollte.

Als Zelllinie für diese Versuche wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK-293) gewählt. Aufgrund guter Expression der Proteine, die für funktionelle Studien G-Protein-vermittelter Signaltransduktion nötig sind, hatten sich diese Zellen zuvor bewährt.

Endogenes SUMO-1 konnte in HEK-293 Zellen nachgewiesen werden. Um aber eine möglichst effiziente Modifizierung von Phd zu erreichen, sollte SUMO zusätzlich transient überexprimiert werden. Da es sich bei der SUMOylierung wie auch bei der Ubiquitinierung um einen weit verbreiteten Mechanismus handelt, wurde die ausreichende Existenz von SUMO-aktivierenden Enzymen (E1) in dem verwendeten Zellsystem vorausgesetzt. Lediglich das SUMO-konjugierende Enzym (E2), UBC9, musste als Geschwindigkeit-bestimmendes Enzym durch transiente Transfektion hinzugefügt werden.

### **2.1. Klonierung von UBC9, SUMO-1 und Phd**

Die kodierenden Sequenzen für humanes SUMO-1 und humanes UBC9 wurden aus EST-Klonen (RZPD, Berlin) mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Passende EST-Klone welche die cDNA-Sequenz für SUMO-1 bzw. UBC9 in voller Länge enthielten, wurden durch BLAST-Datenbanksuche ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Als Primer dienten Oligonukleotide, die mit den 5'- und 3'-Enden des jeweiligen Gens identisch waren. Für die anschließende Klonierung in einen Expressionsvektor enthielten die Primer zusätzlich jeweils eine Sequenz für eine Restriktionsendonuklease. Mit den Primern Ubc\_fwd und Ubc\_rev für UBC9 konnte ein 900 bp großes PCR-Produkt amplifiziert werden (Abb. 10 A), mit den Primern SM1\_fwd und SM1\_rev für SUMO-1 ein 300 bp großes PCR-Produkt (Abb. 10 B). Bovines Phd wurde aus einem vorhandenen Vektor mit den Primern Phd\_fwd und Phd\_rev, welche für das 5'- und 3'-Ende von bovinem Phd sowie einer entsprechenden Sequenz für eine Restriktionsendonuklease kodierten, subkloniert

(Abb. 10 C). Mit den Primern Phd\_fwd und Phd\_Myc wurde die Sequenz von bovinem Phd C-terminal mit dem cMyc-Epitop (EQKLISEEDL) versehen (Phd-Myc), welches die Detektion und Präzipitation von Phd mit anti-Myc Antikörpern ermöglichte. In allen Fällen wurde eine Annealingtemperatur von 55°C bei 25 Zyklen gewählt.

Als Expressionssystem wurde der Vektor pcDNA3 gewählt, bei dem die Transkription des zu exprimierenden Gens unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht. Dieses Vektorsystem ist für die Expression von Genen in Säugetierzellen gut geeignet.

Nach Reinigung wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in den Expressionsvektor pcDNA3, der mit den gleichen Enzymen verdaut worden war, ligiert. Die Sequenzen der resultierenden Plasmide p3\_bvPhd, p3\_hsUBC9 und p3\_hsSM1 wurden durch automatisierte Sequenzierung (Medigenomix, Martinsried) verifiziert.

Plasmide mit Flag-markiertem SUMO-1 wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Stamminger (Universität Erlangen) zur Verfügung gestellt.

Alle diese Plasmide wurden im Folgenden zur Charakterisierung und Untersuchung der SUMOylierung von Phd in HEK-293 Zellen verwendet.

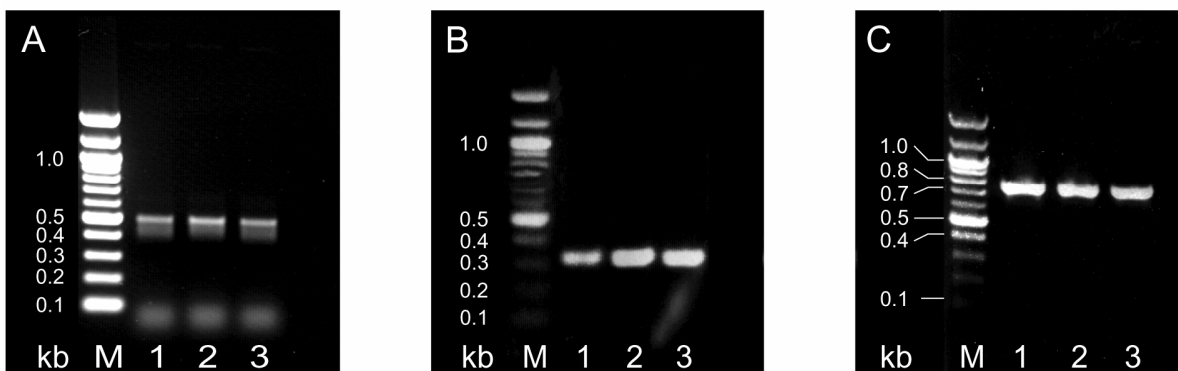
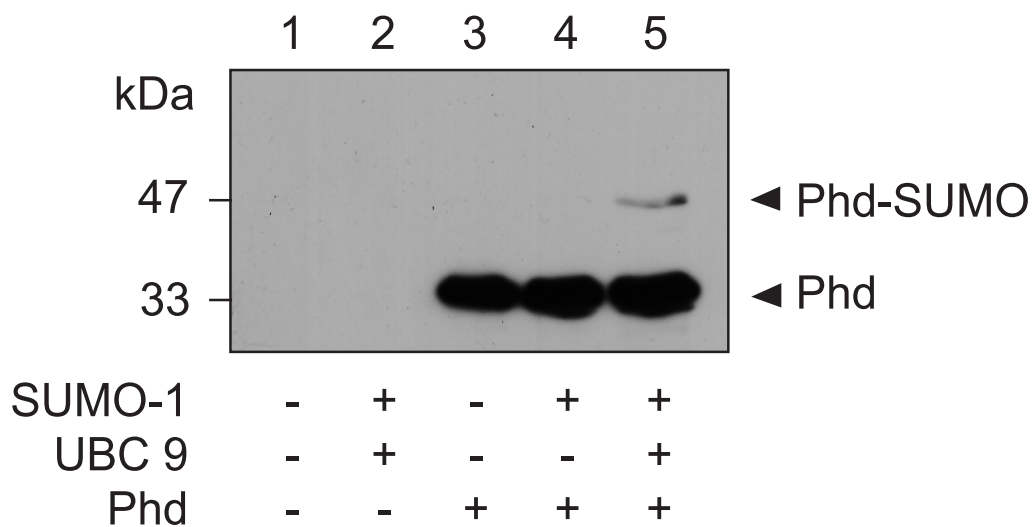


Abbildung 10 | **PCR Amplifikation von UBC9, SUMO-1 und Phosducin.** Aus EST-Klonen wurden mittels geeigneter Oligonukleotid-Kombinationen DNA-Fragmente entsprechend der Sequenz von **A** | UBC9 und **B** | SUMO-1 amplifiziert. **C** | Bovines Phd wurde aus einem bestehenden Konstrukt subkloniert. Die PCR-Produkte wurden in pcDNA3-Vektoren kloniert. Es sind die Kontroll-PCRs von jeweils drei verschiedene Klonen (1-3) sowie der Größenstandard (M) in kb dargestellt. Alle DNA-Produkte wurden auf 1,0% Agarosegelen aufgetrennt und unter UV-Licht dargestellt.

## 2.2. SUMOylierung von Phosducin in HEK-293 Zellen

HEK-293 Zellen wurden mit Phd, UBC9 und SUMO-1 transient transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen lysiert, auf 12,5% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im Western Blot mit anti-Phd Antikörpern analysiert. Erste Versuche unter Verwendung verschiedener Puffer- und Versuchsbedingungen verliefen erfolglos (Daten nicht gezeigt). Dies beruhte offenbar darauf, dass die SUMOylierung eine labile Modifikation ist, da SUMO von spezifischen Peptidasen schnell wieder abgespalten wird. Daher wurde für die folgenden Versuche ein stark denaturierender Puffer auf SDS-Basis unter Verwendung von verschiedenen Proteaseinhibitoren gewählt. Insbesondere hatte sich die alkylierende Substanz N-Ethylmaleylimid (NEM) als Inhibitor für Metalloproteasen hierfür besonders bewährt. Zudem schien die Verwendung von N-terminal Flag-markiertem SUMO zu einer gewissen Stabilisierung der Modifikation von Phd zu führen.



WB: anti-Phd

Abbildung 11 | **Modifikation von Phosducin mit SUMO-1 in HEK-293.** HEK-293 Zellen wurden mit Plasmiden für Phd, UBC9 und Flag-SUMO-1 wie angegeben transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen in SDS-haltigem Puffer unter Verwendung von Proteaseinhibitoren lysiert, und die Proteine wurden im Western Blot mit anti-Phd Antikörpern untersucht.

Nach Optimierung der Extraktionsbedingungen, wurden HEK-293 Zellen erneut mit Phd, UBC9 und Flag-SUMO-1 transient transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen in SDS-haltigem Lysispuffer unter Zusatz von Proteaseinhibitoren lysiert, auf 12,5% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im Western Blot mit anti-Phd Antikörpern



analysiert. Abbildung 11 zeigt, dass bei Transfektion von UBC9 und SUMO-1 keine signifikante Kreuzreaktion mit dem Antikörper stattfand (Spur 1 vs. 2). Dies zeigt, dass HEK-293 Zellen keine signifikanten Mengen an Phd endogen exprimieren. Nach Expression von Phd alleine (Spur 3) oder der Kombination von Phd mit SUMO-1 (Spur 4) ließen sich keine weiteren Banden außer der 33 kDa Bande von Phd detektieren. Erst wenn Phd, UBC9 und SUMO-1 koexprimiert wurden, konnte eine deutliche 47 kDa große Phd-reaktive Bande zusätzlich zu der 33 kDa Bande von Phd identifiziert werden (Spur 5).

Hiermit wurde bestätigt, dass Phd ein Zielprotein für SUMOylierung sein kann, sowohl nach Transfektion in einem Zellsystem, als auch in nativen Systemen (s. Kap. III.1.2). Die Tatsache, dass eine Modifikation nur stattfand, wenn UBC9 und SUMO koexprimiert wurden, lässt zudem vermuten, dass es sich bei UBC9 um ein essentielles und limitierendes Enzym der SUMOylierungs-Kaskade handelt.

### **3. Identifizierung der SUMO-Modifikationsstelle in Phd**

Die C-terminale Carboxylgruppe von SUMO wird – genau wie bei Ubiquitin – durch eine Isopeptidbindung an die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinresten gekoppelt. Im Gegensatz zu der Ubiquitinierung, für die kein einheitliches Motiv in Zielproteinen bekannt ist, welches den modifizierten Lysinrest markiert, wurde für eine Reihe von Zielproteinen der SUMOylierung die kurze Aminosäuresequenz  $\Psi$ KxE um das Akzeptorlysin als Konsensussequenz identifiziert ( $\Psi$  ist eine hydrophobe Aminosäure, x ist eine beliebige Aminosäure, K ist der SUMOylierte Lysinrest) (Sampson, Wang et al. 2001).

Bei der Untersuchung der Aminosäure-Primärstruktur von Phd fiel auf, dass die Aminosäuren 32-35 mit der Sequenz FKLE in der aminoterminalen Domäne von Phd diesem Motiv entsprechen (Abb. 12 A, vgl. Anhang 1).

Um festzustellen, ob Lysin 33 tatsächlich eine SUMO-Akzeptorstelle ist, wurde Lysin 33 in Phd gegen Arginin durch gerichtete Punktmutagenese ersetzt. Hierzu wurden zwei 30 bp lange Oligonukleotide verwendet, welche mit dem Abschnitt um die kodierende Sequenz von Lysin 33 in Phd identisch waren. Das Basentriplet AAA, welches für Lysin 33 in Phd kodiert, wurde zu AGA (= Glycin) mutiert. Dabei bestand das Oligonukleotid Phd33r\_fwd aus den Basen 88 bis 118 des kodogenen Strangs und Phd33r\_rev aus den komplementären Basen 79 bis 109 des kodogenen Strangs.

Unter Verwendung von bvPhd als Template wurde mit den Oligonukleotiden Phd\_fwd und Phd33r\_rev bzw. Phd\_rev und Phd33r\_fwd jeweils eine PCR durchgeführt. Die daraus resultierenden PCR-Produkte von ca. 100 bp bzw. 640 bp wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und gereinigt (Abb. 12 B). Beide PCR-Produkte wurden vereinigt, bei 95°C denaturiert und durch Abkühlen auf 55°C hybridisiert. Unter Verwendung der Primer Phd\_fwd und Phd\_rev wurde das nach der Hybridisierung entstehende 740 bp große DNA-Fragment mittels 25 PCR-Zyklen amplifiziert. Nach Reinigung wurde das Fragment mit den passenden Restriktionsendonukleasen (Hind III und Xho I) verdaut und in den pcDNA3-Vektor kloniert (Abb. 12 C). Für die Myc-markierte K33R-Mutante von Phd (Phd<sup>K33R</sup>-Myc) wurde anstelle des Primers Phd\_rev der Primer Phd\_Myc verwendet. Die Mutation von Lysin 33 nach Arginin wurde durch automatisierte Sequenzierung verifiziert.

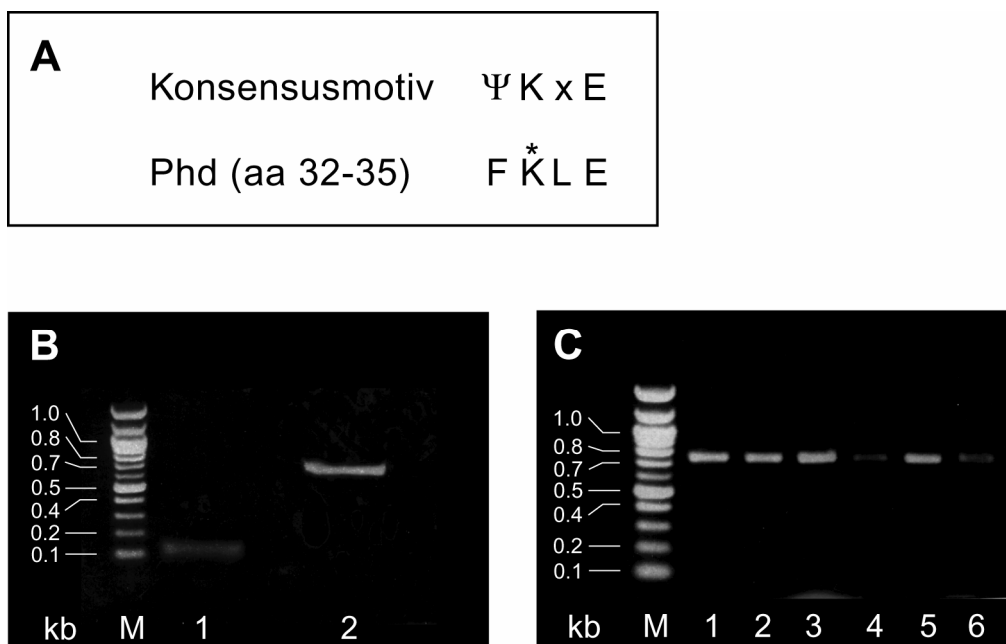
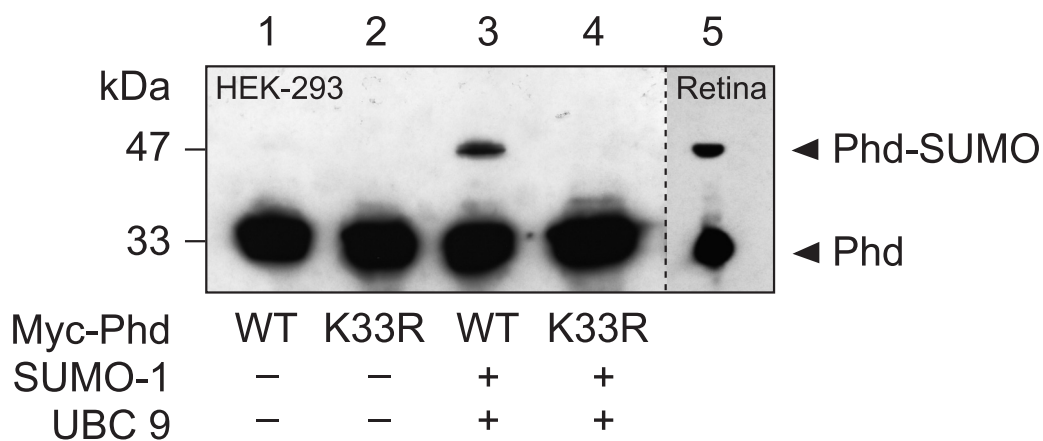


Abbildung 12 | **Mutation Lysin 33 in Phd.** **A** | Das SUMO-Konsensusmotiv ΨKxE (Ψ ist eine hydrophobe Aminosäure und x eine beliebige Aminosäure) stimmt mit den Aminosäuren 32-35 in Phd überein. Lysin 33 ist als potentielle SUMOylierungsstelle mit einem Stern gekennzeichnet. **B** | Um Lysin an Position 33 des Phd gegen Arginin auszutauschen, wurde jeweils eine PCR mit den Primern Phd\_fwd und Phd33r\_rev bzw. Phd\_rev und Phd33r\_fwd durchgeführt. **C** | Die Fragmente 1 und 2 aus A wurden vereinigt und gemeinsam als Template für eine PCR mit den Primern Phd\_fwd und Phd\_rev benutzt. Nach Reinigung wurde das PCR-Produkt in pcDNA3-Vektor kloniert und in *E.coli* transformiert. Die Abbildung zeigt die Kontroll-PCR von sechs positiven Klonen (1-6).

Alle PCR-Produkte wurden auf 1,0% Agarosegelen aufgetrennt und unter UV-Licht dargestellt. M kennzeichnet den Größenstandard.

