



**Die Regulation des Kinasemodulators Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP):
Einfluss von Phosphorylierung und Dimerisierung auf die Interaktion
mit Raf1 und G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinase 2 (GRK2)**

**Regulation of the kinase modulator Raf kinase inhibitor protein (RKIP):
Influence of phosphorylation and dimerization on its interaction
with Raf1 and G protein coupled receptor kinase 2 (GRK2)**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades,
der Graduate School of Life Sciences,
Julius Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Katharina Deiß

aus Hamburg

Würzburg 2012

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Regulation of the kinase modulator Raf kinase inhibitor protein (RKIP): Influence of phosphorylation and dimerization on its interaction with Raf1 and G protein coupled receptor kinase 2 (GRK2)“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Regulation des Kinasemodulators Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP): Einfluss von Phosphorylierung und Dimerisierung auf die Interaktion mit Raf1 und G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinase 2 (GRK2)“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Manfred Gessler
1. Betreuer:	Prof. Dr. Martin J. Lohse
2. Betreuer:	Prof. Dr. Caroline Kisker
3. Betreuer:	Prof. Dr. Susanna Cotecchia
4. Betreuer:	Dr. Kristina Lorenz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	1
1.1.1	Desensibilisierung von GPCR durch GRK-vermittelte Phosphorylierung	4
1.1.2	Die Familie der GRK	5
1.1.3	Regulation der GRK-Aktivität und die Expression von GRK unter pathophysiologischen Bedingungen	6
1.1.4	Weitere Funktionen von GRK	7
1.2	Die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade	8
1.3	Das Raf Kinase Inhibitor Protein	10
1.3.1	RKIP ist ein endogener Inhibitor der Raf/MEK/ERK-Kaskade	10
1.3.2	RKIP hemmt die Aktivierung von NF κ B	12
1.3.3	RKIP ist ein endogener Inhibitor von GRK2	14
1.3.4	Weitere Funktionen von RKIP	15
1.4	RKIP ist ein Mitglied der PEBP-Familie	16
1.5	Strukturelle und biochemische Eigenschaften von RKIP	17
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	19
2	Material	21
2.1	Substanzen	21
2.2	Kits	21
2.3	Molekulare Größenstandards	21
2.4	Proteingel-Auftragspuffer	22
2.5	Isotop markierte Substanzen	22
2.6	Medien und Lösungen für die Kultur eukaryotischer Zellen	22
2.7	Verbrauchsmaterialien	22
2.8	Antikörper	23
2.8.1	Primäre Antikörper	23
2.8.2	Sekundäre Antikörper	23
2.9	Plasmidvektoren	24
2.10	Klonierte RKIP-Mutanten und RKIP-Fragmente	24
2.11	Enzyme	28
2.12	Gereinigte Proteine	29
2.13	Biologisches Material	29
2.13.1	Prokaryotische Zellen	29
2.13.2	Eukaryotische Zellen	29
2.13.3	Mauslinien	29

3 Methoden.....	31
3.1 Molekularbiologische Methoden	31
3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	31
3.1.2 Agarosegelelektrophorese von DNA	33
3.1.3 Darstellung von DNA in Agarosegelen	33
3.1.4 Restriktionsverdau von DNA.....	33
3.1.5 Ligation von DNA	34
3.1.6 Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	35
3.1.6.1 Transformation durch Hitzeschock.....	35
3.1.6.2 Chemische Transformation	35
3.1.7 Überprüfung der transformierten Kulturen	36
3.1.8 Präparative Aufreinigung von DNA	37
3.2 Zellkulturtechniken	37
3.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	37
3.2.2 Herstellung von transformationskompetenten <i>E. coli</i>	37
3.2.3 Eukaryotische Zellkultur von permanenten Zelllinien.....	38
3.2.3.1 Kryokonservierung von Zellen	38
3.2.3.2 Auftauen von Zellen.....	39
3.2.3.3 Kultur von Zellen.....	39
3.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	40
3.2.4 Transfektionsmethoden.....	40
3.2.4.1 Chemische Transfektion	40
3.2.4.2 Lipofektion.....	40
3.3 Proteinbiochemische Methoden	41
3.3.1 Herstellung von Zellysaten	41
3.3.1.1 Zellyse mit detergenzhaltigen Puffern	41
3.3.1.2 Zellyse mittels mechanischer Zerkleinerung	43
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
3.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	44
3.3.4 Färbung von Proteinen im Gel.....	46
3.3.5 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Membranen (<i>Westernblot</i>)	47
3.3.6 Tüpfelblot (<i>Dotblot</i>).....	47
3.3.7 Blocken unspezifischer Membranbindungsstellen.....	48
3.3.8 Immundetektion immobilisierter Proteine	48
3.3.9 Ablösen der gebundenen Antikörper (<i>Strippen</i>)	49
3.3.10 Nachweis von Proteinkomplexen durch <i>Co</i> -Immunpräzipitation.....	50
3.3.11 Nachweis von Proteinkomplexen durch chemisches Vernetzen (<i>Cross-linking</i>)	50
3.3.11.1 Epitop markierte Proteine in transfizierten HEK293-Zellen.....	50

3.3.11.2	Gereinigte Proteine	51
3.3.11.3	Mausherzen	51
3.3.12	Analyse der RKIP-Phosphorylierung in Mausherzen	52
3.4	Reinigung von His ₆ -RKIP	52
3.5	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von gereinigtem RKIP mit PKC δ	54
3.6	Bestimmung der Raf-Aktivität	54
3.7	Methoden zur Bestimmung der GRK2-Aktivität	55
3.7.1	Bestimmung der β_2 AR-Phosphorylierung in Zellen	55
3.7.2	Bestimmung der Rhodopsin-Phosphorylierung mit gereinigten Proteinen.....	55
3.7.3	Messung von cAMP nach Aktivierung des Parathormon-Rezeptors.....	56
3.8	Weitere Methoden.....	57
3.8.1	Nachweis von RNA mittels Reverser Transkriptase (RT) PCR	57
4	Ergebnisse	59
4.1	PKC-vermittelte Phosphorylierung von RKIP an S153 induziert RKIP/RKIP-Dimerisierung.....	59
4.2	Die Mutante RKIP ^{SK153/7EE} imitiert die Eigenschaften von S153-phosphoryliertem RKIP.....	66
4.3	Experimentelle Ansätze zur Generierung einer monomeren RKIP-Mutante.....	70
4.4	Die Deletionsmutante RKIP ^{Δ143-146} dimerisiert und bindet GRK2 phosphorylierungsunabhängig	71
4.5	Die Dimerisierung von RKIP ist essentiell für die RKIP/GRK2-Interaktion	76
4.6	GRK2 bindet an RKIP-Dimere <i>in vitro</i>	81
4.7	Eine verstärkte Dimerisierung von RKIP bewirkt eine verminderte Raf-Hemmung und eine stärkere GRK2-Hemmung.....	82
4.8	Nachweis eines RKIP/RKIP/GRK2-Komplexes in Mausherzen.....	90
5	Diskussion	95
5.1	Wie wird die Interaktion von RKIP mit seinen vielen Interaktionspartnern reguliert?	95
5.2	Die Bedeutung und Regulation von homooligomeren Protein-Protein-Interaktionen	96
5.3	PKC-vermittelte Phosphorylierung von RKIP an S153 induziert RKIP-Dimerisierung	97
5.4	Die Mutante RKIP ^{SK153/7EE} imitiert die Eigenschaften von S153-phosphoryliertem RKIP.....	98
5.5	Das Peptid RKIP ¹²⁷⁻¹⁴⁶ hemmt die Dimerisierung von RKIP	100
5.6	Die Deletionsmutante RKIP ^{Δ143-6} dimerisiert phosphorylierungsunabhängig.....	102
5.7	Die Dimerisierung von RKIP reguliert seine Interaktion mit Raf1 oder GRK2.....	104
5.8	Die funktionelle Bedeutung der RKIP-Dimerisierung.....	106
5.9	Nachweis eines ~122 kDa-Komplexes bestehend aus RKIP und GRK2 in Mausherzen	108
5.9.1	Die Rolle von GRK2 bei Herzinsuffizienz	108
5.9.2	Inhibitoren von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen.....	109
5.10	Ausblick	112

6 Zusammenfassung	115
7 Anhang	119
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	119
7.2 Puffer und Stocklösungen	121
7.2.1 Proteinchemische Arbeiten	121
7.2.2 Molekularbiologische Arbeiten.....	123
7.2.3 Medien und Puffer für Zellkulturtechniken	123
8 Literaturverzeichnis	125
9 Publikationsverzeichnis	141
Curriculum vitae Katharina Deiß	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Danksagung	144

1 Einleitung

Zellen kommunizieren zur Abstimmung der Funktionen von Organen und Organismus über spezielle Zellverbindungen, elektrische Signale oder Botenstoffe miteinander. Solche Botenstoffe binden an Rezeptoren in der Plasmamembran oder im Zellkern und beeinflussen so nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden (Klinke *et al.* 2009). Ein wichtiges Prinzip der Signaltransduktion zur Regulierung physiologischer und auch pathologischer Antworten auf extrazelluläre und intrazelluläre Stimuli ist die reversible Phosphorylierung von Proteinen durch Proteinkinasen (Graves & Krebs 1999; Manning *et al.* 2002; Tarrant & Cole 2009; Tan 2011). Deren präzise Regulation durch regulatorische Proteine ist essentiell für die Homöostase des Organismus. Ein wichtiges Regulatorprotein einer Reihe von Proteinkinasen ist das in dieser Arbeit näher untersuchte Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP). Dieses ist unter anderem an der Regulation der Signaltransduktionskaskaden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) beteiligt (Zeng *et al.* 2008), die im Folgenden hier kurz vorgestellt werden. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der Signaltransduktion von GPCR und ihrer Regulation durch die Interaktion von RKIP mit der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase (GRK) 2.

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Die Familie der GPCR ist mit über 800 Mitgliedern die größte Familie der Membranrezeptoren. Sie kontrollieren essentielle physiologische Prozesse wie zum Beispiel Neurotransmission, Hormonausschüttung, Entzündungsprozesse und Blutdruckregulation. Mehr als die Hälfte aller Arzneistoffe in klinischer Anwendung vermitteln ihre Wirkung über GPCR (Lymperopoulos & Bathgate 2012). Diese Rezeptoren besitzen einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus, welche durch sieben transmembranäre α -Helices mit drei alternierenden intra- und extrazellulären Schleifenregionen verbunden sind. Die sieben charakteristischen α -Helices bilden die Ligandenbindungstasche und gaben den Rezeptoren den Beinamen *heptahelikale* GPCR. Die Bezeichnung *G-Protein-gekoppelter* Rezeptor verweist auf den ersten Schritt der nachfolgenden Signaltransduktion, der allen GPCR gemeinsam ist: Diese Rezeptoren setzen nach Aktivierung durch extrazelluläre Stimuli wie zum Beispiel Hormone, Neurotransmitter oder Ionen intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, indem sie zunächst heterotrimere GDP/GTP-bindende Proteine (G-Proteine) aktivieren (Oldham & Hamm 2008). Diese Proteine bestehen aus einer GDP/GTP-bindenden α -Untereinheit sowie jeweils einer β - und einer γ -Untereinheit (**Abb. 1**). Ein aktivierter

GPCR induziert als Liganden-aktivierter Nukleotid-Austauschfaktor den GDP-GTP-Austausch und damit die Aktivierung der α -Untereinheit. Die GTP-gebundene α -Untereinheit und das $\beta\gamma$ -Dimer dissoziieren und interagieren daraufhin jeweils mit spezifischen Effektorproteinen, welche sekundäre Botenstoffe wie zum Beispiel cAMP, Inositoltriphosphat, Diacylglycerol oder Calcium generieren oder freisetzen. Diese Botenstoffe wiederum aktivieren weitere Effektorproteine – zumeist Serin-/Threoninkinasen oder Phosphatasen – welche eine Vielfalt von weiteren Enzymen und damit zellulären Funktionen beeinflussen. Durch Hydrolyse des gebundenen GTP wird die α -Untereinheit inaktiviert und assoziiert wieder mit dem $\beta\gamma$ -Komplex, womit der Aktivierungszyklus endet (s. **Abb. 1**) (Pierce *et al.* 2002; Hill 2006; Oldham & Hamm 2008; Rosenbaum *et al.* 2009). GPCR-vermittelte Signalwege bewirken somit nicht nur die Weiterleitung eines extrazellulären Signals ins Zellinnere, sondern bewirken auch eine Amplifizierung des Signals, da jeder Rezeptor während eines Aktivierungszyklus mehrere G-Proteine aktivieren kann. Eine weitere massive Signalamplifikation erfolgt dadurch, dass jedes durch ein G-Protein aktiviertes Effektorprotein tausende Moleküle eines sekundären Botenstoffes generieren kann (Aktories *et al.* 2009).

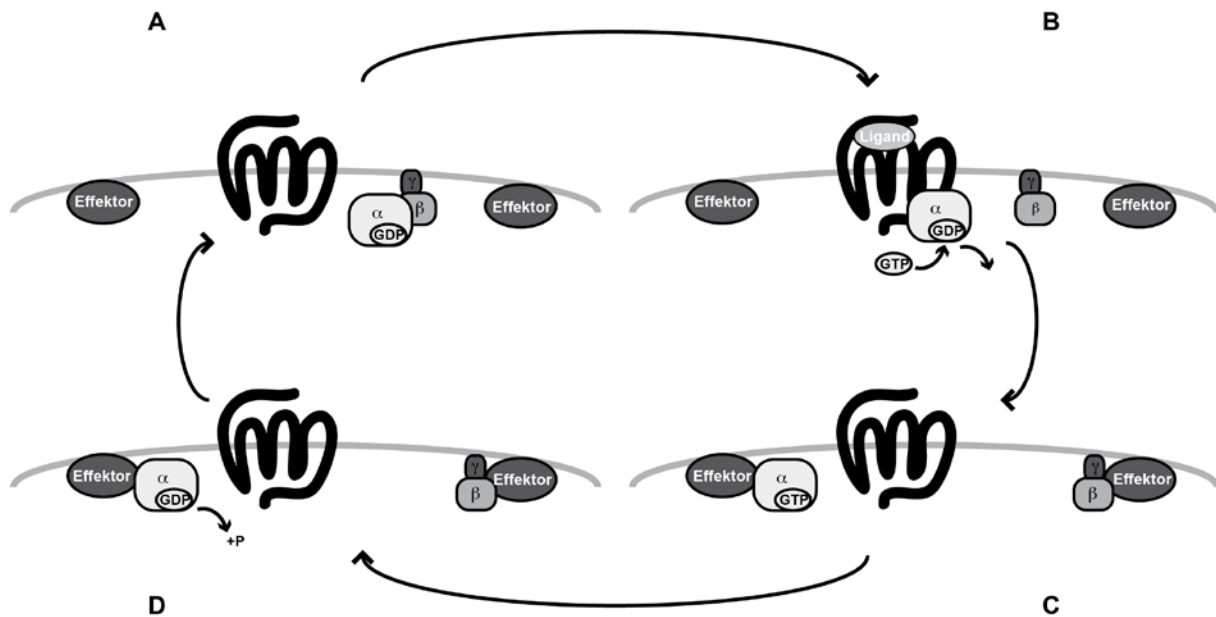


Abb. 1: Die G-Protein-Aktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

A, GPCR koppeln an der Innenseite der Membran an heterotrimeren ($\alpha\beta\gamma$) G-Proteine. Deren α -Untereinheit ist im inaktiven Zustand an GDP gebunden. Der $\beta\gamma$ -Komplex ist durch Lipidreste in der Membran verankert. **B**, Nach Liganden-vermittelter Rezeptoraktivierung erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors (nicht gezeigt), die den Austausch von GDP durch GTP der α -Untereinheit des G-Proteins katalysiert. Der $\beta\gamma$ -Komplex und die α -Untereinheit dissoziieren. **C**, Die α -Untereinheit und der $\beta\gamma$ -Komplex aktivieren membranständige oder zytosolische Effektorproteine. **D**, Die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit hydrolysiert GTP zu GDP, das G-Protein reassoziert und die Signaltransduktion wird beendet.

Auf Grund ihrer Interaktion mit spezifischen Effektorproteinen werden vier Subfamilien von G-Protein α -Untereinheiten unterschieden: $G\alpha_s$ -Proteine stimulieren die Adenylylcyclase, $G\alpha_q$ -Proteine aktivieren Phospholipase C, $G\alpha_i$ -Proteine hemmen die Adenylylcyclase und aktivieren GIRK (G-Protein-gekoppelte einwärtsgerichtete Kalium)-Kanäle und $G\alpha_{12}$ -Proteine aktivieren Rho-GEF (Guanin-Nukleotid Austauschfaktoren). Die β - und die γ -Untereinheiten bilden stabile Komplexe und interagieren ebenfalls mit verschiedenen Effektoren wie z.B. GIRK-Kanälen, Adenylylcyclasen, Phospholipasen und Phosphoinositid-3-Kinasen. Des Weiteren führt die Interaktion des aktivierten $\beta\gamma$ -Komplex mit G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) zu deren Membrantranslokation und Aktivierung. Die Phosphorylierung des GPCR durch GRK leitet die Beendigung der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion ein (Pierce *et al.* 2002; Hill 2006; Oldham & Hamm 2008; Rosenbaum *et al.* 2009).

1.1.1 Desensibilisierung von GPCR durch GRK-vermittelte Phosphorylierung

G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen erkennen aktivierte, Liganden-gebundene GPCR und phosphorylieren Serin- und Threoninreste am zytoplasmatischen C-Terminus oder in der dritten intrazellulären Schleife der aktivierten Rezeptoren (Palczewski & Benovic 1991). Diese Phosphorylierungen vermindern die Affinität des Rezeptors zum G-Protein und erhöhen die Affinität des Rezeptors zum Adaptorprotein β -Arrestin, welches sterisch die Interaktion des Rezeptors mit dem G-Protein und dessen Aktivierung verhindert; der Rezeptor ist desensibilisiert (Lohse *et al.* 1990; Wilden 1995; Krupnick *et al.* 1997). β -Arrestin-gebundene Rezeptoren werden in der Folge internalisiert. Eine unmittelbar darauffolgende Rezeptorstimulation führt auf Grund der desensibilisierten und internalisierten Rezeptoren zu einer verminderten Rezeptorantwort. Diese GRK-induzierte sogenannte *homologe Desensibilisierung* ist der wichtigste Mechanismus zur schnellen Beendigung von GPCR-Signalen. Dieses Phänomen ist liganden- und rezeptorspezifisch und wird unterschieden von der *heterologen Desensibilisierung*, welche definiert wird als eine verminderte Rezeptorantwort eines Rezeptors nach Bindung eines Agonisten an einen anderen Rezeptor (Pierce *et al.* 2002). Diese nicht-Agonisten-abhängige Desensibilisierung erfolgt durch die Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC), welche durch sekundäre Botenstoffe aktiviert werden. Diese Kinasen phosphorylieren anders als GRK sowohl Liganden-gebundene als auch inaktive Rezeptoren, so dass ein Rezeptor als Folge der Aktivierung eines anderen Rezeptors phosphoryliert werden kann. Diese Art der Desensibilisierung erfolgt auch bei niedrigeren Agonistkonzentrationen und ist langsamer als die homologe Desensibilisierung (Thompson *et al.* 2008).

Internalisierte Rezeptoren erfahren entweder eine Dephosphorylierung (Resensitivierung) und Reinsertion des Rezeptors in die Plasmamembran (*recycling*) oder werden proteolytisch in Lysosomen abgebaut, so dass die Menge an funktionellen Rezeptoren in der Plasmamembran abnimmt (*downregulation*) (**Abb. 2**). Ferner wird die Rezeptorexpression durch Regulation der Rezeptorgentranskription und -translation beeinflusst. Diese Mechanismen benötigen im Gegensatz zu den oben beschriebenen, akuten Regulationsmechanismen der Desensibilisierung, welche innerhalb von Sekunden und Minuten ablaufen, einen Zeitraum von Stunden (Claing *et al.* 2002; Pierce *et al.* 2002).

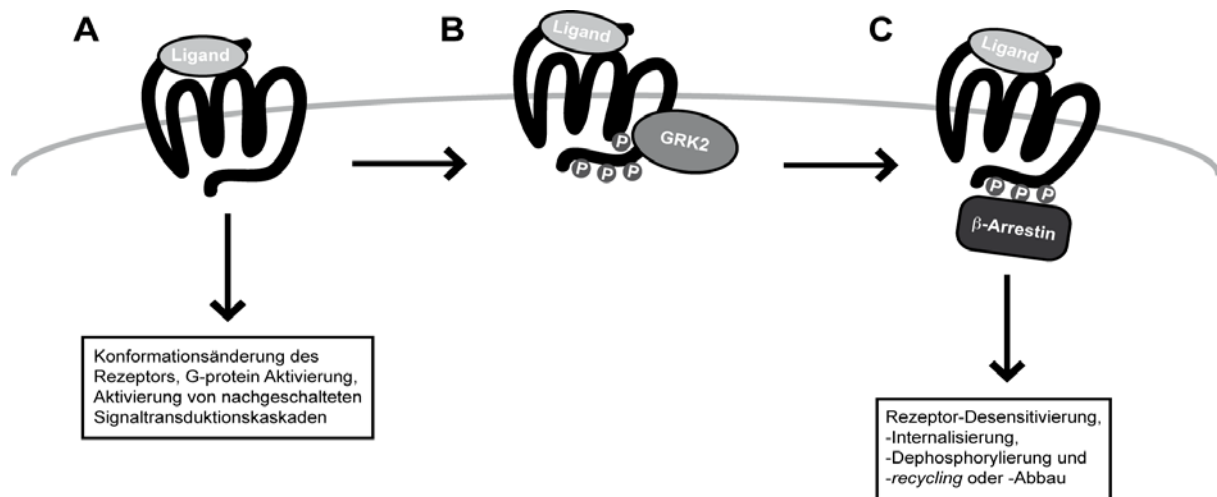


Abb. 2: Modell der GPCR-Regulation durch GRK und β -Arrestin.

A, Der Rezeptor wird durch einen Liganden aktiviert und initiiert über die zwischengeschalteten heterotrimeren G-Proteine die Signaltransduktion (s. **Abb. 1**). B, GRK2 wird durch Liganden-gebundene Rezeptoren aktiviert und phosphoryliert Serin- und Threoninreste am zytoplasmatischen C-Terminus und in der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors. C, Die Phosphorylierung senkt die Affinität des Rezeptors für G-Proteine und erhöht die Affinität zu dem Adaptorprotein β -Arrestin. Durch Bindung von β -Arrestin wird die Interaktion mit den G-Proteinen sterisch gehindert (Desensibilisierung) und der Rezeptor internalisiert. Anschließend wird der Rezeptor dephosphoryliert und wieder zurück an die Membran gebracht (*recycling*) oder proteolytisch degradiert (*downregulation*).

1.1.2 Die Familie der GRK

GRK sind Serin-/Threoninkinasen und gehören zur Familie der AGC-Kinasen (Familie der Proteinkinasen A, G und C), deren Aktivierung normalerweise durch Phosphorylierung erfolgt; GRK hingegen werden, wie bereits erläutert, durch die Bindung an aktivierte Rezeptoren in ihrer katalytisch aktiven Konformation stabilisiert (Palczewski *et al.* 1991) und werden so als atypische Mitglieder dieser Familie bezeichnet.

Basierend auf Unterschieden im Aufbau ihrer C-Termini und dem Mechanismus ihrer Membrantranslokation werden GRK in drei Subfamilien unterteilt (Gurevich *et al.* 2012): (i) Die Rhodopsinkinasen GRK1 und GRK7 werden fast ausschließlich in Stäbchen und Zapfen des Auges exprimiert. Sie werden am C-Terminus prenyliert und so in der Membran verankert. Durch Diffusion in der Membran translozieren sie zu aktivierten GPCR. (ii) Die β -adrenergen Rezeptorkinasen GRK2 und GRK3 werden ubiquitär exprimiert, wobei GRK2 neben GRK3 und GRK5 die im Herzen häufigste Isoform ist (Rockman *et al.* 2002; Rengo *et al.* 2012). Diese Subfamilie verfügt als einzige über einen C-Terminus mit einer PH (*pleckstrin homology*)-Domäne, die mit PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) und

freien G $\beta\gamma$ -Untereinheiten in der Membran interagiert und so die Agonist-abhängige Membrantranslokation von GRK2 und GRK3 zu aktivierten GPCR reguliert (Evron *et al.* 2012). (iii) Die GRK4 Subfamilie besteht aus der im Hoden exprimierten GRK4 und aus den ubiquitär exprimierten Isoformen GRK5 und GRK6. GRK4 und GRK6 werden palmitoyliert, während GRK5 über eine C-terminale Anhäufung positiv geladener Aminosäuren mit Lipiden der Membran interagiert (Gurevich *et al.* 2012).

Hinsichtlich der Substratspezifität sind GRK2 und GRK5 die variabelsten GRK. Sie phosphorylieren fast alle der bisher untersuchten GPCR, darunter die physiologisch besonders wichtigen β -adrenergen Rezeptoren, α_2 -adrenergen Rezeptoren, Angiotensin II Typ1-Rezeptoren, Dopamin-Rezeptoren und viele andere (Pitcher *et al.* 1998a; Reiter & Lefkowitz 2006). Da Säugetiere nur über fünf nicht-visuelle GRK aber über mehr als 800 GPCR verfügen, müsste eine GRK-Isoform mehrere hundert verschiedene GPCR regulieren. Es ist nicht genau bekannt, wie die Spezifität von GRK für bestimmte GPCR vermittelt wird, aber es wird vermutet, dass biologisch relevante Rezeptorspezifität durch *Co*-Expression und *Co*-Lokalisation von GRK und ihren GPCR und zusätzliche regulatorische Mechanismen erreicht wird (Gurevich *et al.* 2012).

1.1.3 Regulation der GRK-Aktivität und die Expression von GRK unter pathophysiologischen Bedingungen

Wie bei den meisten Enzymen ist die Aktivität und Expression von GRK stark reguliert. Die Aktivität wird zusätzlich zu den bereits beschriebenen Mechanismen (der Aktivierung durch Interaktion mit Phospholipiden und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten (1.1.2)) auch durch Phosphorylierung reguliert: Autophosphorylierung von GRK1 wie auch PKA-vermittelte Phosphorylierung von GRK1 und GRK7, ERK-vermittelte Phosphorylierung von GRK2 und PKC-vermittelte Phosphorylierung von GRK5 vermindert ihre Aktivität. Autophosphorylierung von GRK5, PKA-, PKC- und Src-vermittelte Phosphorylierung von GRK2 hingegen steigert ihre Aktivität (Gurevich *et al.* 2012).

Der genaue Mechanismus der Regulation der Expression von GRK ist nicht geklärt und Gegenstand intensiver Forschung, da bei einer Vielzahl von Erkrankungen die Expression von GRK – meist GRK2 – verändert ist (Gurevich *et al.* 2012). Am besten untersucht ist die Expression von GRK2. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz, Hypertrophie, Myokardinfarkt und Hypertonie wurde eine signifikante Erhöhung der GRK2 auf mRNA- und Proteinebene

gezeigt (Ungerer *et al.* 1993, 1994, 1996; Choi *et al.* 1997; Gros *et al.* 1997). Ebenfalls erhöht ist die Expression bei Alzheimer-Patienten und bei depressiven Patienten. Außerdem scheint GRK2 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Insulinresistenz zu spielen. Bei Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis sowie bei Patienten mit chronischen Schmerzen wurde eine verringerte GRK2-Expression nachgewiesen (Penela *et al.* 2010; Rengo *et al.* 2011, 2012; Gurevich *et al.* 2012). Hinsichtlich der Regulation der Expression von GRK2 wurde gezeigt, dass die Promotoraktivität von GRK2 durch Stimulation des α_1 -adrenergen Rezeptors und $G\alpha_q$ gesteigert wird (Ramos-Ruiz *et al.* 2000). Der Abbau von GRK2 durch das Proteasom wird durch Src- und ERK-vermittelte Phosphorylierung begünstigt (Penela *et al.* 2001; Elorza *et al.* 2003).

1.1.4 Weitere Funktionen von GRK

GRK können auch eine Vielzahl von nicht-GPCR-Proteinen phosphorylieren. Hierzu zählen Rezeptortyrosin- und Serin-/Threoninkinasen, Transkriptionsfaktoren und Proteine des Zytoskeletts (Gurevich *et al.* 2012). Das zuerst entdeckte nicht-GPCR Substrat war Tubulin, dessen GRK2-vermittelte Phosphorylierung die Mikrotubuluspolymerisierung reguliert (Carman *et al.* 1998; Haga *et al.* 1998; Pitcher *et al.* 1998). Ein weiteres Beispiel ist Phosducin, dessen Interaktion mit $G\beta\gamma$ -Untereinheiten des retinalen G-Proteins Transducin durch GRK2-vermittelte Phosphorylierung von Phosducin gehemmt wird (Ruiz-Gómez *et al.* 2000). Es ist nicht ganz klar, ob hierfür die basale Aktivität der GRK verantwortlich ist, ob durch GPCR aktivierte GRK fähig sind, auch andere Proteine in der Nähe des aktivierten Rezeptors zu phosphorylieren oder ob auch andere Proteine als GPCR GRK aktivieren. Letzteres scheint der Fall zu sein bei der Interaktion von GRK2 und Tubulin (Carman *et al.* 1998; Haga *et al.* 1998; Pitcher *et al.* 1998b).

Des Weiteren regulieren GRK scheinbar durch direkte Interaktion eine Reihe von Proteinen phosphorylierungsunabhängig. Durch die Interaktion mit $G\alpha_q$ können GRK2 und GRK3 GPCR auch phosphorylierungsunabhängig desensitivieren, indem sie die GTPase Aktivität von $G\alpha_q$ stimulieren und die $G\alpha_q$ -vermittelte PLC-Aktivierung hemmen (Carman *et al.* 1999b). Die Interaktion von GRK2 und GRK3 mit $G\beta\gamma$ -Untereinheiten hat nicht nur die Membrantranslokation dieser Kinasen zur Folge sondern hemmt auch die $G\beta\gamma$ -vermittelte Aktivierung von GIRK-Kanälen (Raveh *et al.* 2010). Ferner hemmt GRK2 die Kinase Akt und damit die Phosphorylierung und Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (Liu *et al.*

2005). Die physiologische Bedeutung dieser GRK-Funktionen muss noch in weiteren Studien gezeigt werden (Ferguson 2007; Gurevich *et al.* 2012).

1.2 Die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade

Die Raf/MEK/ERK-Kaskade ist ein evolutionär hochkonservierter Signalweg. Er gehört zu den ersten beschriebenen Signalwegen, die extrazelluläre Stimuli in das Zellinnere leiten und dort Signale generieren, welche die Genexpression regulieren und so essentielle zelluläre Prozesse wie Proliferation, Überleben, Apoptose, Differenzierung, Motilität und Metabolismus kontrollieren (Kolch 2000, 2005; Antico Arciuch *et al.* 2009). Die Raf/MEK/ERK-Kaskade gehört zur Familie der dreistufigen Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), die unter anderem durch Substanzen aktiviert werden, welche die Zellteilung stimulieren (Mitogene). Die Signaltransduktion der MAPK-Kaskaden zeichnet sich durch die sequentielle Phosphorylierung und damit Aktivierung dreier hintereinandergeschalteter Kinasen aus. Diese werden als MAP3K, MAP2K und MAPK bezeichnet und gehören zu den Serin-/Threoninkinasen. Wie in **Abb. 3** für die Raf/MEK/ERK-Kaskade gezeigt, aktivieren extrazelluläre Stimuli über verschiedene Zelloberflächenrezeptoren die GTPase Ras, welche in der aktiven GTP-gebundenen Form daraufhin die MAP3K Raf an die Membran rekrutiert und über einen noch nicht genau verstandenen Mechanismus aktiviert. Dieser Mechanismus beinhaltet vor allem die Aufhebung der Autoinhibition des regulatorischen N-Terminus von Raf und die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von regulatorischen Aminosäuren (Maurer *et al.* 2011). Zur Raf-Familie gehören A-Raf, B-Raf und Raf1/C-Raf, welche durch ähnliche Mechanismen aktiviert werden. Raf phosphoryliert und aktiviert die MAP2K MEK1/2 (MAPK/ERK-Kinase), welche wiederum die nachgeschaltete MAPK ERK1/2 durch Phosphorylierung aktiviert. Dies führt schließlich zur Phosphorylierung von Substraten im Zellkern, im Zytosol und in der Membran. Hierzu zählen Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Signal- und Strukturproteine. Ebenso wie GRK (**1.1.4**) haben auch MAPK phosphorylierungsunabhängige Funktionen. So konnte gezeigt werden, dass Raf1 Proteine von pro-apoptotischen Signalwegen unabhängig von seiner Kinaseaktivität zu hemmen vermag (Kolch 2005). Obwohl die Signaltransduktion von MAPK zur Vereinfachung meist als linearer Signalweg dargestellt wird, ist er in Wirklichkeit stark verzweigt und weist Interaktionen mit einer Vielzahl von weiteren Signalwegen auf (Kolch 2000, 2005; Roskoski 2010).

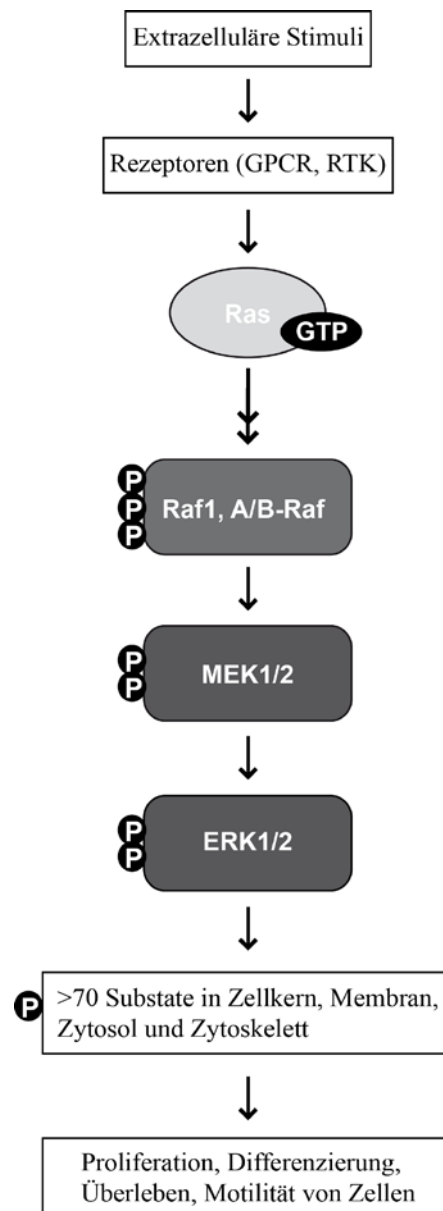


Abb. 3: Die Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade.

Vereinfachte Darstellung der Aktivierung der Extrazellulär-regulierten Kinase (ERK) durch extrazelluläre Stimuli. Diese aktivieren membranäre Rezeptoren wie Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Durch die Aktivierung von GTP-gebundenem Ras wird Raf an die Membran rekrutiert (nicht gezeigt) und dort durch verschiedene Proteinkinasen (nicht gezeigt) phosphoryliert (dargestellt durch P). Dies führt zur sequentiellen Aktivierung durch Phosphorylierung der MAPK/ERK Kinase (MEK) und von ERK, welches nukleäre oder zytosolische Effektoren an Serin- und Threoninresten phosphoryliert und so beispielsweise Proliferation, Differenzierung, Überleben und Motilität von Zellen beeinflusst.

Die Regulation der Raf/MEK/ERK-Kaskade ist komplex und erfolgt durch Kinasen, Phosphatasen und andere regulatorische Proteine (Kolch 2000, 2005; Roskoski 2010). Eine Deregulation von Kinasen oder assoziierten Proteinen dieser Kaskade führt zur onkogenen Transformation von Zellen (Pylayeva-Gupta *et al.* 2011). So gehören die Mitglieder der Ras-

Familie zu den Protoonkogenen und weisen in etwa 20 % von humanen Tumoren onkogene Mutationen auf (Montagut & Settleman 2009), die die GTP-Hydrolyse verhindern und zu einer chronischen Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade führen (Maurer *et al.* 2011). Des Weiteren werden in etwa 7 % von humanen Tumoren aktivierende B-Raf-Mutationen gefunden (Montagut & Settleman 2009). Während selektive Inhibitoren von Rezeptortyrosinkinasen wie der Bcr-Abl-Inhibitor Imatinib und der EGFR-Inhibitor Erlotinib bereits erfolgreich zur Therapie einer Reihe von malignen Erkrankungen eingesetzt werden, sind selektive Inhibitoren des kleinen G-Proteins Ras oder der Serin-/Threoninkinasen Raf, MEK und ERK noch nicht verfügbar für die klinische Anwendung. B-Raf- und MEK-Inhibitoren werden zurzeit in klinischen Studien getestet (Kolch 2005; Montagut & Settleman 2009, Maurer *et al.* 2011). Eines der wenigen bekannten endogenen Inhibitoren der Raf/MEK/ERK-Kaskade ist RKIP.