Wildtyp Phd-Myc oder Phd<sup>K33R</sup>-Myc wurden jeweils zusammen mit UBC9 und SUMO-1 in HEK-293 Zellen exprimiert. Nach 36 h wurden die Zellen lysiert, und Phd wurde durch Immunaffinitätsreinigung mit anti-Myc-Sepharose angereichert. Die Immundetektion nach SDS-PAGE im Western Blot erfolgte mit anti-Phd Antikörpern. Zusätzlich wurden als Kontrolle 3 µg eines Retinalysats auf dem Gel aufgetrennt (Abb. 13). Nach Transfektion von Phd (Spur 1) bzw. Phd<sup>K33R</sup> (Spur 2) alleine konnte nur die 33 kDa Bande von Phd detektiert werden. Durch Transfektion von Phd zusammen mit UBC9 und SUMO ließ sich hingegen zusätzlich zu der 33 kDa Form von Phd SUMOyliertes Phd in Form einer zusätzlichen Bande bei 47 kDa nachweisen (Spur 3), die mit der 47 kDa Form von Phd in der Retina korrespondierte (Spur 5). Diese höhermolekulare Form fehlte allerdings, wenn die Phd<sup>K33R</sup>-Mutante von Phd anstelle des Wildtyp Phd exprimiert wurde (Spur 4).

Dieser Befund zeigt, dass die Mutation von Lysin 33 zu Arginin in Phd die Modifikation von Phd mit SUMO verhindert. Somit scheint Lysin 33 in Phd die Akzeptorstelle für SUMO zu sein. Gleichzeitig zeigt diese Verfahrensweise, dass sich die vorgeschlagene SUMO-Konsensussequenz ΨKxE als prädiktiver Parameter für SUMOylierungsstellen eignet.



AR: anti-Myc (Spur 1-4)

WB: anti-Phd

Abbildung 13 | **Lysin 33 ist die SUMO-Akzeptorstelle in Phosducin.** HEK-293 Zellen wurden mit Plasmiden für Myc-getaggtetes Phd (WT) oder Phd<sup>K33R</sup> (K33R) sowie UBC9 und Flag-SUMO-1 wie angegeben transfiziert. 36 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, und Phd wurde mit anti-Myc-Sepharose angereichert (Spuren 1-4). Als Kontrolle wurden 3 µg Retinalysat verwendet (Spur 5). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit anti-Phd Antikörper untersucht.

#### 4. In vitro SUMOylierung von rekombinantem Phd

Neben den bereits gewonnenen Erkenntnissen zur SUMOylierung von Phd in Zellen, sollte ebenfalls untersucht werden, ob Phd durch alleinige Zugabe von SUMO, dem E1-Enzym-Komplex SAE1/SAE2 und dem E2-Enzym UBC9 in einem zellfreien System modifiziert werden kann. Hierzu wurde His-getaggtetes Phd und Phd<sup>K33R</sup> in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt. Die für die SUMOylierungs-Reaktion nötigen Komponenten wurden dem SUMOylation-Control-Kit (ImmunoKontakt) entnommen.

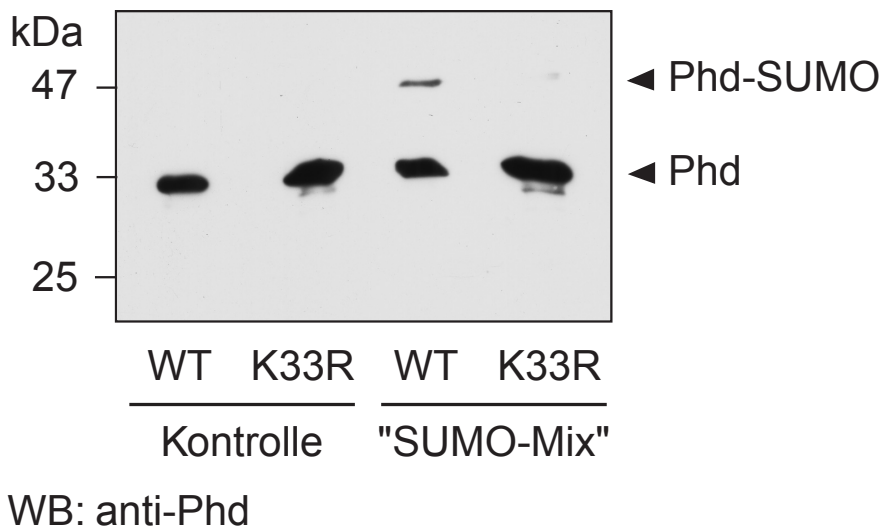


Abbildung 14 | **In vitro SUMOylierung von Phd** | Je 500 ng Phd (WT) oder Phd<sup>K33R</sup> (K33R) wurden alleine (Spur 1+2) oder mit 150 ng SAE1/SAE2, 1 µg UBC9 und 1 µg SUMO-1 (Spur 3+4) für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt, und nach Transfer auf PVDF-Membranen wurden die Proteine im Western Blot mit anti-Phd Antikörpern visualisiert.

Gleiche Mengen an Phd und Phd<sup>K33R</sup> wurden unter Kontrollbedingungen oder mit einem „SUMOylierungs-Mix“ bestehend aus dem E1-Enzym SAE1/SAE2, dem E2-Enzym UBC9 und SUMO-1 in ATP-haltigem Puffer inkubiert. Nach 1 h wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS-Laemmli-Probenpuffer beendet, und nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde Phd im Western Blot dargestellt. Während bei den Kontrollproben von Phd und Phd<sup>K33R</sup> nur ein Signal bei 33 kDa zu detektieren war, ließen sich nach Inkubation von Phd mit dem SUMOylierungs-Mix sowohl eine Bande bei 33 kDa als auch eine etwas schwächere Bande bei 47 kDa darstellen. Im Falle von Phd<sup>K33R</sup> war eine solche höhermolekulare Bande nicht nachzuweisen (Abb. 14).

Hiermit ist durch ausschließliche Verwendung der für die SUMOylierung von Proteinen nötigen Komponenten ohne Einfluss weiterer Faktoren gezeigt worden, dass Phd SUMOyliert wird. Weiterhin wurden die Befunde aus den Zellversuchen bestätigt, dass es sich bei Lysin 33 in Phd um das Akzeptorlysin für SUMO handelt.

## **5. SUMOylierung von PhIP<sub>L</sub> wird durch Deletion von Gln 71 möglich**

Phd und PhIP<sub>L</sub> sind strukturell stark homologe Proteine mit ähnlichen funktionellen Eigenschaften. Hieraus ergab sich die Frage, ob SUMOylierung ausschließlich auf Phd beschränkt ist, oder ob die Phd-ähnlichen Proteine ebenfalls mit SUMO modifiziert werden können.

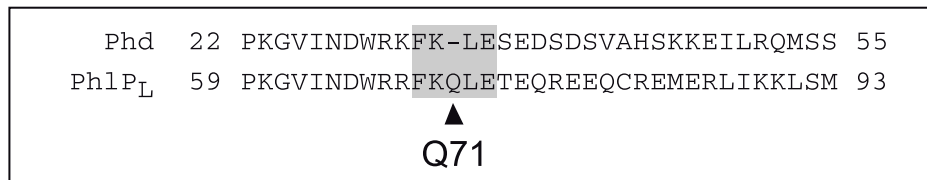
Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von Phd und PhIP<sub>L</sub> zeigte eine hohe Homologie im Bereich der SUMOylierungsstelle an Lys 33 in Phd. Interessanterweise fand sich aber in dem Sequenzabschnitt von PhIP<sub>L</sub> (As 68-73), der mit dem SUMOylierungsmotiv von Phd korrespondierte, ein Einschub von Gln an Position 71. Somit ist das generelle SUMOylierungsmotiv  $\Psi$ KxE in PhIP<sub>L</sub> nicht vorhanden (Abb 15 A, vgl. Anhang 1).

Um zu untersuchen, ob dennoch die Modifikation von PhIP<sub>L</sub> mit SUMO möglich ist, wurde PhIP<sub>L</sub> mittels PCR mit einem N-terminalen Myc-Tag versehen und zur eukaryotischen Expression in den Vektor pcDNA 3 kloniert (Myc-PhIP<sub>L</sub>). Zudem wurde eine Mutante von Myc-PhIP<sub>L</sub> generiert, bei der Gln 71 durch punktgerichtete Mutagenese wie zuvor beschrieben mittels PCR mit den Primern PhIPd71\_fwd und PhIPd71\_rev deletiert worden war und somit ein SUMOylierungs-Motiv eingeführt wurde (Myc-PhIP<sub>L</sub>  $\Delta$ 71). Phd-Myc, Myc-PhIP<sub>L</sub> und Myc-PhIP<sub>L</sub>  $\Delta$ 71 wurden alleine exprimiert oder mit Flag-SUMO und UBC9 in HEK-293 Zellen koexprimiert. Die Zellen wurden lysiert, Myc-getaggte Proteine wurden durch Affinitätsreinigung mit anti-Myc Sepharose (9E10) angereichert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. In der Untersuchung im Western Blot mit anti-Myc Antikörper (9B11) ließ sich bei der Koexpression von Phd-Myc, Flag-SUMO und UBC9 SUMOyliertes Phd in Form einer zusätzlichen Bande bei 47 kDa detektieren (Abb. 15 B, Spur 1 vs. 4). Myc-PhIP<sub>L</sub> wurde bei 44 kDa detektiert, und die Kotransfektion mit Flag-SUMO und UBC9 führte zu keiner höhermolekularen Bande (Spur 2 vs. 5). Daraus lässt sich schließen, dass keine SUMOylierung von PhIP<sub>L</sub> in

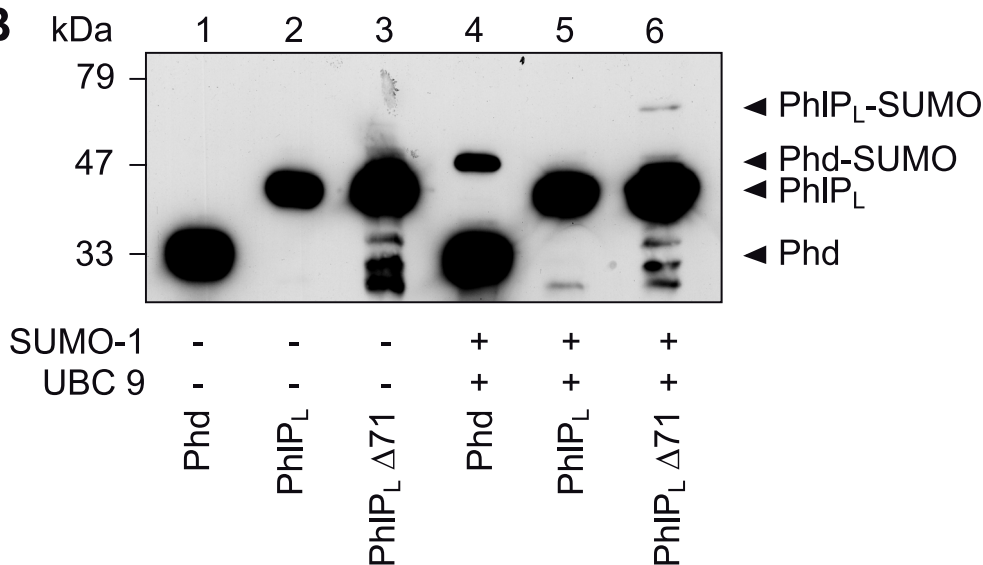
HEK-293 Zellen stattfindet. PhIP<sub>L</sub> Δ71 konnte ebenfalls bei 44 kDa detektiert werden. Im Gegensatz zu PhIP<sub>L</sub> stellte sich bei der Koexpression von PhIP<sub>L</sub> Δ71 mit SUMO und UBC9 neben der Bande bei 44 kDa eine zweite hochmolekulare Bande bei ca. 60 kDa dar (Spur 3 vs. 6). Die niedermolekularen Banden bei der Expression von PhIP<sub>L</sub> Δ71 (Spur 3 und 6) repräsentieren höchstwahrscheinlich Abbauprodukte von PhIP<sub>L</sub> Δ71.

Diese Versuche zeigen, dass Phd mit einem intakten Konsensusmotiv SUMOyliert wird, während dies nicht der Fall für das homologe Protein PhIP<sub>L</sub> ist. Dennoch lässt sich durch Einführung des Konsensusmotivs durch Deletion von Gln 71 die SUMOylierung von PhIP<sub>L</sub> erreichen.

**A**



**B**



AR: anti-Myc (9E10)  
WB: anti-Myc (9B11)

Abbildung 15 | **Rekonstitution der SUMOylierung in PhIP<sub>L</sub>.** **A** | Alignment eines Sequenzabschnittes des N-Terminus von Phd und PhIP<sub>L</sub> um das SUMO-Konsensusmotiv FKLE von Phd (grau hinterlegt). Der Aminosäureeinschub an Position 71 in PhIP<sub>L</sub> ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. **B** | Myc-Phd, Myc-PhIP<sub>L</sub> und Myc-PhIP<sub>L</sub> Δ71 wurden wie angegeben mit UBC9 und Flag-SUMO-1 koexprimiert. Nach 36 h wurden die Zellen lysiert und die Myc-Epitop-markierten Proteine mit anti-Myc gekoppelter Sepharose (9E10) angereichert. Nach SDS-PAGE und Transfer auf PVDF-Membranen wurden die Proteine im Western Blot mit anti-Myc Antikörper (9B11) visualisiert.

## 6. Konsequenzen der SUMOylierung von Phd

### 6.1. Phd<sup>K33R</sup> bindet Gβγ vergleichbar mit Phd

In den vorangegangenen Abschnitten konnte die SUMOylierung von Phd sowohl in der Retina als auch nach Transfektion in HEK-293 Zellen gezeigt werden. Weiterhin unklar blieben die biologischen Konsequenzen, welche die SUMOylierung von Phd hat. Die Identifizierung der SUMOylierungsstelle in Phd und die Etablierung einer SUMOylierungs-defizienten Mutante von Phd, Phd<sup>K33R</sup>, ermöglichten es, diese Fragestellung durch Vergleich von Phd mit Phd<sup>K33R</sup> zu untersuchen.

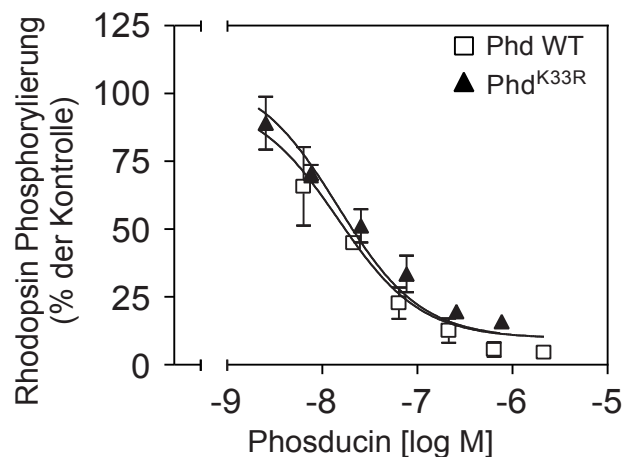


Abbildung 16 | **Gβγ-Bindung von Phd<sup>K33R</sup> im Vergleich zu WT-Phd.** Ansteigende Mengen Phd oder Phd<sup>K33R</sup> wurden zusammen mit GRK2, Rhodopsin und Gβγ inkubiert. Nach Auftrennung der Proteine wurde die Rhodopsinphosphorylierung durch Autoradiographie ermittelt. Die Menge an [<sup>32</sup>P]-Rhodopsin wird als Prozent der Kontrolle (Rhodopsinphosphorylierung ohne Phd) als Dosis-Wirkungskurve gegen die eingesetzten Phd Mengen geplottet (IC<sub>50</sub>: Phd = 14,7 ± 1,3 nM; Phd<sup>K33R</sup> = 17,8 ± 12,8 nM).

Zunächst galt es aber zu überprüfen, ob die K33R Mutation in Phd per se die Funktion des Proteins stört, bzw. ob es zu einer falschen Faltung des Proteins kommt. Als Maß für die Funktionalität wurde die Gβγ-Bindung von Phd und Phd<sup>K33R</sup> *in vitro* durch Gβγ-abhängige Rhodopsinphosphorylierung durch die GRK2 verglichen. Hierzu wurden gereinigte GRK2, Gβγ und Rhodopsin zusammen mit ansteigenden Mengen von gereinigtem Phd oder Phd<sup>K33R</sup> in einem [<sup>32</sup>P]ATP-haltigem Reaktionspuffer inkubiert. Die Rezeptorphosphorylierung wurde durch Licht gestartet

und für 20 min fortgesetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurde die Rhodopsinphosphorylierung durch Autoradiographie ermittelt und gegen die eingesetzte Phd-Konzentration geplottet (Abb. 16). Die  $G\beta\gamma$ -Bindung von Phd und  $\text{Phd}^{\text{K33R}}$ , welche durch eine Abnahme der Rhodopsinphosphorylierung unter ansteigenden Mengen von Phd zu erkennen war, war annähernd gleich ( $IC_{50}$ : Phd =  $14,7 \pm 1,3$  nM;  $\text{Phd}^{\text{K33R}}$  =  $17,8 \pm 12,8$  nM). Dies lässt auf eine korrekte Faltung von  $\text{Phd}^{\text{K33R}}$  schließen.