1.3 Das Raf Kinase Inhibitor Protein

RKIP ist ein multifunktionelles Regulatorprotein von Proteinkinasen und beeinflusst wichtige zelluläre Prozesse wie Zellzyklus, Wachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose sowie die Kontraktilität von Kardiomyozyten. Dies erfolgt scheinbar durch Regulation verschiedener Signaltransduktionswege, wie die von MAPK, von GPCR, des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) und der Glykogensynthasekinase 3 beta (GSK3β) (Zeng *et al.* 2008). Allerdings sind die genauen physiologischen Funktionen und die molekularen Regulationsmechanismen von RKIP bisher nur unvollständig verstanden (Zeng *et al.* 2008; Escara-Wilke *et al.* 2012).

1.3.1 RKIP ist ein endogener Inhibitor der Raf/MEK/ERK-Kaskade

RKIP wurde mittels Hefe-zwei-Hybrid-Technik als Interaktionspartner und in weiteren Versuchen als Inhibitor von Raf1 charakterisiert (Yeung *et al.* 1999). *In vitro* interagiert RKIP nicht nur mit Raf1, sondern auch mit dessen Effektorkinasen MEK und ERK, wobei RKIP aber nur die Raf1-vermittelte Phosphorylierung von MEK hemmt und nicht die MEK-vermittelte Phosphorylierung von ERK (Yeung *et al.* 1999). RKIP inhibiert Raf1-vermittelte Effekte, indem es zum einen dessen Interaktion mit der Effektorkinase MEK kompetitiv hemmt (Yeung *et al.* 2000), zum anderen aber auch die Phosphorylierung und Aktivierung von Raf1 durch die p21-aktivierte Kinase und Src-Kinasen zu verhindern scheint (Trakul *et al.* 2005). Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Phosphorylierung von Raf1 die

Interaktion mit RKIP verstärkt (Park *et al.* 2006; Rath *et al.* 2008; Tavel *et al.* 2012). Zukünftige Studien müssen daher die Rolle der Phosphorylierung von Raf1 für seine Interaktion mit RKIP noch klären. Auch die Frage, ob RKIP nicht nur Raf1 sondern auch B-Raf reguliert ist nicht geklärt: Während Trakul *et al.* zeigten, dass RKIP zwar mit B-Raf assoziiert aber nicht seine Aktivität hemmt (Trakul *et al.* 2005), konnten Park *et al.* eine antagonistische Aktivität von RKIP gegenüber B-Raf feststellen (Park *et al.* 2005).

Ein etablierter Regulationsmechanismus der Interaktion von RKIP mit Raf1 ist hingegen die Phosphorylierung von *RKIP*. So konnte gezeigt werden, dass RKIP und Raf1 dissoziieren, sobald RKIP durch Protein Kinase C (PKC) an S153 phosphoryliert wird (Corbit *et al.* 2003; Lorenz *et al.* 2003). Dies wurde sowohl nach direkter Aktivierung von PKC durch Phorbol-ester als auch nach Aktivierung von PKC durch Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und durch GPCR beobachtet (Corbit *et al.* 2003; Lorenz *et al.* 2003). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RKIP die Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade durch direkte Interaktion mit Raf1 inhibiert. Diese Hemmung wird durch PKC-vermittelte Phosphorylierung von RKIP aufgehoben.

Die Bedeutung der RKIP-vermittelten Raf-Hemmung zeigt sich in Tumoren mit verringerter RKIP-Expression. Die damit einhergehende erhöhte ERK-Aktivität scheint zu einer verstärkten Metastasierung, Hemmung des apoptotischen Zelltodes und Chemo- und Radioresistenz zu führen (Fu *et al.* 2003; Chatterjee *et al.* 2004; Schuierer *et al.* 2004; Woods Ignatoski *et al.* 2008, Ruan *et al.* 2010; Jia *et al.* 2012). Des Weiteren scheint die RKIP-Expression invers mit der Tumorprogression zu korrelieren (Fu *et al.* 2006; Martinho *et al.* 2012a, b). Der genaue molekulare Mechanismus dieser Effekte von RKIP ist unklar (Escara-Wilke *et al.* 2012) und beinhaltet vermutlich auch weitere Interaktionspartner von RKIP wie die Kinase GSK3 β . GSK3 β kann durch Inaktivierung von onkogenen Signalwegen die Tumorprogression verhindern (Wu & Pan 2010). Kürzlich wurde gezeigt, dass RKIP nicht nur Raf sondern auch p38 MAPK hemmt. Da diese ein Inhibitor von GSK3 β ist, verstärkt RKIP so deren Aktivität (Al-Mulla *et al.* 2011). In einigen Krebszelllinien wurden die antimetastatischen Eigenschaften von RKIP auch auf die Hemmung von Kinasen zurückgeführt, welche die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B regulieren (Hagan *et al.* 2005; Beshir *et al.* 2010).

1.3.2 RKIP hemmt die Aktivierung von NFκB

Da die Expression von RKIP in verschiedenen Zelllinien wesentlich höher ist als die von Raf1 (Yeung *et al.* 1999), wurde nach weiteren möglichen Interaktionspartnern von RKIP gesucht. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass RKIP auch mit Kinasen interagiert, welche die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB regulieren (Yeung *et al.* 2001; Tang *et al.* 2010). NFκB ist in einer Vielzahl von Zellen exprimiert und steuert die transkriptionelle Antwort auf inflammatorische oder Stress-Stimuli, die zum Beispiel durch die Zytokine IL1β (Interleukin 1 beta) oder TNFα (Tumor Nekrose Faktor alpha) vermittelt werden (Gilmore & Wolenski 2012). Diese aktivieren Kinasen der MAPK-Familie wie NIK (NFκB induzierende Kinase), MEKK1 (Mitogen-aktivierte Kinase Kinase) und TAK1 (*Transforming growth factor β-activated kinase 1*) oder der MAPK-Familie strukturell verwandte Kinasen wie IKK (Yeung *et al.* 2001). Dadurch wird über eine nicht genau bekannte, komplexe Sequenz von kombinatorischen Phosphorylierungs- und Ubiquitinylierungsereignissen der IKK (IκB-Kinase)-Komplex aktiviert (Weber *et al.* 2010). Der IKK-Komplex phosphoryliert daraufhin IκB (Inhibitor von NFκB), welcher in unstimulierten Zellen NFκB bindet und an der Translokation vom Zytosol zum Zellkern hindert. Diese Phosphorylierung induziert die Ubiquitinylierung und den Abbau von IκB, so dass NFκB in den Zellkern translozieren und dort spezifische Gene mit Bindungsstellen für NFκB anschalten kann (**Abb. 4**).

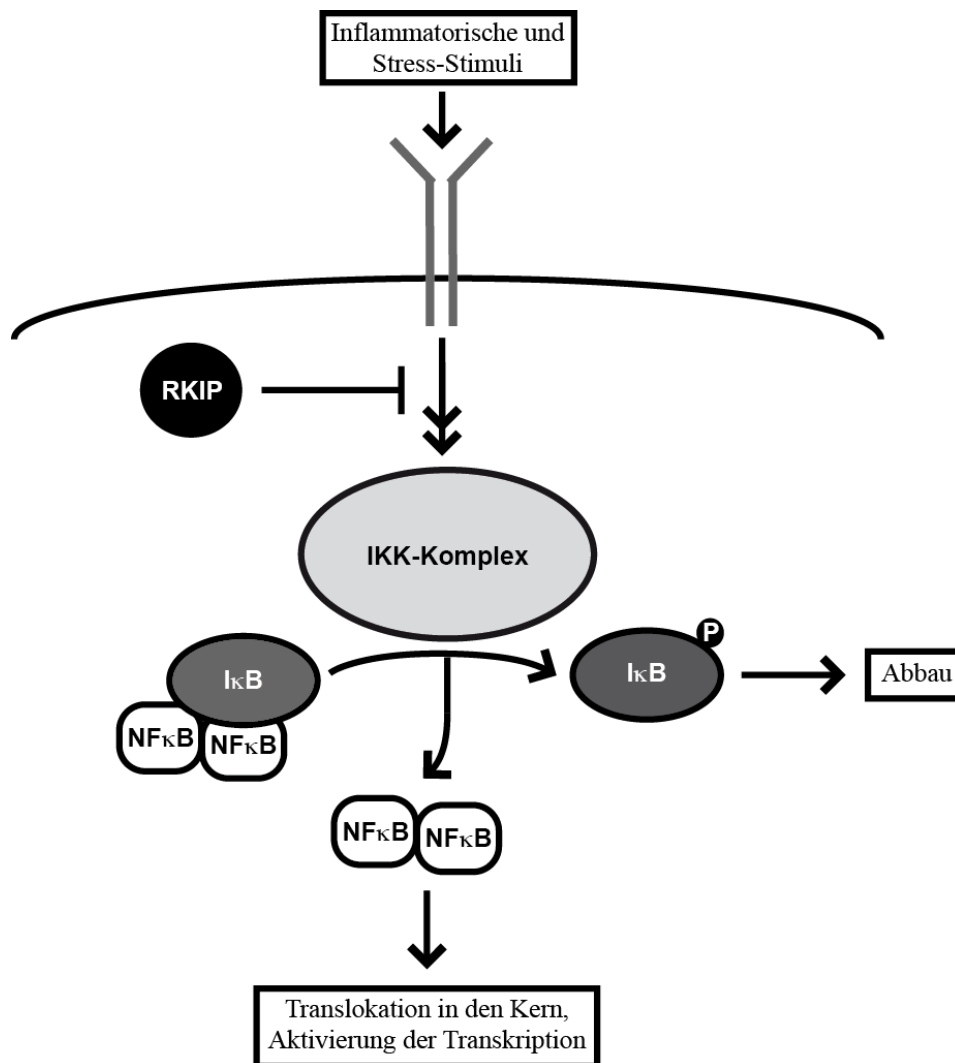


Abb. 4: RKIP hemmt die Aktivierung von NFκB durch Hemmung des IKK-Komplexes.

Im inaktiven Zustand bindet der Transkriptionsfaktor NFκB als Dimer an den Inhibitor IκB und wird so im Zytoplasma zurückgehalten. Inflammatorische und Stress-Signale beispielsweise durch die Zytokine IL1β oder TNFα aktivieren verschiedene membranständige Rezeptoren. Über zwischengeschaltete Kinasen wird der IKK-Komplex aktiviert und phosphoryliert IκB. Die Phosphorylierung von IκB induziert dessen Ubiquitylierung und Abbau durch das Proteasom, so dass NFκB in den Zellkern translozieren und NFκB-regulierte Gene aktivieren kann. RKIP hemmt die Aktivierung des IKK-Komplexes und somit die Aktivierung von NFκB.

Die Aktivierung von NFκB wird unter anderem durch RKIP gehemmt. RKIP hemmt die TNFα- und IL1β-stimulierte Aktivierung des IKK-Komplexes, indem es mit den vorgeschalteten Aktivatoren TRAF6 (TNFα Rezeptor-assoziiertes Faktor), NIK und TAK1 interagiert. Des Weiteren interagiert RKIP mit IKKα und IKKβ und hemmt deren Auto-phosphorylierung (Yeung *et al.* 2001; Tang *et al.* 2010). Hierdurch werden die Phosphorylierung und der Abbau des NFκB-Inhibitors IκB gehemmt (Abb. 4), so dass RKIP ein negativer Modulator von NFκB ist. Es ist allerdings nicht bekannt, ob die beschriebenen

Interaktionen direkt sind und durch welche Mechanismen die RKIP-vermittelte Hemmung des NF κ B-Signalweges reguliert wird.

1.3.3 RKIP ist ein endogener Inhibitor von GRK2

RKIP ist ein multifunktionseller Kinaseregulator, es reguliert nicht nur die Aktivierung von MAPK und von NF κ B, sondern auch die Aktivität von GRK2. Diese Kinase ist einer der wichtigsten negativen Regulatoren der β -adrenergen Rezeptoren und damit der kardialen Kontraktilität (Rockman *et al.* 2002). Eine erhöhte Aktivität von GRK2 scheint eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und anderen kardiovaskulären Erkrankungen zu spielen, so dass die Hemmung von GRK2 als eine vielversprechende Strategie in der Therapie der Herzinsuffizienz diskutiert wird (Lohse *et al.* 2003; Rengo *et al.* 2012). Bisher sind trotz beträchtlicher Anstrengungen keine selektiven GRK2-Inhibitoren für die klinische Anwendung verfügbar (Palczewski *et al.* 1990; Setyawan *et al.* 1999; Kassack *et al.* 2000; Iino *et al.* 2002; Winstel *et al.* 2005; Tesmer *et al.* 2010; Thal *et al.* 2011).

Endogene Inhibitoren von GRK2 sind beispielsweise Calmodulin (Chuang *et al.* 1996), Caveolin-1 (Carman *et al.* 1999a), Aktin (Freeman *et al.* 1998) und α -Aktinin (Freeman *et al.* 2000). Diese besitzen jedoch keine Spezifität für eine bestimmte GRK-Isoform. RKIP hingegen ist ein potenter und spezifischer Inhibitor von GRK2, welche es mit einer IC₅₀ von 450 nM hemmt (Lorenz *et al.* 2003). Die RKIP/GRK2-Interaktion ist (i) spezifisch, da RKIP andere Kinasen wie GRK5, PKA und PKC nicht hemmt, (ii) direkt, da gereinigtes RKIP auch gereinigte GRK2 bindet und hemmt und (iii) existiert unter physiologischen Bedingungen, da sie mit endogenen Proteinen in nativen Geweben gezeigt werden konnte. Herabregulierung von RKIP in Kardiomyozyten führt zu verminderter β -adrenerger Signaltransduktion und einer erniedrigten Kontraktilität von Kardiomyozyten, was die physiologische Bedeutung der RKIP-vermittelten GRK2-Hemmung verdeutlicht.

Es wurde gezeigt, dass die Interaktion von RKIP und GRK2 durch PKC-vermittelte Phosphorylierung von RKIP induziert wird (Yeung *et al.* 1999; Lorenz *et al.* 2003). Diese Phosphorylierung stellt somit einen molekularen Schalter dar, der nicht nur die RKIP/Raf1-Interaktion aufhebt, sondern auch die RKIP/GRK2-Interaktion ermöglicht. Ferner wurde gezeigt, dass RKIP an den N-Terminus von GRK2 bindet (Lorenz *et al.* 2003), der an der Interaktion von GRK2 mit aktivierten Rezeptoren beteiligt ist (Huang & Tesmer 2011). Ein

genaueres Verständnis der RKIP-vermittelten GRK2-Hemmung könnte der Entwicklung von spezifischen GRK2-Inhibitoren hilfreich sein.

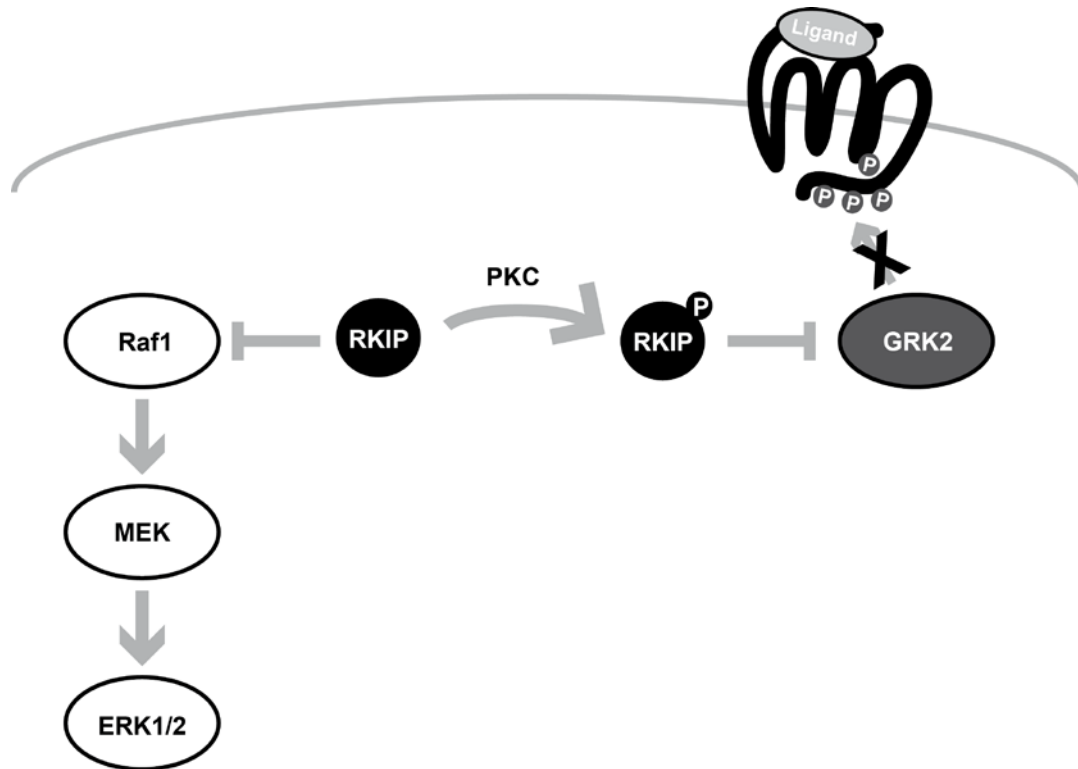


Abb. 5: RKIP hemmt Raf1 oder GRK2 abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus.

Unter basalen Bedingungen hemmt RKIP Raf1 und damit die Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade. Nach Phosphorylierung von RKIP durch Protein Kinase C (PKC) dissoziieren RKIP und Raf1. RKIP vermag nun GRK2 zu hemmen und folglich die Desensibilisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

1.3.4 Weitere Funktionen von RKIP

Vom N-Terminus von RKIP kann ein Undecapeptid abgespalten werden, welches unter der Bezeichnung HCNP (*hippocampal cholinergic neurostimulating peptide*) bekannt ist, da es die Acetylcholin-Transferase stimuliert und so die Differenzierung von cholinergen Neuronen im Hippocampus fördert (Ojika *et al.* 2000). Bei Alzheimer-Patienten ist die Expression von RKIP signifikant vermindert und korreliert negativ mit der Akkumulation von β -Amyloid (Maki *et al.* 2002; George *et al.* 2006). Es wurde deshalb vermutet, dass dies zu der cholinergen Dysfunktion und Pathogenese von Alzheimer-Patienten beiträgt (Zeng *et al.* 2008). Ferner wurde gezeigt, dass RKIP und HCNP in chromaffinen Zellen der Nebenniere vorhanden sind und zusammen mit Catecholaminen unter Stress in die Blutbahn sezerniert

werden (Goumon *et al.* 2004). In isolierten perfundierten Rattenherzen zeigte HCNP einen negativ inotropen Effekt (Angelone *et al.* 2006). Weder das Enzym, welches HCNP abspaltet, noch der Mechanismus, der die Stimulation der Acetylcholin-Transferase vermittelt, sind bisher bekannt. Weiterhin ist beschrieben worden, dass RKIP *in vitro* verschiedene Serinproteasen wie Thrombin, Neuropsin und Chymotrypsin hemmt, während Trypsin, gewebespezifischer Plasminogenaktivator und Elastase nicht gehemmt werden. Der molekulare Mechanismus und die physiologische Bedeutung dieser Funktionen müssen in weiteren Studien gezeigt werden (Hengst *et al.* 2001).

1.4 RKIP ist ein Mitglied der PEBP-Familie

RKIP gehört zur Familie der Phosphatidylethanolamin-bindenden Proteine (PEBP-Familie), die über 400 Mitglieder mit einer evolutionär konservierten Sequenz und Struktur hat (Zeng *et al.* 2008). Homologe Proteine existieren bei Menschen, bei höheren Säugetieren wie Affe, Kuh, Ratte und Maus, bei Vögeln, Insekten, Würmern, Bakterien, Pilzen, Hefen und bei Pflanzen. Menschen exprimieren RKIP sowie das Homolog PEBP4, welches sowohl ähnliche als auch von RKIP verschiedene biologische Funktionen besitzt und in den meisten menschlichen Geweben exprimiert wird. So ist PEBP4 wie RKIP ein Inhibitor von MAPK (Yeung *et al.* 1999; Wang *et al.* 2004). Während die Überexpression von RKIP in Tumoren jedoch eine antimetastatische (Fu *et al.* 2003) und pro-apoptotische (Chatterjee *et al.* 2004) Wirkung hat, scheint PEBP4 Apoptose zu hemmen (Wang *et al.* 2004, 2005; Li *et al.* 2007). Am besten untersucht ist die Funktion von RKIP, welches im menschlichen Organismus ubiquitär exprimiert wird (Zeng *et al.* 2008). Zwar sind die genauen zellulären Funktionen und die molekularen Regulationsmechanismen von RKIP bisher nicht bekannt, jedoch wurde RKIP inzwischen wie bereits erläutert als Regulatorprotein von mehreren wichtigen Signaltransduktionskaskaden identifiziert. Umso erstaunlicher erscheint es, dass homozygote RKIP *knock-out* Mäuse keinen auffälligen Phänotyp besitzen (Moffit *et al.* 2007; Theroux *et al.* 2007; Zeng *et al.* 2008). Da Mäuse jedoch ebenfalls die RKIP-homologen Proteine PEBP2 (Hickox *et al.* 2002) und vermutlich PEBP4 exprimieren (Theroux *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2007), welche ebenfalls Inhibitoren von MAPK sind (Hickox *et al.* 2002; Wang *et al.* 2004), könnte der unauffällige Phänotyp der RKIP *knock-out* Mäuse auf eine genetische Kompensierung zurückzuführen sein.

1.5 Strukturelle und biochemische Eigenschaften von RKIP

RKIP von Säugetieren ist ein lösliches Protein aus einer einzigen Polypeptidkette mit einer Länge von 187 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ~21 kDa. Die dreidimensionale Struktur von RKIP sowie von einer Reihe homologer Proteine verschiedener Spezies wurde mittels Kristallstrukturanalyse bestimmt (Banfield *et al.* 1998; Serre *et al.* 1998; Banfield & Brady 2000; Serre *et al.* 2001; Simister *et al.* 2002; Mima *et al.* 2005; Granovsky *et al.* 2009). Diese Mitglieder der PEBP-Familie besitzen eine kompakte globuläre Struktur, welche sich durch ein zentrales β -Faltblatt umgeben von variableren α -Helices und β -Faltblättern auszeichnet (**Abb. 6**). Die verschiedenen Sekundärstrukturelemente sind durch lange, flexible Schleifenstrukturen (*loops*) verbunden (Zeng *et al.* 2008).

In drei der fünf bekannten Kristallstrukturen von RKIP aus Säugetieren (Banfield *et al.* 1998; Serre *et al.* 1998; Granovsky *et al.* 2009) und auch in einem bakteriellen Homolog (Serre *et al.* 2001) wurde eine kleine taschenartige Region identifiziert, die einen niedermolekularen ionischen Liganden binden kann (**Abb. 6**). Diese putative Bindungstasche ist klein und befindet sich an der Proteinoberfläche. Sie ist umgeben von basischen und hydrophoben Aminosäuren, die in PEBP von Säugetieren stark konserviert sind (Serre *et al.* 1998). Die Eigenschaft dieser Tasche, *in vitro* an Phosphatidylethanolamin oder andere Lipide zu binden, prägte den Namen der PEBP-Familie (Bernier & Jolles 1984; Bernier *et al.* 1986). Ferner werden phosphomimetisches Cacodylat (Banfield *et al.* 1998), Morphin und Morphin-Glucuronide (Grandy *et al.* 1990; Goumon *et al.* 2006), Nukleotide (Schoentgen *et al.* 1992) und andere organische anionische Liganden (Bernier & Jolles 1984; Serre *et al.* 1998; Shemon *et al.* 2010) gebunden. Ob diese Interaktionen für die Funktion von RKIP von physiologischer Relevanz sind, wird kontrovers diskutiert, da die Interaktionen in den meisten Fällen von niedriger Affinität sind und nicht unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden konnten (Atmanene *et al.* 2009; Granovsky *et al.* 2009; Shemon *et al.* 2010; Beshir *et al.* 2011). Es wurde daher vermutet, dass die Ligandenbindungstasche von RKIP eher an der Erkennung und Bindung phosphorylierte Proteine beteiligt ist (Banfield & Brady 2000; Hagan *et al.* 2006). Natürlich vorkommende Mutationen in RKIP-Homologen von Pflanzen und Hefen haben die physiologische Relevanz der Bindungstasche zumindest für diese Homologe bestätigt. So induziert eine Punktmutation in der Bindungstasche eines pflanzlichen RKIP-Homologs die vorzeitige Beendigung des vegetativen Wachstums zu Gunsten der Effloreszenz (Granovsky & Rosner 2008). Für Raf1 wurde gezeigt, dass es mit

der Ligandenbindungstasche von RKIP interagiert. Für viele weitere Interaktionspartner ist dagegen nicht bekannt, mit welchen Bereichen von RKIP sie interagieren. Es wird vermutet, dass RKIP mit anderen Proteinen auch unabhängig von der Ligandenbindungstasche zu interagieren vermag (Beshir *et al.* 2011).

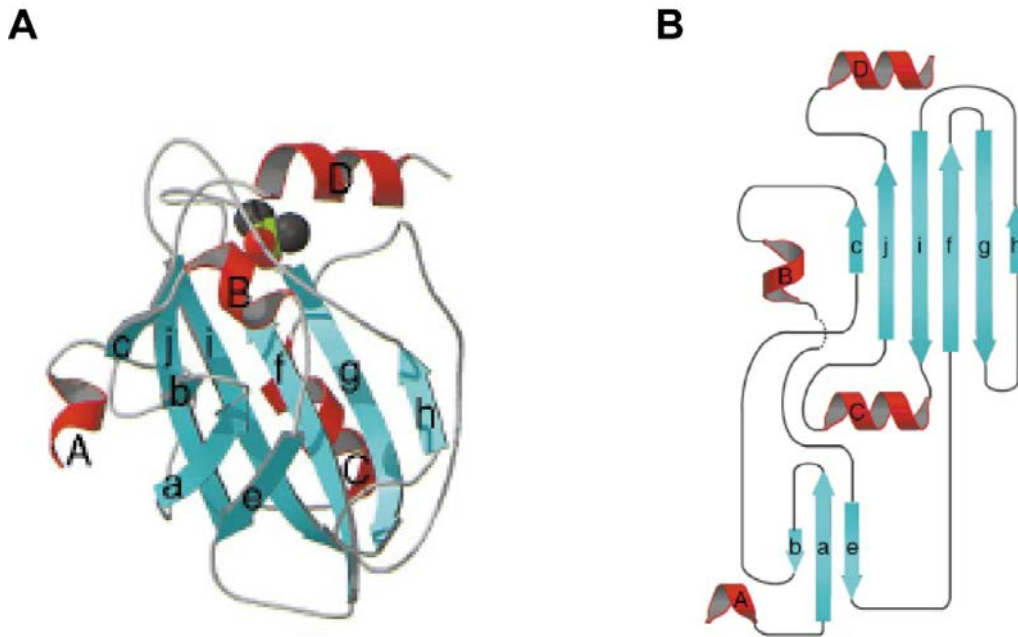


Abb. 6: Struktur von humanem RKIP.

A, Die dreidimensionale Struktur von humanem RKP besteht aus einem zentralen sechssträngigem β -Faltblatt (c, j, i, f, g, h) und einem weiteren kleineren β -Faltblatt bestehend aus drei β -Strängen (b, a, e), sowie vier α -Helices (A, B, C, D). Diese Sekundärstrukturelemente werden durch Schleifenstrukturen verbunden, zwei besonders lange Schleifen verbinden β -Strang h mit β -Strang i und β -Strang i mit α -Helix C. RKIP besitzt eine putative Bindungstasche, in der ein Molekül des phosphomimetischen Cacodylats, dargestellt im Kalottenmodell, gebunden ist. **B,** Schematisches Diagramm der Anordnung der Sekundärstrukturelemente. β -Stränge sind in blau mit kleinen Buchstaben, α -Helices in rot mit großen Buchstaben dargestellt. Die Abbildung ist ein Nachdruck aus *Structure*, Vol 6, MJ Banfield, JJ Barker, ACF Perry, RL Brady, Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction, Pages 1245–1254, Copyright (1998), with permission from Elsevier.

Interessanterweise kristallisieren sowohl humanes RKIP (Banfield *et al.* 1998), als auch ein pflanzliches (Banfield *et al.* 2000) und ein bakterielles Homolog (Serre *et al.* 2001) als Dimer. Auch Bollengier *et al.* detektierten bereits 1989 Dimere und Oligomere in Lysaten von bovinem Gehirn (Bollengier *et al.* 1989). Bisher wurde jedoch weder die Existenz von Dimeren oder Oligomeren unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen noch eine mögliche Bedeutung für die Bindung der verschiedenen Interaktionspartner untersucht.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

RKIP reguliert durch Interaktion mit verschiedenen Proteinkinasen eine Reihe essentieller Signalkaskaden. Als Interaktionspartner wurden so unterschiedliche Kinasen wie Raf1, MEK, ERK, GRK2, IKK α/β , NIK, TAK und GSK3 β charakterisiert. Wie die spezifische Interaktion dieses kleinen Proteins (21 kDa) mit seinen Interaktionspartnern koordiniert und reguliert wird, ist bislang nicht genau verstanden und sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden. Eine direkte Interaktion der erwähnten Kinasen mit RKIP konnte für GRK2 und Raf1 gezeigt werden. Deswegen sollte am Beispiel der Interaktion von RKIP mit diesen Kinasen der zugrundeliegende Interaktionsmechanismus näher untersucht werden, um allgemeine Einblicke in die Regulation von Kinasen und ihren nachgeschalteten Signalwegen zu erhalten.

2 Material

2.1 Substanzen

Es wurden verwendet: Bisindolylmaleimid I (GFX; Merck), Sulfo-ethylenglycol-bis-(succinimidylsuccinat) (sEGS; AppliChem), Isoprenalinhydrochlorid (Iso; Tocris/Biozol), Paraformaldehyd (PFA, AppliChem), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; AppliChem), Parathormon (PTH, Bachem). Alle weiteren Substanzen waren von AppliChem, Roth oder SigmaAldrich wenn nicht anders angegeben.

2.2 Kits

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Proteinbestimmung von Herzlysaten	BCA Protein Assay Kit [®]	Pierce	23225
cAMP-Messung in Zelllysaten	cAMP RIA Kit [®]	Immunotech	IM1117
Detektion von <i>Westernblots</i>	ECL Plus Detection Reagents [®]	GE Healthcare	RPN 2132
DNA-Extraktion aus Agarosegelen	Gel Extraction Kit [®]	Quiagen	28704
Transfektion von ROS-Zellen	Lipofectamine LTX Plus Reagent [®]	Invitrogen	15338100
Plasmidisolierung	Plasmid Plus Midi Kit [®]	Quiagen	12943
RNA-Isolierung	SV Total RNA Isolation System [®]	Promega	Z3101

2.3 Molekulare Größenstandards

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Gele	100 Basenpaar/1 Kilobasenpaar DNA Größenstandard	NEB
Proteingele (bis 120 kDa)	peqGold Protein Marker III [®]	Peqlab
Proteingele (bis 200 kDa)	Kaleidoscope Prestained Standards [®]	Biorad
Proteingele (bis 10 kDa)	Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards [®]	Biorad

2.4 Proteingel-Auftragspuffer

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
Glycin-SDS-Gele	Rotiloads [®]	Roth
Tricin-SDS-Gele	Tricine Sample Buffer [®]	Biorad

2.5 Isotop markierte Substanzen

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
GRK2-Aktivitätsassay	[γ - ³² P] ATP	Hartmann

2.6 Medien und Lösungen für die Kultur eukaryotischer Zellen

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), mit 0,45 % (w/v) Glukose	PAN
DMEM/Ham's F12 (1:1), mit 0,45 % (w/v) Glukose	PAN
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN
Penicillin (10.000 U/ml)	PAN
Streptomycin (10 mg/ml)	PAN
Glutamin (200 mM)	PAN
OptiMEM [®]	Invitrogen

2.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Amicon [®] Ultra Zentrifugeneinheiten	Millipore
Autoradiographiefilme	Fuji Film
Chromatographiepapier	Hartenstein
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran	GE Healthcare/Hartenstein
Entwicklungslösungen für Autoradiographiefilme	Sigma-Aldrich
Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose	Quiagen
Protein-A-Sepharose	GE Healthcare
Chromatographiesäulen	Biorad
Zellkulturschalen	Nunc

2.8 Antikörper

2.8.1 Primäre Antikörper

Epitop	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Katalognr.
c-Myc	Kaninchen	1:1000-1:2000	Santa Cruz	sc-789
ERK	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9102
Flag	Maus	1:10000	Sigma-Aldrich	F3165
GFP	Maus	1:3000	Sigma-Aldrich	G1544
GRK2	Kaninchen	1:2000 (Zelllysate), 1:10000 (gereinigte Proteine)	Santa Cruz	sc-13143
HA	Maus	1:4000	Covance	MMS-101R
His ₆	Maus	1:3000	Cell Signaling	2366
Phospho-β ₂ - AR (S355/356)	Kaninchen	1:5000	Santa Cruz	sc-22191
Phospho-ERK	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9101
Phospho-RKIP (S153)	Kaninchen	1:2000	Epitomics	2445-1
Phospho-RKIP (S153)	Kaninchen	1:2000	Santa Cruz	sc-32622
Raf1	Maus	1:10000	BD Biosciences	610152
RKIP	Ziege	1:500 (Herzen), 1:2000 (HEK293-Zellen)	Santa Cruz	sc-5423, sc- 33184

2.8.2 Sekundäre Antikörper

Epitop	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Katalognr.
Maus IgG	Ziege	1:7500	Dianova	115035003
Ratten IgG	Ziege	1:7500	Dianova	111035144
Ziegen IgG	Esel	1:5000	Santa Cruz	sc-2020

Alle sekundären Antikörper waren mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Der ERK-Antikörper, alle phosphospezifischen Antikörper sowie die sekundären Antikörper wurden in BSA-haltigem Waschpuffer, alle übrigen Antikörper wurden in Blockmilch angesetzt (s. 3.3.8).

2.9 Plasmidvektoren

Bezeichnung	Bemerkung	Spezies	Referenz
Myc-RKIP	Myc-tag N-terminal	Ratte	diese Arbeit
Flag-RKIP	Flag-tag N-terminal	Ratte	diese Arbeit
GRK2		Rind	K. Lorenz
HA-Raf1	HA-tag N-terminal	Mensch	K. Lorenz
HA-RKIP	HA-tag N-terminal	Ratte	K. Lorenz
His ₆ -RKIP	His ₆ -tag N-terminal	Ratte	diese Arbeit
His ₆ -RKIP	His ₆ -tag N-terminal	Maus	K. Lorenz

Die Sequenzen der verwendeten Affinitätssequenzen (*tags*) lauteten:

<i>tag</i>	DNA-Sequenz	Aminosäuresequenz
Flag	gactacaaggacgacgacgacaag	Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
HA	taccatacagatgtccagattacgct	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
His ₆	catcatcatcatcatcat	His His His His His His
Myc	gagcagaagctcatcagcaggaggacctc	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

2.10 Klonierte RKIP-Mutanten und RKIP-Fragmente

Zur Generierung von Deletions- und Punktmutanten wurde das Prinzip der *Primer*-gerichteten Mutagenese angewendet. Hierfür wurden je zwei *Rand-Primer* und zwei *mismatch-Primer* verwendet (s. 3.1.1). Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt jeweils am N-Terminus bei der ersten Aminosäure der Aminosäuresequenz von Ratten-RKIP (nicht an der N-terminalen Affinitätssequenz). Soweit nicht anders angegeben, wurde HA-Wildtyp-RKIP als Ausgangs-DNA für alle Klonierungen verwendet.