## **6.2. $\text{Phd}^{\text{K33R}}$ ist weniger stabil als Phd**

Identische DNA-Mengen von Phd bzw.  $\text{Phd}^{\text{K33R}}$  wurden in HEK-293 Zellen mit der Calciumphosphat-Präzipitations-Methode und in COS 7 Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und gleiche Proteinmengen auf 12,5% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proteine wurden auf PVDF-Membranen transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Phd inkubiert. Die Analyse dieser Western Blots zeigte, dass ein signifikanter Unterschied in den Proteinmengen der beiden Phd-Typen bestand. Dieser Unterschied war über mehrere Versuche stabil und konnte in zwei unterschiedlichen Zellsystemen und mit verschiedenen Transfektionstechniken reproduziert werden (HEK-293,  $\text{Ca}^{2+}$ -Präzipitation vs. COS 7 Zellen, DEAE-Dextran Transfektion). Die Western Blots wurden semiquantitativ ausgewertet und die Ergebnisse von je drei unabhängigen Versuchen analysiert. Für beide Zellsysteme ließ sich jeweils eine signifikante Abnahme der Proteinmenge von  $\text{Phd}^{\text{K33R}}$  von ca. 50% im Vergleich zu Phd ermitteln (Abb. 17 A).

Um einen für dieses Ergebnis verantwortlichen unspezifischen Effekt auszuschließen, der durch die Transfektion von Plasmid-DNA hervorgerufen worden sein könnte, wurde der Vergleich zwischen Phd und  $\text{Phd}^{\text{K33R}}$  mit verschiedenen DNA-Mengen wiederholt. Hierzu wurden je 1,25, 2,5, 5, 10 und 20  $\mu\text{g}$  des Phd-Plasmids bzw. des  $\text{Phd}^{\text{K33R}}$ -Plasmids pro  $10^6$  HEK-293 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und im Western Blot auf Phd untersucht. Die semiquantitative Analyse ergab eine nahezu lineare Proteinzunahme für Phd als auch für  $\text{Phd}^{\text{K33R}}$  über den gesamten DNA-Bereich. Dabei war die Proteinmenge nach Expression von  $\text{Phd}^{\text{K33R}}$  signifikant geringer als die Proteinmenge von Phd (Abb. 17 B).



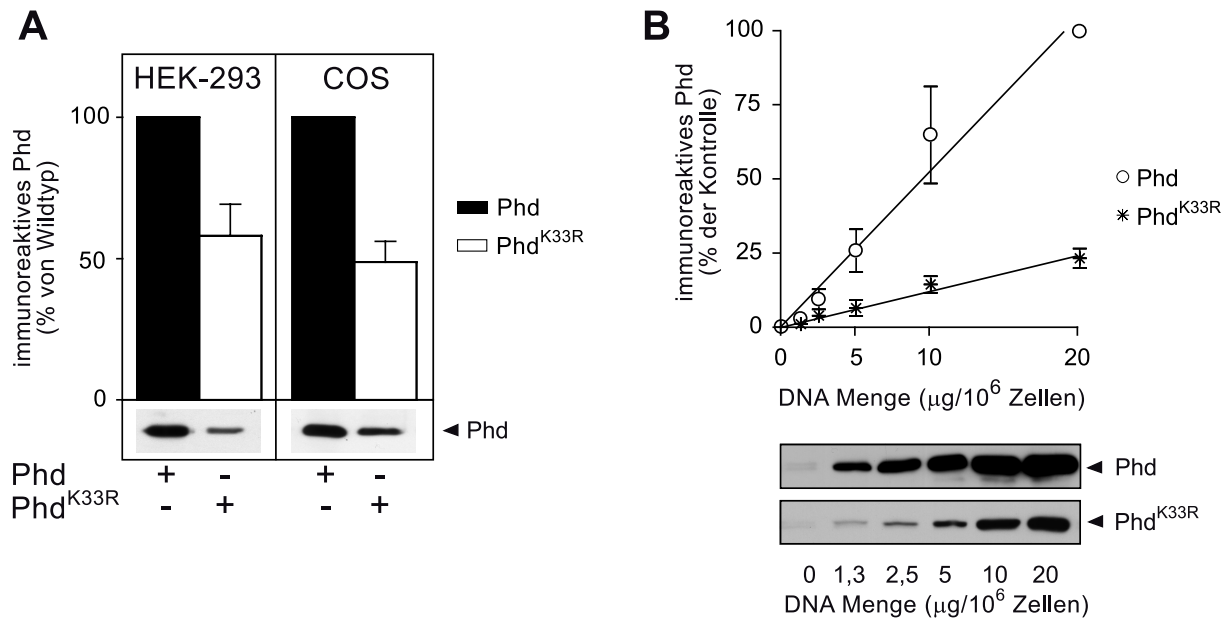


Abbildung 17 | **Verminderte Expression von Phd<sup>K33R</sup> im Vergleich zu WT-Phd.** **A** | HEK-293 oder COS 7 Zellen wurden mit 5 µg cDNA für Phd oder Phd<sup>K33R</sup> transfiziert. 36 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, und Phd wurde mit Phd-spezifischen Antikörpern im Western Blot dargestellt. Die Western Blots wurden densitometrisch analysiert, und die Intensität der Phd<sup>K33R</sup> Bande ist als Prozent der Intensität der Phd Bande angegeben (= Kontrolle). Die Mittelwerte von drei Experimenten (± SEM) sind gezeigt.

**B** | HEK-293 Zellen wurden mit ansteigenden Mengen an Phd oder Phd<sup>K33R</sup> Plasmid transfiziert. 36 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und im Western Blot mit anti-Phd Antikörper analysiert. Gezeigt ist die densitometrische Auswertung und je ein repräsentativer Western Blot. Immunreaktives Phd oder Phd<sup>K33R</sup> sind als Prozent der Kontrolle (= immunreaktives Phd bei 20 µg DNA) gezeigt. Die Mittelwerte von drei Experimenten (± SEM) sind gezeigt.

### 6.3. Phd<sup>K33R</sup> besitzt geringere metabolische Stabilität im Vergleich zu Phd

Wie bei beinahe allen biologischen Molekülen kann die vorliegende Menge eines Proteins in der Zelle einerseits durch die Neubildung und andererseits durch den Abbau des Proteins reguliert werden. Auf welchen dieser Mechanismen die verringerten Proteinmengen der SUMOylierungs-defizienten Mutante Phd<sup>K33R</sup> zurückzuführen sind, sollte durch den Vergleich des Proteinmetabolismus von Phd und von Phd<sup>K33R</sup> mit „Pulse-Chase-Labeling“ ermittelt werden.

HEK-293 Zellen wurden mit Phd bzw. Phd<sup>K33R</sup> transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit Methionin/Cystein-freiem Medium ausgehungert. Die Pulse-Markierung erfolgte mit 200 µCi/ Loch eines [<sup>35</sup>S] Methionin-Cystein-Gemischs über 30 min. Der Chase erfolgte durch Austausch des radioaktiven Mediums gegen nichtradioaktives

Medium, das Methionin und Cystein im Überschuss enthielt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert, und Phd wurde immunpräzipitiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der präzipitierten Proteine erfolgte die Quantifizierung der Radionuklid-haltigen Proteine mittels Phosphorimaging. In Abbildung 18 A sind die Zeitpunkte  $t=0$  und  $t=60$  dargestellt, wobei  $t=0$  den Zeitpunkt des maximalen Aktivitätseinbaus darstellt. Die quantitative Auswertung von fünf Versuchen (Abb. 18 B) zeigt, dass die Menge an radioaktiv markiertem  $\text{Phd}^{\text{K33R}}$  nach 1 h „Chase“ auf ca. 60% des Ausgangswertes abgenommen hatte. Bei Phd hingegen ließ sich im gleichen Zeitintervall keine signifikante Abnahme verzeichnen. Dieser Versuch demonstriert, dass  $\text{Phd}^{\text{K33R}}$  eine verminderte Stabilität im Vergleich zu Phd besitzt.

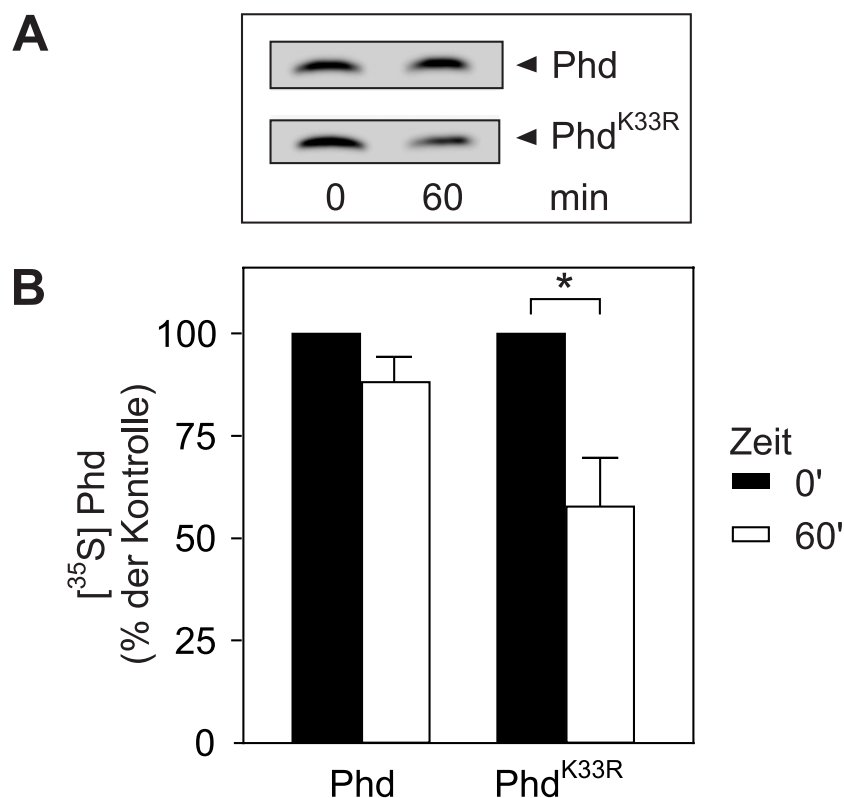


Abbildung 18 | **Phd ist stabiler als Phd<sup>K33R</sup>**. HEK-293 Zellen wurden mit Phd oder Phd<sup>K33R</sup> transfiziert. Gleiche Proteinexpression wurde durch angepasste cDNA-Mengen bei der Transfektion erzielt. Die metabolische Stabilität beider Proteine wurde im Pulse-Chase Experiment ermittelt. Es wurde 30 min mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein-haltigem Medium (400  $\mu\text{Ci/ml}$ ) markiert. Nach 0 und 60 min Chase-Zeit wurden die Zellen lysiert, und Phd wurde immunpräzipitiert. **A** | Präzipitiertes [<sup>35</sup>S]-Phd bzw. [<sup>35</sup>S]-Phd<sup>K33R</sup> wurde durch Analyse mit einem FLA3000 Phosphoimager dargestellt und quantifiziert. **B** | Die Mittelwerte von fünf Experimenten sind gezeigt. Die Menge von [<sup>35</sup>S]-Phd wird als Prozent der Kontrolle (=100% zum Zeitpunkt  $t=0$ ) dargestellt. Der ungepaarte t-Test war signifikant (\*,  $p < 0,05$  bei  $t=0$  gegenüber  $t=60$  für Phd<sup>K33R</sup>).

#### **6.4. SUMOyliertes Phd ist stabiler als natives Phd**

Das vorangegangene Experiment zeigt, dass die Stabilität der SUMOylierungsdefizienten Mutante Phd<sup>K33R</sup> deutlich reduziert ist. Dies legt den Schluss nahe, dass die SUMOylierung einen stabilisierenden Einfluss auf Phd haben könnte. Um diese Vermutung zu bekräftigen, sollte die Stabilität von Phd in Zellen mit intakter oder ausgeschalteter SUMOylierung untersucht werden.

HEK-293 Zellen wurden mit Phd, Flag-SUMO-1 und UBC9 transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Plasmid, welches für GAM 1 kodiert, oder mit gleichen Mengen des leeren Plasmids transfiziert. GAM 1 ist ein adenovirales Protein, welches die SUMOylierung von Proteinen sehr effektiv inhibiert (Boggio, Colombo et al. 2004). Dieser Effekt sollte ausgenutzt werden, um die SUMOylierung von Phd zu unterdrücken. Um den Abbau von Phd im Westernblot darstellen zu können, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Proteinsynthese der Zellen durch Gabe von Cyclohexamid blockiert, eine Substanz, die die Translation von mRNA an den 80S-Ribosomen eukaryotischer Zellen inhibiert. Nach Blockade der Proteinsynthese werden somit nur die vor Zugabe von Cyclohexamid gebildeten Proteine in der Zelle analysiert.

Die Zellen wurden über 0,5, 1, 2, 4 oder 8 h mit 100 µg/ml Cyclohexamid behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Phd wurde im Westernblot mit Phd-spezifischen Antikörpern detektiert und densitometrisch quantifiziert.

In den Zellen ohne GAM 1-Expression war neben unmodifiziertem Phd eine deutliche Fraktion an SUMOyliertem Phd zu erkennen. In den Zellen, welche GAM 1 exprimierten, war dagegen kaum SUMOylierung von Phd nachzuweisen (Abb. 19 A, linkes vs. rechtes Bild). Die densitometrische Auswertung des immunoreaktiven Phd ergab, dass in den Zellen, in denen die SUMOylierung inhibiert war, die Gesamtmenge des Phd nach 8 h um ca. 70% abnahm. In Zellen mit intakter SUMOylierung hingegen blieb die Menge des Phd über denselben Zeitraum weitgehend konstant (Abb. 19 B).

Dieses Experiment deutet an, dass die Proteinstabilität des Phd bei inhibierter SUMOylierung vermindert ist, und somit die SUMOylierung von Phd den Abbau dieses Proteins in der Zelle zu verlangsamen scheint.

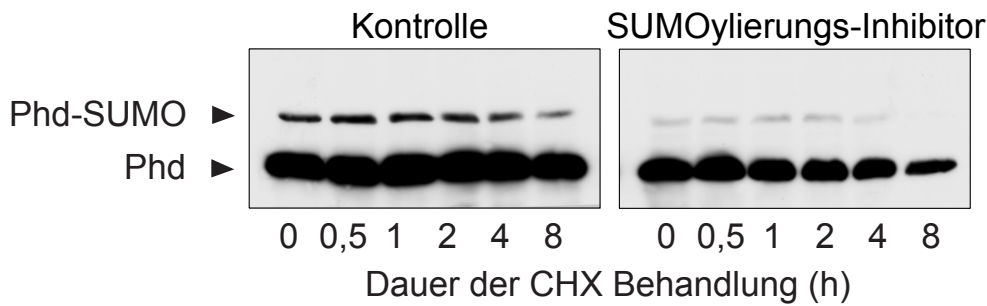
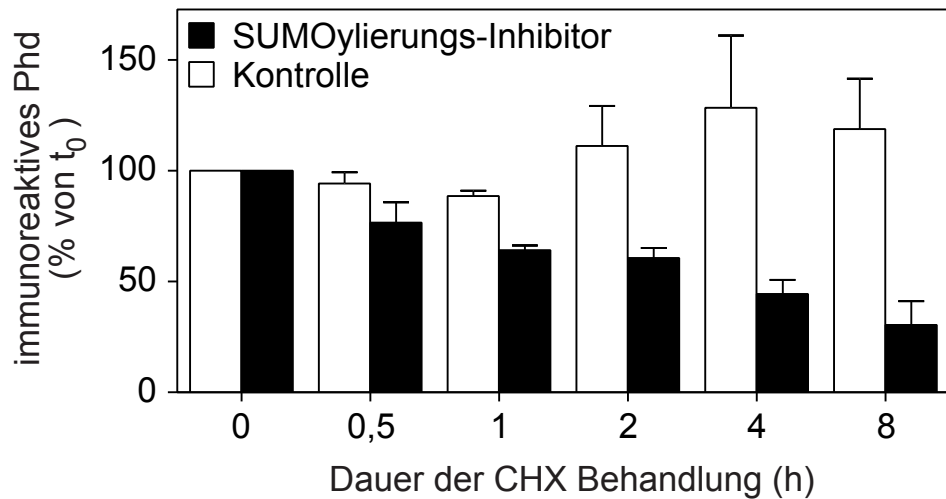
**A****B**

Abbildung 19 | **SUMOyliertes Phd ist stabiler als natives Phd.** HEK-293 Zellen wurden mit Phd, UBC9 und Flag-SUMO1 sowie mit einem SUMOylierungs-Inhibitor (GAM 1) bzw. leerem Plasmid kotransfiziert. 36 h nach der Transfektion wurden die Zellen zum Zeitpunkt 0 mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cyclohexamid behandelt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen lysiert und die Lysate durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Phd wurde im Westernblot mit anti-Phd Antikörpern nachgewiesen. **B** | Die Menge von Phd wurde densitometrisch quantifiziert. Die relative Menge von Phd im Vergleich zum Zeitpunkt 0 ( $t_0$ ) ist dargestellt. Die Mittelwerte von drei Experimenten sind gezeigt.

## 6.5. Phd<sup>K33R</sup> wird verstärkt ubiquitiniert

Der Abbau von Proteinen erfolgt in der Zelle in vielen Fällen nach der Anheftung von linearen Poly-Ubiquitinketten an das Protein, welche spezifische Erkennungssequenzen für das 26S-Proteasom darstellen und das Protein der proteasomalen Degradation zuführen. Dieser Mechanismus gehört zu den grundlegenden Funktionen des Proteinmetabolismus und ist in allen Zellen aktiv.

Für einige Proteine wie p53 oder Mdm2 wurde gezeigt, dass deren Modifikation mit SUMO direkt den durch Ubiquitin getriggerten proteasomalen Abbau inhibiert wird

und somit unmittelbaren Einfluss auf den Proteinmetabolismus hat. Dies beruht entweder auf der Blockade des Akzeptorlysinrests für Ubiquitin durch SUMO, oder auf einer sterischen Blockade jener Region durch SUMO, an der die Ubiquitin-E2-Enzyme binden.