	5' Rand-Primer	3' Rand-Primer
Flag-RKIP	tggtggaataagcttatggactacaaggacgacgacgacaaggccgcccagatcagccagtgg	tgctgaattctagactactcccagccagctgatc
Myc-RKIP	tggtggaataagcttatggagcagaagctcatcagcaggaggacctcggccgacatcagccagtgg	tgctgaattctagactactcccagccagctgatc
His-RKIP	tccctctagcatatgcatcaccatcaccatcacgccgcccagatcagccagtgggcc	tgctcccagatccctactcccagccagctgatcag

Deletionsmutanten	Affinitätssequenz	5' mismatch-Primer	3' mismatch-Primer
RKIP ^{Δ127-130}	Myc-tag	tggtggtgtatgagctgaact gtgacgag	ctcgtcacagttcagctcata caccagcca
RKIP ^{Δ127-146}	Myc-tag	cgctacgtctggctggtgtatg agcaggaggcaagtcaag gtggagtccttccgcaag	cttgcggaaggactccacct tgaactgccctcctgctcat acaccagccagacgtagcg
RKIP ^{Δ129-132}	Myc-tag	gtgtatgagcaggagtgtgac gagcccatc	gatgggctcgtcacactcct gctcatacac
RKIP ^{Δ128-131}	Myc-tag	ctggtgtatgagcagaactgtg acgagccc	gggctcgtcacagttctgct catacaccag
RKIP ^{Δ129-134}	Flag- und Myc-tag	gttgtctccagactgtcacagtt cagagg	gctgaggatgggctcctcct gctcatacac
RKIP ^{Δ131-134}	Flag- und Myc-tag	gagcaggagcagcctgagcc catcctcagc	gctgaggatgggctcagggc tgctcc gctc
RKIP ^{Δ135-138}	Flag- und Myc-tag	cctctgaactgtgacagcaaca agtctgga	tccagactgtgtgtcaca gttcagagg
RKIP ^{Δ135-140}	Flag- und Myc-tag	cctctgaactgtgacaagtctg gagacaac	gttgtctccagactgtcaca gttcagagg
RKIP ^{Δ139-142}	Flag- und Myc-tag	gacgagcccacctcctggagac aaccgcggc	gccgcggtgtctccgagg atgggctcgtc
RKIP ^{Δ141-146}	Flag- und Myc-tag	cccacctcagcaacggcaagt tcaaggtg	caccttgaactgccgttgct gaggatggg
RKIP ^{Δ143-144}	Myc-tag	agcaacaagtctaaccgcggc aag	cttgccgcggttagacttgtt gct
RKIP ^{Δ143-146}	Flag- und Myc-tag	ctcagcaacaagtctggcaagt tcaaggtg	caccttgaactgccagactt gttgctgag
RKIP ^{Δ145-146}	Myc-tag	aacaagtctggacgcggcaag ttc	gaactgccgctccagact tggt
Punktmutanten	Affinitätssequenz	5' mismatch-Primer	3' mismatch-Primer
RKIP ^{P74L}	Flag- und Myc-tag	gaccccgatgctctcagcagg aaggac	gtccttctgctgagagcatc ggggtc
RKIP ^{S99E}	Myc-tag	aacgacattagcgaaggcact gtctc	gaggacagtgccttcgctaa tgctgtt
RKIP ^{T101E}	Myc-tag	agcagtggcgaagtctctcc	ggagaggacttcgccactg ct
RKIP ^{E105R}	Myc-tag	gtcctctccagatacgtgggc	gccacgtatctggagagg ac

Punktmutanten	Affinitätssequenz	5' mismatch-Primer	3' mismatch-Primer
RKIP ^{TE101/105ER}	<i>Myc-tag</i>	agcagtggcgaagtcctctcca gatacgtgggc	gccacgtatctggagagg acttcgccactgct
RKIP ^{DN144/145SS}	<i>Myc-tag</i>	aacaagtctggaagcagccgc ggcaagttc	gaacttcccggctgcttc cagacttgtt
RKIP ^{GDNR143-146AAAA}	<i>Myc-tag</i>	agcaacaagtctgcagccgcc gccggcaagtcaag	cttgaacttcccggcgccg gctgcagacttgttct
RKIP ^{KDRK141/476/8AAAA}	<i>Myc-tag</i>	atcctcagcaacgcgtctggag ccaacgccggcgcgttcaagg tggag	ctccacctgaacgcgccg gcgttggctccagacgcgtt gctgaggat
RKIP ^{S153A}	Flag- und <i>Myc-tag</i>	K. Lorenz	K. Lorenz
RKIP ^{S153D}	<i>Myc-tag</i>	K. Lorenz	K. Lorenz
RKIP ^{S153E}	<i>Myc-tag</i>	K. Lorenz	K. Lorenz
RKIP ^{SF153/4EE}	Flag- und <i>Myc-tag</i>	ttcaagtgagggaagagcgc aagaagtac	gtacttcttgcgctcttctcc accttgaa
RKIP ^{SF153/4EEE}	Flag- und <i>Myc-tag</i>	aagttcaagtgagggaagag gagcgaagaagtaccac	gtgttacttcttgcgctctct tcttccacctgaactt
RKIP ^{SF153/4EEEE}	<i>Myc-tag</i>	aagttcaagtgagggaagag gaggaacgaagaagtacca c	gtgttacttcttgcgttctctcc tcttctccacctgaactt
RKIP ^{SK153/7EE} (Vorlage: RKIP ^{S153E})	Flag- und <i>Myc-tag</i>	gaattccgaaggagtaccac ctggga	tcccagtggtactccttgc ggaattc
Kombinierte Punkt- und Deletionsmutanten	Affinitätssequenz	5'-mismatch Primer	3'-mismatch Primer
RKIP ^{Δ143-146/S153A} (Vorlage: RKIP ^{S153A})	<i>Myc-tag</i>	ctcagcaacaagtctggcaagtt caaggtg	cacctgaacttcccagact tgttgcctgag
RKIP ^{Δ143-146/S153E} (Vorlage: RKIP ^{S153E})	<i>Myc-tag</i>	ctcagcaacaagtctggcaagtt caaggtg	cacctgaacttcccagact tgttgcctgag
RKIP ^{Δ143-146/S153D} (Vorlage: RKIP ^{S153D})	<i>Myc-tag</i>	ctcagcaacaagtctggcaagtt caaggtg	cacctgaacttcccagact tgttgcctgag

Für die Klonierung von RKIP-Fragmenten wurden zwei Rand-*Primer* verwendet:

RKIP-Fragmente	Affinitätssequenz	5'-Rand-Primer	3'-Rand-Primer
RKIP ¹³⁻¹⁸⁷	<i>Myc-tag</i>	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctcttacaggaggtggatgag ccg	tgctgaatttctagactactt cccagccagctgac
RKIP ¹⁻²⁰	<i>Myc-tag</i>	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctcgccgccgacatcagccag tgg	tgctgaatttctagactagg gcggctcatccaccte
RKIP ¹⁻³⁴	<i>Myc-tag</i>	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctcgccgccgacatcagccag tgg	tgctgaatttctagactacac cgftactccgccgta
RKIP ¹⁻⁶⁷	<i>Myc-tag</i>	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctcgccgccgacatcagccag tgg	tgctgaatttctagactagac cagggtgtagagctt
RKIP ¹⁻¹²⁶	<i>Myc-tag</i>	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctcgccgccgacatcagccag tgg	tgctgaatttctagactactc atacaccagccagac
RKIP ¹⁻¹⁵⁰	<i>Myc-tag</i>	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctcgccgccgacatcagccag tgg	tgctgaatttctagactactt gaacttgccgcggtt
RKIP ¹⁻¹⁷⁶	<i>Myc-tag</i>	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctcgccgccgacatcagccag tgg	tgctgaatttctagactagtc atcccactctgcctg
RKIP ⁸⁴⁻¹⁰³	<i>Myc-tag</i>	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctctggcaccacttctggtg	tgctgaatttctagactaga ggacagtgccactgct
RKIP ⁸⁴⁻¹⁵⁰	<i>Myc-tag</i>	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctctggcaccacttctggtg	tgctgaatttctagactactt gaacttgccgcggtt
RKIP ⁸⁴⁻¹⁸⁷	<i>Myc-tag</i>	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctctggcaccacttctggtg	tgctgaatttctagactactt cccagccagctgac
RKIP ¹²⁷⁻¹⁴⁶	<i>Myc-tag</i>	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctccaggagcagcctctgaac tgt	tgctgaatttctagactagc ggttgtctccagactt

RKIP-Fragmente	Affinitätssequenz	5'-Rand-Primer	3'-Rand-Primer
RKIP ¹²⁷⁻¹⁴⁶	Flag-tag,	tggtggaataagcttatggacta caaggacgacgacgacaagca ggagcagcctctgaactgt	tgctgaattctagactagc ggttgtctccagactt
RKIP ¹²⁷⁻¹⁴⁶	FlagMyc-tag	tggtggaataagcttatggacta caaggacgacgacgacaagga gcagaagctcatcagcgag	tgctgaattctagactagc ggttgtctccagactt
RKIP ¹²⁷⁻¹⁴⁶	FlagFlag-tag	tggtggaataagcttatggattat aaagatgacgacgataaagact acaaggacgacgacgac	tgctgaattctagactagc ggttgtctccagactt
RKIP ¹²⁷⁻¹⁴⁶ (Vorlage: FlagFlagRKIP ¹²⁷⁻¹⁴⁶)	FlagFlagFlag-tag,	tggtggaataagcttatggactat aaggatgatgatgacaaagatta taaagatgacgacgat	tgctgaattctagactagc ggttgtctccagactt
RKIP ¹²⁷⁻¹⁴⁶	MycMycMyc-tag	tggtggaataagcttatggaaca aaaactaattagtgagaagatc tagaacaaaactaattagtga gaagatctagagcagaagctca tcagcgaggaggacctc	tgctgaattctagactagc ggttgtctccagactt
RKIP ¹²⁷⁻¹⁶⁰	Myc-tag	tggtggaataagcttatggagca gaagctcatcagcgaggagga cctccaggagcagcctctgaac tgt	tgctgaattctagactacag gtggtactctctgcg

2.11 Enzyme

Name	Hersteller
Protein Phosphatase 1	NEB
PKC δ	Merck
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
SuperScript Reverse Transkriptase [®]	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
<i>Thermus aquaticus</i> -DNA-Polymerase (Taq)	Invitrogen
<i>Thermococcus litoralis</i> -DNA-Polymerase (Vent)	New England Biolabs

2.12 Gereinigte Proteine

Bezeichnung	Gewonnen aus	Aufgereinigt von
GRK2	<i>Sf9</i> -Zellen	C. Dees
His ₆ -RKIP	<i>E. coli</i>	K. Deiss
Rhodopsin	Bovine Retina	C. Dees

2.13 Biologisches Material

2.13.1 Prokaryotische Zellen

Bezeichnung	Herkunft	Verwendung
<i>E. coli</i> XL1-blue	Stratagene	Präparative DNA-Aufreinigung
<i>E. coli</i> BL21 pLysS	Novagen	Präparative Proteinaufreinigung

2.13.2 Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Herkunft	Verwendung
HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) transformiert mit Adenovirus Typ 5 (Ad 5)	(Graham <i>et al.</i> 1977)	Immunpräzipitation, chemische Vernetzung von Proteinen, RNA-Isolierung
ROS 17/2.8 Zellen (Osteosarkomzellen der Ratte)	F. Dicker, Pharmakologie	cAMP-Messungen
GFP-β ₂ AR HEK293	C. Krasel, Pharmakologie	β ₂ AR- und ERK-Phosphorylierung

2.13.3 Mauslinien

Bezeichnung	Herkunft	Verwendung
Wildtyp-Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund	Pharmakologie	Chemische Vernetzung von Proteinen, Dephosphorylierung von RKIP in Herzlysaten

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde 1987 von K.B. Mullis zur enzymatischen Vervielfältigung von Nukleotidsequenzen *in vitro* entwickelt (Saiki *et al.* 1988). Eine Weiterentwicklung dieser Methode wurde zur Einführung von Punktmutationen, Deletionen und Affinitätssequenzen mittels Oligonukleotid (*Primer*)-gerichteter Mutagenese verwendet. Hierzu werden vier verschiedene *Primer* benötigt: Ein 5' Ende-*Primer* komplementär zum Anfang der Ausgangs-DNA (5' Ende-Rand-*Primer*) sowie ein 3' Ende-*Primer* komplementär zum Ende der Ausgangs-DNA (3' Ende-Rand-*Primer*). Des Weiteren werden je ein 5' Ende- und ein 3' Ende-*Primer* verwendet, welche teilweise komplementär zur Ausgangs-DNA sind und inmitten dieser komplementären Sequenz die gewünschte Mutation tragen (*mismatch-Primer*). Durch die partielle Komplementarität zur Ausgangs-DNA können diese *Primer* mit der Ausgangs-DNA hybridisieren. Elongiert die DNA-Polymerase diese *Primer*, entsteht ein Gegenstrang mit der gewünschten Mutation, welcher in weiteren PCR-Zyklen vervielfältigt wird. Für die Einfügung einer Mutation mittels *Primer*-gerichteter Mutagenese sind drei PCR-Ansätze erforderlich (**Abb. 7**): Im ersten Ansatz wird die Ausgangs-DNA mit einem 5' Ende-Rand-*Primer* und einem 3' Ende-*mismatch-Primer* amplifiziert und so nach mehreren PCR-Zyklen ein DNA-Fragment angereichert, welches sich vom 5' Ende der Ausgangs-DNA bis zum 3' Ende des *mismatch-Primers* erstreckt (PCR1). In einem zweiten Ansatz wird mit Hilfe des 5' Ende-*mismatch-Primers* und des 3' Ende-Rand-*Primers* ein DNA-Fragment generiert und amplifiziert, welches vom 5' Ende des *mismatch-Primers* bis zum 3' Ende der Ausgangs-DNA reicht (PCR2). In einem dritten Schritt kann nun mit PCR1 und PCR2 als Ausgangs-DNA und den beiden Rand-*Primern* die gesamte DNA mit der gewünschten Mutation synthetisiert und amplifiziert werden, da PCR1 und PCR2 durch ihre partielle Komplementarität hybridisieren, so dass die Polymerase sich anlagern und den DNA-Strang elongieren kann.

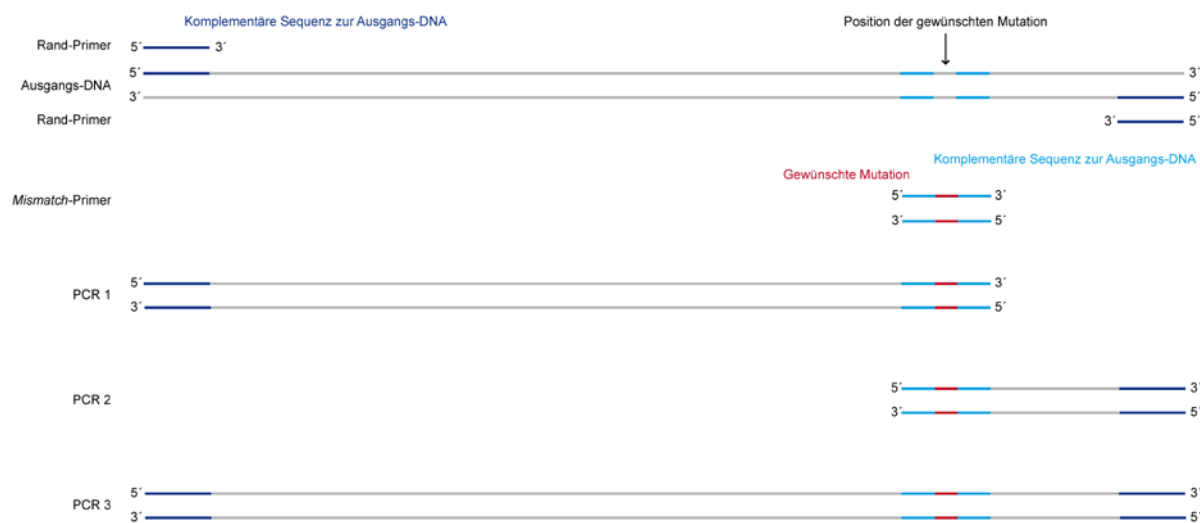


Abb. 7: Das Prinzip der *Primer*-gerichteten Mutagenese.

Primer-gerichtete Mutagenese unter Verwendung von zwei *Rand-Primern* und zwei *mismatch-Primern*. Hierbei wird die gewünschte Mutation durch eine Abfolge von drei verschiedenen PCR eingeführt (nähere Erläuterungen s. Text).

Beispiel für einen PCR-Ansatz (100 μ l)

DNA-Vorlage	1 μ g
5' Ende- <i>Primer</i>	1 μ M
3' Ende- <i>Primer</i>	1 μ M
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	200 μ M
10x Vent-Polymerase-Puffer	10 μ l
Vent	1 μ l (2 U)
H ₂ O	ad 100 μ l

PCR-Schema

	T [$^{\circ}$ C]	t [min]	
Denaturierung	95	3	} 30x
Denaturierung	95	1	
Anlagern der <i>Primer</i>	60	1	
Elongation	72	2	
Elongation	72	7	
Kühlung	4		

3.1.2 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten ist die horizontale Agarosegelelektrophorese. Je nach DNA-Kettenlänge wird die Agarosekonzentration so gewählt, dass eine geeignete Porengröße zur Separierung der synthetisierten DNA-Fragmente resultiert (Sambrook 1989). Die cDNA von RKIP weist eine Länge von etwa 600 Basenpaaren auf, so dass 1 %ige Agarosegele verwendet wurden.

Der PCR-Ansatz wurde mit DNA-Ladepuffer versetzt und eine konstante Spannung (100 V) an das Gel angelegt.

3.1.3 Darstellung von DNA in Agarosegelen

Das Anfärben der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit Ethidiumbromid, das dem Gel zugesetzt (0,5 µg/ml) wurde. Es interkaliert in die Basen der DNA und ist unter UV-Licht als rote Bande zu erkennen, so dass die gewünschten Fragmente ausgeschnitten werden können (Jansohn 2011).

50x Gel-und Laufpuffer (TAE-Puffer)

TRIS-HCl	2 M
Essigsäure, konz.	6 % (m/v)
EDTA	50 mM

5x DNA-Ladepuffer

EDTA	100 mM
Glycerin	50 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 % (m/v)

Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits[®]. Es ermöglicht eine schnelle DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen und auch Abtrennung von Enzymen und DNA Fragmenten kleiner als 70 Basenpaare nach enzymatischen Reaktionen. Nach Aufreinigung wurde die DNA mit 50 µl des im Kit enthaltenen Puffers eluiert.

3.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Um die erhaltene DNA mit dem gewünschten Vektor kovalent zu verknüpfen, wurde zunächst ein Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Diese bakteriellen Enzyme schneiden DNA an bestimmten Stellen, den spezifischen Erkennungssequenzen. Ihre

Entdeckung und Anwendung in der Molekularbiologie erfolgte durch W. Arber, H. Smith und D. Nathans (Arber 1978). Die hier verwendeten Enzyme schneiden den DNA-Doppelstrang dabei versetzt, so dass sogenannte klebrige Enden entstehen, die leichter in der nachfolgenden Ligation mit dem ebenfalls verdauten Vektor rekombiniert werden können. Die Schnittstellen für geeignete Restriktionsenzyme waren dafür durch die PCR mit den *Primern* an das 5'- und 3'-Ende der DNA angefügt worden. Es wurden Restriktionsenzyme gewählt, für die Erkennungssequenzen nur am Ende der zu insertierenden DNA und einmal im Vektor vorlagen. Es wurden der pcDNA3 Vektor (Invitrogen) und die Restriktionsenzyme HindIII und XbaI verwendet. Der Puffer wurde entsprechend den Herstellerangaben der Restriktionsenzyme gewählt.

Beispiel für einen Restriktionsverdauansatz (60 µl)

DNA oder Vektor	20 µl oder 2 µg
BSA (10 mg/ml)	1 µl
10x Restriktionspuffer	6 µl
Restriktionsenzyme	jeweils 1 µl (20 U)
H ₂ O	ad 60 µl

Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Verdaute Vektor-DNA wurde durch Gelelektrophorese, die zu insertierende DNA (*insert*) mit dem QIAquick Gel Extraction Kit[®] aufgereinigt. Für die Elution wurden 30 µl des Elutionspuffers verwendet.

3.1.5 Ligation von DNA

DNA-Ligasen katalysieren die Verknüpfung von DNA-Strängen durch eine Phosphor-Diesterbindung und können so das *insert* mit dem Vektor kovalent verbinden (Sgaramella *et al.* 1970).

Beispiel für einen Ligationsansatz (10 µl)

Vektor	0,5 µl
<i>Insert</i>	3 µl
1x Ligasepuffer	1 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl (400 U)
H ₂ O	ad 10 µl

Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend zur Transformation verwendet.

3.1.6 Transformation kompetenter *E. coli*

Transformation bezeichnet das Einbringen von DNA in kompetente Bakterien. Dies kann unter anderem durch einen kurzen sogenannten Hitzeschock (Huff *et al.* 1990) oder durch Inkubation mit einem geeigneten Puffer erfolgen (Hanahan 1983).

3.1.6.1 Transformation durch Hitzeschock

100 µl kompetente Bakterien wurden hierzu mit 2 µg DNA gemischt und für 50 sec bei 42 °C in einem Thermocycler (Eppendorf) inkubiert. Dabei entstehen Poren in der Membran, durch die DNA in die Zelle gelangt und so ins Genom integriert werden kann. Anschließend wurde der Ansatz kurz auf Eis gekühlt, mit 900 µl *lysogeny broth* (LB)-Medium versetzt und für 50 min bei 37 °C inkubiert. 50 µl der Bakteriensuspension wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml) ausplattiert und diese weitere 15 h bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium

Pepton aus Casein	1,6 % (w/v)
Hefe	1 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

Für die Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt und unter Erwärmen gelöst. Vor dem Gießen der Platte wurde das gewünschte Selektionsantibiotikum zugegeben.

3.1.6.2 Chemische Transformation

Hierbei wird ein Puffer mit einer hohen Konzentration an positiven Ionen verwendet. Diese vermindern die Abstoßung der negativ geladenen DNA und der ebenfalls negativ geladenen bakteriellen Zellwand.

Transformationspuffer (KCM-Puffer)

KCl	500 mM
CaCl ₂	150 mM
MgCl ₂	250 mM

Diese Methode wurde verwendet um den Ligationsansatz in Bakterien einzubringen.

Der Transformationsansatz wurde wie folgt hergestellt und inkubiert:

	t [min]	T [°C]
90 µl KCM- Puffer + 10 µl Ligationsansatz +100 µl Bakterien	20	0
	10	23
+ 900 µl LB-Medium	50	37

Anschließend wurden die Bakterien in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) pelletiert (2300 g, 3 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet nach Resuspendierung in einem Rest Überstand auf einer Agarplatte mit geeigneter Antibiotikaresistenz ausplattiert. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 15 h.

3.1.7 Überprüfung der transformierten Kulturen

Da der Vektor bei der Ligation auch ohne das *insert* ligiert werden kann, wurden 10 Kolonien für 5 h in 3 ml LB-Medium angeimpft und diese Kultur mittels PCR auf das Vorhandensein der zu insertierenden DNA überprüft.

Beispiel für einen Kontroll-PCR-Ansatz (50 µl)

Bakterienkultur	5 µl
5'-Primer	0,5 µM
3'-Primer	0,5 µM
dNTP	100 µM
10x Taq-Polymerase-Puffer	5 µl
Taq-DNA-Polymerase	1 µl (1 U)

PCR-Schema

	T [°C]	t [min]	
Denaturierung	95	3	
Denaturierung	95	0,5	} 30x
Anlagern der <i>Primer</i>	60	1	
Elongation	72	1	
Elongation	72	7	
Kühlung	4		

Die einzelnen Ansätze wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (s. 3.1.2).

3.1.8 Präparative Aufreinigung von DNA

LB-Medium wurde wie unter 3.2.1 beschrieben mit einer transformierten Einzelkolonie angeimpft und nach 15 h Inkubation geerntet. Die DNA-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des Plasmid Plus Midi Kits[®] (Quiagen) nach Anweisung des Herstellers. Anschließend wurde die erhaltene DNA-Konzentration bei 260 nm photometrisch am Nanodrop (Thermo Scientific) bestimmt. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} gibt eine Aussage über die Reinheit der DNA und sollte über 1,6 liegen. Werte unter 1,6 deuten auf eine zu starke Verschmutzung mit Proteinen hin (Jansohn 2011). Mittels PCR eingeführte Mutationen wurden stets durch Sequenzierung (Eurofins MWG Operon) überprüft.

3.2 Zellkulturtechniken

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Hierzu wurde eine transformierte Einzelkolonie von einer Agarplatte (s. 3.1.6) oder 1 ml einer Vorkultur in 100 ml LB-Medium unter Zusatz eines geeigneten Selektionsantibiotikums für 15 h bei 37 °C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation in einer Beckmann Avanti Zentrifuge (3400 g, 7 min, 4 °C) geerntet.

3.2.2 Herstellung von transformationskompetenten *E. coli*

Kompetente Bakterien sind in der Lage Plasmid-DNA aufzunehmen. Da *E. coli* keine Gene zur Erkennung und Aufnahme von DNA besitzen, sind sie nicht natürlicherweise kompetent. Durch Behandlung mit z. B. $MgCl_2$ in Kombination mit einem Hitzeschock bei der späteren Transformation können einige *E. coli* Stämme allerdings durch einen noch nicht genau verstandenen Mechanismus kompetent gemacht werden (Hanahan 1983).

Hierzu wurden *E. coli* XL1-Blue oder BL21 Bakterien auf einer Agarplatte ohne Selektionsantibiotikum ausgestrichen und 15 h bei 37 °C inkubiert. 5 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und im Rotationsschüttler erneut 15 h bei 37 °C inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 250 ml LB-Medium bis zu einer Zelldichte von 10^8 /ml (entspricht einer optischen Dichte von 0,4-0,5 E_{600}) angezogen. Die Kultur wurde anschließend pelletiert (5000 g, 10 min, 4 °C, Hettich Rotina 48R) und das Pellet in kaltem Transformationspuffer resuspendiert.

Transformationspuffer, steril gefiltert

PEG 3350 oder 3000	10 % (m/v)
DMSO	5 % (m/v)
MgCl ₂	20 mM
in LB-Medium, pH 6,1-6,5	

Die resuspendierten Bakterien wurden in Portionen zu 500 µl in Mikroreaktionsgefäße überführt, in Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C gelagert.

Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wurde eine Transformation nach der Hitzeschock-Methode wie oben beschrieben mit 100/500 (XL1-Blue/BL21) pg DNA durchgeführt. Anschließend wurde die Transformationseffizienz ermittelt (Transformationseffizienz=Anzahl von Kolonien/µg transformierter DNA). Eine Negativkontrolle ohne DNA wurde mitgeführt um eine Kontamination auszuschließen.

3.2.3 Eukaryotische Zellkultur von permanenten Zelllinien**3.2.3.1 Kryokonservierung von Zellen**

Zur Langzeitlagerung von Zellen werden diese eingefroren und können dann in flüssigem Stickstoff bei -196 °C für Jahre aufbewahrt werden. Hierzu wird ein Einfriermedium verwendet, dem spezielle Kryoprotektiva, wie z.B. Glycerin oder DMSO, zugesetzt werden. Diese Substanzen vermindern Gefrierschäden auf Grund von Eiskristallen und Lösungseffekten wobei der genaue Schutzmechanismus nicht bekannt ist (Schmitz 2009). Ein weiterer protektiver Effekt wird durch die Verwendung einer höheren Konzentration an fetalem Kälberserum (FCS) erreicht.

Einfriermedium

Medium	70 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)
FCS	20 % (v/v)

Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsiniert, in etwas Medium resuspendiert und die Zellsuspension in einem Falcon zentrifugiert (110 g, 3 min, RT, Hettich Rotina 48R). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 3 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellzahl betrug etwa 10⁶ Zellen pro ml. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt und dieses für etwa 2 h bei -20 °C und über Nacht bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in Stickstofftanks überführt.

3.2.3.2 Auftauen von Zellen

Die in Kryoröhrchen in Stickstoff gelagerten Zellen wurden durch Erwärmen der Kryoröhrchen unter fließendem Wasser schnell aufgetaut, resuspendiert und in 10 ml des jeweiligen Zuchtmediums überführt. Die Zellsuspension wurde in einem Falcon zentrifugiert (110 g, 3 min, RT, Hettich Rotina 48R) und der Überstand abgesaugt, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO für die Zellen toxisch ist (Schmitz 2009). Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Petrischale überführt.

3.2.3.3 Kultur von Zellen

Die Zelllinien HEK293 wurden in Petrischalen bei 37 °C und 7 % CO₂ in DMEM mit 0,45 % (m/v) Glukose gezogen, unter gleichen Bedingungen mit Zusatz von Selektionsantibiotikum wurden die stabilen GFP-β₂AR-HEK293-Zellen kultiviert. ROS-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM/F12 gezogen. Allen Medien wurden zugesetzt:

Bezeichnung	Konzentration	Zweck
FCS	10 % (v/v)	Enthält wachstumsfördernde Komponenten wie Aminosäuren, Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine, Vitamine.
Glutamin	2 mM	Aminosäure mit dem höchsten Stickstoffanteil, wird von schnell wachsenden Zellen zur Deckung des Energiebedarfs benötigt.
Penicillin / Streptomycin	10.000 U / 10 mg/ml	Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen.

Zur Passagierung konfluent gewachsener Zellen wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit PBS-Puffer gewaschen. Um die adhärent wachsenden Zellen abzulösen, kann eine Protease wie Trypsin verwendet werden, da Zelladhäsion durch Proteoglykane vermittelt wird. Um das Trypsinieren zu beschleunigen, wurde eine Trypsin-EDTA (0,05/0,02 % in PBS-Puffer)-Lösung verwendet. EDTA komplexiert zweiwertige Ionen wie Calcium und Magnesium, die Adhäsionproteine stabilisieren und beschleunigt so das Ablösen der Zellen (Schmitz 2009). Nach einer Einwirkzeit von etwa 30 sec wurde die Reaktion mit dem dreifachen Volumen frischen serumhaltigen Mediums abgestoppt, die Zellen resuspendiert und im Verhältnis 1:5 über zwei Tage passagiert.

3.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus einer Glasplatte mit einem eingezätzten Liniennetz definierter Tiefe. Durch Auflegen eines Deckgläschens entsteht eine Kammer mit einem definierten Volumen. Eine Suspension der zu zählenden Zellen wird seitlich an das Deckgläschen pipettiert, so dass sie durch Kapillarkräfte in die Kammer gesaugt wird. Unter dem Mikroskop können dann mit Hilfe des Gitters die Zellen gezählt werden. Durch Multiplikation mit einem Kammer-spezifischen Faktor erhält man die Zellzahl pro ml der Zellsuspension.

3.2.4 Transfektionsmethoden

3.2.4.1 Chemische Transfektion

Die chemischen Transfektionsmethoden für Plasmid-DNA sind eine Weiterentwicklung einer bereits 1958 angewandten Technik zur Steigerung der Infektiosität viraler DNA (Alexander *et al.* 1958). Eine der bekanntesten Methoden ist die Calciumphosphat-Transfektion (Chen & Okayama 1987). Hierbei wird die DNA zuerst mit einer Calciumchlorid-Lösung gemischt und sodann unter Schütteln Phosphat-Puffer dazugegeben. Es wird vermutet, dass die entstehenden DNA-Calciumphosphat-Co-Präzipitate Phagozytose induzieren und dadurch in die Zelle aufgenommen werden (Loyter *et al.* 1982). Diese Methode wurde angewandt zur Transfektion von HEK293-Zellen.

Beispiel für einen Transfektionsansatz (9 cm Petrischale)

H ₂ O	450 µl
2,5 M CaCl ₂	50 µl
DNA	5-10 µg
2x BBS-Puffer	500 µl

2x BBS-Puffer (pH 6,95)

N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure	50 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM

3.2.4.2 Lipofektion

Um ROS-Zellen zu transfizieren, wurde die Methode der Lipofektion angewendet (Felgner *et al.* 1987). Dabei werden kationische Lipide benutzt. Diese binden negativ geladene DNA,

wobei DNA und Liposomen so eingesetzt werden müssen, dass eine positive Nettoladung verbleibt. Vermutlich binden diese Komplexe an negativ geladene Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche, wobei der genaue Aufnahme-Mechanismus nicht bekannt ist (Jansohn 2011).

Für die Transfektion mit Lipofektamin LTX[®] (Invitrogen) wurden ROS-Zellen auf 9 cm Petrischalen kultiviert. Pro Schale wurden 2,5 ml OptiMEM[®] (Invitrogen) mit 12,5 µg DNA und 12,5 µl PlusTM[®] vermischt und für 5 min inkubiert. Daraufhin wurden 37,5 µl Lipofektamin LTX[®] dazugegeben, erneut gemischt und für 30 min inkubiert. Das Gemisch wurde unter Schwenken der Platte auf die Zellen pipettiert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Zellysaten

Die Zellen wurden entweder mit Hilfe von detergentzhaltigen Puffern oder durch mechanische Zerkleinerung aufgebrochen.

3.3.1.1 Zellyse mit detergentzhaltigen Puffern

Das Medium wurde abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit PBS-Puffer gewaschen. Pro 3,5/9 cm Petrischale wurden 400/1000 µl eiskalter Lyse- oder RIPA (*Radioimmuno-precipitation assay*)-Puffer mit Zusatz von Phosphatase- und Proteaseinhibitoren verwendet. Dies resultierte jeweils in einer Proteinkonzentration von etwa 2 mg/ml.

Lysepuffer

1x TSE-Puffer (pH 7,4)	
Triton X	1 % (v/v)

2x TSE-Puffer, pH 7,4

TRIS-HCl	100 mM
NaCl	600 mM
EDTA	10 mM
NaN ₃	3 mM

RIPA-Puffer

TRIS-HCl, pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P-40	1 % (v/v)
Natriumdeoxycholat	0,5 % (m/v)
SDS	0,1 % (m/v)
EDTA	1 mM

Als Proteaseinhibitoren wurden zugesetzt:

100x Proteaseinhibitormix

Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	0,1 % (w/v)
Benzamidin	25 mM
TRIS, pH 7,4	50 mM

100x PMSF

Phenylmethylsulfonylfluorid in 99% Ethanol	100 mM
---	--------

Als Phosphataseinhibitoren wurden zugesetzt:

10x Phosphataseinhibitormix

NaF	500 mM
Na ₄ P ₂ O ₇	50 mM
Na ₃ VO ₄	10 mM
NaN ₃	3 mM
β-Glycerolphosphat	50 mM (frisch dazugeben)

Die Zellen wurden 10 min auf Eis lysiert, abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation pelletiert (14000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde für die Analyse mittels *Westernblot* verwendet.

3.3.1.2 Zellyse mittels mechanischer Zerkleinerung

Eukaryotische Zellen

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels *Co*-Immunpräzipitation (*Co*-IP) wurde Detergenz-freier Puffer verwendet und die Zellen mechanisch aufgebrochen. Hierzu wurden konfluent gewachsene Zellen in 9 cm Petrischalen nach Absaugen des Mediums in 1 ml eiskaltem PBS-Puffer (versetzt mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren) abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschall (Bandelin Sono Puls HD 200; 3 Stöße bei Cycle 30, Power MS72/D) aufgebrochen und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (14000 g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde für die *Co*-Immunpräzipitation verwendet.

10x PBS-Puffer

NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM
Na ₂ HPO ₄	101 mM

Endogene Proteine in Mausherzen

Mausherzen wurden in 500 µl des jeweiligen Versuchspuffers mit einem Ultrathorax-Stab (Janke & Kunkel) für 25 sec zerkleinert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (14000 x g, 15 min, 4 °C) und der Überstand wurde für weitere Versuche verwendet.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Menge an Gesamtprotein wurde mit dem BCA Protein Assay Kit[®] (Pierce) bestimmt. Grundprinzip der BCA-Reaktion ist die Entstehung einer Komplexverbindung violetter Farbe durch die Reaktion von 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Bicinchoninsäure (BCA)) mit zweiwertigen Kupferionen und dem Protein. Dieser Komplex kann dann photometrisch zur quantitativen Proteinbestimmung bei 562 nm genutzt werden. Die Reagenzien wurden in einer 96-Mikrolochplatte gemischt und mit einem Plattenlesegerät (Molecular Devices) ausgewertet.

3.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

SDS-PAGE

Das negativ geladene Detergenz SDS denaturiert und bindet Proteine in einem konstanten Verhältnis (1 Molekül SDS pro 3 Aminosäuren) so dass SDS-Proteinkomplexe mit einem konstanten Ladungs- zu Masse-Verhältnis entstehen. Diese Komplexe wandern im elektrischen Feld und werden durch den Molekularsiebeffekt eines Polyacrylamid-Gels nach ihrem Molekülradius aufgetrennt. Je nach Größe der zu separierenden Proteine bieten sich unterschiedliche Gelsysteme an (Jansohn 2011).

TRIS-Glycin-SDS-PAGE

Diese Gele sind auch als Laemmli-Gele bekannt (Laemmli 1970) und eignen sich je nach Acrylamid-Gehalt des Trenngels für Proteine von 10-200 kDa. Häufig wird eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Dies bedeutet, dass unterschiedliche Puffer für die Herstellung des Gels und für die Elektrophorese verwendet werden und dass Trenn- und Sammelgel eine unterschiedliche Porengröße aufweisen. Dabei wird ein längeres Trenngel mit einem kurzen Sammelgel zur Konzentrierung der Probe überschichtet.

Ansatz für zwei 12 %ige Acrylamid-Gele der Maße 16 x 18 cm:

Sammelgel (4 % Acrylamid)

Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 30 %/0,8 % (m/v))	3 ml
4x Sammelgelpuffer (0,5 M TRIS (pH 6,8) 0,4 % SDS (m/v))	6 ml
H ₂ O	15 ml
Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung (10 % (m/v))	240 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	24 µl

Trenngel (12 % Acrylamid)

Rotiphorese 30	24 ml
4x Trenngelpuffer (1,5 M TRIS (pH 8,8), 0,4 % SDS (m/v))	15 ml
H ₂ O	21 ml
APS-Lösung (10 % (m/v))	400 µl
TEMED	30 µl

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben mit 4x Auftragspuffer versetzt für 20 min auf 42 °C erhitzt.

4x Auftragspuffer

TRIS-HCl	200 mM (pH 6,8)
Glycerin	40 % (m/v)
β -Mercaptoethanol	20 % (v/v)
SDS	8 % (m/v)
Bromphenolblau	0,05 % (m/v)

Anschließend wurde die obere und die untere Gelkammer mit Gelelektrophoresepuffer gefüllt und die Gele bei konstantem Strom (70 mA/Gel) etwa 2 h laufen gelassen. Es wurde das vertikale Gelelektrophorese-System von Hoefer verwendet.

10x SDS-Gelelektrophoresepuffer

TRIS-HCl	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1 % (m/v)

TRIS-Tricin-SDS-PAGE

Bei Verwendung eines TRIS-Tricin- anstelle eines TRIS-Glycin-Puffers können Proteine unter 10 kDa (Schagger & von Jagow 1987) aufgetrennt werden. Das im Laemmli-System verwendete Glycin wandert im sauren Trenngel so langsam, dass kleine Proteine in der Lauffront zurückgehalten (Stapeln oder *stacking* von Proteinen) und daher nicht aufgetrennt werden. Tricin hat einen niedrigeren pK_a -Wert als Glycin, so dass ein größerer Anteil geladen vorliegt und damit schneller wandert. Dies vermindert das *stacking* von kleinen Proteinen und ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen bis 1 kDa.

Ansatz für zwei 16 %ige Acrylamid-Gele der Maße 16 x 18 cm:

Sammelgel (4 % Acrylamid)

Rotiphorese 30	3,3 ml
Puffer (3 M TRIS-HCl (pH 8,45), 0.3 % (m/v) SDS)	6,2 ml
H ₂ O	13 ml
APS-Lösung (10 % (m/v))	240 µl
TEMED	24 µl

Trenngel (16 % Acrylamid)

Rotiphorese 30	33 ml
Puffer (3 M TRIS-HCl (pH 8,45), 0.3% (m/v) SDS)	20 ml
Glycerin	8 g
APS-Lösung (10 % (m/v))	300 µl
TEMED	25 µl

Bei diesem Gelsystem wurden unterschiedliche Kathoden- und Anodenpuffer verwendet:

10x Kathodenpuffer (pH 8,3)

TRIS-HCl	1 M
Tricin	1 M
SDS	1 % (m/v)

10x Anodenpuffer (pH 8,9)

TRIS-HCl	2 M
----------	-----

3.3.4 Färbung von Proteinen im Gel

Zum Anfärben von Proteingelen kann der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R-250 benutzt werden. Dieser bindet unspezifisch an fast alle Proteine, die Nachweisgrenze liegt bei 400 ng pro Bande (Neuhoff *et al.* 1988). Dazu wurden die Gele für 15 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend für 2 h entfärbt.

Färbelösung

Methanol	40 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blau R-250	0,1 % (m/v)

Entfärbungslösung

Methanol	40 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

3.3.5 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Membranen (*Westernblot*)

Durch erneute Elektrophorese können die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe nach Beendigung des Laufs von dem Gel auf eine proteinbindende Membran transferiert werden. Dieses Verfahren bezeichnet man als *Westernblot* (Burnette 1981). Dabei werden die Proteine durch nicht-kovalente Bindung auf der Membran immobilisiert und können in der nachfolgenden Immundetektion mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Methanol-aktivierbare PVDF-Membranen (Gultekin & Heermann 1988) verwendet und die horizontale Halbtrockenzelle von Biorad. Hierzu wurde die Anoden-Elektrode mit Transferpuffer befeuchtet. Anschließend wurden übereinander drei Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier, die aktivierte Membran, das Gel und erneut drei Lagen getränktes Filterpapier geschichtet. Die Kathoden-Elektrode wurde ebenfalls angefeuchtet und die Anordnung unter Spannung gesetzt (75 min, 15 V).

Transferpuffer

TRIS-HCl	20 mM
Glycin	150 mM
Methanol	20 % (v/v)

3.3.6 Tüpfelblot (*Dotblot*)

Diese Variante ermöglicht eine schnelle Expressionskontrolle von Proteinen ohne vorherige Gelelektrophorese (Hawkes *et al.* 1982). Eine ihrer Hauptanwendungsgebiete ist der Nachweis kleinster Proteinmengen (< 10 fmol). Ferner können sehr kleine Proteine, die beim Transfer die Membran durchdringen oder auch sehr große schwer transferierbare Proteine detektiert werden. Hierzu wurden Zellysate punktförmig mehrmals hintereinander direkt auf die aktivierte Membran pipettiert. Zwischen den einzelnen Applikationen wurde gewartet bis das Lysat angetrocknet war.

3.3.7 Blocken unspezifischer Membranbindungsstellen

Bevor die Membran mit den gewünschten Antikörpern zur Darstellung der gebundenen Proteine inkubiert wurde, wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran für 1 h bei RT mit proteinhaltigen Puffern abgesättigt (Hauri & Bucher 1986). Dies erfolgte bei gegen phosphorylierte Epitope gerichteten Antikörpern mit albuminhaltigem Puffer (Waschpuffer), bei allen anderen Antikörpern mit magermilchhaltigem Blockpuffer (Blockmilch). Obwohl in herkömmlichen Protokollen meist Albuminkonzentrationen von 1-5 % verwendet werden, zeigte sich, dass auch 0,25 % ausreichend sind.

Waschpuffer

Albumin Fraktion V	0,25 % (m/v)
NaCl	150 mM
TRIS-HCl	50 mM (pH 7,4)
Nonidet P40	0,2 % (v/v)

Blockmilch

Milchpulver	5 % (m/v)
NaCl	100 mM
TRIS-HCl	10 mM (pH 7,4)
Tween 20	0,1 % (v/v)

3.3.8 Immundetektion immobilisierter Proteine

Auf der Membran immobilisierte Antigene können mit Antikörpern visualisiert werden, dies bezeichnet man als Immundetektion. Dazu wurde die geblockte Membran in einer Lösung eines anti-Antigen-Antikörpers (primärer Antikörpers, 1. Antikörper) geschwenkt und anschließend nicht gebundener Antikörper nach einer Inkubation von 2 h gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem zweiten Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper (sekundärer Antikörper, 2. Antikörper) inkubiert, der gegen das IgG der Spezies des 1. Antikörpers gerichtet war. Die Membran wurde erneut gewaschen und durch Zugabe einer luminolhaltigen Lösung entwickelt. Die an den 2. Antikörper gebundene Peroxidase katalysiert die Reaktion von Luminol mit Oxidationsmitteln wie H_2O_2 . Hierbei wird über Chemilumineszenz Licht abgegeben, so dass die Position des Antigens schließlich durch Auflegen von Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden kann (Ogata *et al.* 1983). Die Verwendung von zwei Antikörpern bietet den Vorteil, dass mehrere 2. Antikörper an den 1. Antikörper binden können und es so zu einer Signalverstärkung kommt. Außerdem kann

der gegen eine Spezies gerichtete 2. Antikörper für alle 1. Antikörper einer Spezies eingesetzt werden.

Verwendete Puffer bei der Immundetektion

	Phospho-Antikörper	Alle übrigen Antikörper	t [min] (RT)
Blocken in	Waschpuffer	Blockmilch	120
1. Antikörper in	Waschpuffer + NaN ₃ (7 mM)	Blockmilch	120
Waschen mit	Waschpuffer	PBS+0,1 % (v/v) Tween 20	5x je 10
2. Antikörper in	Waschpuffer	Waschpuffer	120
Waschen mit	Waschpuffer	PBS	5x je 10

Herstellung der Entwicklungslösung

Lösung 1a	55 µl <i>p</i> -Cumarsäure (90 mM in DMSO)	Aliquots können bei -20 °C aufbewahrt werden.
Lösung 1b	125 µl Luminol (250 mM in DMSO)	
Lösung 1a+1b	in 12,5 ml TRIS-HCl (100 mM, pH 8,3) lösen	Frisch herstellen
Lösung 2	7,5 µl H ₂ O ₂ (30 % (v/v)) in 12,5 ml TRIS-HCl (100 mM pH 8,3)	Frisch herstellen

Kurz vor Verwendung Lösung 1a+1b mit Lösung 2 mischen und die Membran darin 30 sec inkubieren.

3.3.9 Ablösen der gebundenen Antikörper (*Strippen*)

Um eine Membran nach der Entwicklung mit einem weiteren Antikörper zu analysieren, kann der vorherige Antikörper durch Verwendung eines sauren, SDS-haltigen Puffers (*Stripping-Puffer*) entfernt werden (Jansohn 2011). Hierzu wurde die Membran 2 h bei RT in *Stripping-Puffer* geschwenkt, dreimal mit Wasser gewaschen und anschließend wurden freie Proteinbindungsstellen wieder mit Blockpuffer blockiert.

Stripping-Puffer (pH 2,5)

Glycin	100 mM
SDS	0.1 % (m/v)

3.3.10 Nachweis von Proteinkomplexen durch Co-Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Proteinkomplexen wurde Protein-A-Sepharose verwendet, welche Antikörper bindet und so nach Kopplung an einen geeigneten Antikörper zur Isolierung von Proteinen aus Zellysaten verwendet werden kann. Bildet das immunpräzipitierte Protein Komplexe mit anderen Proteinen, werden diese zusammen mit dem präzipitierten Protein isoliert (*Co-Immunpräzipitation*, (Firestone & Winguth 1990)). *Co-präzipitierte* Proteine können nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese im *Westernblot* detektiert werden. Diese Methode wurde zum Nachweis von RKIP-Komplexen angewandt. Über Nacht wurden dazu pro Probe 8 µl Protein-A-Sepharose mit 0,6 µl (3 µg) anti-Flag-Antikörper in PBS-Puffer gekoppelt. Mit Flag- und Myc-RKIP transfizierte HEK293-Zellen von konfluenten 9 cm Petrischalen wurden wie oben beschrieben durch Ultraschall aufgebrochen und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. 700 µl dieses Zellysates (entsprechend etwa 1,5 mg Gesamtprotein) wurden mit 50 µl gekoppelter Protein-A-Sepharose in PBS-Puffer für 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation verworfen und das Präzipitat fünfmal mit PBS-Puffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit Laemmli-Puffer unter Erwärmen (42 °C für 15 min) eluiert und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Im *Westernblot* wurden RKIP-Komplexe nun mit Hilfe von anti-Myc-Antikörpern nachgewiesen.

3.3.11 Nachweis von Proteinkomplexen durch chemisches Vernetzen (*Cross-linking*)**3.3.11.1 Epitop markierte Proteine in transfizierten HEK293-Zellen**

Proteininteraktionen können auch durch Vernetzung der Proteine und Isolierung der entstandenen Komplexe nachgewiesen werden. Dabei werden Lösungen von nucleophilen Reagenzien wie Formaldehyd oder Imidoester eingesetzt, die mit der primären Aminogruppe der Aminosäure Lysin oder dem N-Terminus des Proteins eine kovalente Bindung bilden. Formaldehyd bietet dabei die Vorteile, dass es nur nah benachbarte Proteine zu vernetzen vermag, gut in Zellen diffundiert, schnell reagiert und preiswert ist (Klockenbusch & Kast 2010).

Konfluente transfizierte Zellen in 9 cm Petrischalen wurden vorsichtig abgeschabt und in 500 µl PBS-Puffer (entsprechend 2 mg Gesamtprotein) aufgenommen. Formaldehyd in PBS-Puffer wurde in einer Endkonzentration von 0,7 % (m/v) zugegeben und die Zellsuspension 7 min bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Die Zellen wurden pelletiert (1700 x g, 3 min, RT) und der Überstand verworfen. Um die Reaktion zu stoppen, wurde 1 ml Glycin (1,25 M in PBS-Puffer) dazugegeben und der Überstand nach Zentrifugation erneut verworfen. Durch Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer wurden die Zellen 30 min bei 4 °C lysiert. Zusätzlich wurde das Lysat mit Ultraschall behandelt um unspezifische Produkte zu minimieren. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (14000 x g, 30 min, 4 °C). und der Überstand zur *Westernblot*-Analyse verwendet.

Herstellung von PFA (Paraformaldehyd)-Lösung (4 % (m/v))

- 8 % (m/v) PFA in PBS-Puffer langsam unter Rühren auf 65 °C erwärmen.
- Wenige Tropfen 0,5 M NaOH dazugeben bis die Lösung klar wird und der pH etwa bei 7,4 liegt.
- Lösung unter Rühren abkühlen.
- Mit PBS-Puffer auf 4 % (m/v) PFA verdünnen.

3.3.11.2 Gereinigte Proteine

15 µM gereinigtes RKIP und 2,5 µM gereinigte GRK2 wurden in einen nicht-nucleophilen Reaktionspuffer gegeben und mit 300 µM Sulfo-ethylenglycol-bis-(succinimidylsuccinat) (sEGS) 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TRIS-Puffer (Endkonzentration 50 mM, pH 7,4) abgestoppt und mittels *Westernblot* analysiert.

Reaktionspuffer (pH 7,4)

HEPES	20 mM
EDTA	2 mM

3.3.11.3 Mausherzen

Herzen von Wildtyp-Mäusen mit C57BL/6 Hintergrund wurden für 3 min mit PBS-Puffer mit oder ohne GFX (1,5 µM) und anschließend mit PFA-Lösung (4 % (m/v) in PBS-Puffer) perfundiert. Das verwendete Volumen betrug jeweils etwa 20 ml. Nach einer Einwirkzeit von 8 min (gemessen ab Beginn der Perfusion mit PFA) wurden die linken Ventrikel dieser Herzen in 3 ml TRIS-Puffer (600 mM in PBS-Puffer (pH 7,4)) und nach weiteren 10 min in 500 µl Lysepuffer (s. 3.3.1.1) überführt. Die Behandlung der Herzen mit einem

Ultrathoraxstab, wie oben beschrieben, erfolgte in Lysepuffer. Für die *Westernblot*-Analyse wurden etwa 100-200 µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen.

3.3.12 Analyse der RKIP-Phosphorylierung in Mausherzen

Um zu überprüfen ob RKIP bereits in unstimulierten Herzen phosphoryliert ist, wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt.

Behandlung von Mausherzen mit PKC-Inhibitor

Herzen von Wildtyp-Mäusen mit C57BL/6 Hintergrund wurden für 3 min mit PBS-Puffer mit oder ohne PKC-Inhibitor GFX (1,5 µM) perfundiert. Das verwendete Volumen betrug jeweils etwa 20 ml. Die linken Ventrikel dieser Herzen wurden in 500 µl Lysepuffer überführt und wie oben beschrieben mittel einem Ultrathoraxstab homogenisiert. Für die *Westernblot*-Analyse wurden etwa 150 µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen.

Behandlung von Mausherzlysaten mit Protein Phosphatase 1

Linke Ventrikel von Wildtyp-Mäusen mit C57BL/6 Hintergrund wurden in Dephosphorylierungspuffer überführt und mit einem Ultrathoraxstab homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (14000 g, 15 min, 4 °C). 100 µg Lysat wurde mit Protein Phosphatase 1 (20 U, 30 min, 30 °C) inkubiert und die Reaktion schließlich mit Laemmli-Puffer abgestoppt.

Dephosphorylierungspuffer (pH 7,5)

HEPES	50 mM
NaCl	100 mM
DTT	2 mM
MnCl ₂	1 mM
□□□□ 35	0,01 %
Aprotinin	50 µg/ml
Leupeptin	50 µg/ml
PMSF	0,5 mM
Benzamidin	1 mM

3.4 Reinigung von His₆-RKIP

Um His₆-RKIP (His-RKIP) in Bakterien zu exprimieren und anschließend aufzureinigen, wurde das pET Expressionssystem verwendet. Dazu wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI die cDNA von Ratten His-RKIP in den pET-3c Vektor (Agilent Technologies) hinter den T7 Promotor kloniert.

Mit diesem Plasmid wurde der *E. coli* Stamm BL21 (Novagen) wie oben beschrieben transformiert. Dieser Bakterien-Stamm trägt das *lacI* gene und die *lacUV5* Promotor kontrollierte T7 RNA Polymerase Expressionskassette. Das *lacI* Gen kodiert für einen Repressor, der die Aktivierung des *lacUV5* Promotors verhindert. Wird nun das der Laktose ähnliche IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) zum Nährmedium der Bakterien zugegeben, bindet es an den Repressor und der *lacUV5* Promotor wird de-reprimiert. Folglich wird T7 RNA-Polymerase exprimiert und damit auch His-RKIP. Proteine mit einer His-Affinitätsgruppe können nach dem Prinzip der immobilisierten Metall Affinitätschromatographie (Hochuli *et al.* 1987) unter Verwendung einer Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose-Säule (Qiagen) aufgereinigt werden. Agarose ist hier als Säulenmatrix an Nitrilotriessigsäure gekoppelt, welche Nickelionen cheliiert. Das Nickelion interagiert mit dem His₆-Protein über die Seitenketten des Histidins und bindet so das Protein reversibel an die Säule. Nach mehreren Waschschritten kann das Protein mit Imidazol eluiert werden, da dieses mit den Histidinresten um die Nickel-Bindungsstellen konkurriert.

Für die präparative Proteinreinigung wurde eine transformierte Einzelkolonie in 10 ml LB-Medium unter Zusatz eines geeigneten Selektionsantibiotikums für 15 h bei 37 °C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 4 ml in 400 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum bis zu einer Zelldichte von 10^8 /ml (entsprechend einer optischen Dichte von 0,4-0,5 E₆₀₀) angezogen. Dann erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 200 μ M). Nach 6 h wurden die Bakterien geerntet (Beckman Avanti J-25; 3400 g, 10 min, 4 °C), das Pellet in Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C gelagert. Am folgenden Tag wurde das Pellet auf Eis aufgetaut und mit 15 ml Puffer 1 resuspendiert. Die Bakterien wurden mit Ultraschall aufgebrochen (Bandelin Sono Puls HD 200; 3x10 Stöße bei Cycle 30, Power MS72/D) und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (Beckman Le-70; 1 h, 165000 g, 4 °C). In der Zwischenzeit wurden leere Chromatographiesäulen (Biorad) mit 1,5 ml Nickel-NTA-Agarose beladen und das Säulenmaterial mehrmals mit Puffer 1 gewaschen. Der Überstand des Bakterienlysats wurde auf die Säule gegeben und das gebundene Protein fünfmal mit 10 ml Puffer 2 und fünfmal mit 10 ml Puffer 3 gewaschen. Anschließend wurde das Protein mit 3 ml Puffer 4 eluiert und das Eluat auf eine mit Puffer 5 äquilibrierte Zentrifugationseinheit (Millipore) gegeben. Durch sechsmaliges Waschen mit Puffer 5 wurde die Imidazolkonzentration von 150 mM auf 150 nM verdünnt. Das gereinigte Protein wurde resuspendiert und die Konzentration photometrisch mit Hilfe des spezifischen Absorptionskoeffizienten von Ratten-RKIP ($\epsilon = 36565$ l/Mol*cm) und des

Molekulargewichtes von RKIP (21 kg/Mol) am Nanodrop bestimmt. Nach Aliquotierung und Schockfrostung in Stickstoff erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

Alle verwendeten Puffer beinhalteten 20 mM TRIS (pH 7,4), 7 mM β -Mercaptoethanol. Die Imidazol- und NaCl-Konzentration wurde folgendermaßen variiert:

	NaCl [mM]	Imidazol [mM]
Puffer 1	300	10
Puffer 2	500	20
Puffer 3	300	20
Puffer 4	300	150
Puffer 5	300	–

3.5 *In vitro* Phosphorylierung von gereinigtem RKIP mit PKC δ

His-RKIP (50 μ M) wurde bei 30 °C mit rekombinanter PKC δ (3 nM; Merck) in PKC-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von PMA (25 μ M) und nach 30 min wurden die Proteine wie unter **3.3.11.2** beschrieben vernetzt.

PKC-Puffer (pH 7,2)

HEPES	20 mM
MgCl ₂	10 mM
CaCl ₂	0,1 mM
β -Mercaptoethanol	3 mM

3.6 Bestimmung der Raf-Aktivität

Um die RKIP-vermittelte Raf-Hemmung zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung der Effektorkinasen ERK1/2 bestimmt, da eine Aktivierung von Raf zu einer sequentiellen Phosphorylierung der Kinasen MEK und ERK führt (**1.2**). Es existieren phosphospezifische Antikörper gegen das phosphorylierte TEY-Motiv von ERK1/2, welches für die Aktivierung dieser Kinasen essentiell ist (Canagarajah *et al.* 1997). Für diese Analyse wurden mit dem β_2 AR stabil transfizierte HEK293-Zellen verwendet, die auch zur Bestimmung der GRK2-Aktivität in Zellen verwendet worden waren (**3.7.1**). Die Zellen wurden auf 3,5 cm Petrischalen kultiviert und unter Verwendung der Calciumphosphat-Methode (s. **3.2.4.1**) transient mit Myc-RKIP-Konstrukten oder leerem Vektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium durch serumfreies Medium ersetzt, um eine FCS-vermittelte RKIP-Phosphorylierung zu verringern. 36 h nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wie unter **3.3.1.1** beschrieben mit RIPA-Puffer lysiert. Die Lysate

wurden unter Verwendung eines anti-phospho-ERK1/2- und eines anti-ERK1/2-Antiköpers mittels *Westernblot* analysiert.

3.7 Methoden zur Bestimmung der GRK2-Aktivität

3.7.1 Bestimmung der β_2 AR-Phosphorylierung in Zellen

Nach Aktivierung des β_2 ARs wird dieser durch GRK2 phosphoryliert (Benovic *et al.* 1986), so dass aus dem Ausmaß der Phosphorylierung GRK2-spezifischer Phosphorylierungsstellen direkt auf die GRK2-Aktivität rückgeschlossen werden kann. Hierzu wurde ein phospho-spezifischer Antikörper verwendet, der gegen ein Peptid des β_2 ARs gerichtet ist, das die GRK2-Phosphorylierungsstelle S355/S356 einschließt (phospho- β_2 AR (S355/356)).

Um eine gleichmäßige Rezeptorexpression in allen Zellen zu gewährleisten, wurden mit GFP- β_2 AR stabil transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Diese Zellen wurden auf 3,5 cm Petrischalen kultiviert und unter Verwendung der Calciumphosphat-Methode transient mit GRK2 und entweder RKIP-Konstrukten oder leerem Vektor *co*-transfiziert um so das Ausmaß der RKIP-vermittelten GRK2-Hemmung bestimmen zu können. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium durch serumfreies Medium ersetzt, um eine bessere Stimulierbarkeit der Rezeptoren zu erreichen. 36 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Isoprenalin (1 μ M, 5 min) stimuliert, das Medium abgesaugt und die Zellen wie unter **3.3.1.1** beschrieben mit RIPA-Puffer lysiert. Die Lysate wurden unter Verwendung des anti-phospho- β_2 AR (S355/356)-Antikörpers und eines anti-GFP-Antikörpers mittels *Westernblot* analysiert. Dabei diente der GFP-Antikörper der Kontrolle einer gleichen Rezeptormenge in den Proben, da keine spezifischen Antikörper für die Detektion des β_2 AR bekannt sind (Hamdani & van der Velden 2009).

3.7.2 Bestimmung der Rhodopsin-Phosphorylierung mit gereinigten Proteinen

Der Rhodopsin-Rezeptor ist ein GPCR, der durch Licht aktiviert wird. Er wird unter physiologischen Bedingungen von GRK1 phosphoryliert (Weller *et al.* 1975) und *in vitro* ebenfalls von GRK2 (Benovic *et al.* 1986). Da sich Membranen mit einem sehr hohen Rhodopsingehalt in ausreichender Menge und Reinheit präparieren lassen (Wilden & Kuhn 1982), wird dieser Rezeptor traditionell zur *in vitro* Bestimmung der GRK2-Aktivität eingesetzt.

Membranen mit Rhodopsin wurden von C. Dees aus Kuhaugen präpariert. Bovine GRK2 wurde in mit Baculoviren-transfizierten Insektenzellen exprimiert und von C. Dees durch SP- und Heparin-Sepharose-Chromatographie gereinigt (Kim *et al.* 1993). His-RKIP wurde wie unter 3.4 beschrieben aufgereinigt. In insgesamt 50 μ l GRK2-Puffer wurden im abgedunkelten Raum unter Rotlicht GRK2 (5 nM), Rhodopsin (400 nM), [γ - 32 P] ATP (50 μ M) und His-RKIP (3 μ M) vorsichtig gemischt. Anschließend wurde der Rezeptor mit Weißlicht aktiviert und somit die GRK2-vermittelte Rezeptorphosphorylierung induziert. Die Reaktion wurde nach 10 min durch Zugabe von Laemmli-Puffer gestoppt. Die in Rhodopsin inkorporierte Radioaktivität wurde nach Gelelektrophorese der Proben durch Autoradiographie bestimmt.

GRK2-Puffer (pH 7,2)

HEPES	20 mM
EDTA	2 mM

3.7.3 Messung von cAMP nach Aktivierung des Parathormon-Rezeptors

Der Parathormon-Rezeptor (PTHr) ist ein GPCR, der sowohl G_s als auch G_q aktiviert. Die Bestimmung der sekundären Botenstoffe cAMP oder IP_3 nach Stimulation mit PTH liefert indirekt eine Aussage über die Aktivität von GRK2, da diese auch die Signaltransduktion des PTHR durch Phosphorylierung beendet (Dicker *et al.* 1999).

cAMP wurde in Zelllysaten durch *Radioimmunoassay* (RIA) bestimmt (Steiner *et al.* 1972). Dabei werden immobilisierte cAMP-Antikörper in Röhrchen mit dem Lysat in Gegenwart von einer bekannten Menge radioaktiv markierten cAMP inkubiert. Nach Absaugen des Ansatzes kann über Messung der gebundenen Radioaktivität auf die cAMP-Konzentration der Probe geschlossen werden. In dieser Arbeit wurde das cAMP-RIA-Kit von Immunotech verwendet. Es beinhaltet anti-cAMP-Antikörper beschichtete Röhrchen, einen Dilutionspuffer, cAMP-Standards und 125 I-markiertes cAMP.

Zur Durchführung des Versuchs wurden transfizierte ROS-Zellen auf 6-Lochplatten kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen pro Loch in 1 ml RIA-Puffer inkubiert. Die Hälfte der Löcher wurde mit PTH (30 nM, 5 min, 37 °C) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mit 100 μ l $HClO_4$ (20 % (v/v)) lysiert und nach 15 min in Reaktionsgefäße überführt. Durch Zugabe eines vorher ermittelten Volumens KOH (1 M, etwa 470 μ l) wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt. Unlösliche Bestandteile wurden

abzentrifugiert (14000 x g, 5 min, RT) und das geklärte Lysat 1:11 mit dem mitgelieferten Dilutionspuffer verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden in die beschichteten Röhrchen überführt und mit 500 µl der radioaktiven cAMP-Lösung vermischt. Nach Inkubation (18 h, 4 °C) wurde das Gemisch abgesaugt und die gebundene Radioaktivität im Gamma-Zähler gemessen. Durch Mitführung von cAMP-Standards wurde mit Hilfe eines semi-logarithmischen Kurvenanpassungsprogramms eine Standardkurve erstellt und die cAMP-Konzentration der Probe ermittelt.

RIA-Puffer (pH 7,3)

NaCl	137 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1 mM
KCl	5 mM
HEPES	15 mM

3.8 Weitere Methoden

3.8.1 Nachweis von RNA mittels Reverser Transkriptase (RT) PCR

Mit Hilfe des SV Total RNA Isolation System[®] (Promega) wurde aus transfizierten HEK293-Zellen RNA nach Anweisung des Herstellers RNA isoliert. Diese wurde anschließend mit dem Superscript First-Strand Synthesis System[®] (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben und mittels PCR amplifiziert. PCR-Produkte wurden mit Ethidiumbromid in Agarosegelen unter UV-Licht dargestellt. Myc-*getaggte* RKIP-Fragmente wurden durch Verwendung folgender *Primer*-Paare detektiert:

5'-Ende-*Primer* für Myc-RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ und Myc-RKIP¹⁻²⁰: gagcagaagctcatcagcaggaggacctc;

3'-Ende-*Primer* für Myc-RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶: tgctgaatttctagactagcggttgctccagactt;

3'-Ende-*Primer* für Myc-RKIP¹⁻²⁰: tgctgaatttctagactagggcggtcctccacctc.

Die *Primer*-Anlagerungstemperatur betrug 65 °C, alle anderen Parameter waren wie unter **3.1.1** beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 PKC-vermittelte Phosphorylierung von RKIP an S153 induziert RKIP/RKIP-Dimerisierung

Als ein möglicher regulatorischer Mechanismus der Interaktion von RKIP mit Raf1 und GRK2 wurde eine phosphorylierungsregulierte Oligomerisierung von RKIP in Betracht gezogen. Diese Hypothese wurde mit Hilfe einer *Co*-Immunpräzipitation untersucht. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit Flag- und Myc-Epitop-markiertem RKIP transfiziert (im Folgenden als Flag- und Myc-RKIP bezeichnet; wenn nichts anderes angegeben ist, ist hierunter Wildtyp-RKIP zu verstehen). Bei einer möglichen Komplexbildung von RKIP würden, neben anderen Kombinationsmöglichkeiten, Komplexe zwischen Flag- und Myc-RKIP entstehen. Durch Immunpräzipitation der Komplexe mit anti-Flag-Antikörpern und nachfolgende *Westernblot*-Analyse von *co*-präzipitiertem Myc-RKIP ließen sich mögliche Komplexe nachweisen.

Um die Phosphorylierung von RKIP durch PKC zu induzieren und so eine mögliche phosphorylierungsabhängige Oligomerisierung zu untersuchen, wurden die Zellen vor der Immunpräzipitation mit dem PKC-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 5 min stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Anschließend wurde das Zelllysate mit Protein-A-Sepharose inkubiert, an die anti-Flag-Antikörper gebunden war. Um eine unspezifische Interaktion von Myc-RKIP mit der Protein-A-Sepharose auszuschließen, wurden Zelllysate mit Protein-A-Sepharose (ohne anti-Flag-Antikörper) inkubiert (Kontrolle). Nach mehreren Waschschritten wurden die gebundenen Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und im *Westernblot* detektiert. Unter Basalbedingungen war nur eine äußerst schwache immunreaktive Myc-Bande zu erkennen, deren Intensität nach PKC-Stimulation deutlich zunahm (**Abb. 8**). Dies lässt darauf schließen, dass RKIP nur nach PKC-Aktivierung einen ausreichend stabilen Komplex bildet.

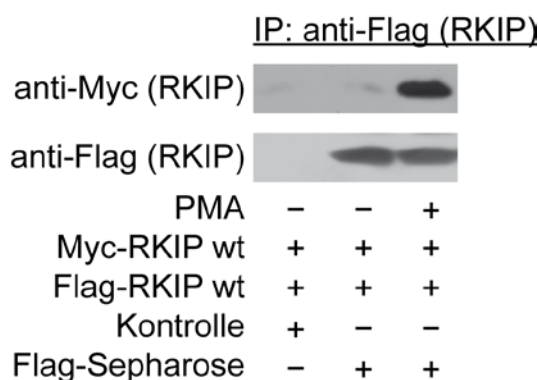


Abb. 8: RKIP oligomerisiert nach PKC-Stimulation.

Flag-RKIP wurde von HEK293-Zelllysaten immunpräzipitiert (IP) und *co*-präzipitiertes Myc-RKIP mit anti-Myc-Antikörpern im Immunoblot detektiert. Transfizierte RKIP-Konstrukte und Phorbol-12-myristat-13-acetat-Stimulation (PMA; 1 μ M, 5 min) sind angegeben. Zelllysate wurden entweder mit ungekoppelter Sepharose (Kontrolle) oder mit an anti-Flag-Antikörper gekoppelter Sepharose (Flag-Sepharose) inkubiert. (Alle in dieser Arbeit abgebildeten Immunoblots zeigen, sofern nicht anders angegeben, ein repräsentatives Ergebnis von $n \geq 3$ Versuchen.)

Um sicherzustellen, dass tatsächlich die PKC-vermittelte Phosphorylierung von RKIP für die beobachtete Komplexbildung verantwortlich ist, wurde eine phosphorylierungsdefiziente Mutante von RKIP, RKIP^{S153A}, verwendet. Bei dieser Mutante war die PKC-Phosphorylierungsstelle S153 zu Alanin mutiert, so dass diese kein Substrat mehr für PKC darstellt (Corbit *et al.* 2003; Lorenz *et al.* 2003). Mit dieser Mutante wurde weder unter basalen Bedingungen noch nach PKC-Stimulation eine Oligomerisierung beobachtet (**Abb. 9**).

Wenn die Zellen zusätzlich zu Flag- und Myc-RKIP mit Raf1 und GRK2 transfiziert wurden, zeigte sich, dass die Oligomerisierung von RKIP nach Stimulation von PKC gleichzeitig mit der bereits bekannten Dissoziation von RKIP und Raf1 und der Assoziation von RKIP mit GRK2 erfolgte (**Abb. 9**, Corbit *et al.* 2003; Lorenz *et al.* 2003). Dies war nach PKC-Stimulation und Präzipitation von Flag-RKIP an einer geringeren Menge an *co*-präzipitiertem Raf1 und einer größeren Menge an *co*-präzipitiertem Myc-RKIP und GRK2 im Vergleich zu Basalbedingungen zu erkennen.

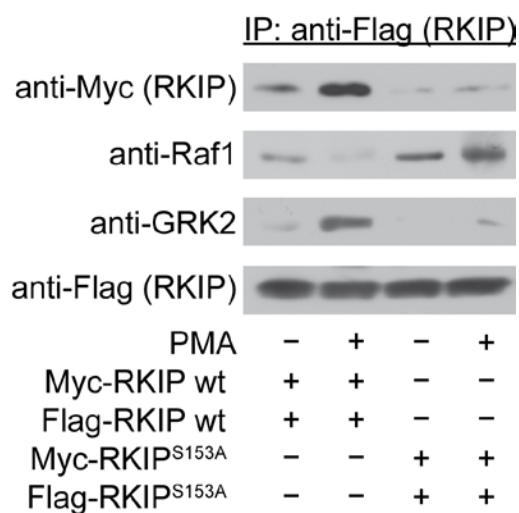


Abb. 9: Die PKC-vermittelte RKIP-Oligomerisierung geht einher mit der Dissoziation von RKIP und Raf1 und der Assoziation von RKIP und GRK2.

Flag-RKIP wt oder Flag-RKIP^{S153A} wurde von HEK293-Zelllysaten immunpräzipitiert (IP) und *co*-präzipitiertes Myc-RKIP wt oder Myc-RKIP^{S153A}, Raf1 und GRK2 im Immunoblot detektiert. Die verwendeten transfizierten RKIP-Konstrukte und Phorbol-12-myristat-13-acetat-Stimulation (PMA; 1 μ M, 5 min) sind angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Um zu verifizieren, dass PMA tatsächlich die Phosphorylierung von RKIP an S153 induziert, wurden die Zelllysate mit einem phosphospezifischen anti-RKIP-Antikörper (pRKIP(S153)) im *Westernblot* analysiert. Dabei ergaben nur die Lysate der Zellen, welche mit PMA stimuliert und mit Wildtyp-RKIP (im Folgenden als RKIP wt bezeichnet) transfiziert worden waren, ein starkes pRKIP(S153)-immunreaktives Signal (**Abb. 10**).

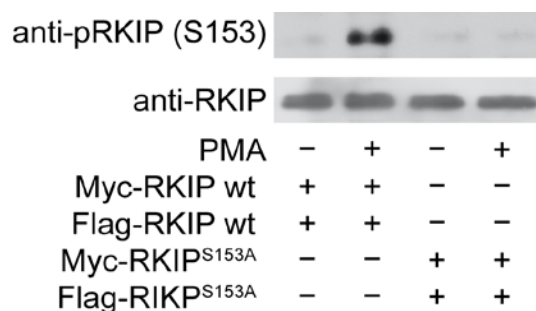


Abb. 10: PMA-Behandlung führt zur Phosphorylierung von RKIP an S153.