Wie die vorangegangenen Abschnitte verdeutlichen, gibt es Hinweise, dass ebenfalls eine SUMOylierungs-abhängige Regulation des Proteinmetabolismus von Phd vorliegen könnte. Um herauszufinden, ob die geringeren Proteinmengen im Gleichgewicht der SUMOylierungs-defizienten Phd-Mutante tatsächlich auf einer verstärkten Ubiquitinierung und dem damit verbundenen erhöhten Abbau des Proteins beruhte, wurde die Ubiquitinierung von Phd und Phd<sup>K33R</sup> verglichen. HEK-293 Zellen wurden mit Phd oder Phd<sup>K33R</sup> und Flag-Ubiquitin kotransfiziert. Die Zellen wurden lysiert und im Western Blot untersucht. Der anti-Phd Blot (Abb. 20 A, oberes Bild) zeigte, dass Phd unter Kotransfektion von Ubiquitin keinem wesentlich gesteigerten Abbau unterworfen war (Spur 1 vs. Spur 3). Die Transfektion von Ubiquitin zu Phd<sup>K33R</sup> hingegen reduzierte die Menge an Protein signifikant im Vergleich zu Phd<sup>K33R</sup> ohne Ubiquitin (Spur 2 vs. Spur 4). Die gleichmäßige Expression von Ubiquitin wurde durch Nachweis des Flag-Epitops mit monoklonalen Antikörpern überprüft (Abb. 20 A, unteres Bild). Als Kontrolle für gleiche Proteinmengen in den aufgetragenen Proben diente der Nachweis von c-Src mit monoklonalen Antikörpern. Dieses Protein wird im inaktiven Zustand kaum proteasomal abgebaut (Harris, Shoji et al. 1999). Im Gegensatz zu Phd<sup>K33R</sup> änderten sich die Proteinmengen von c-Src bei Ubiquitinierung erwartungsgemäß nicht (Abb. 20 A, mittleres Bild). Daher lässt sich feststellen, dass eine vermehrte Expression von Ubiquitin zum gesteigerten Abbau von Phd<sup>K33R</sup> führt, wohingegen Phd davon relativ unbeeinflusst bleibt.

Der direkte Nachweis, dass Phd<sup>K33R</sup> im Gegensatz zu Phd verstärkt ubiquitiniert wird, wurde durch Analyse der Bindung von Ubiquitin an Phd bzw. Phd<sup>K33R</sup> mittels Immunpräzipitation erbracht. Hierzu wurden HEK-293 Zellen mit Myc-getaggttem Phd bzw. Phd<sup>K33R</sup> und Flag-markiertem Ubiquitin<sup>K48R</sup> kotransfiziert. In dieser Ubiquitinmutante wurde Lysin 48, welches für die Formation der Polyubiquitinketten verantwortlich ist und damit eine notwendige Voraussetzung des proteasomalen Targetings und Abbaus darstellt, gegen Arginin ausgetauscht (Chau, Tobias et al. 1989). Die Verwendung dieser Mutante ermöglicht die Darstellung von mono- und oligo-ubiquitinierten Proteinen und stellt somit eine elegante Alternative zu den sonst

für die Darstellung ubiquitiniertes Proteine nötigen Proteasomeninhibitoren dar. Die transfizierten Zellen wurden lysiert, Phd wurde mit anti-Myc Sepharose angereichert, und die präzipitierten Proteine wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Durch Nachweis des Flag-Epitops von Ubiquitin im Western Blot stellen sich bei Phd<sup>K33R</sup> zwei Banden bei 40 und 48 kDa dar welche vermutlich mono- und diubiquitiniertes Phd<sup>K33R</sup> repräsentieren. Im Gegensatz dazu lässt sich nahezu kein ubiquitiniertes Wildtyp Phd nachweisen (Abb. 20 B, oberes Bild). Als Kontrolle für die gleichmäßige Präzipitation von Phd dienen anti-Phd Western Blots der präzipitierten Proteine (Abb. 20 B, unteres Bild).

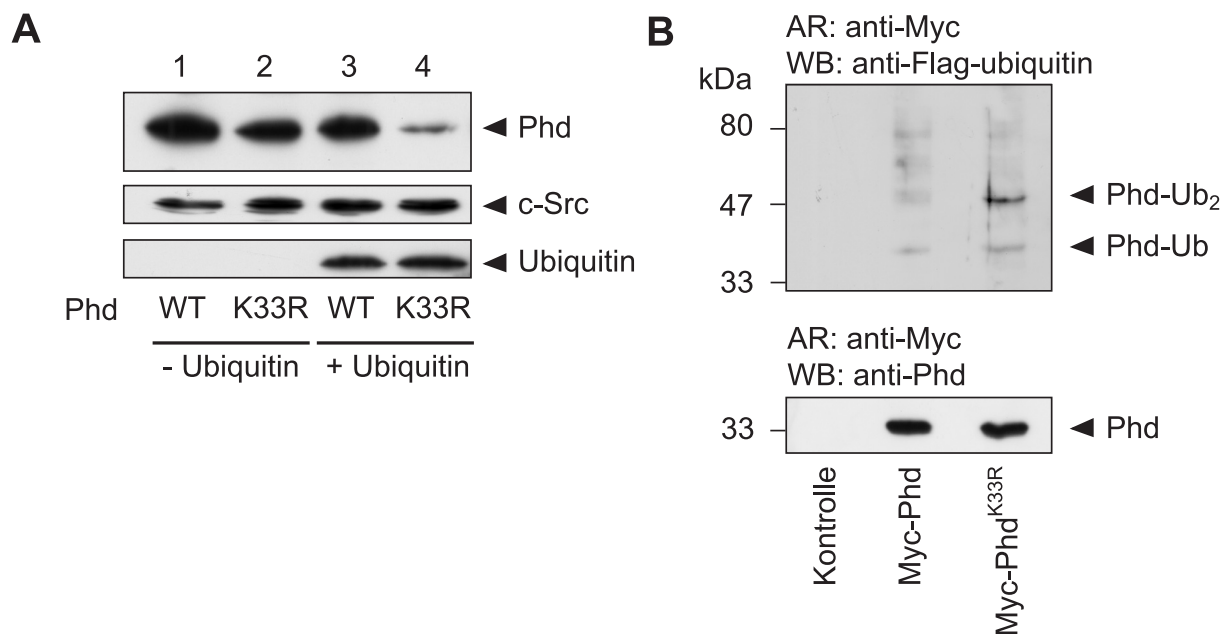


Abbildung 20 | **Gesteigerte Ubiquitinierung von Phd<sup>K33R</sup>**. **A** | HEK-293 Zellen wurden mit Phd bzw. Phd<sup>K33R</sup> alleine oder zusammen mit Flag-Ubiquitin transfiziert. Die Zellen wurden lysiert, und Phd wurde im Western Blot mit anti-Phd Antikörpern analysiert (oben). Die Membran wurde regeneriert und mit anti-c-Src Antikörper zum Nachweis von c-Src (Mitte), welches praktisch nicht ubiquitiniert wird, oder mit anti-Flag Antikörper zur Darstellung von Flag-Ubiquitin untersucht (unten).

**B** | HEK-293 Zellen wurden mit Myc-Phd oder Myc-Phd<sup>K33R</sup> und Flag-Ubiquitin<sup>K48R</sup> transfiziert. 36 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Lysispuffer lysiert, und Phd wurde mit anti-Myc-Sepharose angereichert. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Der Nachweis von ubiquitinierten Proteinen erfolgte mit anti-Flag Antikörper. Die gleichmäßige Expression von Phd und Phd<sup>K33R</sup> wurde durch Immundetektion mit anti-Phd Antikörpern verifiziert.

## 6.6. Chromatographische Auftrennung von retinalem Phd

Zur Charakterisierung der Eigenschaften von Phd und SUMOyliertem Phd wurden bei Formen aus Retinalysaten durch chromatographische Verfahren aufgetrennt. Hierzu wurden die Retinae aus Rinderaugen präpariert und in Saccharoselösung ausgeschüttelt, um die Zellmembranen aufzubrechen und die zytosolischen Proteine in Lösung zu bringen. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurden die im Überstand befindlichen Proteine durch Ionenaustausch-Chromatographie auf einer DEAE-Sephacel-Säule aufgetrennt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in einem linearen NaCl-Gradienten (0-500 mM) bei pH 8 (4°C). Zur Analyse wurde aus den einzelnen Fraktionen eine Proteinmengenbestimmung nach Bradford durchgeführt, gleiche Proteinmengen jeder Fraktion in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Anschließend wurde Phd im Western Blot mit Phd-spezifischen Antikörpern dargestellt. Mit ansteigender Salzkonzentrationen des Eluationsgradienten konnte sowohl die 33 kDa Form von Phd als auch 47 kDa SUMOylierte Phd Form eluiert werden. Bei niedriger Salzkonzentration löste sich zunächst das SUMOylierte Phd und mit graduell ansteigender Salzkonzentration dann das nicht-modifizierte Protein (Abb. 21). Dies zeigt, dass SUMOylierung die Assoziation von Phd mit der Ionenaustauschermatrix DEAE-Sephacel verändert und ist ein erster Hinweis darauf, dass SUMOylierung die Bindungseigenschaften von Phd verändern könnte.

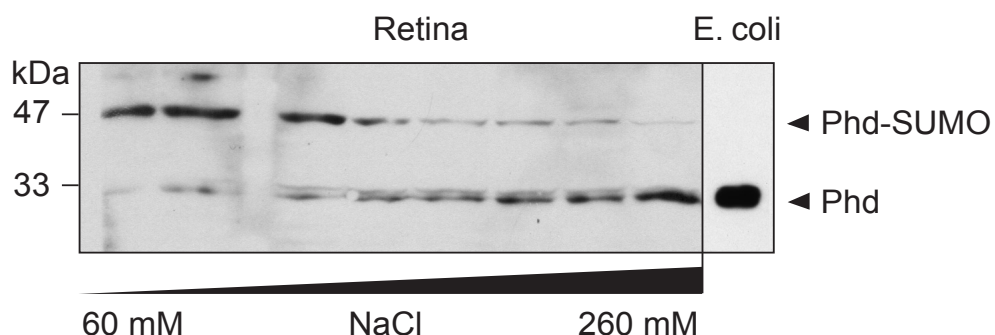


Abbildung 21 | **Chromatographische Auftrennung von Phd aus boviner Retina.** Lysate aus boviner Retina wurden auf DEAE-Sephacel-Säulen chromatographisch aufgetrennt. Das gebundene Protein wurde in einem NaCl-Gradienten (0-500 mM in Tris-HCl [pH 8,0]) eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen mit Konzentrationsunterschieden von 25 mM NaCl gesammelt. Phd wurde bei NaCl-Konzentrationen von 60-260 mM eluiert und im Western Blot mit Phd-spezifischen Antikörpern identifiziert. Als Kontrolle diente 1 pmol rekombinantes Phd, welches aus *E.coli* aufgereinigt worden war (*E.coli*).

## **6.7. SUMOylierung reduziert die G $\beta$ $\gamma$ -Bindung von Phd**

Nachdem gezeigt wurde, dass SUMOylierung die Interaktion von Phd mit einer Ionenaustauschermatrix veränderte, stellte sich die Frage, ob SUMO zudem auch physiologische Funktionen von Phd beeinflussen kann, insbesondere die Bindung von G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten.

Um diese Frage zu untersuchen, wurden aus bovinem Hirn gereinigte G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten an einer Affi-Gel-Matrix immobilisiert. Diese G $\beta$  $\gamma$ -Matrix wurde im Folgenden mit Retinalysat, welches größere Mengen an nativem und SUMOyliertem Phd enthielt, inkubiert. Um die spezifische Bindung der beiden Phd-Formen an G $\beta$  $\gamma$  zu bestimmen, wurden äquivalente Mengen des Lysats vor der Inkubation und nach der Inkubation mit der G $\beta$  $\gamma$ -Matrix im Westernblot mit anti-Phd Antikörpern untersucht. Zusätzlich wurden die gebundenen Proteine von der Matrix eluiert und ebenfalls im Westernblot gegen Phd untersucht. Als Kontrolle diente eine Affi-Gel-Matrix, an die keine G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten gekoppelt worden waren (Abb. 22 A).

Die densitometrische Auswertung der Westernblots zeigte, dass die G $\beta$  $\gamma$ -Matrix im Vergleich zu der Kontrollmatrix ca. dreimal mehr des unmodifizierten Phd bindet (Abb. 22 B, linkes Diagramm). Im Gegensatz dazu zeigte die SUMOylierte 47 kDa Form von Phd keine signifikante Interaktion mit G $\beta$  $\gamma$  im Vergleich zu der Kontrollmatrix (Abb 22 B, rechtes Diagramm). Die Untersuchung der an die Matrix gebundenen Proteine im Westernblot mit anti-Phd Antikörpern bestätigte diesen Befund: Im Eluat der G $\beta$  $\gamma$ -Matrix war ausschließlich natives Phd nachweisbar (Abb. 22 A, rechtes Bild).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass nur natives Phd in vitro in der Lage ist, G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten zu binden. Somit kontrolliert SUMO die G $\beta$  $\gamma$ -Bindungseigenschaften von Phd.



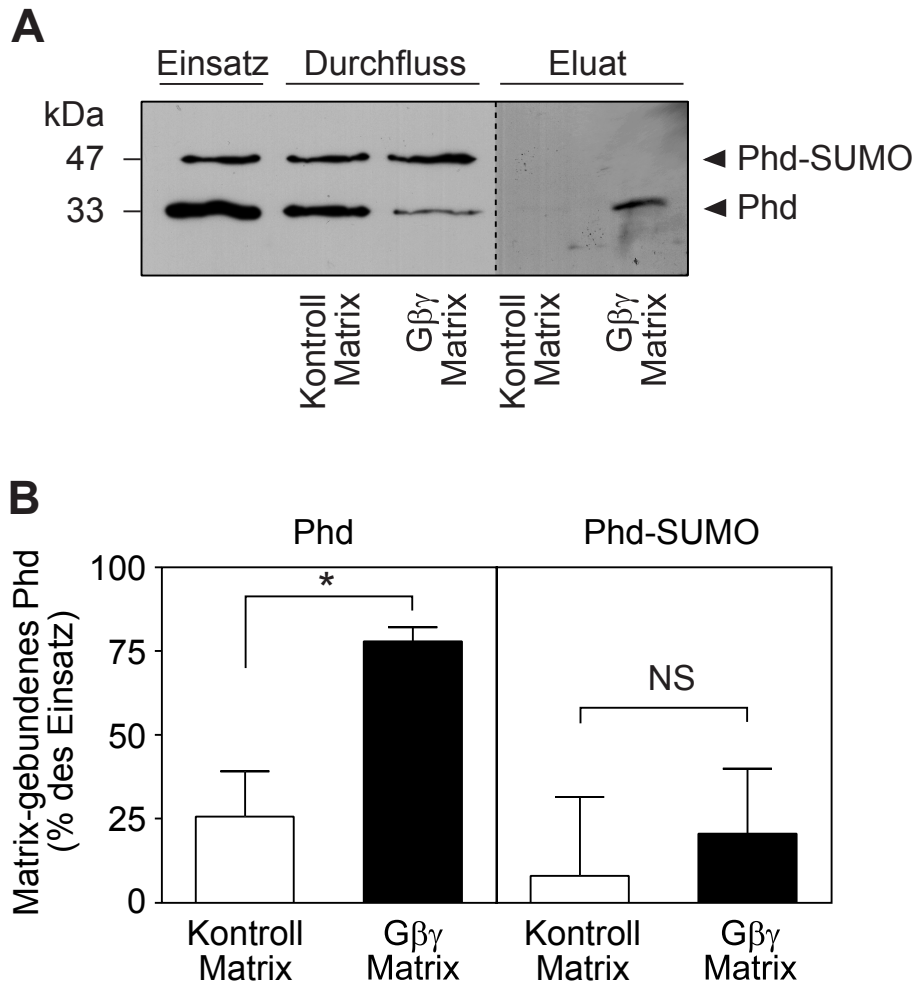


Abbildung 22 | **SUMOylierung reduziert die Gβγ-Bindung von Phd.** **A** | Vierzig µg Retinalysat wurden mit Affi-Gel gekoppelten Gβγ-Untereinheiten (Gβγ-Matrix) oder mit deaktiviertem Affi-Gel inkubiert (Kontroll-Matrix). Anschließend wurden die nicht gebundenen Proteine (Durchfluss) aufgefangen, die Matrix wurde mit Waschlösung (150 mM NaCl; 100 mM HEPES [pH 7,4]) gewaschen und die gebundenen Proteine wurden mit kochendem SDS-Laemmli Puffer eluiert (Eluat). Acht µg des Retinalysats (Einsatz) und äquivalente Mengen des Durchflusses und des Eluats wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit anti-Phd Antikörpern analysiert. Die Größenstandards sind auf der linken Seite angegeben. **B** | Densitometrische Quantifizierung der Gβγ-Interaktion. Die Signalintensität der Westernblots aus A wurde densitometrisch ermittelt. Die Intensität der 33 kDa (Phd) und der 47 kDa (Phd-SUMO) Phd-reaktiven Bande aus dem Durchfluss wurde mit der Signalintensität der entsprechenden Bande des Retinalysats verglichen. Dargestellt ist gebundenes Phd als Differenz der Phd-Menge im aufgetragenen Retinalysat (=100%) und der verbleibenden Phd-Menge im Durchfluss. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Der ungepaarte t-Test von Gβγ-gebundenem Phd vs. Kontroll-Matrix gebundenem Phd war signifikant für  $p < 0,05$ , jedoch nicht bei Phd-SUMO.

## IV. Diskussion

### 1. Signalkaskaden erfordern strenge Regulation

Die Übermittlung eines Signals über einen heptahelikalen Rezeptor durch Aktivierung eines G-Proteins mit anschließender Freisetzung eines intrazellulären Botenstoffes stellt einen der wichtigsten Signaltransduktionswege in biologischen Systemen dar. Den Rezeptoren kommt dabei durch selektive Bindung eines Agonisten die Funktion eines Signalfilters zu. Agonist-besetzte Rezeptoren aktivieren zunächst heterotrimere G-Proteine, welche anschließend nachgeschaltete Effektoren zu stimulieren vermögen. Dies führt zur Freisetzung von niedermolekularen, intrazellulären Botenstoffen („second messengers“), die schließlich die zelluläre Antwort auslösen. Die Mehrstufigkeit der Signalkaskade hat große Auswirkungen auf die Dynamik der Signaltransduktion und bewirkt zudem eine große Verstärkung des Signals.