Gezeigt ist eine Immunoblotanalyse der in **Abb. 9** verwendeten Zellysate mit anti-pRKIP(S153)- bzw. anti-RKIP-Antikörpern. Transfizierte RKIP-Konstrukte und Phorbol-12-myristat-13-acetat-Stimulation (PMA; 1 μ M, 5 min) sind angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Da Oligomerisierung von Proteinen durch hohe Proteinkonzentrationen begünstigt werden kann (Marianayagam *et al.* 2004), wurde das Expressionsniveau dieser RKIP-Konstrukte im Vergleich zum endogenen RKIP überprüft (**Abb. 11**).

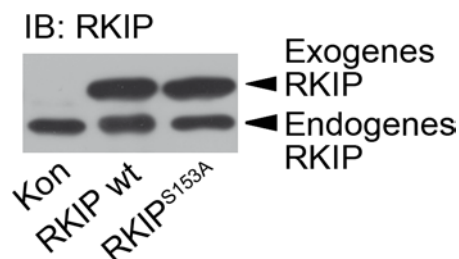


Abb. 11: Die Expression von exogenem Wildtyp-RKIP, RKIP^{S153A} und endogenem RKIP ist vergleichbar.

Die Abbildung zeigt eine Immunoblotanalyse der Expression von exogenem und endogenem RKIP unter Verwendung von anti-RKIP-Antikörpern. Als Kontrolle (Kon) wurden mit leerem Vektor transfizierte Zellen verwendet. Pfeile markieren die jeweiligen Banden von exogenem und endogenem RKIP. Deren Zuordnung ist möglich, da das exogene RKIP durch eine Antikörperaffinitätssequenz von 8 bzw. 10 Aminosäuren (Flag- bzw. Myc-tag) ein höheres Molekulargewicht besitzt als endogenes RKIP und deswegen im Gel langsamer wandert (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Es zeigte sich, dass die Expression des exogenen RKIP in etwa der des endogenen RKIP entsprach und die RKIP-Expression somit physiologischen Bedingungen nahe kam. Ein Artefakt durch Überexpression konnte deshalb weitestgehend ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass PKC-vermittelte Phosphorylierung von RKIP an S153 zur Oligomerisierung von RKIP führt, zur Dissoziation von RKIP und Raf1 und zur Assoziation von RKIP mit GRK2.

Die für die Detektion der RKIP/RKIP-Komplexe gewählte Methode der *Co*-Immunpräzipitation erlaubt keine Aussage über die Größe der beobachteten Komplexe. Deswegen wurden Versuche mit Protein-vernetzenden Substanzen (*Cross-linker*) durchgeführt. Nach Auftrennung der erhaltenen Komplexe mittels Gelelektrophorese und anschließendem *Westernblot* können anhand ihrer molekularen Größe beispielsweise Dimere von Oligomeren höherer Ordnung unterschieden werden. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit Myc-RKIP transfiziert und mit PMA stimuliert oder unbehandelt belassen, um das Ausmaß der phosphorylierungsinduzierten Oligomerisierung von RKIP zu untersuchen. Die Zellen wurden dann für einige Minuten mit einer Lösung des *Cross-linkers* Formaldehyd inkubiert und anschließend lysiert. Formaldehyd ist zellpermeabel und kann so Proteinkomplexe in intakten Zellen vernetzen. Nach PKC-Stimulation zeigte sich für Wildtyp-RKIP ein starker Anstieg einer immunreaktiven Bande von etwa 42 kDa. Dies entspricht der molekularen Masse von RKIP-Dimeren (**Abb. 12**). Oligomere höherer Ordnung wurden weder nach Inkubation mit Formaldehyd, welches nur nah benachbarte Proteine vernetzt, noch nach Verwendung von *Cross-linkern* mit einem längeren Abstand der reaktiven Gruppen beobachtet (Daten nicht gezeigt und **Abb. 12**).

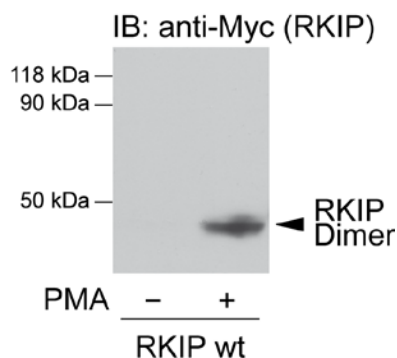


Abb. 12: RKIP-Komplexe bestehen aus Dimeren und nicht aus Oligomeren höherer Ordnung.

Cross-linking-Versuche in HEK293-Zellen, die mit Myc-RKIP transfiziert worden waren. Die Zellen wurden mit Phorbol-12-myristat-13-acetat stimuliert (PMA; 1 μ M, 5 min) wie angegeben und mit Formaldehyd-Lösung inkubiert (PFA; 0.75 % (w/v), 7 min). Die Zelllysate wurden mittels Immunoblot unter Verwendung eines anti-Myc-Antikörpers auf RKIP-Komplexe untersucht. Molekulare Größenstandards und die Bande von dimerem RKIP sind angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Unphosphoryliertes RKIP und RKIP^{S153A} hingegen zeigte nur eine geringe Tendenz zur Dimerisierung, was auf eine schwache RKIP/RKIP-Interaktion unter Basalbedingungen schließen lässt (**Abb. 12** und **Abb. 13**). In diesen Versuchen zeigte sich eine – verglichen zu der Dimerbande (21 kDa) –sehr prominente Monomerbande (21 kDa) (**Abb. 13**). Dies könnte

zwar darauf hindeuten, dass nur ein kleiner Anteil von RKIP als Dimer vorliegt. Allerdings ist das Ergebnis von Vernetzungsversuchen stark von den gewählten Vernetzungsbedingungen wie zum Beispiel Proteinkonzentration, Konzentration des Vernetzers, Inkubationszeit und -temperatur abhängig (Klockenbusch & Kast 2010) und das tatsächliche Monomer/Dimer-Verhältnis ist schwer zu bestimmen (Nooren *et al.* 2003). Da in Zellen das Verhältnis von RKIP zu GRK2 als größer als 10:1 bestimmt wurde, könnte auch eine unvollständige RKIP-Dimerisierung von funktioneller Bedeutung für die Interaktion mit GRK2 sein.

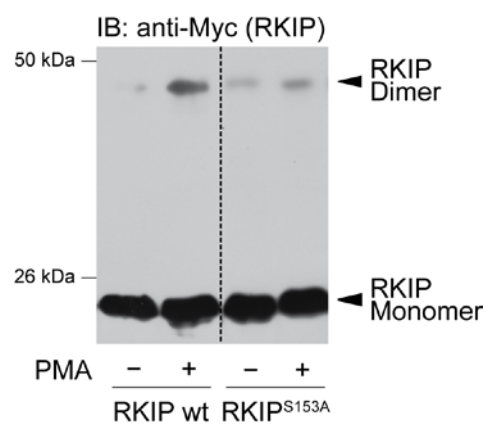


Abb. 13: Phosphoryliertes RKIP dimerisiert stärker als unphosphoryliertes oder phosphorylierungsdefizientes RKIP.

Cross-linking-Versuche in HEK293-Zellen, die mit Myc-RKIP wt oder der phosphorylierungsdefizienten RKIP-Mutante RKIP^{S153A} transfiziert worden waren. Die Zellen wurden wie angegeben mit Phorbol-12-myristat-13-acetat stimuliert (PMA; 1 μ M, 5 min) und anschließend mit Formaldehyd-Lösung vernetzt (PFA; 0.75 % (w/v), 7 min). Zellysate wurden mittels Immunoblot unter Verwendung eines anti-Myc-Antikörpers auf RKIP-Komplexe untersucht. Molekulare Größenstandards und die jeweiligen Banden von monomerem und dimerem RKIP sind angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Da die RKIP/RKIP-Interaktion bisher nur im zellulären Kontext gezeigt worden war, war nicht klar, ob es sich um eine direkte Interaktion handelt. Um dies zu untersuchen, wurde gereinigtes His₆-RKIP (im Folgenden als His-RKIP bezeichnet) unter Verwendung von rekombinanter PKC δ *in vitro* phosphoryliert und anschließend mit Formaldehyd-Lösung vernetzt. Auch unter diesen Bedingungen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Dimerisierung nach PKC-Stimulation (**Abb. 14**). Dies weist darauf hin, dass die RKIP/RKIP-Interaktion direkt ist und durch PKC δ -Phosphorylierung induziert wird. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Lorenz *et al.* überein, die zeigten, dass RKIP *in vitro* von PKC α und δ phosphoryliert wird, wohingegen Corbit *et al.* RKIP als Substrat von PKC α , β , γ und ζ charakterisierten (Corbit *et al.* 2003; Lorenz *et al.* 2003).

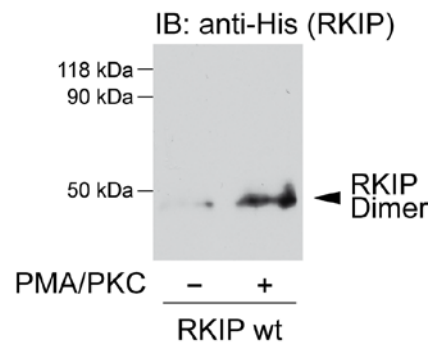


Abb. 14: Die RKIP/RKIP-Interaktion ist direkt.

Gereinigtes His-RKIP wurde ohne oder mit rekombinanter Proteinkinase (PKC) ζ und Phorbol-12-myristat-13-acetat inkubiert (PMA; 25 μ M, 30 min, 30 $^{\circ}$ C) und anschließend mit Formaldehyd-Lösung (PFA; 0.6 % (w/v), 10 min) vernetzt. Proteinkomplexe wurden mittels Immunoblot unter Verwendung eines anti-His-Antikörpers auf die Anwesenheit von RKIP-Komplexen untersucht. Molekulare Größenstandards und die Bande von dimerem RKIP sind angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Die bisherigen Versuche zeigen, dass RKIP nach PKC-induzierter Phosphorylierung an S153 dimerisiert. Um zu bestimmen, ob beide RKIP-Moleküle für die Dimerisierung phosphoryliert vorliegen müssen, wurden *Co*-Immunpräzipitationsversuche mit Flag-RKIP wt oder Flag-RKIP^{S153A} und Myc-RKIP wt durchgeführt. Im Gegensatz zu Flag-RKIP wt war Flag-RKIP^{S153A} nicht in der Lage nach PKC-Stimulation an Myc-RKIP wt zu binden (**Abb. 15**). Dies impliziert, dass nur zwei phosphorylierte RKIP-Moleküle dimerisieren können.

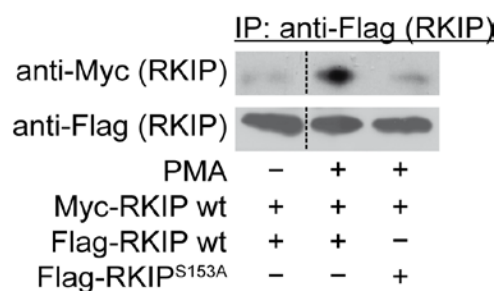


Abb. 15: Zur Bildung von RKIP-Dimeren sind zwei phosphorylierte RKIP-Moleküle notwendig.

HEK293-Zellen wurden mit Myc- und Flag-RKIP wt oder mit Myc-RKIP wt und der phosphorylierungsdefizienten RKIP-Mutante Flag-RKIP^{S153A} transfiziert. Flag-RKIP wt oder Flag-RKIP^{S153A} wurden immunpräzipitiert und *co*-präzipitiertes Myc-RKIP im Immunoblot detektiert. Die jeweils transfizierten RKIP-Konstrukte und Phorbol-12-myristat-13-acetat Stimulation (PMA; 1 μ M, 5 min) sind angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Es wurde somit gezeigt, dass unphosphoryliertes RKIP als Monomer vorliegt, während ein Teil des phosphorylierten RKIP eine direkte Interaktion eingeht und dimerisiert. Außerdem wurde gezeigt, dass unphosphoryliertes RKIP mit Raf1 interagiert, phosphoryliertes RKIP aber mit GRK2. Dies deutet darauf hin, dass RKIP als Monomer mit Raf1 interagiert. Da nach Phosphorylierung sowohl monomeres als auch dimeres RKIP zu existieren scheint, ist nicht klar, ob GRK2 mit phosphoryliertem monomerem oder dimerem RKIP interagiert.

4.2 Die Mutante RKIP^{SK153/7EE} imitiert die Eigenschaften von S153-phosphoryliertem RKIP

Um den Einfluss der Phosphorylierung auf die Dimerisierung und die spezifische Interaktion von RKIP mit Raf1 und GRK2 weiter zu untersuchen, sollte eine phosphomimetische Mutante generiert werden, welche die PKC-vermittelte Phosphorylierung von S153 imitiert. Die physikochemischen und geometrischen Veränderungen, die aus der Übertragung einer Phosphatgruppe auf eine Serin- oder Threoninseitenkette resultieren, können in einigen Fällen durch den Austausch der phospho-Akzeptor-Aminosäure gegen Glutamat oder Aspartat imitiert werden (Tarrant & Cole 2009). Es war allerdings bereits bekannt, dass die Mutanten RKIP^{S153D} und RKIP^{S153E} nicht die erwartete verminderte Bindung an Raf1 (Corbit *et al.* 2003) und vermehrte Bindung an GRK2 zeigen (Lorenz *et al.*, unveröffentlichte Daten). Da eine Phosphatgruppe zweifach negativ geladen ist, entstand die Idee, eine weitere negative Ladung in RKIP^{S153E} einzuführen. Zunächst wurden in RKIP^{S153E} ein oder zwei zusätzliche Glutamatreste zwischen die Position 153/154 eingeführt (RKIP^{SF153/4EEE}, RKIP^{SF153/4EEEE}).

Diese Mutanten präzipitierten jedoch unspezifisch. Da die Phosphorylierungsstelle S153 in einer α -Helix liegt, wurde schließlich vermutet, dass es auf Grund der Helixwindung sinnvoll sein könnte, eine zweite negative Ladung in Position 157 einzubringen (RKIP^{SK153/7EE} (im Folgenden RKIP^{SK/EE} genannt)), da eine Windung einer α -Helix aus ca. vier Aminosäuren besteht (Cohen & Perry 1986). Somit würden die negativen Glutamatreste in 153 und in 157 eine ähnliche Orientierung auf der Oberfläche des Proteins besitzen (**Abb. 16**).

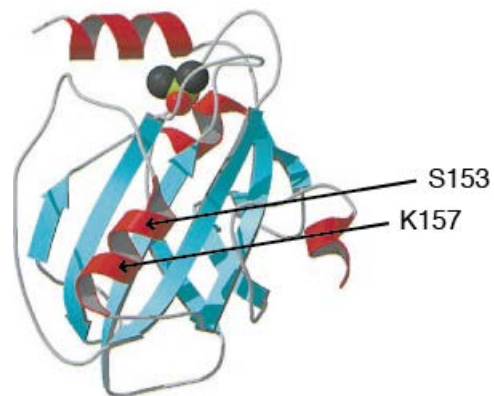


Abb. 16: Position der in RKIP^{SK153/7EE} mutierten Aminosäuren in der Struktur von humanem RKIP. Die Position der in RKIP^{SK153/7EE} mutierten Aminosäuren S153 und K157 sind mit Pfeilen markiert. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck aus *Structure*, Vol 6, MJ Banfield, JJ Barker, ACF Perry, RL Brady, Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction, Pages 1245–1254, Copyright (1998), with permission from Elsevier.

Durch *Co*-Immunpräzipitationsversuche von Flag-RKIP^{SK/EE} mit Raf1 oder GRK2 konnte gezeigt werden, dass RKIP^{SK/EE} tatsächlich phosphomimetische Eigenschaften besitzt, da RKIP^{SK/EE} unter basalen Bedingungen Raf1 weniger gut und GRK2 besser als Wildtyp-RKIP *co*-immunpräzipitierte (**Abb. 17**).

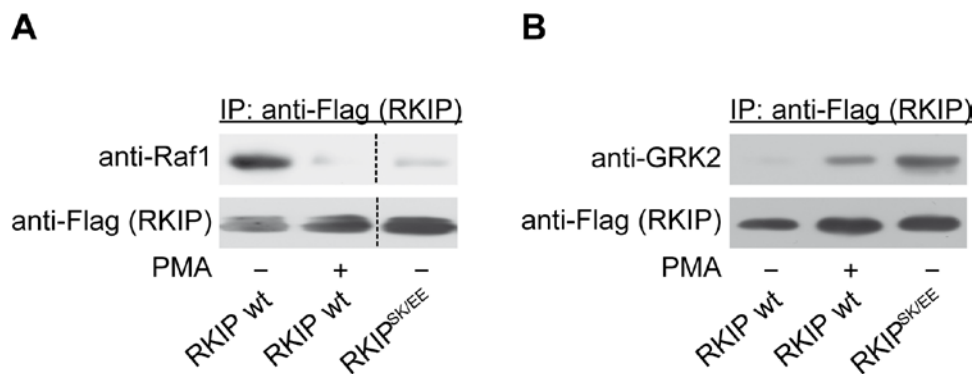


Abb. 17: Die Mutation der Aminosäuren 153 und 157 zu Glutamat imitiert die Eigenschaften von phosphoryliertem RKIP bezüglich der RKIP/Raf1-Dissoziation und RKIP/GRK2-Assoziation.

Immunpräzipitation (IP) von Flag-RKIP wt oder der phosphomimetischen RKIP-Mutante RKIP^{SK153/7EE} (RKIP^{SK/EE}) in Lysaten von HEK293-Zellen und nachfolgende Immunoblotanalyse von *co*-präzipitiertem Raf1 (A) oder GRK2 (B) mit den angegebenen Antikörpern. Die jeweils transfizierten RKIP-Konstrukte und die Phorbol-12-myristat-13-acetat Stimulation (PMA; 1 μ M, 5 min) sind angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Da phosphoryliertes RKIP nicht nur von Raf1 dissoziiert und GRK2 bindet, sondern auch dimerisiert (4.1), wurde untersucht, ob dies auch für RKIP^{SK/EE} zutrifft. *Co*-Immunpräzipitationsexperimente mit Flag- und Myc-RKIP^{SK/EE} sowie *Cross-linking*-Experimente mit Myc-RKIP^{SK/EE} in Abb. 18 zeigten, dass phosphomimetisches RKIP bereits ohne PKC-Stimulation eine ähnliche oder sogar stärkere Neigung besitzt, Dimere zu bilden als phosphoryliertes Wildtyp-RKIP. Dies zeigte sich nach Vernetzung nicht nur durch eine stärkere Dimerbande (42 kDa), sondern auch durch eine im Vergleich zu Wildtyp-RKIP geringere Menge von monomeren (21 kDa) RKIP^{SK/EE} (Abb. 18).

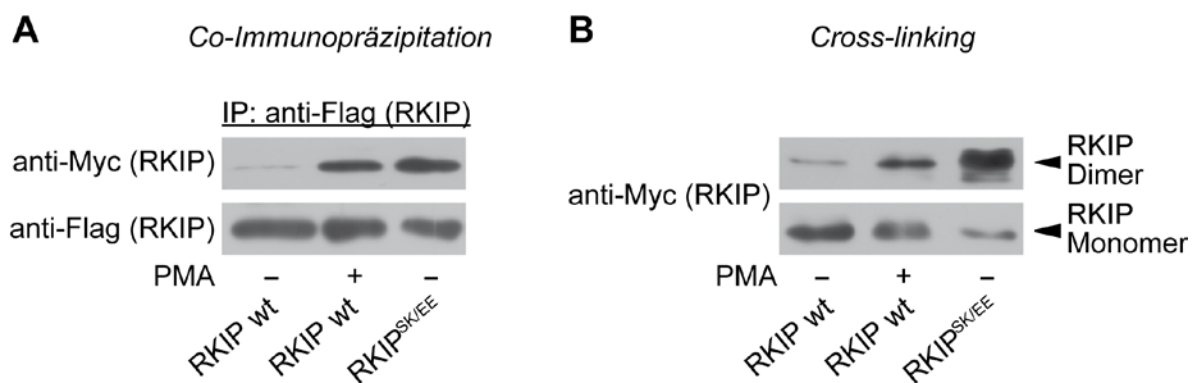


Abb. 18: Phosphomimetisches RKIP, RKIP^{SK/EE}, dimerisiert auch in Abwesenheit von einem PKC-Stimulus.

A, HEK293-Zellen wurden mit phosphomimetischem oder Flag-RKIP wt und Myc-RKIP transfiziert. Flag-RKIP wurde immunpräzipitiert und *co*-präzipitiertes Myc-RKIP mit einem anti-Myc-Antikörper im Immunoblot analysiert. **B**, HEK293-Zellen wurden mit Myc-RKIP wt oder RKIP^{SK/EE} transfiziert, mit Phorbol-12-myristat-13-acetat stimuliert (PMA; 1 μ M, 5 min) und mit Formaldehyd-Lösung inkubiert (0.75 % (w/v), 7 min). Zelllysate wurden mittels Immunoblot unter Verwendung eines anti-Myc-Antikörpers auf die Anwesenheit von RKIP-Komplexen untersucht. Die untere Abbildung in **B** zeigt einen Film mit kürzerer Belichtung. Die jeweils transfizierten RKIP-Konstrukte und Phorbol-12-myristat-13-acetat-Stimulation (PMA; 1 μ M, 5 min) sind angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Die Expression der RKIP-Konstrukte in **Abb. 18** erfolgte in physiologischen Mengen (**Abb. 19**), so dass eine artifizielle, konzentrationsabhängige Dimerbildung weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

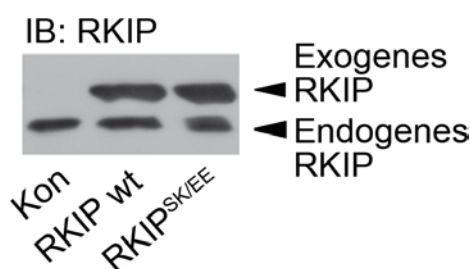


Abb. 19: Die Expression von exogenem Wildtyp-RKIP und RKIP^{SK/EE} sind mit den endogen exprimierten RKIP-Mengen vergleichbar.

Gezeigt ist eine Immunoblotanalyse der Expressionsmengen von exogenem und endogenem RKIP mit einem anti-RKIP-Antikörper. Als Kontrolle (Kon) wurden mit leerem Vektor transfizierte Zellen verwendet. Pfeile markieren die jeweiligen Banden von exogenem und endogenem RKIP (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Einführung von Glutamat in Position 153 und 157 von RKIP die Phosphorylierung von RKIP an S153 sowohl in Bezug auf die Raf1- und GRK2-Bindungseigenschaften als auch hinsichtlich der RKIP-Dimerisierung imitiert.

4.3 Experimentelle Ansätze zur Generierung einer monomeren RKIP-Mutante

Verschiedene experimentelle Ansätze zur Generierung einer monomeren RKIP-Mutante sind im Rahmen dieser Studie verfolgt worden. Zunächst wurde versucht, durch Deletion verschiedener Aminosäuren im Bereich der langen Schleife auf der Oberfläche von RKIP (Aminosäure 127-150, s. **Abb. 20**) eine monomere RKIP-Mutante zu generieren. Diese Schleife wurde in der Arbeit von Banfield *et al.*, in der RKIP-Dimere in der Kristallstruktur von humanem RKIP beobachtet wurden, als mögliche RKIP/RKIP-Interaktionsfläche vorgeschlagen (Banfield *et al.* 1998).

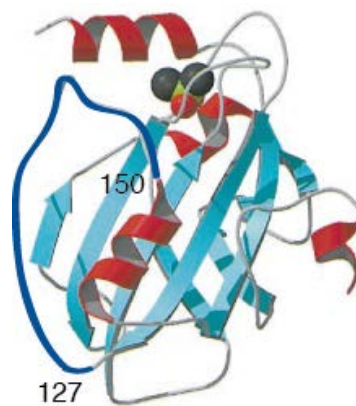


Abb. 20: Putative Dimerinteraktionsfläche (Aminosäure 127-150) in humanem RKIP.

Struktur von humanem RKIP. Die Aminosäuren 127 bis 150 sind blau markiert. Diese Schleife wurde von Banfield *et al.* als mögliche RKIP/RKIP-Interaktionsfläche vorgeschlagen. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck aus *Structure*, Vol 6, MJ Banfield, JJ Barker, ACF Perry, RL Brady, Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction, Pages 1245–1254, Copyright (1998), with permission from Elsevier.

Um die Bedeutung dieser Region für die phosphorylierungsinduzierte Dimerisierung von RKIP näher zu untersuchen, wurde versucht, mittels Mutation dieser Region eine dimerisierungsdefiziente Mutante zu generieren: Zunächst wurden jeweils 2, 4, oder 6 konsekutive Aminosäuren und schließlich auch die gesamte Schleife deletiert. Dabei wurden in einzelnen Mutanten folgende Aminosäuren (AS) deletiert: [127-130, [128-131, [129-132, [129-134, [131-134, [135-138, [135-140, [139-142, [141-146, AS 143-144, [143-146, [145-146 und [127-146. In einem weiteren Ansatz wurden einige geladene Aminosäuren der Schleife gegen Alanine ausgetauscht (RKIP^{KDRK141/144/146/148AAAA}). Viele dieser Mutanten konnten nicht auf ihr Dimerisierungs-

verhalten getestet werden, da sie entweder schlecht exprimiert waren oder unspezifisch präzipitierten (Daten nicht gezeigt). Deswegen wurde mit Hilfe von C. Kisker ein RKIP-Dimer simuliert und Aminosäuren identifiziert, die bei einer Dimerisierung interagieren könnten. Diese Aminosäuren wurden so ausgetauscht, dass eine elektrostatische Abstoßung der RKIP-Mutanten resultieren sollte. Hierzu wurden folgende Mutanten generiert: $\text{RKIP}^{\text{T101E}}$, $\text{RKIP}^{\text{E105R}}$ und $\text{RKIP}^{\text{TE101/105ER}}$. Schließlich wurde auch die C-terminale α -Helix (AS 176-187) und das N-terminale HCNP-Peptid (AS 1-12) deletiert, um einen Einfluss dieser Regionen auf die Dimerisierung von RKIP zu überprüfen. Keine dieser Mutanten zeigte eine verminderte Dimerisierungstendenz.

4.4 Die Deletionsmutante $\text{RKIP}^{\Delta 143-146}$ dimerisiert und bindet GRK2 phosphorylierungsunabhängig



Abb. 21: Ungefähre Position der in $\text{RKIP}^{\Delta 143-6}$ deletierten Aminosäuren in der Struktur von humanem RKIP.

Struktur von humanem RKIP. Die in $\text{RKIP}^{\Delta 143-6}$ deletierten Aminosäuren sind mit einem orangenen Kreis markiert. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck aus *Structure*, Vol 6, MJ Banfield, JJ Barker, ACF Perry, RL Brady, Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction, Pages 1245–1254, Copyright (1998), with permission from Elsevier.

Eine der in 4.3 beschriebenen Deletionsmutanten ($\text{RKIP}^{\Delta 143-6}$, **Abb. 21**) mit einer Deletion von vier Aminosäuren am C-terminalen Ende der Schleife wies interessanterweise bereits unter basalen Bedingungen eine verstärkte Tendenz zur Dimerisierung auf. Dies wurde wie bei der phosphomimetischen Mutante sowohl in *Co*-Immunpräzipitations- als auch in *Cross-linking*-Experimenten beobachtet. Zusätzlich zu der verstärkten Dimerisierung interagierte die Mutante auch unter basalen Bedingungen deutlich mit GRK2 (**Abb. 22**).

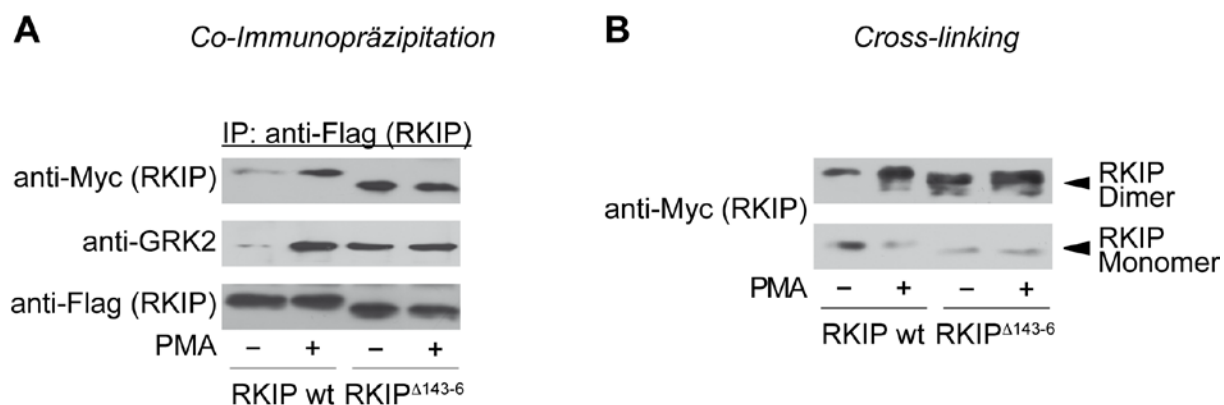


Abb. 22: RKIP mit einer Deletion der Aminosäuren 143-146 (RKIP^{Δ143-6}) hat eine verstärkte Neigung zur Dimerisierung und GRK2-Bindung.

A, HEK293-Zellen wurden mit Flag-RKIP wt oder Flag-RKIP^{Δ143-6} und GRK2 transfiziert. Die Zellen wurden mit PMA stimuliert (PMA; 1 μ M, 5 min) und lysiert. Flag-RKIP wurde immunpräzipitiert und *co*-präzipitiertes Myc-RKIP und GRK2 wurden mittels Immunoblotanalyse nachgewiesen. **B**, Gezeigt sind *Cross-linking*-Versuche in HEK293-Zellen, die mit Myc-RKIP wt oder RKIP^{Δ143-6} transfiziert worden waren. Die Zellen wurden wie angegeben mit Phorbol-12-myristat-13-acetat stimuliert (PMA; 1 μ M, 5 min) und mit Formaldehyd-Lösung inkubiert (0.75 % (w/v), 7 min). Zelllysate wurden mittels Immunoblot unter Verwendung eines anti-Myc-Antikörpers auf die Anwesenheit von RKIP-Komplexen untersucht. Die untere Abbildung in **B** zeigt einen Film mit kürzerer Belichtung. Die jeweils transfizierten RKIP-Konstrukte und Phorbol-12-myristat-13-acetat Stimulation sind angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Des Weiteren zeigte RKIP^{Δ143-6} – im Vergleich zu Wildtyp-RKIP – nur eine sehr schwache Interaktion mit Raf1 (**Abb. 23**).

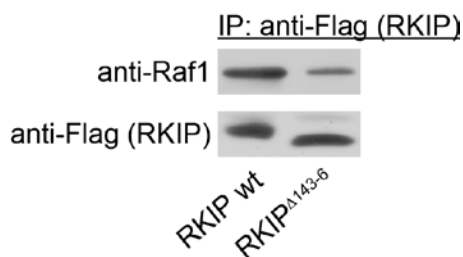


Abb. 23: RKIP mit einer Deletion der Aminosäuren 143-146 interagiert schwächer mit Raf1 als Wildtyp-RKIP.

HEK293-Zellen wurden mit Flag-RKIP wt oder Flag-RKIP^{Δ143-6} und Raf1 transfiziert. Flag-RKIP wurde immunpräzipitiert und *co*-präzipitiertes Raf1 wurde mittels Immunoblotanalyse nachgewiesen. (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Auch bei diesen Versuchen entsprach die Expression des exogenen RKIP in etwa der des endogenen RKIP (**Abb. 24**).

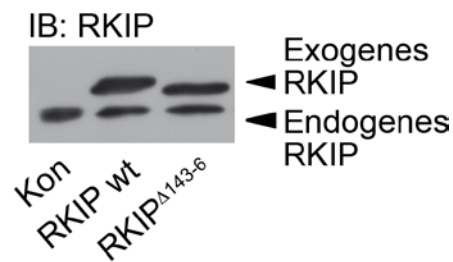


Abb. 24: Die Expressionsmengen von exogenem Wildtyp-RKIP, RKIP^{Δ143-6} und endogenem RKIP sind vergleichbar.

Immunoblotanalyse der Expressionsmengen von exogenem und endogenem RKIP mit einem anti-RKIP-Antikörper. Als Kontrolle (Kon) wurden Zellen mit leerem Vektor transfiziert. Pfeile markieren die jeweiligen Banden von exogenem und endogenem RKIP (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Diese Versuche zeigen, dass die Deletion der Aminosäuren 143-146 in der von Banfield *et al.* vorgeschlagenen Dimerinteraktionsfläche 127-150 die Dimerisierung von RKIP sogar begünstigt. Zudem führt die Deletion der Aminosäuren 143-146 in RKIP zu einer verstärkten Interaktion der resultierenden Mutante mit GRK2 und einer verminderten Interaktion mit Raf1.

Um sicherzustellen, dass die Eigenschaften der Deletionsmutante RKIP^{Δ143-6} nicht durch einen veränderten Phosphorylierungsstatus verursacht wurden, wurde die Phosphorylierung der Mutante überprüft. Eine Immunoblotanalyse mit phosphospezifischen RKIP-Antikörpern (pRKIP(S153)) von Lysaten transfizierter Zellen ließ tatsächlich eine verstärkte Phosphorylierung von RKIP^{Δ143-6} sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach PKC-Stimulation erkennen (**Abb. 25**).

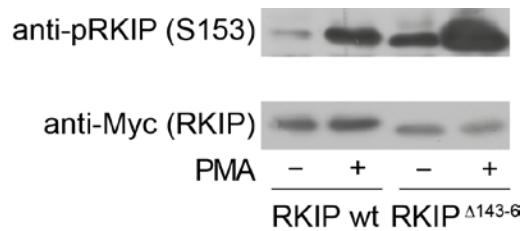


Abb. 25: RKIP mit einer Deletion der Aminosäuren 143-146 ist sowohl unter Basalbedingungen als auch nach PKC-Stimulation stärker phosphoryliert als Wildtyp-RKIP.

Die in **Abb. 22** verwendeten Zellysate wurden mit einem phosphospezifischen RKIP-Antikörper (anti-pRKIP(S153)) auf ihren Phosphorylierungsstatus überprüft. Ein anti-Myc-Antikörper diente der Kontrolle vergleichbarer Expressionsmengen von Wildtyp-RKIP und RKIP $\Delta 143-6$. In der Abbildung ist angezeigt, welche RKIP-Konstrukte transfiziert wurden und wann mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; 1 μ M, 5 min) stimuliert wurde (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

In nachfolgenden Versuchen wurde untersucht, ob die verstärkte Dimerisierung und die verstärkte Interaktion von RKIP $\Delta 143-6$ und GRK2 tatsächlich durch die verstärkte Phosphorylierung dieser Mutante zu erklären ist. Um die Phosphorylierung der Deletionsmutante zu verhindern, wurde in der RKIP $\Delta 143-6$ Mutante die PKC-Phosphorylierungsstelle zu Alanin mutiert. Da diese Mutante (RKIP $\Delta 143-6/S153A$) wie auch weitere Mutanten mit Aspartat (RKIP $\Delta 143-6/S153D$) oder Glutamat (RKIP $\Delta 143-6/S153E$) anstelle von S153 unspezifisch präzipitierten (Daten nicht gezeigt), wurde ein neuer Ansatz gewählt. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit Flag- und Myc-RKIP $\Delta 143-6$ transfiziert und vor der Immunpräzipitation entweder 2 h mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (GFX) oder für 5 min mit dem PKC-Aktivator PMA behandelt. Die Behandlung mit GFX inhibierte die Phosphorylierung von RKIP $\Delta 143-6$ nahezu komplett (**Abb. 26**).

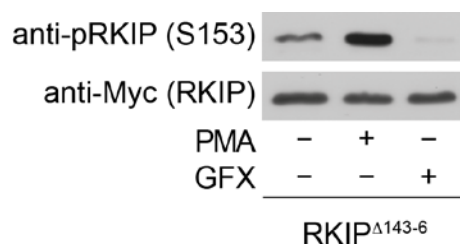


Abb. 26: Die Phosphorylierung von RKIP^{Δ143-6} an S153 kann durch einen PKC-Inhibitor gehemmt werden.

HEK293-Zellen wurden mit Myc-RKIP^{Δ143-6} transfiziert und entweder mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (GF109203X, GFX; 3 μM, 2 h) oder mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; 1 μM, 5 min) behandelt und lysiert. Zur Detektion der Phosphorylierung wurden ein phosphospezifischer RKIP-Antikörper (anti-pRKIP(S153)) und zur Kontrolle der Expressionsmengen ein anti-Myc-Antikörper verwendet. In der Abbildung ist angegeben, welche Proben mit PMA oder mit GFX behandelt wurden (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Durch Immunpräzipitation von Flag-RKIP^{Δ143-6} und nachfolgende Detektion von *co*-präzipitiertem Myc-RKIP oder GRK2 mittels *Westernblot* zeigte sich, dass die verstärkte Dimerisierung und GRK2-Bindung unabhängig von der verstärkten Phosphorylierung von RKIP^{Δ143-6} war, da weder die Dimerisierung noch die Interaktion mit GRK2 nach GFX- oder PMA-Behandlung verändert war (**Abb. 27**).