Die zentrale Rolle, die der G-Protein vermittelten Signaltransduktion im Leben und Wachstum einer Zelle zukommt, setzt voraus, dass auf allen Ebenen der Signalkaskade effektive Kontrollmechanismen bestehen, die eine regelrechte Funktion des Organismus garantieren. Tatsächlich trifft dies sowohl für die Rezeptorebene als auch für die G-Proteine zu. Die wiederholte oder lange andauernde Stimulierung eines Rezeptors führt zur Desensibilisierung der Rezeptoren und Verminderung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche. Auf der Ebene des G-Proteins stellen sowohl die  $G\alpha$ - als auch die  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten Angriffspunkte zur Regulation dar. Mit den RGS-Proteinen wurde eine eigene Proteinklasse zur Regulation der  $\alpha$ -Untereinheit gefunden.

Als ein wichtiger Interaktionspartner und Modulator der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit wurde Phd identifiziert. Dieses 33 kDa zytosolische Protein, welches in hohen Konzentrationen in der Retina (Lee, Lieberman et al. 1987) und der verwandten Epiphyse (Lee, Lieberman et al. 1987; Craft, Lolley et al. 1991; Lolley, Craft et al. 1992), aber auch in vielen anderen Organen nachgewiesen werden konnte (Danner und Lohse 1996), ist im Gegensatz zu den  $G\alpha$ -Modulatoren bisher nicht als Effektor in der Signalkaskade beschrieben worden. Es bildet aber hochaffine Komplexe mit  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten (Lee, Lieberman et al. 1987), wobei keine Präferenzen bezüglich der Art des

G-Proteins bestehen (Müller, Straub et al. 1996). Diese unspezifische  $G\beta\gamma$ -Bindung führt zu einer direkten Konkurrenz mit verschiedenen  $G\beta\gamma$ -Effektoren, und somit zu einer Abschwächung des  $G\beta\gamma$ -Signals. Darüber hinaus verhindert die Sequestrierung von  $G\beta\gamma$  durch Phosducin die Reassoziierung von  $G\alpha$  mit  $G\beta\gamma$  zum heterotrimeren Komplex, dem Ausgangszustand des G-Proteins, welcher für die Aktivierung weiterer Rezeptoren essentiell ist. Durch diese Reduktion des funktionellen G-Protein-Pools inhibiert Phosducin indirekt ebenfalls  $G\alpha$ -vermittelte Effekte.

Entscheidend für die Funktion von Phosducin ist der Phosphorylierungsstatus an Serin 73, welcher durch cAMP-abhängige Kinasen moduliert wird (Reig, Yu et al. 1990; Bauer, Müller et al. 1992; Yoshida, Willardson et al. 1994). Im phosphorylierten Zustand ist die Affinität von Phosducin an  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten stark reduziert, wohingegen die unphosphorylierte Form den aktiven Zustand darstellt. Vor allem im Auge scheinen diese Vorgänge von entscheidender Bedeutung zu sein. In den retinalen Rezeptorzellen bindet Phosducin, welches im hell-adaptierten Auge in der unphosphorylierten Form vorliegt, effektiv die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins Rhodopsin und unterbricht so die Signalübertragung zur cGMP-Phosphodiesterase, welche das Membranpotential der Rezeptorzelle reguliert. Im Hellen dämpft Phosducin so das lichtinduzierte Rezeptorpotential der Stäbchenzelle. Dieser Mechanismus scheint unter bestimmten Bedingungen eine Rolle bei der Hell-Dunkel-Adaptation des Auges zu spielen (Yoshida, Willardson et al. 1994; Willardson, Wilkins et al. 1996).

## **2. Phosducin ist eine neues Zielprotein der SUMOylierung**

Betrachtet man diese grundlegenden Funktionen Phosducins auf die Regulation der  $G\beta\gamma$ - und auch  $G\alpha$ -vermittelten Signaltransduktion unter Berücksichtigung der großen Mengen, in denen dieses Protein in der Retina vorkommt, so wird deutlich, dass die Aktivität Phosducins einer strengen Regulation unterworfen sein muss. Interessanterweise sind außer der phosphorylierungsabhängigen, funktionellen Deaktivierung bisher keine weiteren Mechanismen bekannt, die hierfür in Betracht kommen könnten.

Vor diesem Hintergrund wurden Lysate aus boviner Retina auf Phosducin untersucht. Neben der schon bekannten 33 kDa Form von Phosducin wurde eine weitere, höhermolekulare Form identifiziert. Die Analyse dieses ca. 47 kDa großen Proteins

ergab, dass es sich hierbei um Phosducin handelte, an das der Small Ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) gebunden war. Dieses 18 kDa Polypeptid gehört in die Gruppe der Ubiquitin-ähnlichen Proteine, die eine neue Klasse der posttranslationalen Proteinmodifikation darstellen. Diese Ergebnisse ließen sich sowohl in HEK-293 Zellen unter transienter Transfektion der für den SUMOylierungsprozess nötigen Komponenten als auch durch SUMOylierung von gereinigtem Phosducin und Phosducin<sup>K33R</sup> *in vitro* reproduzieren.

Der rechnerische Vergleich der Massenunterschiede von unmodifiziertem und modifiziertem Phosducin ergab, dass Phosducin nur mit einem Molekül SUMO modifiziert sein konnte. SUMO wird – wie auch das verwandte Ubiquitin – durch eine kovalente Bindung an Lysinreste des Zielproteins gebunden. Die Identifizierung des Akzeptorlysins in Phd gelang durch Mutagenese von Lysin 33, was in einer Mutante resultierte, die nicht mehr SUMOyliert werden konnte. Diese SUMOylierungsstelle konnte sowohl durch transiente Transfektion in Zellen als auch durch *in vitro* SUMOylierung rekombinanten Phosducins belegt werden. Im Gegensatz zu Ubiquitin, für das bisher kein einheitliches Modifikationsmotiv bekannt ist, scheint ein kurzes Aminosäuremotiv ausreichend zu sein, um als Konsensussequenz der SUMOylierung zu dienen (Sampson, Wang et al. 2001). Der Vergleich der Primärstruktur von Phosducin ergab, dass die Aminosäuren 32-35 gleichfalls diesem Muster ( $\Psi$ KxE;  $\Psi$  ist eine hydrophobe Aminosäure, K der modifizierte Lysinrest, x ist eine beliebige Aminosäure) entsprachen. Diese Ergebnisse unterstützen, dass sich das vorgeschlagene SUMO-Konsensusmotiv als prädiktiver Parameter zur Identifizierung von SUMOylierungsstellen eignet.

Eine Reihe von Zielproteinen der SUMOylierung weist neben diesem minimalen Konsensusmotiv sog. PEST-Sequenzen als weitere Gemeinsamkeit auf (Melchior 2000). Hierbei handelt es sich um Abschnitte von mindestens 12 Aminosäuren Länge, welche vornehmlich Prolin, Glutamat, Aspartat, Serin und Threonin, aber keine positiv geladenen Aminosäuren enthalten (Rechsteiner und Rogers 1996). Die Untersuchung der Proteinsequenz von humanem und bovinem Phosducin durch den PEST-Find Algorithmus (<http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind>; Rechsteiner & Rogers) ergab, dass humanes Phosducin ebenfalls ein PEST-Motiv enthält. In bovinem Phosducin hingegen finden sich nur Abschnitte mit geringer Wahrscheinlichkeit für ein solches Motiv (vgl. Anhang 2). Dies ermöglicht den direkten Vergleich zweier homologer Proteine mit und ohne PEST-Sequenz in

Hinblick auf ihre SUMOylierungs-Eigenschaften. Da bovines Phosducin – wie in dieser Arbeit gezeigt – SUMOyliert wird, scheint die PEST-Sequenz keine notwendige Bedingung für die Modifikation mit SUMO zu sein. Allerdings weisen PEST-Sequenzen Merkmale auf, die bestimmten Sequenzabschnitten ähneln, welche die Ubiquitinierung von Proteinen regulieren. Daher könnten PEST-Sequenzen in Zielproteinen in Analogie dazu regulative Funktionen auf den SUMOylierungsvorgang haben (Hershko und Ciechanover 1998; Melchior 2000).

Die Modifikation mit SUMO ist ein sehr dynamischer, reversibler Prozess. Dies beruht auf der Existenz einer Reihe von SUMO-spezifischen Proteasen (SUSPs), die selektiv die  $\epsilon$ -Isopeptidbindung zwischen SUMO und dem modifizierten Lysinrest spalten. Erste Versuche, SUMO-modifiziertes Phosducin in Zellkultur darzustellen, scheiterten. Erst durch Verwendung spezifischer Metalloproteaseinhibitoren und stark denaturierender Bedingungen konnte ein geringer Anteil an SUMOyliertem Phosducin in HEK-293 Zellen dargestellt werden. Trotz intensiver Versuche ließ sich die relative Menge von modifiziertem zu nicht-modifiziertem Phosducin bisher nicht steigern. In der Retina hingegen liegt Phosducin in einem wesentlich höheren Anteil in der SUMOylierten Form vor. Diese Diskrepanz im Verhältnis zwischen modifiziertem zu unmodifiziertem Protein lässt auf Unterschiede in beiden Systemen schließen. Einerseits könnte dafür eine weitaus höhere Aktivität der SUMO-spezifischen Proteasen in HEK-293 Zellen verantwortlich gemacht werden, die trotz Verwendung spezifischer Inhibitoren funktionell bleiben und SUMO schnell von Phosducin abspalten. Andererseits könnte eine zusätzliche Komponente in der Retina vorliegen, die letztlich zu einer Stabilisierung von Phosducin-SUMO führt, bzw. dort die Menge an modifiziertem Phosducin steigert. Beobachtungen dieser Art wurden zuvor schon für andere Zielproteine der SUMOylierung gemacht. So werden RanGAP, I $\kappa$ B $\alpha$  und p53 zwar auch *in vitro* durch Zugabe von gereinigten E1- und E2-Enzymen und SUMO modifiziert, allerdings fällt die Menge des SUMOylierten Proteins im Vergleich zu der nicht-modifizierten Variante *in vivo* relativ gering aus. In Zellen hingegen wurden weitaus größere Mengen des SUMOylierten Proteins gefunden (Desterro, Rodriguez et al. 1998; Okuma, Honda et al. 1999; Rodriguez, Desterro et al. 1999). Daraus wurde – in Analogie zu Ubiquitin – die Existenz von SUMO-Ligasen (E3 Enzymen) postuliert, welche die SUMOylierung bestimmter Substrate zusätzlich verstärken können. Mittlerweile konnten drei Proteingruppen identifiziert werden, die eine solche E3-Funktion besitzen: Proteine der PIAS-Gruppe

und Topors, RanBP2 und Pc2 (Johnson und Gupta 2001; Sachdev, Bruhn et al. 2001; Kotaja, Karvonen et al. 2002; Pichler, Gast et al. 2002; Kagey, Melhuish et al. 2003; Ungureanu, Vanhatupa et al. 2003; Weger, Hammer et al. 2005).

Es liegt nahe, aufgrund der Diskrepanz zwischen den Mengen modifizierten Phosducins in der Retina und in HEK-293 Zellen ein retinales E3-Enzym vorzuschlagen, welches die Modifikation von Phosducin erleichtert. Versuche mit einigen der derzeit bekannten SUMO-E3-Enzymen, die SUMOylierung von Phosducin zu steigern, verliefen bisher allerdings erfolglos (Daten nicht gezeigt). Dies muss aber kein direkter Widerspruch für die Existenz eines solchen E3-Enzyms sein: Neben der Erleichterung der SUMOylierung bestimmter Proteine durch E3-Enzyme wird vermutet, dass solche Proteine ebenfalls die Substratspezifität der SUMOylierung gewährleisten (Müller, Hoege et al. 2001). Dies erscheint plausibel, da UBC9, welches als einzige andere Komponente der SUMOylierung ebenfalls in Kontakt mit SUMO und dem Zielprotein tritt, die SUMOylierung aller bisher untersuchten Zielproteine katalysiert. Eine ausgeprägte Substratspezifität von UBC9 ist somit eher auszuschließen. Der Kontakt des SUMO-besetzten UBC9 mit dem Zielprotein wird offenbar vielmehr durch eine Vielzahl verschiedener E3-Enzyme gewährleistet. Insofern erscheint die Existenz eines bisher noch unbekanntes, möglicherweise Retina-spezifischen E3-Enzyms neben den bisher bekannten E3-Enzymen durchaus nahe liegend.

### **3. Vergleich mit anderen Vertretern der Phosducin-Familie**

Neben Phosducin, das in einer Reihe eukaryotischer Spezies vorkommt, existieren mehrere Phd-ähnliche Proteine. Diese Proteine besitzen eine weitaus breitere evolutionäre Verteilung. So wurden Phd-ähnliche Proteine sowohl in Vertebraten wie dem Menschen und der Ratte als auch in verschiedenen niederzelligen Organismen und Pflanzen nachgewiesen. Während Phosducin insgesamt eine extrem hohe Konservierung zwischen den einzelnen Spezies aufweist, sind die Phosducin-ähnlichen Proteine eine eher heterogene Gruppe. Zwar bestehen je nach Protein teilweise deutliche Übereinstimmungen zu der Aminosäuresequenz von Phosducin, allerdings kommen wichtige Strukturmerkmale, die in Phosducin funktionelle Eigenschaften determinieren, in vielen Phd-ähnlichen Proteinen nicht vor. So fehlt einigen der Phd-ähnlichen Proteine die für Phosducin typische Fähigkeit  $\beta\gamma$ -Untereinheiten

heterotrimerer G-Proteine zu binden. Ebenfalls ist in manchen der Phd-ähnlichen Proteine die für die G $\beta\gamma$ -Bindung regulative Phosphorylierung nicht vorhanden. Darüber hinaus wurden mehrere zusätzliche Proteininteraktionen Phd-ähnlicher Proteine beschrieben, die auf ein erweitertes oder völlig anderes Aufgabenspektrum dieser Proteine schließen lassen. Aufgrund dieser teilweise höchst unterschiedlichen Eigenschaften zwischen den einzelnen Phd-ähnlichen Proteinen ist es interessant zu vergleichen, ob sich die SUMOylierung nur bei Phosducin findet, oder ob es sich hierbei um ein gemeinsames Merkmal aller Vertreter der Phd-Familie handelt.

Wie diese Arbeit gezeigt hat, bestehen tatsächlich Unterschiede in der SUMOylierung von Phosducin und PhIP<sub>L</sub>. Während Phosducin an Lys 33 durch SUMO modifiziert wird, lässt sich eine solche Modifikation für PhIP<sub>L</sub> nicht nachweisen. Allerdings kann die SUMOylierung von PhIP<sub>L</sub> durch Deletion von Gln 71 in PhIP<sub>L</sub> hergestellt werden. Durch diese Mutation wird eine dem SUMO-Konsensusmotiv FKLE von Phosducin homologe Sequenz in PhIP<sub>L</sub> generiert. Dies zeigt, dass dieses Motiv essentiell ist für die SUMOylierung von Phosducin und Phd-ähnlichen Proteinen.

In Anhang 1 wurden exemplarisch die Sequenzen von Phosducin dreier verschiedener Spezies sowie mehrerer Phd-ähnlicher Proteine miteinander verglichen. Bei den Phosducinen, die insgesamt eine Homologie von über 90% aufweisen, ist das Motiv zu 100% konserviert.

Die PhIP-Proteine und PhLOP1 hingegen zeigen zwar abschnittsweise hohe Übereinstimmung mit Phosducin, aber keines dieser Proteine enthält das SUMO-Konsensusmotiv. Einzig in PhIOP2 existiert ein Konsensusmotiv an der gleichen Stelle wie in Phosducin. Allerdings scheint es sich bei PhIOP2 um eine Splicevariante von Phosducin zu handeln, die durch einen Baseneinschub in codierenden Genbereichen zustande gekommen ist (Craft, Xu et al. 1998). Daher ist dieses Protein wohl eher den Phosducinen zuzurechnen.

Insgesamt zeigt sich, dass die SUMOylierung offenbar ein spezifisches Merkmal von Phosducin ist. Für keines der untersuchten Phd-ähnlichen Proteine gibt es einen Hinweis, dass sie ebenfalls SUMOyliert werden. Damit wäre ein weiterer entscheidender Unterschied zwischen Phosducin und den Phd-ähnlichen Proteinen gegeben, wodurch die Hypothese, dass es sich bei beiden Gruppen um unterschiedliche Proteine mit unterschiedlichen Funktionen handeln könnte (Craft, Xu et al. 1998; Zhu und Craft 2000; Blaauw, Knol et al. 2003), durch einen weiteren Punkt unterstützt wird.

#### 4. Biologische Konsequenzen der SUMOylierung von Phd

Trotz der großen Gemeinsamkeiten in der Struktur und dem Mechanismus der Modifikation von Ubiquitin und SUMO sind die biologischen Effekte der beiden Modifikatoren grundsätzlich verschieden. Während Ubiquitin in der Regel das proteasomale Targeting und den damit verbundenen Abbau von Proteinen katalysiert, dient SUMO mehreren Funktionen.

Für einige Proteine wurde gezeigt, dass SUMOylierung deren Stabilität erhöht. Dieser Effekt beruht auf der funktionellen Antagonisierung des Ubiquitin-vermittelten Abbaus. Interessanterweise waren die Proteinmengen der SUMOylierungsdefizienten Mutante Phd<sup>K33R</sup> im Vergleich zu Phosducin stets signifikant reduziert und die Quantifizierung des Proteinumsatzes von Phosducin und Phd<sup>K33R</sup> im Pulse-Chase-Experiment zeigte einen verstärkten Abbau von Phd<sup>K33R</sup>. Wildtyp-Phosducin konnte in einen ähnlich rapiden Abbau getrieben werden, nachdem die SUMOylierungsmaschinerie der Zelle durch einen Inhibitor der SUMOylierung ausgeschaltet worden war und somit das offenbar stabilisierende Moment von SUMO entfiel. Die Erhöhung des Proteinumsatzes durch Aktivierung der Ubiquitin-Maschinerie nach Überexpression von Ubiquitin führte zu einer weiteren Abnahme von Phd<sup>K33R</sup>, während die Proteinmengen des Wildtyps nahezu unverändert blieben. Gleichzeitig ließen sich vermehrt ubiquitinierte Formen von Phd<sup>K33R</sup> im Vergleich zu Wildtyp Phosducin nachweisen. Die G $\beta$  $\gamma$ -Bindung von Phd<sup>K33R</sup> war vergleichbar mit der von Phosducin. Eine falsche Proteinfaltung, welche als Begründung für die geringere Stabilität der Phosducin-Mutante herangezogen werden könnte, war somit unwahrscheinlich. Demzufolge zeigen diese Experimente, dass das Fehlen der SUMOylierung von Phd in einem verstärkten Abbau des Proteins resultiert, und dass dieser Abbau Ubiquitin-vermittelt ist.

Die Beobachtung, dass trotz der Mutation von Lysin 33 Phosducin sogar verstärkt ubiquitiniert wird, schließt die Bindung von SUMO und Ubiquitin an einen gemeinsamen Lysinrest aus. Dies steht im direkten Widerspruch zu einigen Publikationen, in denen gezeigt wurde, dass SUMO und Ubiquitin in einer Reihe von Zielproteinen um denselben Lysinrest konkurrieren (Desterro, Rodriguez et al. 1998; Buschmann, Fuchs et al. 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vielmehr darauf schließen, dass SUMO und Ubiquitin verschiedene Bindungsstellen in Phosducin besitzen. Da SUMOyliertes Phosducin weniger stark ubiquitiniert und abgebaut wird als nicht-



SUMOyliertes Phosducin, scheint die Bindung von SUMO dennoch mit der Bindung von Ubiquitin in Phosducin zu interferieren. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Akzeptorlysine von SUMO und Ubiquitin in Phosducin räumlich relativ eng beieinander liegen. Die Bindung von SUMO an Phosducin könnte daher die Bindungsstelle(n) von Ubiquitin durch Konformationsänderung oder sterische Blockade maskieren, so dass SUMOyliertes Phosducin nicht mehr ubiquitiniert werden kann (Abb. 23). Ein solcher Mechanismus wurde ebenfalls für die SUMOylierung von cMyb vorgeschlagen (Bies, Markus et al. 2002).

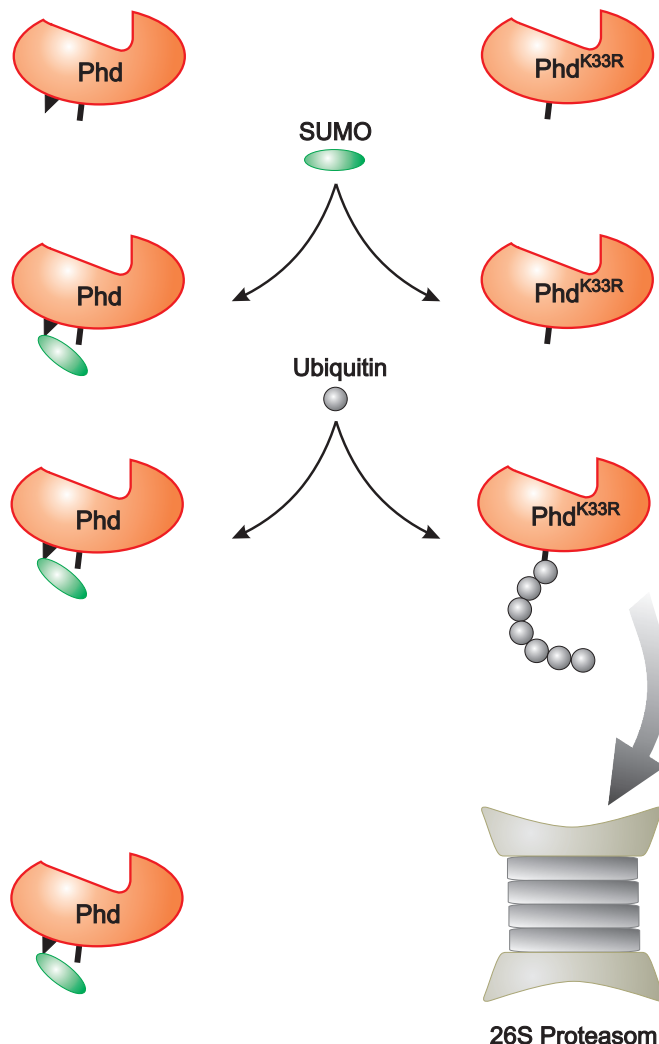


Abbildung 23 | **Hypothetischer Mechanismus des Metabolismus von Phd und Phd<sup>K33R</sup>**.

Phd wird an Lys33 (Dreieck) durch SUMO (grün) modifiziert. Dadurch wird die Ubiquitin-Bindungsstelle von Phd (Balken) maskiert, und Phd kann nicht mehr ubiquitiniert werden.

In Phd<sup>K33R</sup> fehlt die SUMOylierungsstelle. Dadurch kann es zur Bindung von Ubiquitin (grau) an Phd<sup>K33R</sup> kommen und schließlich zur Bildung von Polyubiquitinketten. Dies stellt das auslösende Signal für den Abbau von Phd<sup>K33R</sup> durch das 26S-Proteasom dar.

## 5. Strukturelle Aspekte

Generell befinden sich posttranslationale Modifikationen an Stellen des gefalteten Proteins, welche für die modifizierenden Enzyme zugänglich sind. Der Angriff dieser Enzyme an der Proteinoberfläche stellt somit eine wichtige Bedingung für die erfolgreiche Modifikation dar. Im Falle von Ubiquitin und den Ubiquitin-ähnlichen Proteinen kommt hinzu, dass es sich hierbei um Polypeptide handelt, die im Gegensatz zu kompakteren und kleineren Modifikationen wie Zucker- oder Phosphatgruppen eine größere räumliche Ausdehnung haben.

Der direkte Größenvergleich der Strukturen von Phosducin und SUMO zeigt, dass aufgrund der Größe SUMOs die SUMOylierung von Phosducin Auswirkungen auf die Funktionalität und die Struktur des Proteins haben könnte, wie z. B. die Interaktion mit  $G\beta\gamma$  (Abb. 24).

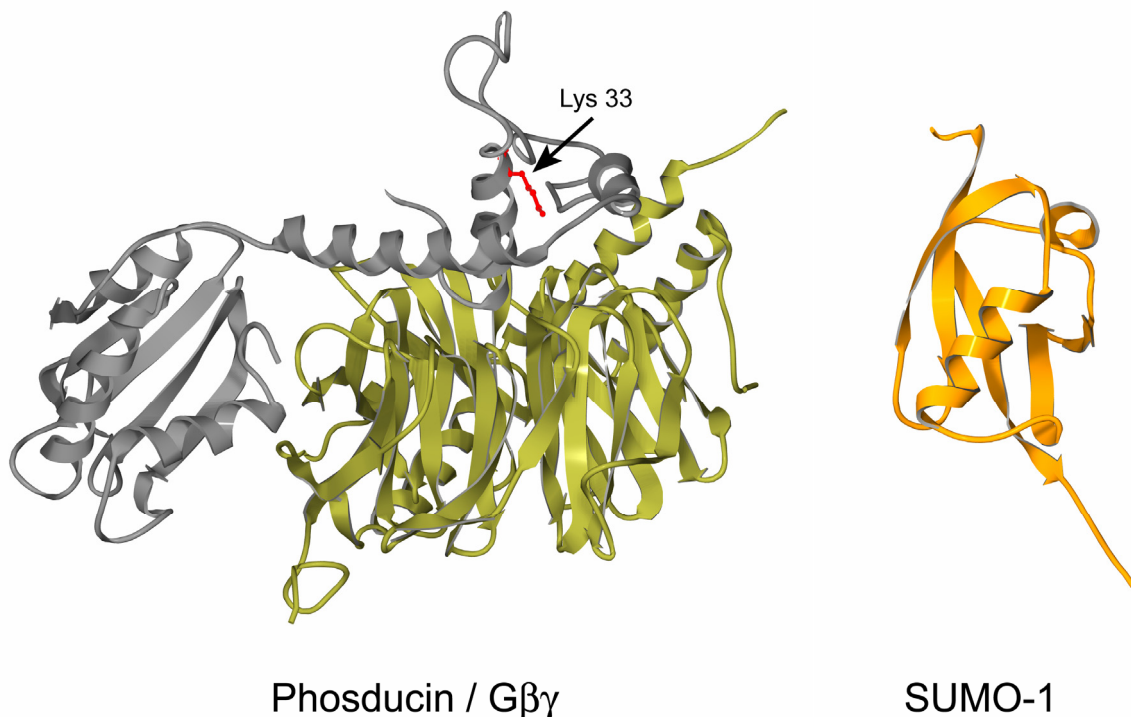


Abbildung 24 | **Größenvergleich der Struktur von Phosducin/ Gβγ und SUMO.** Phosducin (silber) im Komplex mit Gβγ (golden) und SUMO-1 (orange) sind als dreidimensionale Strukturdarstellungen im gleichen Maßstab gegenübergestellt. Die SUMOylierungsstelle an Lys33 ist rot dargestellt.

Interessanterweise finden sich die wichtigsten für die  $G\beta\gamma$ -Bindung erforderlichen Aminosäuren sowie die regulative Phosphorylierungsstelle in der N-terminalen Domäne Phosducins. Hinzu kommt, dass die SUMOylierungsstelle an Lysin 33 ebenfalls im aminoterminalen Bereich liegt. Obwohl der C-Terminus ebenfalls in die  $G\beta\gamma$ -Bindung involviert ist, scheint die Regulierbarkeit der Funktion des Phosducins nur im N-Terminus zu liegen.

Diese ungleiche Verteilung der funktionellen Bereiche auf die beiden Domänen des Proteins scheint erklärbar zu sein. Im Gegensatz zur Thioredoxin-Domäne besitzt der N-Terminus eine nur wenig ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur, so dass eine hohe Flexibilität dieses Bereichs angenommen werden muss. Dies scheint eine nötige Voraussetzung für die Bindung der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit zu sein (Gaudet, Bohm et al. 1996). Zudem ermöglicht eine relativ lockere Proteinstruktur mit hoher Flexibilität einen leichten Kontakt von anderen Proteinen, beispielweise Enzymen, die posttranslationale Modifikationen katalysieren.

Diese Arbeit zeigt, dass die SUMOylierung von Phosducin in der Retina ein weiterer Mechanismus ist, um die Bindung von  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten an Phosducin negativ zu beeinflussen. Dieser Effekt lässt sich am ehesten durch Wechselwirkungen von SUMO mit den  $G\beta\gamma$ -bindenden Bereichen des Proteins erklären. Dabei kommt insbesondere Tryptophan 29 sowie den benachbarten Aminosäuren eine besondere Rolle zu. Es wurde gezeigt, dass Tryptophan 29 eine wichtige stabilisierende Funktion des N-Terminus bei der Bindung von  $G\beta\gamma$  hat, und die alleinige Mutation von Tryptophan 29 reduzierte die  $G\beta\gamma$ -Bindung drastisch (Xu, Wu et al. 1995; Gaudet, Bohm et al. 1996). Es ist daher durchaus möglich, dass SUMO an Lysin 33 einen ähnlichen Effekt auf Tryptophan 29 und andere  $G\beta\gamma$ -Bindungsstellen ausübt, wobei dies einerseits durch eine räumliche Blockade erfolgen könnte, welche die Bindung von  $G\beta\gamma$  nicht mehr zulässt, oder andererseits könnte SUMO den flexiblen Teil Phosducins so verformen, dass die  $G\beta\gamma$ -Bindung unmöglich wird (Abb. 25 A).

Die enge räumliche Beziehung in der aminoterminalen Domäne zwischen der SUMOylierungsstelle, Lysin 33, und der Phosphorylierungsstelle, Serin 73, von Phosducin (Abb. 25 B) lässt weitere Überlegungen über eine gegenseitige Beeinflussung zu. Serin 73 findet sich am Beginn von Helix 2 (H2), wobei der Aminosäurerest einwärtsgewandt in Richtung Helix 1 (H1) weist. Damit stehen sich die Reste der beiden Modifikationsstellen gegenüber. Dies wirft die Frage auf, ob die

Phosphorylierung Phosducins neben der Modulation der G $\beta$  $\gamma$ -Bindung auch regulative Eigenschaften auf die SUMOylierung hat, indem es Lysin 33 für die SUMOylierungsmaschinerie unerreichbar macht. Andererseits könnte ebenfalls die zuverige SUMOylierung Phosducins die anschließende Phosphorylierung an Serin 73 blockieren (Abb. 25 B).

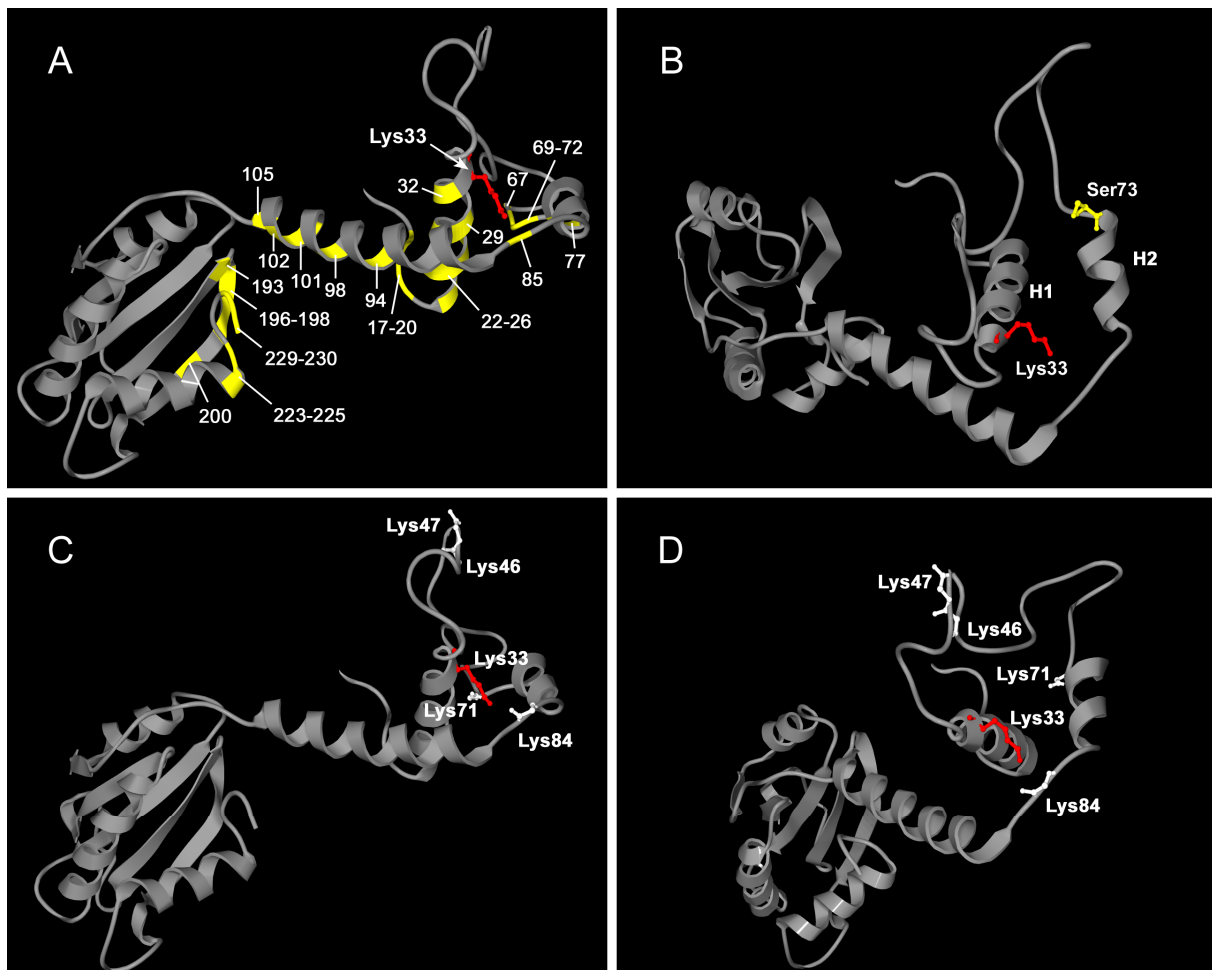


Abbildung 25 | **Darstellung der Modifikationsstellen in Phosducin.** **A** | Darstellung der SUMOylierungsstelle (rot) und der G $\beta$  $\gamma$ -Bindestellen (gelb) von Phosducin (nach Gaudet, Bohm et al. 1996). Die Nummern geben die Position der jeweiligen Aminosäure in der Sequenz wider. **B** | Darstellung der SUMOylierungsstelle (rot) und der Phosphorylierungsstelle an Serin 73 (gelb) von Phosducin. **C,D** | Die SUMOylierungsstelle an Lysin 33 ist rot dargestellt. Die weißen Gruppen (Lys46, Lys47, Lys71, Lys84) sind benachbarte Lysin-Gruppen, die als mögliche Akzeptorstellen für die Bindung von Ubiquitinketten in Frage kommen könnten. Aufgrund der großen Nähe zu Lysin 33 könnten Lys71 und Lys84 dabei eine besondere Rolle zukommen.