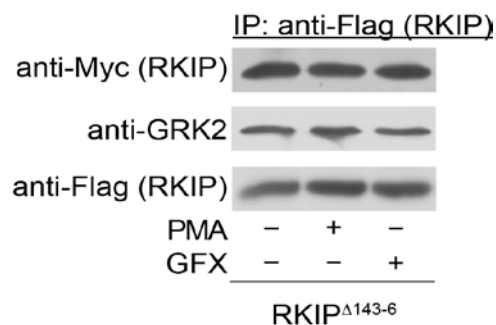


Abb. 27: Dimerisierung und GRK2-Bindung von RKIP^{Δ143-6} sind phosphorylierungsunabhängig.

HEK293-Zellen wurden mit Flag- und Myc-RKIP^{Δ143-6} und mit GRK2 transfiziert. Flag-RKIP wurde immunpräzipitiert und *co*-immunpräzipitiertes Myc-RKIP^{Δ143-6} und GRK2 im Immunoblot detektiert. Die Zellen wurden wie angegeben entweder mit dem PKC-Inhibitor (GFX; 3 μM, 2h) oder mit dem PKC-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; 1 μM, 5 min) behandelt (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Diese Versuche zeigen, dass RKIP mit einer Deletion der Aminosäuren 143-146 phosphorylierungsunabhängig stärker dimerisiert als Wildtyp-RKIP. Da auch eine verstärkte Interaktion mit GRK2 gezeigt werden konnte, scheint nicht die Phosphorylierung sondern die

Dimerisierung von RKIP wichtig für die Dissoziation des RKIP/Raf1-Komplexes und die Assoziation von RKIP mit GRK2 zu sein.

4.5 Die Dimerisierung von RKIP ist essentiell für die RKIP/GRK2-Interaktion

Abgesehen von der phosphorylierungsdefizienten RKIP-Mutante RKIP^{S153A} war die Generierung einer Monomermutante nicht erfolgreich gewesen. Eine solche Mutante hätte zeigen können, ob es die Phosphorylierung und/oder die Dimerisierung von RKIP ist, welche über die Interaktion von RKIP mit Raf1 oder GRK2 entscheidet. Um diese Frage zu klären, wurde schließlich folgende Strategie gewählt: Wenn die in **4.3** beschriebene Schleife von RKIP tatsächlich die Interaktionsfläche des Dimers darstellt, könnte ein Peptid bestehend aus dieser Schleife die Dimerisierung von RKIP kompetitiv inhibieren. Um diese Hypothese zu testen, wurden HEK293-Zellen erneut mit Flag- und Myc-RKIP und GRK2 transfiziert und *Co*-Immunpräzipitationsexperimente wie in **4.1** beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen zusätzlich mit dem Peptid Myc-RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ (RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶) oder mit leerem Vektor (Kon) *co*-transfiziert wurden. Tatsächlich hemmte dieses Peptid effektiv die phosphorylierungsinduzierte Dimerisierung von RKIP. Mit diesem Peptid konnte infolgedessen nun untersucht werden, ob die Hemmung der RKIP-Dimerisierung die RKIP/GRK2-Interaktion beeinflusst. Interessanterweise hemmte das Peptid die RKIP/GRK2-Interaktion (**Abb. 28**).

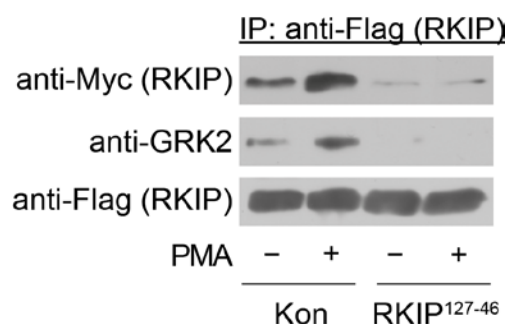


Abb. 28: Die Dimerisierung und GRK2-Bindung von RKIP wird durch das Peptid RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ gehemmt.

HEK293-Zellen wurden mit Flag- und Myc-RKIP, GRK2 und entweder mit leerem Vektor (Kon) oder mit dem RKIP-Fragment RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ *co*-transfiziert. Zellen wurden wie angegeben mit Phorbol-12-myristat-13-acetat zur Aktivierung von PKC (PMA, 1 μ M, 5 min) behandelt und lysiert. Flag-RKIP wurde immunpräzipitiert und *co*-immunpräzipitiertes Myc-RKIP und GRK2 wurden mit den angegebenen Antikörpern im Immunoblot visualisiert (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Dies deutet daraufhin, dass eine Hemmung der RKIP-Dimerisierung zu einer Hemmung der RKIP/GRK2-Interaktion führt und somit die Dimerisierung essentiell für die RKIP/GRK2-Interaktion sein könnte.

Um eine Hemmung der RKIP/GRK2-Interaktion durch eine Myc-RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶-vermittelte Hemmung der RKIP-Phosphorylierung ausschließen zu können, wurde der Phosphorylierungsstatus von RKIP mit einem anti-pRKIP(S153)-Antikörper im *Westernblot* überprüft. Wie in **Abb. 29** gezeigt, hemmte das Peptid die S153-Phosphorylierung von RKIP jedoch nicht. Auch die Expression von Myc-RKIP war nicht vermindert (**Abb. 29**).

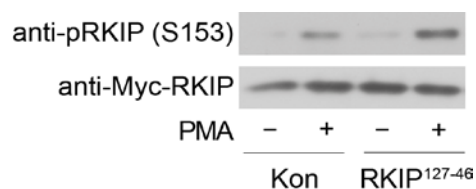


Abb. 29: Die Expression von RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von RKIP an S153.

Gezeigt ist eine Immunoblotanalyse der in **Abb. 28** verwendeten Zelllysate mit anti-pRKIP(S153)-Antikörpern zur Detektion des Phosphorylierungsstatus und mit anti-Myc-Antikörpern zur Überprüfung einer gleichmäßigen RKIP-Expression in den zu vergleichenden Proben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Da durch die Überexpression von RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ nur die RKIP/GRK2-Bindung gehemmt wurde, nicht aber die RKIP/Raf1-Interaktion (**Abb. 30**), geben diese Versuche einen weiteren

Hinweis darauf, dass die Dimerisierung von RKIP über seine Interaktion mit Raf1 oder GRK2 entscheidet.

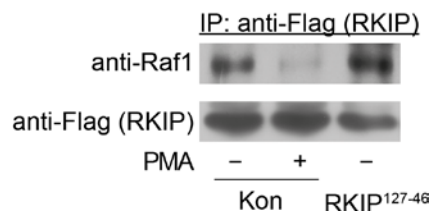


Abb. 30: Die Expression von RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ hat keinen Einfluss auf die RKIP/Raf1-Interaktion.

Immunpräzipitation (IP) von Flag-RKIP wt aus Zellen, die mit Flag-RKIP und Raf1 und entweder mit leerem Vektor (Kon) oder mit dem RKIP-Fragment RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ *co*-transfiziert worden waren. Zellen wurden mit Phorbol-12-myristat-13-acetat stimuliert wie angegeben (PMA; 1 μ M, 5 min) und *co*-präzipitiertes Raf1 wurde mittels Immunoblot detektiert (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Als Kontrolle für unspezifische Effekte von RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ auf die Dimerisierung von RKIP wurde in weiteren Versuchen anstelle des leeren Vektors ein Kontrollpeptid (RKIP¹⁻²⁰) verwendet, welches aus dem N-Terminus von RKIP bestand und die gleiche Länge wie RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ hatte. Dieses Peptid zeigte keinerlei Wirkung auf die Dimerisierung oder Interaktion von RKIP und GRK2 (**Abb. 31**).

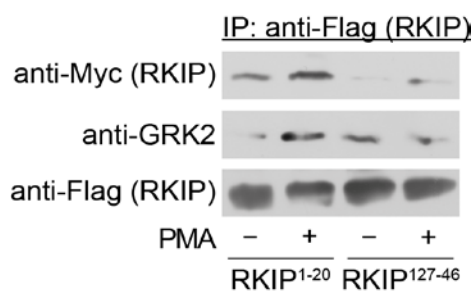


Abb. 31: Das RKIP-Fragment RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ hemmt die RKIP-Dimerisierung und RKIP/GRK2-Interaktion während das RKIP-Fragment RKIP¹⁻²⁰ keinen Effekt hat.

Immunpräzipitation (IP) von Flag-RKIP wt aus Zellen, die mit Flag- und Myc-RKIP und GRK2 und entweder mit dem RKIP-Fragment RKIP¹⁻²⁰ oder RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ *co*-transfiziert worden waren. Zellen wurden mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, 1 μ M, 5 min) stimuliert wie angegeben. *Co*-präzipitiertes Myc-RKIP und GRK2 wurden mit den angegebenen Antikörpern im Immunoblot visualisiert (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Sogar die verstärkte Dimerisierungstendenz und GRK2-Bindung der phosphomimetischen Mutante RKIP^{SK/EE} und der Dimermutante RKIP ^{Δ 143-6} wurde gleichermaßen durch RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ gehemmt, während RKIP¹⁻²⁰ erneut keinen Effekt zeigte (**Abb. 32**).

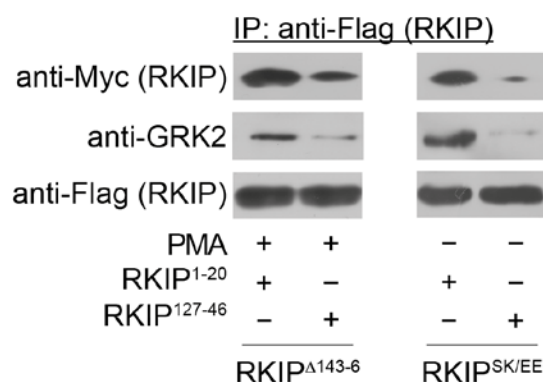


Abb. 32: Das RKIP-Fragment RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ hemmt die Dimerisierung von RKIP^{Δ143-6} und RKIP^{SK/EE} und deren Interaktion mit GRK2 während das RKIP-Fragment RKIP¹⁻²⁰ keinen Effekt hat.

Immunpräzipitation (IP) von Flag-RKIP aus Zellen, die mit Flag- und Myc-RKIP^{Δ143-6} (linke Seite) oder mit Flag- und Myc-RKIP^{SK153/7EE} (RKIP^{SK/EE}, rechte Seite) transfiziert worden waren. Die Zellen wurden zusätzlich mit dem RKIP-Fragment RKIP¹⁻²⁰ oder RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ *co*-transfiziert und wie angegeben mit PMA (1 μM, 5 min) stimuliert. *Co*-präzipitiertes Myc-RKIP und GRK2 wurden mit den angegebenen Antikörpern im Immunoblot visualisiert (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Vermutlich auf Grund ihrer kleinen Größe ließen die Peptide RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ und RKIP¹⁻²⁰ sich nicht im *Westernblot* nachweisen (Daten nicht gezeigt). Deswegen wurde die Expression der mRNA der verwendeten RKIP-Fragmente mittels Reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR) und die Proteinexpression im Tüpfelblot überprüft (**Abb. 33 A, B**).

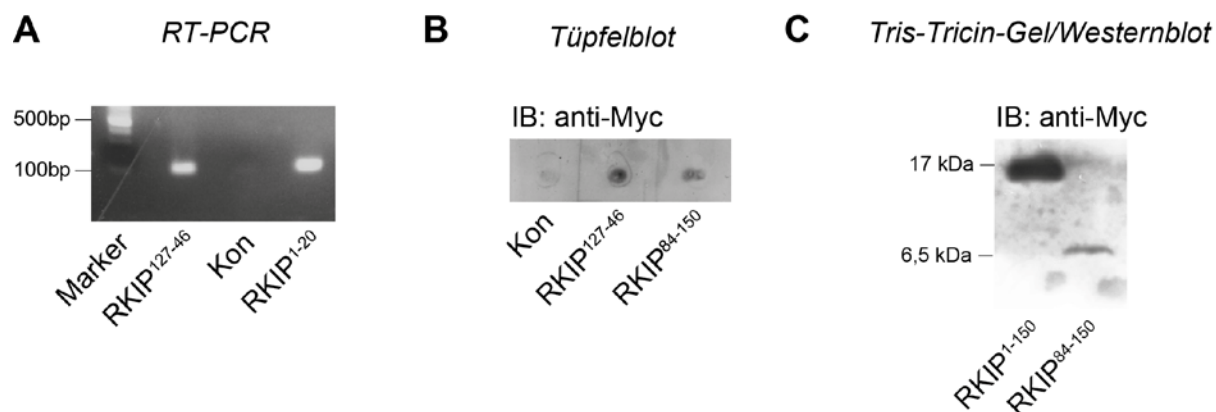


Abb. 33: Nachweis der Expression der verwendeten RKIP-Fragmente.

A, Gezeigt ist eine reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR). RNA wurde aus HEK293-Zellen isoliert, die entweder mit leerem Vektor (Kon) oder den Myc-RKIP-Fragmenten RKIP^{1-20} oder $\text{RKIP}^{127-146}$ transfiziert worden waren. PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese analysiert. **B**, Die Expression der Myc-RKIP-Fragmente $\text{RKIP}^{127-146}$ und RKIP^{84-150} wurde mittels Tüpfelblot unter Verwendung eines anti-Myc-Antikörpers nachgewiesen. **C**, Die Expression der Myc-RKIP-Fragmente RKIP^{1-150} und RKIP^{84-150} wurde analysiert durch TRIS-Tricin-SDS-PAGE und nachfolgende Immunoblotanalyse mit einem anti-Myc-Antikörper (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Zusätzlich wurde getestet, ob längere RKIP-Fragmente (RKIP^{1-150} und RKIP^{84-150}), welche ebenfalls die Sequenz der Schleife 127-150 einschlossen und sich aber im *Westernblot* nachweisen ließen (**Abb. 33 C**), ebenfalls die Dimerisierung und RKIP/GRK2-Interaktion hemmen. Für den Nachweis dieser Fragmente wurde das von Schagger *et al.* eingeführte TRIS-Tricin-Gelsystem verwendet (**Abb. 33 C**), welches sich insbesondere für die Auftrennung von Proteinen unter 10 kDa eignet (Schagger & von Jagow 1987). Wie **Abb. 34** zeigt, hemmten auch die Fragmente RKIP^{1-150} und RKIP^{84-150} die RKIP-Dimerisierung und die RKIP/GRK2-Interaktion. Kontrollzellen wurden entweder mit leerem Vektor transfiziert (Kon) oder mit dem Kontrollpeptid RKIP^{1-67} . Diese Versuche bestätigen, dass die Aminosäuren 127-150 von RKIP an der Dimerisierung von RKIP beteiligt sind und dass die Dimerisierung von RKIP wichtig für die RKIP/GRK2-Interaktion ist.

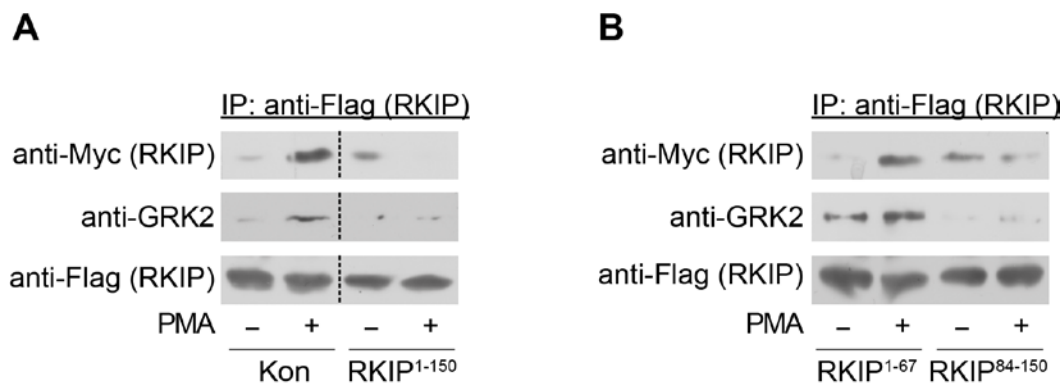


Abb. 34: Auch längere RKIP-Fragmente, welche die Sequenz der Schleife 127-150 beinhalten, hemmen die RKIP-Dimerisierung und RKIP/GRK2-Interaktion.

Immunpräzipitation (IP) von Flag-RKIP aus Zellen, die mit Flag- und Myc-RKIP und GRK2 und entweder mit leerem Vektor (Kon) oder dem RKIP-Fragment RKIP¹⁻¹⁵⁰ (A) oder RKIP¹⁻⁶⁷ oder RKIP⁸⁴⁻¹⁵⁰ (B) co-transfiziert worden waren. Zellen wurden mit PMA (1 μ M, 5 min) zur Aktivierung von PKC behandelt und lysiert. Co-präzipitiertes Myc-RKIP und GRK2 wurden mit den angegebenen Antikörpern im Immunoblot visualisiert (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

4.6 GRK2 bindet an RKIP-Dimere *in vitro*

Wie in 4.5 durch Co-Immunpräzipitationsexperimente gezeigt, verhindert die Hemmung der Dimerisierung von RKIP dessen Interaktion mit GRK2. Dies deutet darauf hin, dass GRK2 präferentiell mit RKIP-Dimeren interagiert. Um dies zu verifizieren, sollte der RKIP/RKIP/GRK2-Komplex *in vitro* nachgewiesen werden. Hierzu wurden chemische Vernetzungsexperimente mit gereinigter GRK2 und Wildtyp-RKIP, RKIP^{SK/EE} oder RKIP ^{Δ 143-6} unter Verwendung des chemischen Vernetzers Sulfo-ethylglycol-bis-(succinimidylsuccinat) (sEGS) durchgeführt. In der Tat konnten fast ausschließlich Komplexe mit einer Größe von etwa 122 kDa nachgewiesen werden, was der Größe eines RKIP/RKIP/GRK2-Komplexes entspricht. Die erhöhte Tendenz zur Dimerisierung der Mutanten RKIP^{SK/EE} und RKIP ^{Δ 143-6} ging mit einer erhöhten GRK2-Bindung einher. Wie bereits in Zellen gezeigt (Abb. 18, Abb. 22), zeigte sich die erhöhte Dimerisierungstendenz auch in einer geringeren Menge von monomerem RKIP^{SK/EE} und RKIP ^{Δ 143-6} nach Vernetzung (Abb. 35). Es ist anzumerken, dass der Film, welcher die Monomerbande zeigt, kürzer belichtet wurde (um unterschiedliche Intensitäten der einzelnen Banden sehen zu können), als die Filme der Dimerbande und des RKIP/RKIP/GRK2-Komplexes. Das Monomer/Dimer-Verhältnis wurde nicht bestimmt, da es stark von den gewählten Vernetzungsbedingungen wie zum Beispiel Proteinkonzentration, Konzentration des Vernetzers, Inkubationszeit

und -temperatur abhängig ist (Klockenbusch & Kast 2010). Dieses Experiment bestätigt, dass GRK2 *in vitro* tatsächlich präferentiell mit RKIP-Dimeren interagiert.

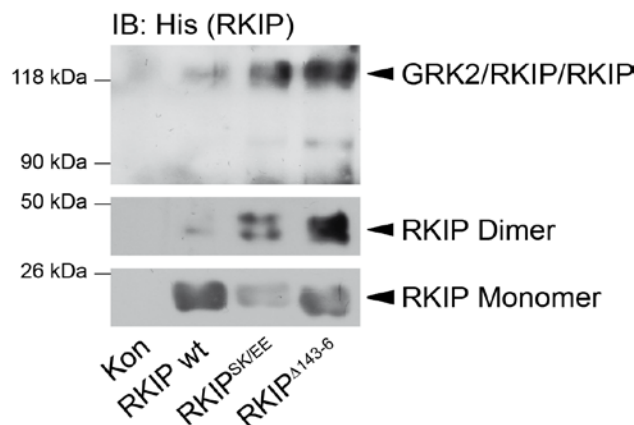


Abb. 35: GRK2 bindet präferentiell an RKIP-Dimere *in vitro*.

Gezeigt sind Vernetzungsexperimente ohne (Kon) oder mit gereinigtem His-RKIP wt, His-RKIP^{SK153/7EE} (RKIP^{SK/EE}) oder His-RKIP^{Δ143-6} und gereinigter GRK2 unter Verwendung von sEGS (0,3 mM, 15 min, RT) als chemischem Vernetzer. RKIP-Komplexe wurden mittels SDS-PAGE aufgereinigt und mit einem anti-His-Antikörper visualisiert. Die Positionen der molekularen Massenstandards sowie die jeweiligen Banden des RKIP/RKIP/GRK2-Komplexes, des RKIP-Dimers und des RKIP-Monomers (kürzer belichteter Film) sind angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

4.7 Eine verstärkte Dimerisierung von RKIP bewirkt eine verminderte Raf-Hemmung und eine stärkere GRK2-Hemmung

Als nächstes stellte sich die Frage, ob RKIP^{SK/EE} und RKIP^{Δ143-6}, die schwächer mit Raf1 aber stärker mit GRK2 interagieren, auch die inhibitorische Aktivität von RKIP gegenüber Raf1 und GRK2 beeinflussen.

Um dies zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit Wildtyp-RKIP, RKIP^{SK/EE} oder RKIP^{Δ143-6} transfiziert. Auch hier wurde mit in etwa physiologischen Expressionsmengen gearbeitet (**Abb. 36**).

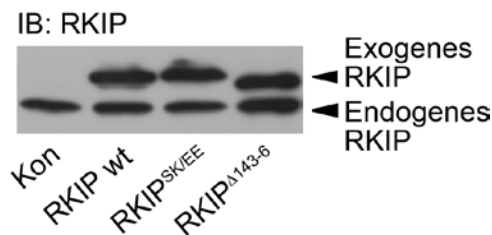


Abb. 36: Die Expressionsmengen von exogenem Wildtyp-RKIP, RKIP^{SK/EE} und RKIP^{Δ143-6} und endogenem RKIP sind ähnlich.

Die Abbildung zeigt eine Immunoblotanalyse der Expressionsmengen von exogenem und endogenem RKIP mit einem anti-RKIP-Antikörper. Zellen wurden mit leerem Vektor (Kon), Myc-RKIP wt, Myc-RKIP^{SK153/7EE} (RKIP^{SK/EE}) oder Myc-RKIP^{Δ143-6} transfiziert. Pfeile markieren die jeweiligen Banden von exogenem und endogenem RKIP (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Eine Aussage über die Raf-Aktivität liefert die Ermittlung der Phosphorylierung der Effektorkinasen ERK1/2 (1.2), für die phosphospezifische Antikörper existieren. Wie in **Abb. 37** zu sehen ist, zeigte nur Wildtyp-RKIP eine signifikante Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung, d.h. eine signifikante Hemmung der ERK1/2-vorangeschalteten Kinase Raf. Da die Aktivität von endogenem ERK1/2 und Raf bestimmt wurde, lässt sich nicht sagen, ob nur Raf1 oder auch die anderen Isoformen A-Raf und B-Raf gehemmt wurden, so dass hier – wie auch an späterer Stelle – nur die Bezeichnung Raf-Aktivität verwendet wird.

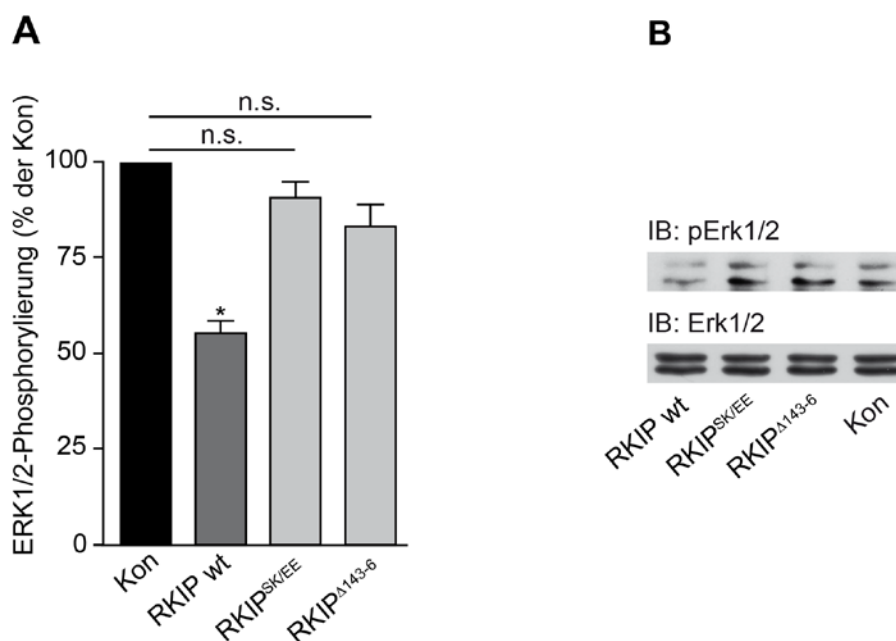


Abb. 37: Wildtyp-RKIP hemmt die Raf-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 stärker als RKIP^{SK/EE} und RKIP^{Δ143-6}.

A, Gezeigt ist die Quantifizierung der ERK1/2-Phosphorylierung in HEK293-Zellen mit stabiler Expression von GFP- β_2 AR und *co*-transfiziertem leerem Vektor (Kon), Myc-RKIP wt, Myc-RKIP^{SK153/7EE} (RKIP^{SK/EE}) oder Myc-RKIP^{Δ143-6}. Die ERK1/2-Phosphorylierung wurde detektiert mit phosphospezifischen Antikörpern gegen pERK1/2(TEY). Der Graph zeigt die ERK1/2-Phosphorylierung als Prozent der Werte in Abwesenheit von *co*-transfiziertem RKIP. $n=7$ Experimente; *, $P < 0.01$. **Abbildung B** zeigt einen repräsentativen Westernblot (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Dieser Versuch deutet darauf hin, dass die verstärkte Dimerisierung der Mutanten RKIP^{SK/EE} und RKIP^{Δ143-6} die RKIP-vermittelte Raf-Hemmung vermindert.

Anschließend wurde der Einfluss einer verstärkten Dimerisierung von RKIP auf die Hemmung der GRK2-Aktivität untersucht. GRK sind wichtige negative Regulatoren von GPCR (Gurevich *et al.* 2012). Durch Phosphorylierung von aktivierten GPCR induzieren GRK die Desensibilisierung und Internalisierung von GPCR und beenden so die G-Protein-Aktivierung und nachfolgende Generierung sekundärer Botenstoffe. Deswegen können über die Bestimmung der Rezeptorphosphorylierung oder die Messung von sekundären Botenstoffen Rückschlüsse auf die Aktivität von GRK gezogen werden (Lorenz *et al.* 2003).

Hierzu wurde die Rezeptorphosphorylierung in HEK293-Zellen mit stabiler Expression von GFP-*getaggt*en β_2 -adrenergen Rezeptoren bestimmt, da für diesen Rezeptor ein phosphospezifischer Antikörper (p β_2 AR(S355/356)) verfügbar ist. In einem Vorversuch wurde mittels *Co*-Immunpräzipitation gezeigt, dass RKIP auch nach Stimulation von β_2 AR mit dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin dimerisiert (**Abb. 38**).

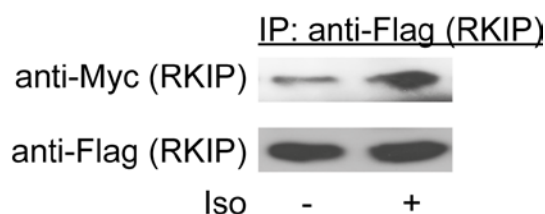


Abb. 38: RKIP dimerisiert nach Stimulation von β_2 -adrenergen Rezeptoren (β_2 AR) mit Isoprenalin. Die Abbildung zeigt ein vorläufiges Ergebnis ($n=2$) einer Immunpräzipitation (IP) von Flag-RKIP in Lysaten von HEK293-Zellen, die mit Flag- und Myc-RKIP und mit dem β_2 AR *co*-transfiziert worden waren. *Co*-präzipitiertes Myc-RKIP wurde im Immunoblot detektiert. Die Isoprenalin-Stimulation (Iso; 1 μ M, 5 min) ist angegeben.

Für die Bestimmung der β_2 AR-Phosphorylierung in Gegenwart von RKIP wurden Zellen mit vergleichbaren Mengen an Wildtyp-RKIP, RKIP^{SK/EE}, RKIP ^{Δ 143-6} oder leerem Vektor (Kon) transfiziert (**Abb. 39**). Die Expression der RKIP-Konstrukte entsprach in etwa der Expression des endogenen RKIP (Daten nicht gezeigt, **Abb. 36**).

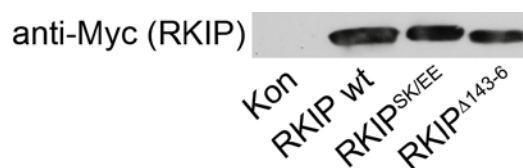


Abb. 39: Wildtyp-RKIP, RKIP^{SK/EE} und RKIP ^{Δ 143-6} wurden in β_2 AR-Zellen in vergleichbaren Mengen exprimiert. Myc-RKIP wt, -RKIP^{SK153/7EE} (RKIP^{SK/EE}) und -RKIP ^{Δ 143-6} wurden in HEK293-Zellen mit stabiler Expression des β_2 AR *co*-exprimiert und mit einem anti-Myc-Antikörper nachgewiesen. Kontrollzellen wurden mit leerem Vektor transfiziert (Kon).

Da der β_2 AR nicht nur durch GRK2 sondern auch durch GRK6 an S555/356 phosphoryliert (Nobles *et al.* 2011) und diese Phosphorylierung auch durch den in den folgenden Experimenten verwendeten anti-p β_2 AR(S355/356)-Antikörper detektiert werden kann, wurden die Zellen mit GRK2 *co*-transfiziert, um so Hintergrundsignale durch andere Kinasen zu vermindern. Wie in **Abb. 40** zu sehen ist, resultierte nur die Überexpression von GRK2 in einem starken immunreaktiven p β_2 AR(S355/356)-Signal nach Isoprenalin-Stimulation. Da keine spezifischen Antikörper für die Detektion des β_2 AR bekannt sind (Hamdani & van der Velden 2009), wurde die Rezeptorexpression unter Verwendung eines anti-GFP-Antikörpers überprüft.

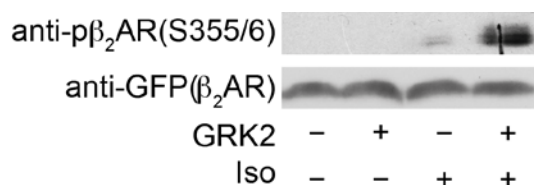


Abb. 40: Die Überexpression von GRK2 führt zu einer starken Phosphorylierung des β_2 -adrenergen Rezeptors (β_2 AR) nach Isoprenalin-Stimulation.

Gezeigt ist eine Immunoblot-Analyse der Isoprenalin-stimulierten β_2 AR-Phosphorylierung in HEK293-Zellen, die stabil mit GFP- β_2 AR und transient ohne oder mit GRK2 transfiziert worden waren. Die Phosphorylierung des Rezeptors wurde mit einem phosphospezifischen Antikörper (p β_2 AR(S355/6)) detektiert und die Gesamtmenge an Rezeptor mit einem anti-GFP-Antikörper. Die Transfektion von GRK2 und die Isoprenalin-Stimulation (Iso; 1 μ M, 5 min) sind in der Abbildung angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Die Rezeptorphosphorylierung wurde durch fünfminütige Stimulation mit Isoprenalin induziert und anschließend mit anti-p β_2 AR(S355/356)-Antikörpern im *Westernblot* dargestellt. Die densitometrische Auswertung der erhaltenen Signale zeigte nicht nur, dass alle RKIP-Konstrukte die Rezeptorphosphorylierung signifikant hemmten, sondern auch, dass RKIP^{SK/EE} und RKIP ^{Δ 143-6} die Rezeptorphosphorylierung und damit die GRK2-Aktivität etwas stärker hemmten als Wildtyp-RKIP. Dies äußerte sich in schwächeren immuno-reaktiven p β_2 AR(S355/356)-Signalen im *Westernblot* in den Proben, die mit RKIP^{SK/EE} oder RKIP ^{Δ 143-6} transfiziert waren im Vergleich zu mit Wildtyp-RKIP transfizierten Proben (**Abb. 41**). Diese Versuche zeigen nicht nur, dass die dimerischen RKIP-Mutanten RKIP^{SK/EE} und RKIP ^{Δ 143-6} funktionell bezüglich der Hemmung von GRK2 sind, sondern auch, dass sie die GRK2-Aktivität sogar besser hemmen als Wildtyp-RKIP.

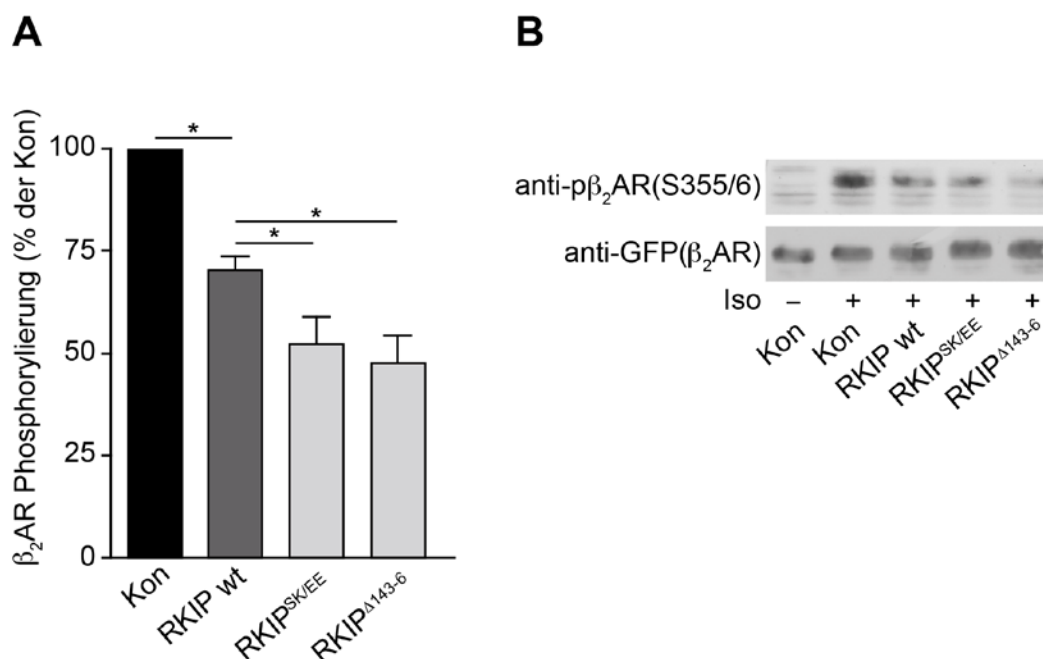


Abb. 41: RKIP^{SK/EE} und RKIP^{Δ143-6} hemmen die GRK2-vermittelte Phosphorylierung von β₂-adrenergen Rezeptoren (β₂AR) nach Isoprenalin-Stimulation stärker als Wildtyp-RKIP.

A, Abgebildet ist die Quantifizierung der Isoproterenol-induzierten Phosphorylierung von β₂AR (Iso; 1 μM, 5 min) in HEK293-Zellen, welche stabil mit GFP-β₂AR und transient mit GRK2, Myc-RKIP wt oder Myc-RKIP^{SK153/7EE} (RKIP^{SK/EE}) oder Myc-RKIP^{Δ143-6} transfiziert worden waren. Die Rezeptorphosphorylierung wurde detektiert mit phosphospezifischen Antikörpern (pβ₂AR(S355/6)). Der Graph zeigt die Isoprenalin-stimulierte β₂AR-Phosphorylierung als Prozent der Werte in Abwesenheit von *co*-transfiziertem RKIP. *n*=5-6 Experimente; *, *P* < 0.05. **Abbildung B** zeigt einen repräsentativen *Westernblot* (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Dies wurde im Folgenden auch für gereinigte Proteine *in vitro* gezeigt. Hierzu wurde Rhodopsin als Substrat verwendet, welches durch Licht aktiviert werden kann. Dieser Rezeptor wird unter physiologischen Bedingungen von GRK1 phosphoryliert (Weller *et al.* 1975), kann aber *in vitro* ebenfalls von GRK2 phosphoryliert werden (Benovic *et al.* 1986). Dank seiner hohen Expression in den Stäbchenzellen des Auges lassen sich Membranen mit einem sehr hohen Rhodopsingehalt präparieren (Wilden & Kuhn 1982) und können als Substrat für *in vitro* Versuche zur GRK-vermittelten Rezeptorphosphorylierung herangezogen werden (Präparation von Rhodopsinmembranen aus boviner Retina durch C. Dees). Bovine GRK2 wurde aus mit Baculoviren-transfizierten Insektenzellen isoliert (Aufreinigung durch C. Dees). His-RKIP wurde im Rahmen dieser Arbeit in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt (**Abb. 42**).

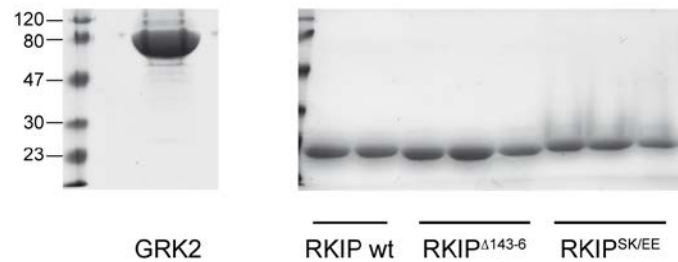


Abb. 42: SDS-PAGE-Gele von gereinigter GRK2 und RKIP-Proteinen (angefärbt mit Coomassie-Brilliant Blau-Lösung).

Bovine GRK2 wurde in mit Baculoviren infizierten *Sf9*-Zellen exprimiert und durch SP- und Heparin-Sepharose-Chromatographie aufgereinigt. His-RKIP-Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und durch Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt. GRK2 besitzt eine molare Masse von ~80 kDa, RKIP eine molare Masse von ~21 kDa. Ein Proteingrößenstandard in kDa ist angegeben.

Um die GRK-vermittelte Rhodopsinphosphorylierung in Gegenwart der verschiedenen RKIP-Proteine zu ermitteln, wurden Rhodopsin und GRK2 ohne (Kon) oder mit His-Wildtyp-RKIP, RKIP^{SK/EE} oder RKIP^{Δ143-6} in Gegenwart von ³²P-markiertem ATP unter Rotlicht zusammengegeben. Die Aktivierung von Rhodopsin wurde durch Weißlicht initiiert und nach 10 min abgestoppt. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese separiert und anhand des in Rhodopsin inkorporierten radioaktiv markierten Phosphats das Ausmaß der Rezeptorphosphorylierung in Gegenwart der verschiedenen RKIP-Mutanten miteinander verglichen. Unter diesen *in vitro* Bedingungen zeigten sich die RKIP-Mutanten ebenfalls als funktionelle GRK2-Inhibitoren (**Abb. 43**).

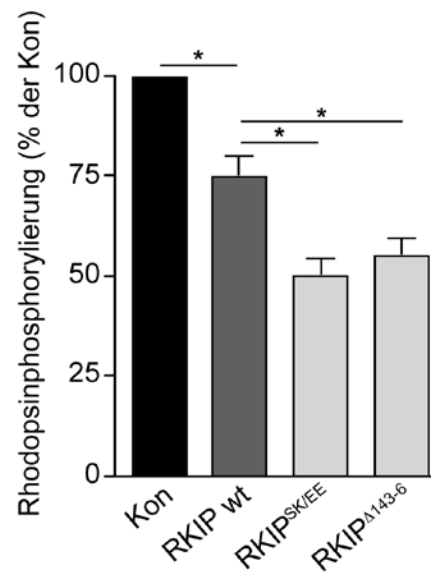


Abb. 43: RKIP^{SK/EE} und RKIP^{Δ143-6} hemmen die GRK2-vermittelte Phosphorylierung von Rhodopsin stärker als Wildtyp-RKIP.

Gezeigt ist die Quantifizierung der GRK2-vermittelten Rhodopsinphosphorylierung in Abwesenheit (Kon) oder Gegenwart von gereinigtem His-RKIP wt, His-RKIP^{SK153/7EE} (RKIP^{SK/EE}) oder His-RKIP^{Δ143-6}. Die Rhodopsinphosphorylierung wurde analysiert durch Verwendung von [γ -³²P]-ATP und Autoradiographie sowie Phosphoimager-Analyse der Gele nach SDS-PAGE. Der Graph zeigt die Licht-stimulierte Rhodopsinphosphorylierung als Prozent der Werte in Abwesenheit von gereinigtem RKIP. $n=15$ Experimente; *, $P < 0.05$ (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Die Hemmung der Rezeptorphosphorylierung durch die Mutanten RKIP^{SK/EE} und RKIP^{Δ143-6} im Vergleich zu Wildtyp-RKIP war in diesem *in vitro* Versuch deutlicher als bei der in Zellen bestimmten β_2 AR-Phosphorylierung (**Abb. 41**). Dies ist vermutlich auf die Abwesenheit von PKC unter den *in vitro* Bedingungen zurückzuführen. Da RKIP^{SK/EE} und RKIP^{Δ143-6} bereits unter basalen Bedingungen dimerisieren, deuten diese Versuche darauf hin, dass die RKIP-Dimerisierung die Hemmung von GRK2 begünstigt.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, das unterschiedliche Ausmaß der GRK2-Hemmung von Wildtyp-RKIP und den dimerischen RKIP-Mutanten auch auf der Ebene der durch Rezeptoraktivierung generierten sekundären Botenstoffe nachzuweisen. Hierzu wurden ROS-Zellen gewählt, da diese den Parathormon (PTH)-Rezeptor exprimieren und K. Lorenz bereits gezeigt hatte, dass überexprimiertes RKIP die PTH-induzierte Phosphorylierung dieses Rezeptors verringert (Lorenz *et al.* 2003). Der PTHR ist ein GPCR, der sowohl an G_s - als auch an G_q -Proteine koppelt (Mannstadt *et al.* 1999), so dass über die Bestimmung von cAMP oder IP₃ indirekt eine Aussage über die GRK2-Aktivität gewonnen werden kann. Durch die RKIP-vermittelte Hemmung von GRK2 und der damit verbundenen vermehrten Rezeptoraktivität wäre eine erhöhte Menge von sekundären Botenstoffen in Gegenwart von

RKIP zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit wurde die PTH-induzierte cAMP-Produktion in Abwesenheit (Kon) oder Anwesenheit der verschiedenen RKIP-Proteine untersucht. Mit leerem Vektor, RKIP, RKIP^{SK/EE} oder RKIP^{Δ143-6} transfizierte ROS-Zellen wurden mit PTH für 5 min stimuliert und das zelluläre cAMP wurde anschließend mit Hilfe eines *Radioimmunoassay*-Kits bestimmt. Hierzu wurden die Zellysate mit spezifischen Antikörpern gegen cAMP in Gegenwart von einer bekannten Menge radioaktiven cAMP inkubiert. Durch anschließende Bestimmung des an die Antikörper gebundenen cAMP im Gamma-Zähler kann das in den Zellysaten befindliche cAMP ermittelt werden. Wie in **Abb. 44** zu sehen ist, führte die Expression aller RKIP-Proteine zu einer signifikanten Steigerung der cAMP-Produktion nach Stimulation des PTH-Rezeptors mit PTH. Allerdings konnten mit dieser Methode keine Unterschiede in der inhibitorischen Aktivität der RKIP-Proteine festgestellt werden.

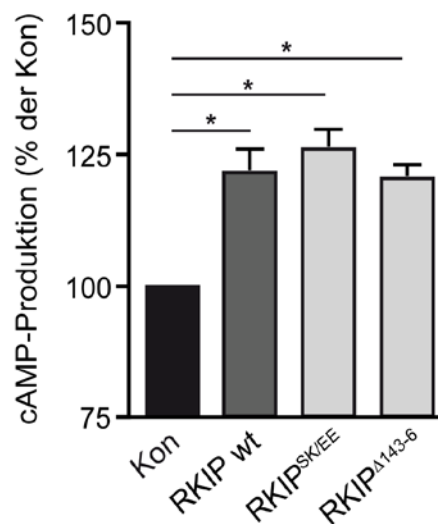


Abb. 44: Die Überexpression von Wildtyp-RKIP, RKIP^{SK/EE} und RKIP^{Δ143-6} in ROS-Zellen führt zu einer signifikanten Steigerung der PTH-induzierten cAMP-Produktion.

Gezeigt ist die Quantifizierung der PTH-stimulierten (30 nM, 5 min) cAMP-Produktion in ROS-Zellen in Abwesenheit (Kon) oder Gegenwart von transfiziertem Myc-RKIP wt, Myc-RKIP^{SK153/7EE} (RKIP^{SK/EE}) oder Myc-RKIP^{Δ143-6}. Die cAMP Menge wurde durch einen *Radioimmunoassay* bestimmt. Der Graph zeigt die PTH-stimulierte cAMP-Produktion als Prozent der Kontrolle (Kon). $n=9$ Experimente; *, $P < 0.05$.

4.8 Nachweis eines RKIP/RKIP/GRK2-Komplexes in Mauserzen

Da die vorherigen Versuche alle unter Verwendung von exogenem RKIP und GRK2 in Zellen oder mit gereinigten Proteinen durchgeführt worden waren, sollte nun untersucht werden, ob die RKIP-Komplexe auch in nativem Gewebe mit endogenen Proteinen nachweisbar sind.

GRK2 ist von besonderer Bedeutung im Herzen und wird als vielversprechendes Zielprotein für Arzneistoffe in der Therapie der Herzinsuffizienz und anderen kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert (Lohse *et al.* 2003; Belmonte & Blaxall 2011; Rengo *et al.* 2012). Deswegen wurde untersucht, ob der RKIP/RKIP/GKR2-Komplex im Herzen nachgewiesen werden kann. Hierzu wurden Mausherzen von Wildtyp-Mäusen mit einer Lösung des *Cross-linkers* Formaldehyd perfundiert, lysiert und mittels Immunoblotanalyse auf die Anwesenheit von RKIP/GRK2-Komplexen untersucht. Tatsächlich detektierten sowohl GRK2- als auch RKIP-Antikörper einen Komplex von etwa 122 kDa, was der Größe eines möglichen RKIP/RKIP/GRK2-Komplexes entspricht. Diese Befunde deuten darauf hin, dass RKIP-Dimere auch unter physiologischen Bedingungen vorkommen und an GRK2 binden. Interessanterweise war im RKIP-Immunoblot eine schwache weitere Bande von etwa 94 kDa zu sehen, die der Größe nach den RKIP/Raf1-Komplex darstellen könnte (**Abb. 45**).

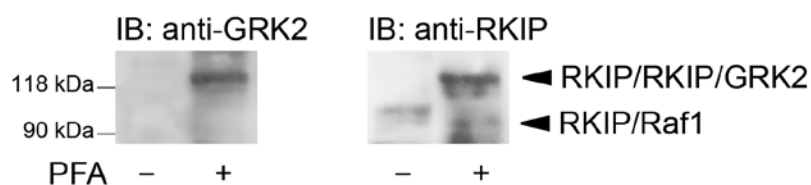


Abb. 45: Nachweis eines ~122 kDa Komplexes bestehend aus GRK2 und RKIP in Mausherzen.

Die Abbildung zeigt Vernetzungsexperimente in Wildtyp-Mausherzen unter Verwendung des chemischen *Cross-linkers* Formaldehyd (PFA; 4 % in PBS-Puffer, 9 min). Proteinkomplexe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-GRK2- und anti-RKIP-Antikörpern im Immunoblot analysiert. Die Positionen der molekularen Massenstandards und die jeweiligen Banden des RKIP/RKIP/GRK2-Komplexes und des RKIP/Raf1-Komplexes sind angegeben (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Da ich zeigen konnte, dass die Phosphorylierung von RKIP eine Voraussetzung zur Dimerisierung ist (4.1), wurde der Phosphorylierungsstatus von RKIP in Mausherzen untersucht. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zuerst wurden Herzen mit PBS-Puffer oder dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (GFX) perfundiert, um die PKC-vermittelte RKIP-Phosphorylierung zu hemmen, und diese dann mittels Immunoblot analysiert. Dabei zeigte sich, dass RKIP in den mit PKC-Inhibitor behandelten Herzen weniger stark phosphoryliert war als in den nur mit PBS-Puffer perfundierten Herzen (**Abb. 46**).

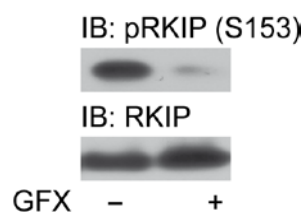


Abb. 46: Die RKIP-Phosphorylierung in Mausherzen ist nach Perfusion mit einem PKC-Inhibitor reduziert.

Gezeigt ist eine Immunoblotanalyse von aus Herzen von Wildtyp-Mäusen gewonnenen Lysaten, welche mit PBS-Puffer ohne oder mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (GFX; 1,5 μ M, 3 min) perfundiert worden waren. Die RKIP-Phosphorylierung wurde im Immunoblot unter Verwendung eines gegen pRKIP(S153)-gerichteten Antikörpers analysiert (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Da auch durch den Vorgang der Perfusion die Phosphorylierung von RKIP induziert worden sein könnte, wurden in einem weiteren Ansatz Lysate von nicht-perfundierten Mausherzen hergestellt und diese mit Protein Phosphatase 1 (PP1) inkubiert. Nach Behandlung mit der Phosphatase nahm die Phosphorylierung von RKIP deutlich ab (**Abb. 47**).

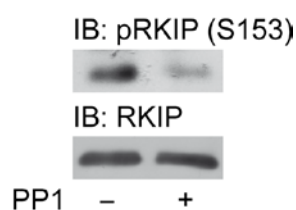


Abb. 47: Die RKIP-Phosphorylierung in Mausherzlysaten ist nach Behandlung mit einer Protein Phosphatase reduziert.

Immunoblotanalyse von aus Mausherzen gewonnenen Lysaten, welche ohne oder mit Protein Phosphatase 1 (PP1; 20 U PP1/100 μ g Lysat, 30 min, 30 $^{\circ}$ C) inkubiert worden waren. Die RKIP-Phosphorylierung wurde im Immunoblot unter Verwendung eines gegen pRKIP(S153)-gerichteten Antikörpers analysiert (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Diese beiden Versuchsansätze zeigen deutlich, dass RKIP tatsächlich in unstimulierten Herzen durch PKC phosphoryliert wird und somit dimerisieren und GRK2 binden kann.

Schließlich wurde auch untersucht, ob ein Komplex bestehend aus monomerem RKIP und Raf1 in Mausherzen existiert. Da sich in den vorherigen Versuchen gezeigt hatte, dass RKIP bereits unter basalen Bedingungen phosphoryliert ist, wurden die Herzen vor der PFA-Perfusion mit dem PKC-Inhibitor GFX perfundiert, um die PKC-vermittelte Phosphorylierung zu reduzieren. Unter diesen Bedingungen konnte im Immunoblot mit anti-Raf1-Antikörpern eine schwache Bande von etwa 94 kDa nachgewiesen werden. Dies entspricht

der Größe eines RKIP/Raf1-Komplexes. Auf Grund einer starken unspezifischen Raf1-immunreaktiven Bande, die jedoch auch in den nicht-vernetzten Proben zu sehen war, konnte die Existenz eines theoretisch möglichen RKIP/RKIP/Raf1-Komplexes allerdings nicht ausgeschlossen werden (**Abb. 48**). Interessanterweise detektierte der anti-RKIP-Antikörper ebenfalls eine etwa 94 kDa große Bande und im Vergleich zu den nicht mit GFX behandelten Herzen nur eine sehr schwache etwa 122 kDa große Bande (Vergleich **Abb. 47** und **Abb. 48**). Auch in dem RKIP-Immunoblot war eine unspezifische Bande zu erkennen, die allerdings nach PFA-Behandlung verschwand. Der Grund hierfür könnte sein, dass das für die Bande verantwortliche Protein durch die Behandlung mit PFA zu einem höher molekularen und/oder unlöslichen Komplex vernetzt wird, und deswegen nach PFA-Behandlung nicht mehr auf derselben Höhe detektiert wird.

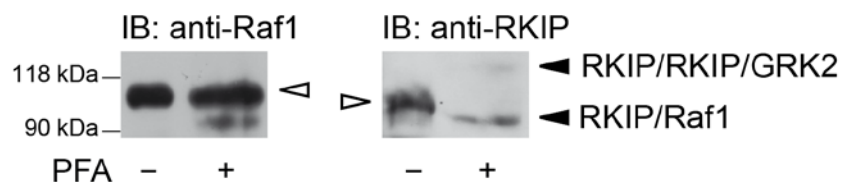


Abb. 48: Nachweis eines ~94 kDa Komplexes bestehend aus Raf1 und RKIP in Mauserherzen.

Vernetzungsexperimente in Wildtyp-Mauserherzen unter Verwendung des chemischen *Cross-linkers* Formaldehyd (PFA; 4 % in PBS-Puffer, 9 min) nach Perfusion mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (GFX; 1,5 μ M, 3 min). Proteinkomplexe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-Raf1- und anti-RKIP-Antikörpern im Immunoblot analysiert. Die Positionen der molekularen Massenstandards und die jeweiligen Banden des RKIP/RKIP/GRK2-Komplexes und des RKIP/Raf1-Komplexes sind angegeben. Die offenen Pfeile zeigen unspezifische immunreaktive Banden (Abbildung aus Deiss *et al.* 2012).

Somit konnte gezeigt werden, dass RKIP in unstimulierten Mauserherzen durch PKC phosphoryliert wird und infolgedessen als Dimer mit GRK2 zu interagieren vermag. Unter physiologischen Bedingungen scheint RKIP im Herzen nur schwach mit Raf1 zu interagieren; eine verstärkte Interaktion kann nach Hemmung der basalen Phosphorylierung von RKIP beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass RKIP im Herzen stärker mit GRK2 als mit Raf1 interagiert.

5 Diskussion

5.1 Wie wird die Interaktion von RKIP mit seinen vielen Interaktionspartnern reguliert?

RKIP reguliert direkt oder indirekt die Aktivität der Proteinkinasen GRK2, Raf, MEK, ERK, IKK, NIK, TAK und GSK3 β (Zeng *et al.* 2008; Escara-Wilke *et al.* 2012). Eine direkte Interaktion mit RKIP konnte für Raf1 und GRK2 gezeigt werden (Yeung *et al.* 1999; Lorenz *et al.* 2003). Wie die spezifische Interaktion dieses kleinen Proteins (21 kDa) mit seinen Interaktionspartnern koordiniert wird, ist bislang nicht genau verstanden (Yeung *et al.* 2000; 2001; Corbit *et al.* 2003; Lorenz *et al.* 2003). Ein mechanistisches Verständnis ist dabei von besonderem Interesse für die Interaktion von RKIP mit Raf1 und GRK2, da für diese Kinasen nicht nur eine direkte Interaktion mit RKIP sondern auch eine Hemmung ihrer Kinaseaktivität durch RKIP mit einem IC₅₀-Wert im mikromolekularen Bereich gezeigt wurde (Yeung *et al.* 1999; Lorenz *et al.* 2003). Während GRK2 eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz spielt, ist eine chronische Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade bei vielen Tumoren zu finden. Das Verständnis ihrer RKIP-vermittelten Hemmung könnte die Entwicklung spezifischer Inhibitoren voranbringen.

Wie bereits bekannt war, ist ein regulatorischer Mechanismus der Interaktion von RKIP mit Raf1 oder GRK2 die PKC-vermittelte Phosphorylierung von RKIP an S153. So wurde gezeigt, dass RKIP unter basalen Bedingungen an Raf1 bindet, jedoch nach PKC-vermittelter Phosphorylierung dissoziiert und GRK2 bindet und hemmt (Yeung *et al.* 1999; Lorenz *et al.* 2003). Es war unklar, wie diese Phosphorylierung diese Interaktionen zu regulieren vermag, da sie nicht in der Region von RKIP liegt, die wichtig für die Interaktion mit Raf1 ist (Aminosäuren 77-108 von RKIP, Yeung *et al.* 2000). Deswegen wurde nach einem zusätzlichen Element gesucht, welches die Interaktion von RKIP mit Raf1 oder GRK2 beeinflussen könnte.

Proteinphosphorylierung führt durch die kovalente Anheftung einer Phosphatgruppe an eine Aminosäureseitenkette zu sterischen und elektrischen Veränderungen der Proteinoberfläche. In der Folge kommt es zu lokalen oder größeren Konformationsänderungen oder Umorientierungen von Subdomänen (Nishi *et al.* 2011). Dies wiederum beeinflusst häufig enzymatische Aktivität, Protein-Protein-Interaktionen und die subzelluläre Lokalisation von Proteinen. Vielfach kann Proteinphosphorylierung auch die Selbstassoziiierung von Proteinen,

z. B. zu Dimeren, induzieren (Langland & Jacobs 1992; Shuai *et al.* 1994; Firulli *et al.* 2003; Lorenz *et al.* 2009) oder hemmen (Torshin 1999). Andererseits ist auch bekannt, dass Dimerisierung die Voraussetzung für eine nachfolgende Phosphorylierung sein kann (Madhani 2001; Lemaire *et al.* 2004). Somit könnte die PKC-vermittelte Phosphorylierung von RKIP eine mögliche Dimerisierung von RKIP regulieren oder auch durch diese erst induziert werden. Interessanterweise kristallisieren humanes RKIP sowie ein bakterielles und ein pflanzliches RKIP-Homolog als Dimer (Banfield *et al.* 1998; Banfield & Brady 2000; Serre *et al.* 2001). Ungeklärt war allerdings bisher, ob RKIP-Dimere auch unter physiologischen Bedingungen existieren und ob sie eine funktionelle Bedeutung besitzen.

5.2 Die Bedeutung und Regulation von homooligomeren Protein-Protein-Interaktionen

Die transienten Protein-Protein-Interaktionen und deren dynamische Regulation ist ein wichtiges Thema der Zellbiologie, da sie essentiell für fast alle biologischen Prozesse sind (Jones & Thornton 1995; Klemm *et al.* 1998; Torshin 1999; Shoemaker & Panchenko 2007). Selbstassoziiierung (*Homooligomerisierung*) und Assoziierung mit anderen Proteinen (*Heterooligomerisierung*) kann zu Dimeren, Trimeren oder zu Oligomeren höherer Ordnung führen.

Im Folgenden wird insbesondere auf die Bedeutung und Regulierung der Homooligomerisierung eingegangen, da diese für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse ist. Homooligomerisierung, vor allem Dimerisierung, ist weit verbreitet bei allen Organismen, da aus ihr strukturelle und funktionelle Vorteile resultieren können (Gronenborn 2009; Hashimoto *et al.* 2011). So kann Oligomerisierung die Diversität und Spezifität von Protein-Protein-Interaktionen erhöhen, ohne die Genomgröße zu verändern, da Interaktionsflächen neu entstehen oder verdeckt werden und so die Affinität für einige Substrate erhöht und für andere reduziert sein kann. Auch die simultane Bindung mehrerer Proteine kann durch Oligomerisierung ermöglicht werden. Ferner kann die Aktivität oder Lokalisation von Proteinen reguliert oder das Protein durch die verringerte Oberfläche vor Denaturierung geschützt werden. Kanalproteine werden vielfach erst durch Oligomerisierung zum Transport von Molekülen über die Zellmembran befähigt. Für die Entstehung von komplexen und stabilen Proteinstrukturen wie z.B. Myosin-, Keratin- und Tubulinfilamenten oder Kollagenfasern ist Oligomerisierung vorteilhaft, da die Anordnung von mehreren identischen Untereinheiten zu einer großen funktionellen Einheit einfacher als die Faltung eines einzigen großen Proteins ist. So beeinflusst Homooligomerisierung die Aktivität von Enzymen, Ionen-

kanälen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren und reguliert die Spezifität und Diversität von zellulären Signalwegen (Klemm *et al.* 1998; Torshin 1999; Goodsell & Olson 2000; Nooren & Thornton 2003; Marianayagam *et al.* 2004; Gronenborn 2009; Hashimoto & Panchenko 2010; Hashimoto *et al.* 2011). Deregulierte Oligomerisierung wie etwa die Bildung von Amyloidfibrillen bei der Alzheimer-Erkrankung oder die Polymerisierung von Hämoglobin bei der Sichelzell-Anämie kann allerdings auch zu pathogenen Zuständen führen. Die Regulation von transienten Protein-Protein-Interaktionen erfolgt entweder durch eine Änderung der Konzentration der beteiligten Komponenten oder deren Bindungsaffinität. Die Proteinkonzentration kann beispielsweise durch Diffusion und vaskulären Transport oder durch eine veränderte Genexpression, Sekretion oder Proteindegradierung verändert werden. Die Bindungsaffinität, welche durch die physikochemischen und geometrischen Eigenschaften der Interaktionsfläche bestimmt wird, wird häufig durch die Anwesenheit von bestimmten Ionen, Chemikalien, Proteinen, Veränderungen des pH-Wertes, der Temperatur oder durch kovalente Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung beeinflusst. Diese Mechanismen ermöglichen dem Organismus die effektive Regulation von dynamischen Protein-Netzwerken (Klemm *et al.* 1998; Marianayagam *et al.* 2004; Gronenborn 2009; Hashimoto *et al.* 2011).

5.3 PKC-vermittelte Phosphorylierung von RKIP an S153 induziert RKIP-Dimerisierung

Um eine mögliche phosphorylierungsregulierte Oligomerisierung von RKIP zu untersuchen, wurden zunächst *Co*-Immünpräzipitationsexperimente mit oder ohne Stimulation von PKC in transfizierten HEK-Zellen durchgeführt. Der Befund einer phosphorylierungsinduzierten Oligomerisierung wurde durch eine phosphorylierungsdefiziente Mutante bestätigt, welche nicht dimerisierte (**Abb. 8**, **Abb. 9**). Durch *cross-linking*-Experimente in Zellen und mit gereinigten Proteinen konnte nicht nur gezeigt werden, dass RKIP-Komplexe aus Dimeren bestehen, sondern auch, dass die RKIP/RKIP-Interaktion direkt ist (**Abb. 12-Abb. 14**). Weitere *Co*-Immünpräzipitationsversuche demonstrierten, dass beide RKIP-Moleküle phosphoryliert sein müssen um zu dimerisieren (**Abb. 15**).

Die beobachtete phosphorylierungsabhängige Dimerisierung stimmt mit der inzwischen etablierten Annahme überein, dass RKIP über seine von basischen Aminosäuren umgebene Ligandenbindungstasche (Serre *et al.* 1998; Banfield & Brady 2000) mit anionischen oder phosphorylierten Liganden oder Proteinen interagiert (Bernier *et al.* 1986; Bucquoy *et al.*

1994; Granovsky *et al.* 2009; Shemon *et al.* 2010). Vermutlich interagiert RKIP auch bevorzugt mit *phosphoryliertem* Raf1. Dies muss allerdings noch näher untersucht werden, da auch gezeigt wurde, dass RKIP die Phosphorylierung von Raf1 hemmt (Trakul *et al.* 2005; Rath *et al.* 2008; Tavel *et al.* 2012). Deswegen wurde vermutet, dass RKIP mit monophosphoryliertem Raf1 interagiert und dann dessen weitere Phosphorylierung und Aktivierung hemmt (Banfield & Brady 2000).

5.4 Die Mutante RKIP^{SK153/7EE} imitiert die Eigenschaften von S153-phosphoryliertem RKIP

Um die funktionellen Effekte der phosphorylierungsinduzierten Dimerisierung von RKIP besser untersuchen zu können, sollte eine phosphomimetische Mutante von RKIP generiert werden. Die Mutation von Serin oder Threonin zu Aspartat oder Glutamat kann in einigen Fällen die Phosphorylierung dieser Aminosäuren imitieren, jedoch vermittelt dieser Austausch in den meisten Fällen nicht die funktionellen Eigenschaften einer Phosphorylierung (Tarrant & Cole 2009). Dies lässt sich dadurch erklären, dass spezifische Unterschiede zwischen einer phosphorylierten Serin- oder Threoninaminosäureseitenkette und der Carboxygruppe eines Aspartat- oder Glutamatrestes bestehen. Dies betrifft die Größe (Phosphor ist größer als Kohlenstoff), die Anzahl der Sauerstoffatome (vier in der Phosphatgruppe gegen zwei in der Carboxygruppe) und die Anzahl an negativen Ladungen (zwei in der Phosphatgruppe gegen eine in der Carboxygruppe) (Tarrant & Cole 2009).

Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt, dass die Mutation von S153 zu Glutamat oder Aspartat RKIP keine phosphomimetischen Eigenschaften verleiht (Corbit *et al.* 2003; Lorenz *et al.* unveröffentlichte Daten). Um dem di-ionischen Charakter der Phosphatgruppe besser zu entsprechen, wurde deswegen eine zweite negativ geladene Aminosäure in die Mutante RKIP^{S153E} eingeführt. Die Phosphorylierungsstelle S153 ist in einer α -Helix lokalisiert und eine Umdrehung einer α -Helix besteht aus etwa vier Aminosäuren (Cohen & Parry 1986). Dies führte schließlich zu der Idee, ein weiteres Glutamat in Position 157 einzuführen, um so die beiden negativen Ladungen der Glutamatseitenketten benachbart auf der Oberfläche des Proteins zu lokalisieren. Tatsächlich zeigte die resultierende Mutante RKIP^{SK153/7EE} nicht nur phosphomimetische Eigenschaften bezüglich der Raf1- und GRK2-Bindung sondern auch eine deutliche Tendenz zur Dimerisierung unter basalen Bedingungen (**Abb. 17**, **Abb. 18**). Interessanterweise besitzt ein pflanzliches Homolog von RKIP, TF1 (*Terminal flower*), an den korrespondierenden Positionen zu 153 und 157 ebenfalls zwei Glutamatreste (**Abb. 49**).

TF1 gehört zur CETS-Familie (benannt nach ihren zuerst entdeckten Mitgliedern CEN, TF1 und SP), welche pflanzliche Entwicklungsprozesse regulieren (Pnueli *et al.* 2001). Als Interaktionspartner dieser Familie wurden bisher unter anderem eine Serin-/Threoninkinase, ein Transkriptionsfaktor und das Regulatorprotein 14-3-3 identifiziert (Pnueli *et al.* 2001; Lifschitz & Eshed 2006; McGarry & Ayre 2012). Es wäre interessant, nach weiteren Interaktionspartnern dieser natürlich vorkommenden „phosphomimetischen Mutante“ in Pflanzen zu suchen. Da Pflanzen auch Raf-ähnliche MAPK besitzen (Pitzschke *et al.* 2009), könnte untersucht werden, ob die pflanzlichen RKIP-Homologe Raf hemmen. Ferner könnte versucht werden, diese Variante in eukaryotischen Zelllinien zu exprimieren und dort zu testen, ob diese mit Raf oder GRK2 interagiert.

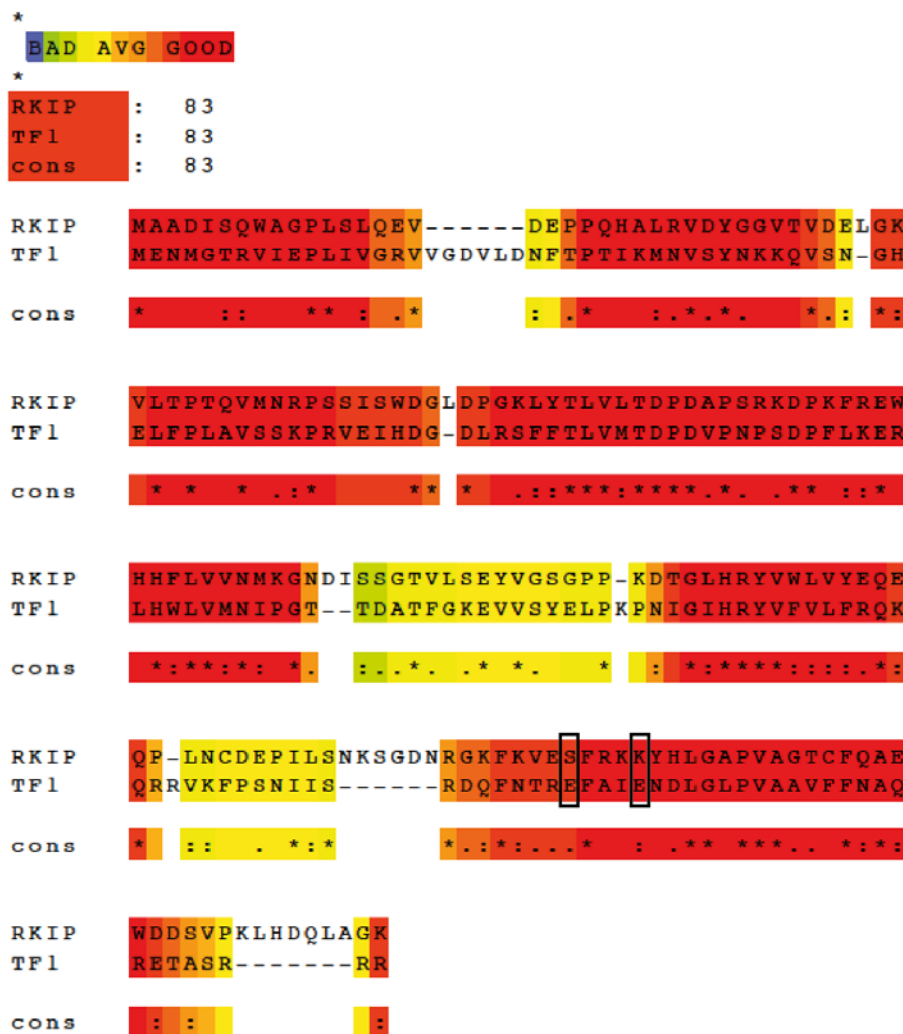


Abb. 49: Das RKIP nahe verwandte Rapsprotein *Terminal Flower 1* (TF1) besitzt an den korrespondierenden Positionen zu S153 und K157 je einen Glutamatrest.

Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen von Ratten-RKIP und dem nahe verwandten Protein *Terminal Flower 1* (TF1) aus Raps. Die Positionen der in RKIP^{SK153/7EE} mutierten Aminosäuren sind mit einem schwarzen Kasten markiert. Stark konservierte Aminosäuren sind in rot/orange markiert, ähnliche Aminosäuren in gelb und schlecht konservierte in grün. Der Sequenzvergleich erfolgte mit Hilfe von *T-Coffee Multiple Sequence Alignment Tools* (Notredame *et al.* 2000).

5.5 Das Peptid RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ hemmt die Dimerisierung von RKIP

In der Kristallstruktur von humanem RKIP (Banfield *et al.* 1998) interagieren zwei RKIP-Moleküle miteinander über eine schleifenartige Struktur von 24 Aminosäuren (AS 127-150). Diese Region ist in Homologen von Säugetieren stark konserviert (Granovsky *et al.* 2009) und wurde in einer kürzlich erschienenen Arbeit als eine der bevorzugten Interaktionsstellen von RKIP charakterisiert (Martin & Lavery 2012). Ferner hatten Hashimoto *et al.*

demonstriert, dass Deletionen, die Dimerisierung von Proteinen verhindern, meist an der Interaktionsstelle der Proteine lokalisiert sind und dass kurze Insertionen oder Deletionen oft einen großen Einfluss auf die Komplexstabilität haben können (Hashimoto & Panchenko 2010). Dies ließ vermuten, dass durch Deletion der richtigen Aminosäuren in der Region 127-150 eine dimerisierungsdefiziente Mutante generiert werden könnte.

Deswegen wurde eine Mutationsanalyse dieser Region durchgeführt, jedoch konnten viele der Mutanten nicht für Immunpräzipitationsexperimente verwendet werden, da sie schlecht exprimiert waren oder unspezifisch präzipitierten. Als verschiedene weitere Ansätze (s. **4.3**) auch erfolglos waren, entstand die Idee, die Dimerisierung von RKIP kompetitiv durch ein Peptid bestehend aus den Aminosäuren der schleifenartigen Struktur zu hemmen. Durch Co-Immunpräzipitationsexperimente konnte gezeigt werden, dass ein Peptid, welches diese Region enthielt (RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶), tatsächlich die Dimerisierung und RKIP/GRK2-Assoziation von Wildtyp-RKIP, RKIP^{SK153/7EE} und RKIP^{Δ143-6} hemmte (**Abb. 28**, **Abb. 31**, **Abb. 32**). Da die Expression dieses Peptids, – vermutlich auf Grund seiner Kürze – nur durch Tüpfelblot und RT-PCR nachweisbar war (**Abb. 33**), wurden auch längere Peptide getestet (RKIP¹⁻¹⁵⁰ und RKIP⁸⁴⁻¹⁵⁰). Diese Peptide inhibierten ebenfalls die RKIP-Dimerisierung und RKIP/GRK2-Assoziation (**Abb. 34**) und waren nach Gelelektrophorese im Immunoblot eindeutig nachweisbar (**Abb. 33**). Um auf unspezifische Effekte des Peptids RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ zu testen, wurde die Synthese von RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ und dem entsprechenden *scrambled peptide* in Auftrag gegeben (Bachem). Dabei wurde an den N-Terminus der Peptide eine sogenannte *Tat*-Sequenz gehängt um das Peptid mit zellpenetrierenden Eigenschaften zu versehen. Das Tat-Protein entstammt dem HI-Virus und besteht aus hauptsächlich positiv geladenen Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass polykationische Peptide durch einen noch nicht genau verstandenen Mechanismus die Zellmembran penetrieren und so in die Zelle aufgenommen werden (Frankel & Pabo 1988). Leider lieferten nur wenige der Versuche eindeutige Ergebnisse, da sich die Zellen oft schlecht stimulieren ließen (Daten nicht gezeigt). Deswegen wurde als ein Kontrollpeptid schließlich ein kloniertes Peptid aus dem N-Terminus von RKIP verwendet (RKIP¹⁻²⁰). Dieses Peptid zeigte keinerlei inhibitorischen Effekt auf die Dimerisierung von RKIP (**Abb. 31**, **Abb. 32**). Theoretisch könnte das Peptid auch die Dimerisierung von RKIP durch Hemmung der PKC-vermittelten Phosphorylierung inhibieren. Da das Peptid aber nur die Dimerisierung von RKIP, nicht aber dessen Phosphorylierung hemmte (**Abb. 29**), wurde somit auch gezeigt, dass die Dimerisierung nicht die Voraussetzung für eine Phosphorylierung von RKIP ist wie es beispielsweise bei den Rezeptortyrosinkinasen der Fall ist (Madhani 2001).