Wie diese Arbeit zeigt, scheint SUMO die Ubiquitinierung eines benachbarten Lysinrestes in Phosducin zu blockieren. Somit stellt sich die Frage, welche der übrigen Lysinreste in Phosducin die entsprechenden Akzeptorstellen für Ubiquitin sind. Insgesamt finden sich eine Reihe weiterer Lysinreste im aminoterminalen Bereich

von Phosducin, die hierfür in Frage kommen könnten. In der Strukturdarstellung erkennt man, dass speziell Lysin 84, welches in der Verbindung zwischen Helix 2 und Helix 3 liegt, eine sehr große räumliche Nähe zu Lysin 33 aufweist. Die Modifikation von Lysin 33 durch SUMO würde sehr gut erklären, warum Lysin 84 für eine weitere posttranslationale Modifikation nicht erreichbar wäre. Da es sich bei SUMO allerdings um eine vergleichsweise große Struktur handelt, lässt sich nicht ausschließen, dass auch weitere nicht direkt benachbarte Lysinreste potentielle Ubiquitylierungsstellen sein könnten. Die nahegelegenen Lysinreste 46, 47 und 71 sind daher als mögliche Modifikationsstellen für Ubiquitin ebenfalls zu berücksichtigen. Zudem lässt sich nicht ausschließen, dass es sich nicht nur um eine, sondern gegebenenfalls auch um mehrere Ubiquitylierungsstellen von Phosducin handeln könnte (Abb. 25 C-D).

## **6. Ausblick**

Neben den Auswirkungen auf den Proteinmetabolismus ist eine weitere zentrale Funktion der SUMOylierung bekannt. Demnach kommt die Anheftung von SUMO an ein Protein einem Adressschild gleich und führt zu einer Änderung der subzellulären Lokalisation des Proteins. Insbesondere für den Transport in den Zellkern und für die Formation von nukleären Komplexen (PML-bodies u.a.) wurde diese Funktion verantwortlich gemacht. Dies steht in Einklang mit der Tatsache, dass der Großteil der SUMOylierten Proteine im Zellkern vorkommt. Eine Vielzahl dieser Proteine hat Einfluss auf die Transkription verschiedener Gene.

Auch für Phosducin wurde mehrfach gezeigt, dass neben der zytosolischen Hauptfraktion ein geringer Anteil im Zellkern vorliegt (Zhu und Craft 2000; Margulis, Dang et al. 2002). Der Mechanismus, der zum Übertritt von Phosducin in den Zellkern führt, ist bisher unklar. Ebenfalls ungeklärt bleibt die Funktion nukleären Phosducins. Allerdings belegen einige Studien, dass Phosducin neben der Regulation von G-Proteinen weitere Funktionen innehaben könnte. Es wurde gezeigt, dass Phosducin sowie die C-terminale Splicevariante von Phosducin (PhIOP1) eine Binderegion für CRX besitzen, einen Retina- und Pinealozyten-spezifischen Transkriptionsfaktor (Zhu und Craft 2000). Weiterhin konnte die Interaktion von Phosducin und Phosducin-ähnlichen Proteinen mit SUG1, einer Untereinheit des 26S-Proteasoms und einem potentiellen Transkriptionsfaktor, dargestellt werden (Zhu und Craft 1998).

Basierend auf diesen Erkenntnissen und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich eine Reihe interessanter Fragestellungen. Einerseits sind die Auswirkungen der SUMOylierung Phosducins auf die G-Protein vermittelte Signaltransduktion weiter zu beleuchten. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, ob die hier gezeigte Inhibition der Bindung von  $G\beta\gamma$  an Phosducin durch dessen SUMOylierung physiologische Auswirkungen auf die G-Protein vermittelte Signaltransduktion hat.

Die großen Mengen modifizierten Phosducins in der Retina und die Diskrepanz zu anderen Zellsystemen geben Anlass zu der Vermutung, dass weitere Faktoren die SUMOylierung Phosducins beeinflussen. Ob hierfür ein retinales, Phosducin-spezifisches E3-Enzym verantwortlich ist, bleibt zu klären. Dies würde ebenfalls die Erforschung der funktionellen Eigenschaften SUMOylierten Phosducins erheblich vereinfachen. Auf der anderen Seite steht die Erkenntnis, dass Phosducin ebenfalls teilweise im Zellkern zu finden ist. Hier ist von besonderem Interesse, ob die SUMOylierung diese Translokation ermöglicht und welche Aufgaben nukleäres Phosducin zusätzlich zu den bisher bekannten Funktionen erfüllt.

Die vorliegende Arbeit und die Aufklärung der oben angesprochenen Punkte leistet somit einen Beitrag zum weiteren Verständnis der Funktion Phosducins für zelluläre Funktionen und zeigt neue Regulationsmechanismen der G-Protein vermittelten Signaltransduktion auf.

## V. Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und nachgeschaltete Proteine stellen einen der bedeutendsten Signaltransduktionsmechanismen in multizellulären Organismen dar. Die Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren und Agonisten macht eine effektive Kontrolle des einzelnen Signals unumgänglich. Für die G-Protein vermittelte Signaltransduktion existieren mehrere regulative Mechanismen, die sowohl auf Rezeptor- als auch auf G-Proteinebene wirksam sind. Das zytosolische Protein Phosducin, welches erstmals in der Retina identifiziert wurde, ist ein Vertreter der Gruppe der G-Protein-Regulatoren. Nach Dephosphorylierung bindet Phosducin freie  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivierter G-Proteine und unterdrückt damit sowohl  $G\beta\gamma$ -vermittelte Effekte als auch indirekt  $G\alpha$ -vermittelte Effekte. Dies scheint unter bestimmten Bedingungen insbesondere eine Rolle bei der Hell-Dunkel Adaptation des Auges zu spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der bekannten 33 kDa Form von Phosducin eine weitere 47 kDa große Form in der Retina identifiziert. Hierbei handelte es sich um Phosducin, welches mit dem small ubiquitin-related modifier, SUMO, modifiziert war. Durch gemeinsame Expression von Phosducin, SUMO und dem E2-Enzym UBC9 konnte diese posttranslationale Modifikation Phosducins ebenfalls in HEK-293 Zellen demonstriert werden. Weiterhin wurde sowohl *in vitro* als auch in zellulären Systemen gezeigt, dass Phosducin mit einem Molekül SUMO an Lysin 33 modifiziert wird. Durch punktgerichtete Mutation dieser Modifikationsstelle wurde eine SUMOylierungs-defiziente Phosducin-Mutante generiert. Diese Mutante unterliegt einem gesteigerten Turnover im Vergleich zu Wildtyp-Phosducin, welcher auf die verstärkte Ubiquitinierung und dem damit verbundenen proteasomalen Abbau der Mutante zurückzuführen war. Dies demonstriert, dass SUMOylierung von Phosducin protektive Wirkung auf dieses Protein hat. Darüberhinaus behindert die SUMOylierung von Phosducin dessen Bindung an  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine. Diese Beobachtungen erlauben den Schluss, dass SUMOylierung neben der Phosphorylierung ein neuer und wichtiger Mechanismus ist, über den die Verfügbarkeit von Phosducin als G-Protein-Regulator kontrolliert wird.

## *VI. Literaturverzeichnis*

- Arshavsky, V. Y., C. L. Dumke, et al. (1992). "Noncatalytic cGMP-binding sites of amphibian rod cGMP phosphodiesterase control interaction with its inhibitory gamma-subunits. A putative regulatory mechanism of the rod photoresponse." J Biol Chem **267**(34): 24501-7.
- Bauer, P. H., S. Müller, et al. (1992). "Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator." Nature **358**(6381): 73-6.
- Bauer, P. H. und M. J. Lohse (1998). "Effects of phosducin on the GTPase cycle of Go." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **357**(4): 371-7.
- Bayer, P., A. Arndt, et al. (1998). "Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1." J Mol Biol **280**(2): 275-86.
- Berman, D. M., T. M. Wilkie, et al. (1996). "GAIP and RGS4 are GTPase-activating proteins for the Gi subfamily of G protein alpha subunits." Cell **86**(3): 445-52.
- Berstein, G., J. L. Blank, et al. (1992). "Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator." Cell **70**(3): 411-8.
- Bies, J., J. Markus, et al. (2002). "Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity." J Biol Chem **277**(11): 8999-9009.
- Blaauw, M., J. C. Knol, et al. (2003). "Phosducin-like proteins in Dictyostelium discoideum: implications for the phosducin family of proteins." Embo J **22**(19): 5047-57.
- Blüml, K., W. Schnepf, et al. (1997). "A small region in phosducin inhibits G-protein betagamma-subunit function." Embo J **16**(16): 4908-15.
- Boddy, M. N., K. Howe, et al. (1996). "PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia." Oncogene **13**(5): 971-82.



- Boggio, R., R. Colombo, et al. (2004). "A mechanism for inhibiting the SUMO pathway." Mol Cell **16**(4): 549-61.
- Bohren, K. M., V. Nadkarni, et al. (2004). "A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus." J Biol Chem **279**(26): 27233-8.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Buschmann, T., S. Y. Fuchs, et al. (2000). "SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53." Cell **101**(7): 753-62.
- Chan, R. K. und C. A. Otte (1982). "Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones." Mol Cell Biol **2**(1): 21-9.
- Chau, V., J. W. Tobias, et al. (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." Science **243**(4898): 1576-83.
- Chen, C. und H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." Mol Cell Biol **7**(8): 2745-52.
- Chen, C. K., T. Wieland, et al. (1996). "RGS-r, a retinal specific RGS protein, binds an intermediate conformation of transducin and enhances recycling." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12885-9.
- Ciechanover, A. (1998). "The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life." Embo J **17**(24): 7151-60.
- Clapham, D. E. und E. J. Neer (1997). "G protein beta gamma subunits." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 167-203.

- Craft, C. M., R. N. Lolley, et al. (1991). "Rat pineal gland phosducin: cDNA isolation, nucleotide sequence, and chromosomal assignment in the mouse." Genomics **10**(2): 400-9.
- Craft, C. M., J. Xu, et al. (1998). "PhLPs and PhLOPs in the phosducin family of G beta gamma binding proteins." Biochemistry **37**(45): 15758-72.
- Danner, S. und M. J. Lohse (1996). "Phosducin is a ubiquitous G-protein regulator." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10145-50.
- Desterro, J. M., J. Thomson, et al. (1997). "Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin." FEBS Lett **417**(3): 297-300.
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, et al. (1998). "SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation." Mol Cell **2**(2): 233-9.
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, et al. (1999). "Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1." J Biol Chem **274**(15): 10618-24.
- Flanary, P. L., P. R. DiBello, et al. (2000). "Functional analysis of Plp1 and Plp2, two homologues of phosducin in yeast." J Biol Chem **275**(24): 18462-9.
- Gärtner, U., M. Holzner, et al. (1999). "Elevated expression of p21-ras is an early event in Alzheimer's disease and precedes neurofibrillary degeneration." Neuroscience **91**(1): 1-5.
- Gaudet, R., A. Bohm, et al. (1996). "Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin betagamma and its regulator, phosducin." Cell **87**(3): 577-88.
- Gill, G. (2004). "SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?" Genes Dev **18**(17): 2046-59.
- Gilman, A. G. (1987). "G proteins: transducers of receptor-generated signals." Annu Rev Biochem **56**: 615-49.

- Glickman, M. H. und A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiol Rev **82**(2): 373-428.
- Gong, L., B. Li, et al. (1999). "Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex." FEBS Lett **448**(1): 185-9.
- Gong, L., S. Millas, et al. (2000). "Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease." J Biol Chem **275**(5): 3355-9.
- Haas, A. L. und T. J. Siepmann (1997). "Pathways of ubiquitin conjugation." Faseb J **11**(14): 1257-68.
- Hamm, H. E. (1998). "The Many Faces of G Protein Signaling." J Biol Chem **273**(2): 669-72.
- Harris, K. F., I. Shoji, et al. (1999). "Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13738-43.
- Hawes, B. E., K. Touhara, et al. (1994). "Determination of the G beta gamma-binding domain of phosducin. A regulatable modulator of G beta gamma signaling." J Biol Chem **269**(47): 29825-30.
- Hekman, M., P. H. Bauer, et al. (1994). "Phosducin inhibits receptor phosphorylation by the beta-adrenergic receptor kinase in a PKA-regulated manner." FEBS Lett **343**(2): 120-4.
- Henikoff, S. und J. G. Henikoff (1992). "Amino acid substitution matrices from protein blocks." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10915-10919.
- Hepler, J. R., D. M. Berman, et al. (1997). "RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-Gq alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 428-32.
- Hershko, A. und A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-79.

- Hicke, L. (1997). "Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins." Faseb J **11**(14): 1215-26.
- Hochstrasser, M. (1996). "Ubiquitin-dependent protein degradation." Annu Rev Genet **30**: 405-39.
- Holm, M., C. S. Hardtke, et al. (2001). "Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of Arabidopsis COP1." Embo J **20**(1-2): 118-27.
- Humrich, J., C. Bermel, et al. (2005). "Phosducin-like protein regulates G-protein betagamma folding by interaction with tailless complex polypeptide-1alpha: dephosphorylation or splicing of PhLP turns the switch toward regulation of Gbetagamma folding." J Biol Chem **280**(20): 20042-50.
- Johnson, E. S. und G. Blobel (1997). "Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p." J Biol Chem **272**(43): 26799-802.
- Johnson, E. S., I. Schwienhorst, et al. (1997). "The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer." Embo J **16**(18): 5509-19.
- Johnson, E. S. und A. A. Gupta (2001). "An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins." Cell **106**(6): 735-44.
- Kagey, M. H., T. A. Melhuish, et al. (2003). "The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3." Cell **113**(1): 127-37.
- Kamitani, T., K. Kito, et al. (1998). "Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins." J Biol Chem **273**(18): 11349-53.
- Kasahara, S., P. Wang, et al. (2000). "Identification of bdm-1, a gene involved in G protein beta-subunit function and alpha-subunit accumulation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 412-7.
- Kotaja, N., U. Karvonen, et al. (2002). "PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases." Mol Cell Biol **22**(14): 5222-34.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Lee, B. N. und T. H. Adams (1994). "The *Aspergillus nidulans* fluG gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I." Genes Dev **8**(6): 641-51.
- Lee, G. W., F. Melchior, et al. (1998). "Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires Ubc9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue." J Biol Chem **273**(11): 6503-7.
- Lee, R. H., B. M. Brown, et al. (1984). "Light-induced dephosphorylation of a 33K protein in rod outer segments of rat retina." Biochemistry **23**(9): 1972-7.
- Lee, R. H., B. S. Lieberman, et al. (1987). "A novel complex from bovine visual cells of a 33,000-dalton phosphoprotein with beta- and gamma-transducin: purification and subunit structure." Biochemistry **26**(13): 3983-90.
- Lee, R. H., J. P. Whelan, et al. (1988). "The photoreceptor-specific 33 kDa phosphoprotein of mammalian retina: generation of monospecific antibodies and localization by immunocytochemistry." Exp Eye Res **46**(6): 829-40.
- Lee, R. H., B. S. Lieberman, et al. (1990). "Retinal accumulation of the phosducin/T beta gamma and transducin complexes in developing normal mice and in mice and dogs with inherited retinal degeneration." Exp Eye Res **51**(3): 325-33.
- Lee, R. H., T. D. Ting, et al. (1992). "Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin in bovine rod photoreceptor cells. Interaction of phosducin and transducin." J Biol Chem **267**(35): 25104-12.
- Li, S. J. und M. Hochstrasser (1999). "A new protease required for cell-cycle progression in yeast." Nature **398**(6724): 246-51.
- Loew, A., Y. K. Ho, et al. (1998). "Phosducin induces a structural change in transducin beta gamma." Structure **6**(8): 1007-19.
- Lohse, M. J. (1993). "Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization." Biochim Biophys Acta **1179**(2): 171-88.

- Lohse, M. J., K. Blüml, et al. (1996). "Regulators of G-protein-mediated signalling." Biochem Soc Trans **24**(4): 975-80.
- Lohse, M. J., S. Engelhardt, et al. (2003). "What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?" Circ Res **93**(10): 896-906.
- Lolley, R. N., B. M. Brown, et al. (1977). "Protein phosphorylation in rod outer segments from bovine retina: cyclic nucleotide-activated protein kinase and its endogenous substrate." Biochem Biophys Res Commun **78**(2): 572-8.
- Lolley, R. N., C. M. Craft, et al. (1992). "Photoreceptors of the retina and pinealocytes of the pineal gland share common components of signal transduction." Neurochem Res **17**(1): 81-9.
- Lombardi, M. S., A. Kavelaars, et al. (2002). "Role and modulation of G protein-coupled receptor signaling in inflammatory processes." Crit Rev Immunol **22**(2): 141-63.
- Lukov, G. L., T. Hu, et al. (2005). "Phosducin-like protein acts as a molecular chaperone for G protein betagamma dimer assembly." Embo J **24**(11): 1965-75.
- Margulis, A., L. Dang, et al. (2002). "Presence of phosducin in the nuclei of bovine retinal cells." Mol Vis **8**: 477-82.
- Matunis, M. J., E. Coutavas, et al. (1996). "A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex." J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1457-70.
- Matunis, M. J., J. Wu, et al. (1998). "SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex." J Cell Biol **140**(3): 499-509.
- Melchior, F. (2000). "SUMO--nonclassical ubiquitin." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 591-626.

- Miles, M. F., S. Barhite, et al. (1993). "Phosducin-like protein: an ethanol-responsive potential modulator of guanine nucleotide-binding protein function." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10831-5.
- Müller, S., A. Straub, et al. (1996). "Interactions of phosducin with defined G protein beta gamma-subunits." J Biol Chem **271**(20): 11781-6.
- Müller, S., C. Hoege, et al. (2001). "SUMO, ubiquitin's mysterious cousin." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 202-10.
- Nishida, T., H. Tanaka, et al. (2000). "A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase." Eur J Biochem **267**(21): 6423-7.
- Okuma, T., R. Honda, et al. (1999). "In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2." Biochem Biophys Res Commun **254**(3): 693-8.
- Okura, T., L. Gong, et al. (1996). "Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin." J Immunol **157**(10): 4277-81.
- Pichler, A., A. Gast, et al. (2002). "The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity." Cell **108**(1): 109-20.
- Pickart, C. M. (1997). "Targeting of substrates to the 26S proteasome." Faseb J **11**(13): 1055-66.
- Pippig, S., S. Andexinger, et al. (1993). "Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors." J Biol Chem **268**(5): 3201-8.
- Rechsteiner, M. und S. W. Rogers (1996). "PEST sequences and regulation by proteolysis." Trends Biochem Sci **21**(7): 267-71.
- Reig, J. A., L. Yu, et al. (1990). "Pineal transduction. Adrenergic -> cyclic AMP-dependent phosphorylation of cytoplasmic 33-kDa protein (MEKA) which binds beta gamma-complex of transducin." J Biol Chem **265**(10): 5816-24.

- Rodriguez, M. S., J. M. Desterro, et al. (1999). "SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53." Embo J **18**(22): 6455-61.
- Sachdev, S., L. Bruhn, et al. (2001). "PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies." Genes Dev **15**(23): 3088-103.
- Saitoh, H., D. B. Sparrow, et al. (1998). "Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2." Curr Biol **8**(2): 121-4.
- Saitoh, H. und J. Hinchev (2000). "Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3." J Biol Chem **275**(9): 6252-8.
- Sampson, D. A., M. Wang, et al. (2001). "The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification." J Biol Chem **276**(24): 21664-9.
- Schröder, S. und M. J. Lohse (1996). "Inhibition of G-protein betagamma-subunit functions by phosducin-like protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 2100-4.
- Schröder, S., K. Blüml, et al. (1997). "Identification of a C-terminal binding site for G-protein betagamma-subunits in phosducin-like protein." FEBS Lett **401**(2-3): 243-6.
- Schröder, S. und M. J. Lohse (2000). "Quantification of the tissue levels and function of the G-protein regulator phosducin-like protein (PhIP)." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 435-9.
- Seufert, W., B. Futcher, et al. (1995). "Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins." Nature **373**(6509): 78-81.
- Sobko, A., H. Ma, et al. (2002). "Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis." Dev Cell **2**(6): 745-56.
- Sternweis, P. C. und J. D. Robishaw (1984). "Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain." J Biol Chem **259**(22): 13806-13.



- Strader, C. D., T. M. Fong, et al. (1995). "The family of G-protein-coupled receptors." Faseb J **9**(9): 745-54.
- Stryer, L. (1991). "Visual excitation and recovery." J Biol Chem **266**(17): 10711-4.
- Takahashi, Y., T. Kahyo, et al. (2001). "Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates." J Biol Chem **276**(52): 48973-7.
- Tanaka, K., J. Nishide, et al. (1999). "Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation." Mol Cell Biol **19**(12): 8660-72.
- Tatham, M. H., E. Jaffray, et al. (2001). "Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9." J Biol Chem **276**(38): 35368-74.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res. **22**: 4673-80.
- Thulin, C. D., J. R. Savage, et al. (2001). "Modulation of the G protein regulator phosphodiesterase by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation and 14-3-3 protein binding." J Biol Chem **276**(26): 23805-15.
- Ungureanu, D., S. Vanhatupa, et al. (2003). "PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1." Blood **102**(9): 3311-3.
- Watson, N., M. E. Linder, et al. (1996). "RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha-subunits." Nature **383**(6596): 172-5.
- Weger, S., E. Hammer, et al. (2005). "Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo." FEBS Lett **579**(22): 5007-12.
- Wess, J. (1997). "G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition." Faseb J **11**(5): 346-54.

Wilkins, J. F., M. W. Bitensky, et al. (1996). "Regulation of the kinetics of phosducin phosphorylation in retinal rods." J Biol Chem **271**(32): 19232-7.

Willardson, B. M., J. F. Wilkins, et al. (1996). "Regulation of phosducin phosphorylation in retinal rods by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent adenylyl cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(4): 1475-9.

Wilson, V. G. und D. Rangasamy (2001). "Viral interaction with the host cell sumoylation system." Virus Res **81**(1-2): 17-27.

Xu, J., D. Wu, et al. (1995). "The N terminus of phosducin is involved in binding of beta gamma subunits of G protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 2086-90.

Yeh, E. T., L. Gong, et al. (2000). "Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles." Gene **248**(1-2): 1-14.

Yoshida, T., B. M. Willardson, et al. (1994). "The phosphorylation state of phosducin determines its ability to block transducin subunit interactions and inhibit transducin binding to activated rhodopsin." J Biol Chem **269**(39): 24050-7.

Zhu, X. und C. M. Craft (1998). "Interaction of phosducin and phosducin isoforms with a 26S proteasomal subunit, SUG1." Mol Vis **4**: 13.

Zhu, X. und C. M. Craft (2000). "Modulation of CRX transactivation activity by phosducin isoforms." Mol Cell Biol **20**(14): 5216-26.

## VII. Abkürzungsverzeichnis

As	Aminosäure
AR	Affinitätsreinigung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHX	Cyclohexamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Essigsäuredinatriumtetraacetat
G $\alpha$	$\alpha$ -Untereinheit eines G-Proteins
G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -untereinheit eines G-Proteins
G $_t$	Transducin
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Broth Medium zur Kultivierung von <i>E. coli</i>
mRNA	Botenribonukleinsäure
MWCO	molecular weight cut off
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Phd	Phosducin
PhIP	Phosducin like protein
PhIOP	Phosducin like orphan protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
NEM	N-Ethylmaleylimid
OD $_{xxx}$	optische Dichte bei xxx nm Wellenlänge
p.A.	zur Analyse
UpM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SUMO	Small Ubiquitin related Modifier
Taq-Polymerase	hitzebeständige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

# VIII. Anhang

		~~~~~=====H1=	
		++++ ++ ++ ++	
HsPhd	.....MEEAKSQSLEEDFE	COATHTGPKGVINDWR	30
BvPhd	.....MEKAKSQSLEEDFE	COASHTGPKGVINDWR	30
RnPhd	.....MEEAASQSLEEDFE	COATHTGPKGVINDWR	30
HsPhLOP1	.....		0
HsPhLOP2	.....MSDKPGRRQTSIQN	QCP.HDGPR.RINDWR	28
HsPhLP (L)	..MTLDDKLLGKLLQYYYSSSEDE.DSDHEDKDRGRCAPASSVPAEAEELAGE	CSVNTGPKGVINDWR	67
DdPhLP1	....MEQNILNSILDKFGDQERSDIRHND....SGDENDNHSDHGNGNNE	CCEGNEDGDKKEYEV	60
	====	~~~~~=====H2=====	
	+▽▽	+ + + + +	
HsPhd	KFK.LESQDSDSIPPSKKE	ILROMS.....SPOS	RNGKDSKERVSRKMSIQEYELIHKEK. 84
BvPhd	KFK.LESEDSDSVAHSHKKE	ILROMS.....SPOS	RDDKDSKERVSRKMSIQEYELIHKDK. 84
RnPhd	KFK.LESEDSDSIPPSKKE	ILROMS.....SPOS	RDDKDSKERMSTRKMSIQEYELIHQDK. 84
HsPhLOP1	.....MS	.....SPOS	RNGKDSKERVSRKMSIQEYELIHKEK. 32
HsPhLOP2	KFK.LESQDSDSIPPSKKE	ILROMS.....SPOS	RNGKDSKEDFESR...QGFSP
HsPhLP (L)	REKOLETEQREEQCREMERLIKLSMTC....RSHLDEEEEEQKQKDLQEKIS	CKMTLKEFAIMNEDO.	131
DdPhLP1	DVEDMTDEQYAQFIQEQQEPKIKSGGNTGVKGVLSDYAEHREKQKQKYLQKKYETQKMLEKMCFTTRDQP		130
	~~~~~	====H3=====	~~~~~ S1>~~~~~H4=====
HsPhd	..EDENCL.....RKYRRCQMODM.HOKLSFG	..PRYGFV...YELETGKQFLETIEKEK	LKIT 134
BvPhd	..EDENCL.....RKYRRCQMODM.HOKLSFG	..PRYGFV...YELESGEQFLETIEKEK	OKIT 134
RnPhd	..EDEVCL.....RKYRRCQMODM.HOKLSFG	..PRYGFV...YELESGEQFLETIEKEK	OKVT 134
HsPhLOP1	..EDENCL.....RKYRRCQMODM.HOKLSFG	..PRYGFV...YELETGKQFLETIEKEK	LKIT 82
HsPhLOP2	..QAQ.....	..RSKLL...YQIOS.....LKWK	95
HsPhLP (L)	..DDEEFT.....QQYRQRMEEM..ROQLHKG	..PQFKQV...FEISSGEGFTDMIDKEK	OKSI 181
DdPhLP1	PPTEEDENQDSDDDDLRIRKARMEQWKSQOITSDVKKPEKK.VFGYFKOIDS	SS.QYTHEIDMPPNV	197
	--S2-->~~~~~=====H5=====	~~~~~S3->=H6=~~~~~	~~~~~S4->~~~~~S5->~~~~~
		+ + + + +	
HsPhd	TIIVVHLYEDGKIGCDALNSSLICLAAEYPIVKFKIKASNTGAGDRFSLDVLPTLLIYKGGELISNFISV		204
BvPhd	TIIVVHIYEDGKIGCDALNSSLICLAAEYPMVKFKIKASNTGAGDRFSSDVLPTLLVYKGGELISNFISV		204
RnPhd	TIIVVNIYEDGVRGCDALNSSLECLAAEYPMVKFKIRASNTGAGDRFSSDVLPTLLVYKGGELISNFISV		204
HsPhLOP1	TIIVVHIYEDGKIGCDALNSSLICLAAEYPIVKFKIKASNTGAGDRFSLDVLPTLLIYKGGELISNFISV		152
HsPhLOP2	KPKAKVVRKTLK.....		107
HsPhLP (L)	VIMVHIYEDGIPCTEAMNGCMICLAAEYPAVKFKVKS SVIGASSQFTRNALPALLIYKGGELICNFVRV		251
DdPhLP1	FVIIHLFQNYTPECVLLNQQLGQAVKRYIKFTLKILS..KEAKENYHDEALPSSLVYVIGGKLVSVFVPL		265
	~~~~~=====H7=====		
	+++ ++		
HsPhd	AEQFAEEFFAGDVESFLNEYGLLPEREVHVL.....EHTKIE.EEDVE..		246
BvPhd	TEQLAEEFFFTGDVESFLNEYGLLPEKEMHVL.....EQTNME..EDME..		245
RnPhd	AEQFAEEFFAADVESFLNEYGLLPEREIHDL.....GQTNTE..DEDIE..		246
HsPhLOP1	AEQFAEEFFAGDVESFLNEYGLLPEREVHVL.....EHTKIE.EEDVE..		194
HsPhLOP2	.....DRPHIO..DPK..E		117
HsPhLP (L)	TDQLGDDFFFAVDLEAFLOEFGLLPEKEVVLV.....TSV.RNSATCHSE.DSDLEID		301
DdPhLP1	TEELGRNEEQEDLELLLSYDITE.NPMKAKNSNWETSLSRKR.....ESDDNDND		316

Anhang 1 | Sequenzvergleich mehrerer Phd-homologer Proteine. Die Proteinsequenzen von Phosducin und homologen Proteinen verschiedener Organismen wurden durch BLAST-Suche aus Datenbanken erhalten und mit dem Programm CLUSTAL W zugeordnet. Sequenzkonservierung wurde mit einer BLOSUM62-Matrix (Henikoff und Henikoff 1992) ermittelt. Schwarze Reste geben 80-100% Konservierung aller Sequenzen an, graue Reste sind zu 60-70% in allen Sequenzen konserviert. Die Strukturelemente von humanem Phosducin sind wie folgend angegeben: ~~~, flexibler Loop; ===:  $\alpha$ -Helix (H1-7);  $\rightarrow$ ,  $\beta$ -Strang (S1-5). Die  $G\beta\gamma$ -interagierenden Bereiche sind durch + oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Die SUMOylierungsstelle von Phosducin wird durch ein ausgefülltes Dreieck markiert. Die minimale SUMO-Konsensussequenz ist durch eine geschwungene Klammer markiert, Glu71 (leeres Dreieck) kennzeichnet den Einschub in HsPhIP, welcher dieses Motiv zerstört. Der unterstrichene Bereich in PhIP<sub>L</sub> entspricht der Sequenz der kurzen Splicevariante PhIP<sub>S</sub>. (Hs=Homo sapiens; Bv=Bos taurus; Rn=Rattus norvegicus; Dd=Dictyostelium discoideum)

**Phosducin, bovin**

MEKAKSQSLEEDFEGQASHTGPKGVINDWRKFKLESESDSDVAHSKKEILRQMSSPQSRD 60  
 DKDSKERFSRKMSVQEYELIHKDKEDENCLRKYRRQCMQDMHQKLSFGPRYGFVYELESG 120  
 EQFLETIEKEQKITTTIVVHIYEDGIKGCDALNSSLICLAAEYPMVKFCKIKASNTGAGDR 180  
 FSSDVLPTLLVYKGGELLSNFISVTEQLAEFFFTGDVESFLNEYGLLPEKEMHVLEQTNM 240  
 EEDME 245

**Phosducin, human**

MEEAKSQSLEEDFEGQATHGPKGVINDWRKFKLESQSDSIIPPSKKEILRQMSSPQSRN 60  
 GKDSKERVSRKMSIQEYELIHKEKEDENCLRKYRRQCMQDMHQKLSFGPRYGFVYELETG 120  
 KQFLETIEKELKITTTIVVHIYEDGIKGCDALNSSLTCLAAEYPIVKFCKIKASNTGAGDR 180  
 FSLDVLPTLLIYKGGELISNFISVAEQFAEEFFAGDVESFLNEYGLLPEREVHVLEHTKI 240  
 EEEDVE 246

Anhang 2 | **PEST-Sequenzen in humanem und bovinem Phosducin.** Die Sequenzen von bovinem und humanem Phosducin (Swiss-Prot Accession Nr. P19632 und P20941) wurden mit dem PEST-Find Algorithmus auf PEST-Sequenzen untersucht (<http://www.at.embnnet.org/embnnet/tools/bio/PESTfind/> ). Sequenzabschnitte mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit für PEST-Sequenzen sind schwarz hinterlegt. Die grau schattierten Bereiche kennzeichnen Sequenzabschnitte, welche eine geringe Wahrscheinlichkeit für ein PEST-Motiv aufweisen.

# *Danksagung*

Mein Dank gilt zunächst Frau Prof. Dr. Ursula Quitterer, die meine Doktorarbeit initiiert und begleitet hat. Bei ihr war freies, selbstständiges Arbeiten von der ersten Stunde an oberstes Gebot. Dies war zunächst ungewohnt und sicherlich nicht immer der einfachste Weg zum Ziel. Dennoch half es, das selbstständige Forschen zu erlernen.

Ganz besonders möchte ich Frau Dr. Kristina Lorenz danken. Sie übernahm vom ersten Tag an die schwere Aufgabe, mir das nötigste Handwerkszeug auf den Weg zu geben und war fortan jederzeit für Fragen oder sonstige Probleme vor Ort und stets eine gute Ansprechpartnerin. Ebenso danke ich Herrn Dr. Jan Humrich, der sich als mein tägliches Gegenüber im Labor stets hilfsbereit meiner Nöte annahm und ebenfalls mit vielen guten Ideen zur Fortführung meiner Arbeit beitrug.

Frau Michaela Hoffmann danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor und die vielen kleineren und größeren Gefallen, die stets anspruchsvolle und informative akustische Versorgung durch einschlägige Radiosender eingeschlossen.

Herrn Christian Dees danke ich für die Unterstützung bei der Präparation der Rinderaugen und den Proteinreinigungen und für den steten Kaffeenachschub, ohne den das Projekt nie zu seiner vollen Reife gelangt wäre.

Mein Dank geht darüber hinaus an alle übrigen Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie für die gute Arbeitsatmosphäre, große Hilfsbereitschaft, guten Kuchen und viele schöne gemeinsame Stunden – auch außerhalb des Labors.

Herrn Prof. Dr. Martin J. Lohse gebührt besonderer Dank. Er hat meine Arbeit trotz vieler anderer Verpflichtungen von Anfang an begleitet und verhalf gerade zum Ende zu einem gelungenen Abschluss. Viele Gespräche mit ihm – nicht nur über diese Arbeit – sorgten gerade in schwierigeren Phasen wieder für neuen Schwung.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Sie haben es mir durch ihre ständige Unterstützung ermöglicht, ein Studium meiner Wahl zu beginnen, erfolgreich durchzuführen und mit dieser Arbeit zu beenden.

# *Lebenslauf*

Johann Christoph Klenk

geboren: 11. März 1978 in Gießen  
Staatsbürgerschaft: deutsch  
Adresse: Steinheilstrasse 56, 97080 Würzburg  
Familienstand: ledig

## **Ausbildung**

1984-1990 Grundschule, Gießen  
1990-1997 Gymnasium , Gießen  
Juni 1997 Abitur, Gießen  
1997-1998 Wehrdienst  
1998-2004 Studium der Humanmedizin  
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
1. Oktober 2004 Approbation zum Arzt  
seit Oktober 2004 Stipendiat des MD/PhD Programms der Universität Würzburg

## **Klinische Tätigkeit**

*Praktisches Jahr (Mai 2003-April 2004)*

Neurologie Neurologische Klinik, Universität Würzburg  
Innere Medizin St. Boniface Hospital, Winnipeg (Kanada)  
Grady Memorial Hospital, Atlanta (USA)  
Chirurgie F. Tappeiner Krankenhaus, Meran (Italien)

## **Forschungstätigkeit**

Oktober 1999 - März 2000, Institut für Virologie, Universität Marburg  
"Regulation of fusion activity by cytoplasmic domain of paramyxovirus F protein"

seit April 2001, Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg  
Medizinische Doktorarbeit

Würzburg im Februar 2006



---