Folgende Befunde anderer Gruppen bestätigen die Vermutung, dass die Region 127-150 maßgeblich an der Dimerisierung von RKIP beteiligt ist: (i) Es wurde gezeigt, dass unstrukturierte Schleifenstrukturen auf Proteinoberflächen häufig eine Schlüsselrolle in Protein-Protein-Interaktionen spielen (Craστο & Feng 2001; Akiva *et al.* 2008; Fong *et al.* 2009; Hashimoto & Panchenko 2010). (ii) Regionen, die Protein-Oligomerisierung modulieren, besitzen oft einen hohen Anteil an geladenen, polaren Aminosäuren, Glycinen und Prolinen (Jones & Thornton 1995; Rauscher *et al.* 2006; Hashimoto & Panchenko 2010). Tatsächlich enthält die Schleifenstruktur 127-150 acht geladene und acht polare Aminosäuren, zwei Glycinreste und zwei Prolinreste. (iii) Ahn *et al.* demonstrierten, dass Sequenzunterschiede in dieser Region verantwortlich sind für die gegensätzlichen Effekte zweier pflanzlicher Homologe auf die Effloreszenz von *Arabidopsis thaliana* (Ahn *et al.* 2006).

All diese Befunde und die hohe Konservierung der Region 127-150 in RKIP von Säugetieren weisen auf eine besondere Rolle dieser Region in der Regulation von Protein-Protein-Interaktionen hin.

5.6 Die Deletionsmutante RKIP^{Δ143-6} dimerisiert phosphorylierungsunabhängig

Durch die Mutationsanalyse der Region 127-150 zeigte sich, dass die Deletion der Aminosäuren 143-146 eine Dimerisierung von RKIP unter basalen Bedingungen bewirkt (**Abb. 22**). Da eine Mutante von RKIP bekannt ist, welche bereits unter basalen Bedingungen verstärkt phosphoryliert wird (Granovsky *et al.* 2009), wurde überprüft, ob dies auch auf RKIP^{Δ143-6} zutrifft. Tatsächlich war RKIP^{Δ143-6} sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach PKC-Stimulation wesentlich stärker phosphoryliert als Wildtyp-RKIP (**Abb. 25**). Um zu untersuchen, ob die verstärkte Dimerisierung von RKIP^{Δ143-6} durch dessen verstärkte Phosphorylierung verursacht wird, wurden Doppelmutanten mit einer Deletion der Aminosäuren 143-146 und einer Mutation der PKC-Phosphorylierungsstelle S153 kloniert. Da diese unspezifisch präzipitierten, wurde schließlich stattdessen ein PKC-Inhibitor verwendet. Interessanterweise inhibierte die Hemmung von PKC zwar die Phosphorylierung von RKIP^{Δ143-6} (**Abb. 26**), jedoch nicht dessen Dimerisierung (**Abb. 27**). Dies deutet darauf hin, dass RKIP^{Δ143-6} im Gegensatz zu Wildtyp-RKIP phosphorylierungsunabhängig dimerisiert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Phosphorylierung in der α -Helix von Wildtyp-RKIP eine Konformationsänderung in der benachbarten schleifenartigen

Region verursacht, welche durch die Deletion der Aminosäuren in RKIP^{Δ143-6} imitiert wird, so dass RKIP^{Δ143-6} nicht mehr der Phosphorylierung bedarf, um zu dimerisieren. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung von Granovsky *et al.* unterstützt, dass bereits die Mutation von S153 zu Glutamat (RKIP^{S153E}) – ohne phosphomimetische Eigenschaften zu vermitteln – zu strukturellen Veränderungen der Aminosäuren 142, 146, 147 und 150 führt (Granovsky *et al.* 2009). Die Beobachtung, dass eine Verkürzung der Region 127-150 die Dimerisierung von RKIP begünstigt, wird auch dadurch bestätigt, dass ein pflanzliches Homolog von RKIP, dessen korrespondierende Region fünf Aminosäuren kürzer ist (**Abb. 50**), als Dimer kristallisiert (Banfield & Brady 2000). Allerdings weist dieses Protein auch in anderen Regionen erhebliche Veränderungen auf, so dass auch diese für die Dimerisierung verantwortlich sein könnten.

Unklar ist, warum die Deletionsmutante RKIP^{Δ143-6} stärker von PKC phosphoryliert wird. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass durch die Deletion in der Schleife, welche in der Nähe der Phosphorylierungsstelle S153 liegt, der Zugang der Kinase zu dieser erleichtert wird. Ferner könnte es auch sein, dass das Dimer ein besseres Substrat für PKC ist als das Monomer. Dagegen spricht allerdings, dass das Peptid RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶, welches die Dimerisierung von RKIP hemmt, die Phosphorylierung von RKIP nicht vermindert (**Abb. 29**). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Deletionsmutante – evtl. auf Grund der stärkeren Dimerisierung – langsamer dephosphoryliert wird.

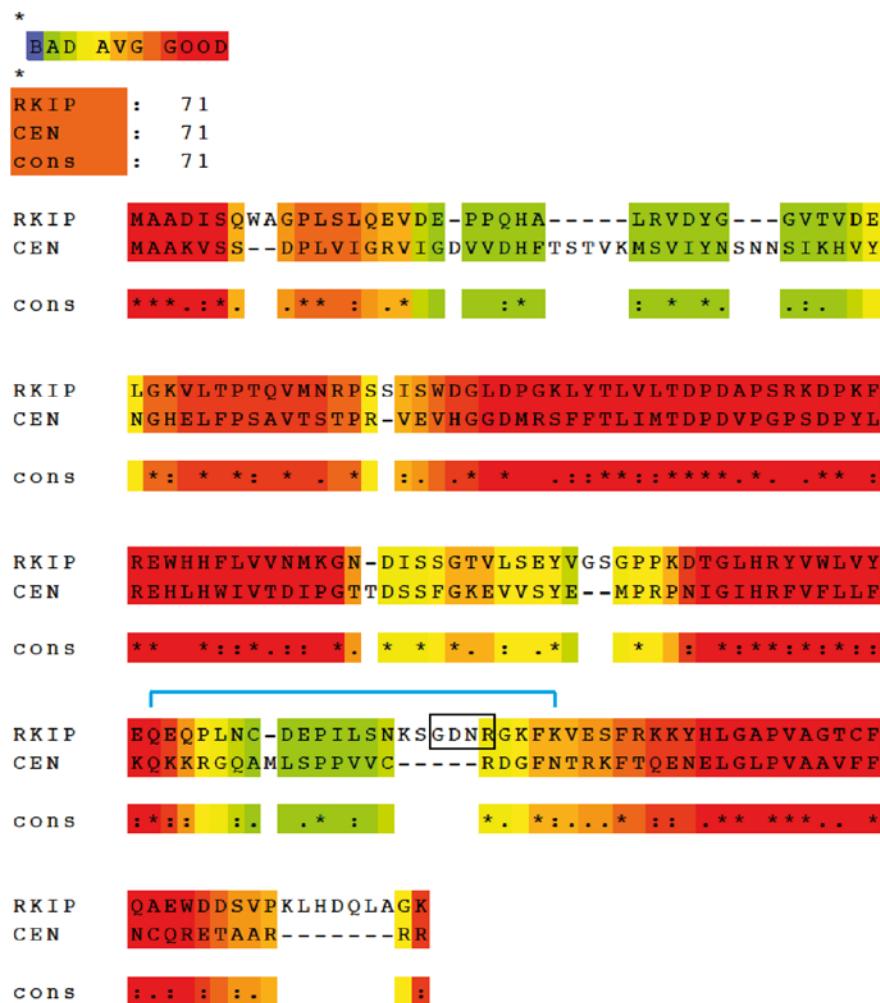


Abb. 50: Die korrespondierende Schleife zu 127-150 in RKIP ist in dem nahe verwandten Protein Centroradialis (CEN) aus *Antirrhinum majus* fünf Aminosäuren kürzer und nicht sehr stark konserviert.

Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen von Ratten-RKIP und dem nahe verwandten Protein Centroradialis (CEN) aus *Antirrhinum majus*. Die Positionen der in RKIP^{Δ143-6} deletierten Aminosäuren sind mit einem schwarzen Kasten markiert, die Schleife 127-150 mit einer blauen Klammer. Stark konservierte Aminosäuren sind in rot/orange markiert, ähnliche Aminosäuren in gelb und schlecht konservierte in grün. Der Sequenzvergleich erfolgte mit Hilfe von *T-Coffee Multiple Sequence Alignment Tools* (Notredame *et al.* 2000).

5.7 Die Dimerisierung von RKIP reguliert seine Interaktion mit Raf1 oder GRK2

Zusammengenommen wurde also festgestellt, dass RKIP nach PKC-vermittelter Phosphorylierung nicht nur von Raf1 dissoziiert und an GRK2 bindet, sondern auch dimerisiert. Die Dimerisierung von Proteinen scheint von besonderer biologischer Bedeutung zu sein, da sie

stark konserviert (Marianayagam *et al.* 2004) und in vielen Signaltransduktionswegen involviert ist (Klemm *et al.* 1998; Torshin 1999). Sie wird evolutionär begünstigt, da Multimere strukturelle und funktionelle Vorteile wie gesteigerte Stabilität und Kontrolle über die Zugängigkeit und Spezifität von Interaktionsflächen bieten (Marianayagam *et al.* 2004; Gronenborn 2009; Dayhoff *et al.* 2010). Dies eröffnet die Möglichkeit, dass die Dimerisierung von RKIP die spezifische Interaktion mit Raf1 oder GRK2 reguliert. Ergebnisse von drei unterschiedlichen Versuchen machen dies wahrscheinlich: (i) Die Mutante RKIP^{Δ143-6} dimerisierte nicht nur phosphorylierungsunabhängig sondern interagierte auch schwächer mit Raf1 (**Abb. 23**) und stärker mit GRK2 (**Abb. 22**). Da die Hemmung der RKIP^{Δ143-6}-Phosphorylierung die Interaktion mit GRK2 nicht beeinflusste (**Abb. 27**), deutet dies darauf hin, dass dimeres RKIP^{Δ143-6} nicht mehr der Phosphorylierung bedarf, um mit GRK2 zu interagieren. (ii) Das Peptid RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ inhibierte nicht nur die Dimerisierung von RKIP sondern auch seine Interaktion mit GRK2 (**Abb. 28, Abb. 31-Abb. 34**), während die Interaktion mit Raf1 (**Abb. 30**) oder die Phosphorylierung von RKIP (**Abb. 29**) nicht gehemmt wurde. Dies zeigt, dass die Phosphorylierung von RKIP nicht ausreicht, um die Interaktion mit GRK2 zu erlauben, sondern dass RKIP bevorzugt als Dimer mit GRK2 interagiert während Raf1 mit monomerem RKIP interagiert. (iii) Durch *cross-linking*-Versuche konnte nicht nur gezeigt werden, dass GRK2 bevorzugt an RKIP-Dimere bindet, sondern auch, dass die verstärkte Dimerisierung der Mutanten RKIP^{SK153/7EE} und RKIP^{Δ143-6} in einer verstärkten Komplexbildung mit GRK2 resultiert (**Abb. 35**).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht eindeutig gezeigt werden, ob es die Phosphorylierung oder die Dimerisierung von RKIP ist, welche die Dissoziation des RKIP/Raf1-Komplexes bewirkt. Auf Grund folgender Überlegungen nehme ich an, dass nicht die Phosphorylierung sondern erst die Dimerisierung von RKIP die Dissoziation von Raf1 bewirkt. (i) Die Phosphorylierungsstelle S153 ist nicht in der für die Interaktion mit Raf1 entscheidenden Region von RKIP (Aminosäuren 77-108 in RKIP) lokalisiert. (ii) Es erscheint möglich, dass dieselben Regionen von RKIP an der Interaktion mit phosphoryliertem Raf1 und der Dimerisierung von phosphoryliertem RKIP beteiligt sind. Für Raf1 wurde bereits gezeigt, dass es mit der Ligandenbindungstasche (Yeung *et al.* 2000; Rath *et al.* 2008; Granovsky *et al.* 2009) und auch Teilen der Schleife 127-150 (Tavel *et al.* 2012) von RKIP interagiert. Für die Interaktion mit phosphoryliertem RKIP kann dies ebenfalls angenommen werden, da Banfield *et al.* demonstrierten, dass die Dimerisierung eines pflanzlichen RKIP-Homologs (Banfield & Brady 2000) den Zugang zu dieser Ligandenbindungstasche blockiert. Ferner wird angenommen, dass RKIP über die Ligandenbindungstasche mit phosphorylierten

Proteinen interagiert (s. **1.5**), also möglicherweise auch nach Phosphorylierung mit sich selbst. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Schleife 127-150 die Dimerisierung von RKIP reguliert und somit vermutlich auch an der Interaktionsfläche beteiligt ist.

Dies alles macht es wahrscheinlich, dass sowohl an Raf1 gebundenes RKIP (die Phosphorylierungsstelle 153 liegt nicht in der Raf1/RKIP-Interaktionsfläche) als auch ungebundenes RKIP (gereinigtes RKIP lässt sich *in vitro* phosphorylieren, die Bindung an Raf1 ist nicht erforderlich) von PKC phosphoryliert wird und dass das von RKIP gebundene Raf1 durch ein weiteres phosphoryliertes RKIP-Molekül verdrängt wird. Da durch Dimerisierung nicht nur Interaktionsflächen verdeckt werden sondern auch neue entstehen (Klemm *et al.* 1998; Marianayagam *et al.* 2004; Gronenborn 2009; Hashimoto & Panchenko 2010), ermöglicht sie RKIP vermutlich gleichzeitig die Interaktion mit GRK2 (s. Schema **Abb. 51**).

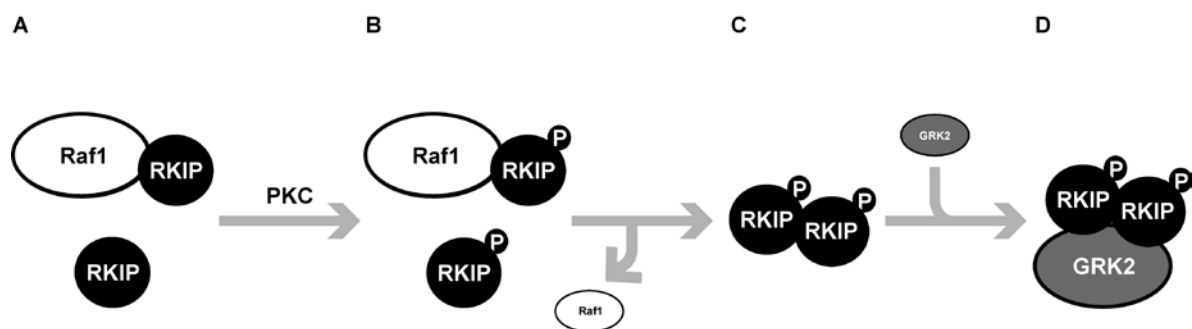


Abb. 51: Die Dimerisierung von RKIP reguliert seine Interaktion mit Raf1 oder GRK2.

Modell der Interaktion von RKIP mit Raf1 und GRK2. **A**, Unter Basalbedingungen ist RKIP ein Monomer und interagiert mit Raf1. **B**, PKC phosphoryliert sowohl Raf1-gebundenes als auch freies RKIP. **C**, Die RKIP-Dimerisierung bewirkt die Dissoziation von RKIP und Raf1. **D**, Die Dimerisierung von RKIP ermöglicht die Interaktion von RKIP und GRK2.

5.8 Die funktionelle Bedeutung der RKIP-Dimerisierung

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Dimerisierung von RKIP die Interaktion mit Raf1 zu verhindern scheint, während sie die Interaktion mit GRK2 begünstigt, wurde untersucht, ob dies auch mit einer veränderten Aktivität von Raf und GRK2 einhergeht. Hierbei zeigte sich, dass die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen die Ergebnisse der Interaktionsstudien widerspiegeln: Während Wildtyp-RKIP die Phosphorylierung von ERK1/2 und damit die Aktivität von Raf hemmte, zeigten die dimerischen Mutanten RKIP^{SK153/7EE} und RKIP^{Δ143-6} keine signifikante Hemmung (**Abb. 37**). Dies stimmt mit der verminderten Interaktion dieser

Mutanten mit Raf1 überein (**Abb. 17, Abb. 23**). Die Hemmung der GRK2-Aktivität durch RKIP wurde durch Bestimmung der (i) Licht-aktivierten Rhodopsinphosphorylierung unter Verwendung von gereinigten Proteinen, (ii) der Isoprenalin-stimulierten Phosphorylierung von β_2 -adrenergen Rezeptoren in Zellen und der (iii) Parathormon-stimulierten cAMP-Produktion in Zellen bestimmt. Während die Versuche der Rhodopsinphosphorylierung und der β_2 -adrenergen Rezeptorphosphorylierung zeigten, dass RKIP^{SK153/7EE} und RKIP ^{Δ 143-6} die Aktivität von GRK2 signifikant stärker hemmten als Wildtyp-RKIP (**Abb. 41, Abb. 43**), konnten bei der Bestimmung der PTH-stimulierten cAMP-Produktion keine Unterschiede zwischen Wildtyp-RKIP und den dimerischen Mutanten festgestellt werden (**Abb. 44**). Auch die Verwendung von anderen Zellen (verschiedene HEK293-Zelllinien, Kardiomyozyten), anderen Agonisten (Isoprenalin) oder die Messung von Inositoltriphosphat nach Stimulation des Parathormonrezeptors oder des α_1 -adrenergen Rezeptors ergab keine Unterschiede zwischen Wildtyp-RKIP und den dimerischen Mutanten hinsichtlich der Menge an produzierten sekundären Botenstoffen (Daten nicht gezeigt). Dies könnte verschiedene Ursachen gehabt haben. Zum einen könnte die Messung von sekundären Botenstoffen zu weit abwärts von dem Effekt der RKIP-vermittelten GRK2-Hemmung sein. Auch könnte der verwendete *Radioimmunoassay* nicht sensitiv genug sein, um potentielle Unterschiede zu detektieren. Zum anderen könnte die Agonistkonzentration (PTH, 30 nM) zu hoch gewesen sein, niedrigere Konzentrationen hatten allerdings zu zu großen Schwankungen der Messwerte geführt. Auch die Stimulationsdauer von 5 min könnte zu lang gewesen sein, so dass potentielle Unterschiede nivelliert wurden. Ein möglicher Lösungsansatz hierfür könnte beispielsweise die Messung der Aktivierung von G_s mit Hilfe eines FRET-Sensors darstellen (Hein *et al.* 2006). Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass in den verwendeten ROS-Zellen RKIP nach PTH-Stimulation maximal phosphoryliert vorlag und deswegen keine Unterschiede zwischen Wildtyp-RKIP und den dimerischen Mutanten bestanden.

Die in den Versuchen der Rhodopsinphosphorylierung und der Phosphorylierung von β_2 -adrenergen Rezeptoren gezeigte stärkere inhibitorische Aktivität der dimerischen Mutanten korreliert mit ihrer stärkeren Interaktion mit GRK2 (**Abb. 17, Abb. 22, Abb. 35**). Interessanterweise war der Unterschied zwischen Wildtyp-RKIP und den dimerischen Mutanten in der inhibitorischen Aktivität unter *in vitro* Bedingungen größer als in Zellen. Dies ist vermutlich durch die Abwesenheit von PKC-induzierter Phosphorylierung unter den *in vitro* Bedingungen zu erklären. Die Hemmung der GRK2-Aktivität durch Wildtyp-RKIP *in vitro* (**Abb. 43** und Lorenz *et al.* 2003) lässt sich nun durch die Existenz eines gewissen Anteils von Dimeren unter diesen Bedingungen, wie durch *cross-linking*-Versuche gezeigt

(**Abb. 14, Abb. 35**), erklären. Die hohe Proteinkonzentration der *in vitro*-Versuche erhöht vermutlich die Tendenz zur Dimerisierung (Marianayagam *et al.* 2004), so dass auch unphosphoryliertes RKIP teilweise dimerisiert und GRK2 hemmt.

5.9 Nachweis eines ~122 kDa-Komplexes bestehend aus RKIP und GRK2 in Mausherzen

Um zu untersuchen, ob der RKIP/RKIP/GRK2-Komplex auch im Herzen von Mäusen existiert und somit von physiologischer Relevanz für die Regulation der kardialen GRK2-Aktivität sein könnte, wurden *cross-linking* Versuche in Mausherzen durchgeführt. In Vorversuchen war überprüft worden, ob RKIP in unstimulierten Mausherzen phosphoryliert vorliegt, da sich in den vorigen Versuchen gezeigt hatte, dass dies die Voraussetzung für die Dimerisierung von RKIP und Interaktion mit GRK2 ist. Tatsächlich wurde RKIP bereits in unstimulierten Mausherzen durch PKC phosphoryliert (**Abb. 46, Abb. 47**). Nach Perfusion der Mausherzen mit Formaldehyd-Lösung ließ sich ein Komplex der Größe eines RKIP-Dimers gebunden an GRK2 nachweisen (**Abb. 45**) und nach Perfusion der Herzen mit einem PKC-Inhibitor und anschließender Vernetzung ebenfalls ein RKIP/Raf1-Komplex (**Abb. 48**). Dies impliziert, dass RKIP-Dimere auch unter physiologischen Bedingungen die Interaktion von RKIP mit Raf1 und GRK2 regulieren.

5.9.1 Die Rolle von GRK2 bei Herzinsuffizienz

Seit entdeckt wurde, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz die Expression und Aktivität von GRK2 signifikant erhöht ist (Ungerer *et al.* 1993, 1994), wird die Rolle dieser Kinase in der Pathogenese der Herzinsuffizienz intensiv untersucht. Obwohl noch nicht eindeutig geklärt ist, ob die gesteigerte GRK2-Aktivität protektiv oder schädlich für das Herz ist, erscheint die Hemmung der GRK2-Aktivität in zunehmendem Maße als eine vielversprechende Strategie in der Therapie der Herzinsuffizienz und anderen kardiovaskulären Erkrankungen (Lohse *et al.* 2003; Belmonte & Blaxall 2011; Rengo *et al.* 2012). Dies wird durch eine Reihe von Studien belegt, in denen die GRK2-Expression oder Aktivität sowohl in Zellen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz, als auch in Tieren beeinflusst wurde (Rengo *et al.* 2011). So verhindert die Depletion von GRK2 in Kardiomyozyten vor oder selbst nach Induktion eines Myokardinfarkts bei Mäusen die Progression der Herzinsuffizienz (Raake *et al.* 2008), während Überexpression von GRK2 kardiale Dysfunktion *in vivo* verursacht (Koch *et al.* 1995). Ferner demonstrierten Aguero *et al.* kürzlich, dass die myokardiale Expression von

GRK2 und GRK5 mit den funktionellen Parametern und dem Schweregrad der Herzinsuffizienz korreliert (Aguero *et al.* 2012). Dies impliziert, dass eine erniedrigte GRK-Aktivität und eine damit einhergehende erhöhte Aktivität β -adrenerger Rezeptoren protektiv für das Herz ist. Dagegen spricht scheinbar, dass eine gesteigerte Aktivität von β -adrenergen Rezeptoren durch Überexpression auf Dauer zu Hypertrophie und Herzinsuffizienz führt (Engelhardt *et al.* 1999, Liggett *et al.* 2000) und dass β -adrenerge Rezeptorantagonisten zur Standardtherapie der Herzinsuffizienz zählen (McMurray *et al.* 2012). Es ist allerdings zu vermuten, dass die bei Engelhardt *et al.* verwendete 15-fache Rezeptorüberexpression nicht mit der durch GRK2-Hemmung vermittelten Normalisierung der Rezeptorexpression verglichen werden kann (Rengo *et al.* 2009). Interessanterweise führt auch die Therapie mit β -adrenergen Rezeptorantagonisten zu einer verminderten GRK2-Expression und Aktivität (Ping *et al.* 1995) und einer Normalisierung der Rezeptorexpression und -aktivität (Rockman *et al.* 2002). Die Kombination von β -adrenergen Rezeptorantagonisten und GRK-Inhibition zeigte im Tiermodell sogar synergistische Effekte auf Herzfunktion und Überleben (Harding *et al.* 2001). Ferner scheinen GRK2-Inhibitoren neben den oben beschriebenen Effekten auf die β -adrenerge Signaltransduktion weitere positive Effekte zu haben wie eine erhöhte Akt-Aktivierung und NO-Freisetzung und damit verbundene anti-apoptotische Effekte (Brinks *et al.* 2010). So könnte durch die Kombination von β -Rezeptorantagonisten und GRK2-Inhibitoren nicht nur das Überleben von Herzinsuffizienzpatienten verbessert werden, sondern auch die Dosis und damit Nebenwirkungen von β -Rezeptorantagonisten reduziert werden (Lymperopoulos *et al.* 2012). Da trotz beträchtlicher Anstrengungen bisher kein selektiver und klinisch anwendbarer GRK2-Inhibitor entwickelt werden konnte, ist es von besonderem Interesse die RKIP-vermittelte Hemmung von GRK2 genau zu verstehen.

5.9.2 Inhibitoren von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen

Seit der Entdeckung der GRK werden für die bessere Erforschung der Funktionen der verschiedenen GRK-Isoformen und als potentielle Therapeutika für beispielsweise kardiovaskuläre und neurologische Erkrankungen (s. 1.1.3) isoformspezifische Inhibitoren gesucht, allerdings mit begrenztem Erfolg. Generelle Strategien zur Entwicklung von Kinaseinhibitoren beinhalten die Generierung von ATP-, Peptid- oder ATP-Peptid-Bisubstrat-Analoga. Die häufig starke Konservierung der katalytischen Kinasedomäne bedingt, dass ATP-Analoga teilweise keine ausreichende Spezifität besitzen. Trotzdem gelang die Entwicklung solcher Inhibitoren für Rezeptortyrosinkinasen bereits. Klinisch angewendete

Beispiele sind Gefitinib und Erlotinib, welche den EGF-Rezeptor hemmen (Noble *et al.* 2004). Die Protein-Substrat-Bindungstasche ist meist weniger konserviert, jedoch besitzen Peptid-Analoga eine schlechte Bioverfügbarkeit und ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften (Tarrant & Cole 2009).

Eine vielversprechende Alternative bieten niedermolekulare Substanzen, welche die inaktive Konformation der Kinase zu stabilisieren vermögen, da diese meist spezifisch für die jeweilige Kinase ist (Noble *et al.* 2004). Ein therapeutisch bereits eingesetztes Beispiel dieser Substanzklasse ist der Abl-Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (Schindler *et al.* 2000; Tarrant & Cole 2009).

Von besonderem Interesse ist die Entwicklung von GRK2-spezifischen Inhibitoren, da diese für die Therapie der Herzinsuffizienz und anderen kardiovaskulären Erkrankungen gesucht werden (Lohse *et al.* 2003; Rengo *et al.* 2012). Polyanionische Verbindungen wie Heparin und Dextransulfat (Benovic *et al.* 1989b) und der Naturstoff Banolol, welcher in die ATP-Bindungstasche bindet (Setyawan *et al.* 1999; Tesmer *et al.* 2010), sind potente, aber unspezifische GRK2-Inhibitoren. Wegen der zu großen Entfernung der ATP- und der Substratbindungstasche lassen sich keine niedermolekularen Substanzen entwickeln, welche gleichzeitig an die ATP- und an die Substratbindungstasche (ATP-Peptid-Bisubstrat-Analoga) binden (Iino *et al.* 2002). Andere eignen sich nicht auf Grund von geringer Aktivität, Selektivität oder schlechter Bioverfügbarkeit, wie etwa einige synthetische Peptide von intrazellulären Regionen des β_2 -adrenergen Rezeptors (Benovic *et al.* 1990; Winstel *et al.* 2005) und einige Substanzen, welche in die ATP-Bindungstasche binden (Palczewski *et al.* 1990; Kassack *et al.* 2000; Iino *et al.* 2002). Kürzlich entwickelten Takeda Pharmaceuticals Inhibitoren, welche spezifisch die inaktive Konformation von GRK2 und GRK3 stabilisieren (Thal *et al.* 2011). Informationen zur Verträglichkeit und Wirksamkeit dieser Substanzen bei experimentellen Herzinsuffizienzmodellen sind noch nicht erhältlich.

Die in dieser Arbeit generierte und charakterisierte phosphomimetische RKIP-Mutante könnte bei der Generierung eines stabilen RKIP/GRK2-Co-Krystalls hilfreich sein. Ein solcher Komplex würde wichtige Hinweise geben wie die spezifische Hemmung von GRK2 ermöglicht werden kann und damit die Entwicklung von GRK2-Inhibitoren für die Testung zur Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen voranbringen. K. Lorenz untersucht zurzeit den Effekt globaler und kardialer RKIP-Überexpression in verschiedenen experimentellen Herzinsuffizienzmodellen in Mäusen. Wie die ersten Ergebnisse zeigen, verbessert die Überexpression von RKIP bei Herzinsuffizienz die Herzfunktion und verlängert die

Überlebenszeit dieser Mäuse (K. Lorenz, unpublizierte Daten). Falls sich die Sicherheit und Effizienz der Gentherapie, welche momentan in klinischen Studien untersucht wird (Raake *et al.* 2011), bestätigen sollte, könnte die Gentherapie mit RKIP oder seiner phosphomimetischen Mutante eine vielversprechende Strategie bei der Therapie der Herzinsuffizienz darstellen.

5.10 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, wie die phosphorylierungsinduzierte Dimerisierung von RKIP seine spezifische Interaktion mit Raf1 und GRK2 reguliert. Dabei führt die Dimerisierung von RKIP nicht nur zu einer verstärkten Aktivität der Raf/MEK/ERK-Kaskade, sondern auch der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion. Somit bewirkt die Aktivierung von PKC durch einen der beiden Signalwege auch die Verstärkung des jeweils anderen. Ausgehend von diesen Ergebnissen eröffnen sich neue Fragestellungen: Welche Rolle spielt der gefundene Mechanismus für die Interaktion mit den anderen bekannten Interaktionspartnern von RKIP wie den Kinasen des NF κ B-Signalweges oder GSK3 β ? Da die *cross-linking*-Versuche implizieren, das phosphoryliertes RKIP in einem Monomer/Dimer-Gleichgewicht existiert, wäre es möglich, dass andere Kinasen spezifisch mit phosphoryliertem, monomerem RKIP interagieren. Dies könnte unter Zuhilfenahme der phosphomimetischen Mutante und des Peptids RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶, welches die Dimerisierung von RKIP inhibiert, untersucht werden.

Des Weiteren wäre interessant zu ermitteln, warum die Dimerisierung von RKIP wichtig für die Interaktion mit GRK2 ist. Die erhaltenen Ergebnissen führten zu der Annahme, dass die Dimerisierung von RKIP wichtig für seine physische Interaktion mit GRK2 ist, da nach *cross-linking* ein Komplex der Größe eines RKIP-Dimers gebunden an GRK2 nachgewiesen wurde. Ein *Co*-Kristall der phosphomimetischen Mutante und GRK2 könnte eine solche Hypothese bestätigen und könnte ferner wichtige Einblicke geben, wie die spezifische Hemmung von GRK2 ermöglicht werden kann. Da bisher der einzige Hinweis, dass das RKIP-Dimer mit GRK2 interagiert, von *cross-linking* Experimenten stammt, welche auch artifizielle Komplexe hervorbringen können, könnte die Bedeutung der Dimerisierung auch eine andere sein. So wäre vorstellbar, dass die Dimerisierung von RKIP dessen subzelluläre Lokalisation verändert und dadurch erst die Interaktion mit GRK2 ermöglicht. Versuche unter Zuhilfenahme der Fluoreszenzmikroskopie und beispielsweise GFP-*getaggt*en Wildtyp-RKIP im Vergleich zu den verschiedenen RKIP-Mutanten könnten zeigen, ob die Dimerisierung tatsächlich – wie zu vermuten wäre – eine Translokation von RKIP vom Zytosol zur Plasmamembran und damit in die Nähe aktivierter GRK2 induziert.

Auch könnte bestimmt werden, welche Faktoren das Gleichgewicht von unphosphoryliertem RKIP zu phosphoryliertem RKIP und das Monomer/Dimer-Verhältnis regulieren. Dies ist von biologischer Bedeutung, da Faktoren, welche das Gleichgewicht zugunsten des Dimers verschieben, eine Verstärkung der Signaltransduktion von sowohl der

Raf/MEK/ERK-Kaskade als auch von GPCR bewirken und *vice versa*. Wie sich in den Mausherzen gezeigt hatte, scheint in diesen Herzen RKIP bereits in unstimulierten Zellen teilweise phosphoryliert vorzuliegen. Es ist nicht klar, ob dies in anderen Zellen und Organen ebenfalls der Fall ist. Eine mögliche regulatorische Komponente könnte offensichtlich die Co-Lokalisierung und/oder Aktivität von PKC aber auch von Phosphatasen sein.

Wenig bekannt ist bisher über die in Menschen und anderen Säugetieren exprimierte Isoform von RKIP, PEBP4. Es wäre interessant herauszufinden, ob dessen Funktion ebenfalls durch Phosphorylierung und/oder Dimerisierung reguliert wird und ob RKIP und PEBP4 womöglich durch Heterodimerisierung gemeinsame Funktionen ausüben.

Eine bedeutende weiterführende Fragestellung wäre, ob der gefundene Mechanismus ein allgemeines Prinzip der Zelle darstellt, auf ökonomische Weise die Vielfalt der Proteinkinasen und anderer Enzyme spezifisch durch wenige Regulatorproteine zu regulieren und Signalwege miteinander zu verknüpfen. Der Vorgang der phosphorylierungsinduzierten Dimerisierung bedingt, dass RKIP in drei verschiedenen Zuständen (unphosphoryliertes Monomer, phosphoryliertes Monomer, phosphoryliertes Dimer) existieren kann. Wie bereits für das unphosphorylierte Monomer und das Dimer gezeigt, können diese Zustände spezifische regulatorische Funktionen haben. Folglich erweitert der Vorgang der phosphorylierungsinduzierten Dimerisierung durch Veränderung der Proteinoberfläche und/oder Lokalisierung die funktionelle Diversität und Spezifität der möglichen Interaktionen, ohne jedoch die Genomgröße zu verändern. Dieser elegante Mechanismus wurde hier erstmals für die Regulation der Proteinkinasen Raf1 und GRK2 beschrieben. Es ist anzunehmen, dass diesem einfachen, flexiblen und ökonomischen Mechanismus eine wichtige biologische Rolle in der zellulären Organisation von Signaltransduktionskaskaden und -netzwerken zukommt.

6 Zusammenfassung

RKIP reguliert Proteinkinasen der Signaltransduktionskaskaden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, der Raf/MEK/ERK-MAPK, des Transkriptionsfaktors NF κ B und von GSK3 β . Unklar war bisher, wie die spezifische Interaktion von RKIP mit seinen mannigfaltigen Interaktionspartnern ermöglicht und reguliert wird. Raf1 und GRK2 sind die einzigen bekannten direkten Interaktionspartner von RKIP und wurden deshalb gewählt, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser Interaktion genauer zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass RKIP nach PKC-vermittelter Phosphorylierung von Serin153 dimerisiert und dass diese Dimerisierung für die RKIP/Raf1-Dissoziation und die RKIP/GRK2-Interaktion essentiell ist. *Co*-Immunpräzipitationsexperimente mit einer phosphorylierungsdefizienten Mutante zeigten, dass für diese Dimerisierung die Phosphorylierung von beiden RKIP-Molekülen notwendig ist. Als Dimerinteraktionsfläche wurden die Aminosäuren 127-146 von RKIP identifiziert, da das Peptid RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶ die Dimerisierung von RKIP spezifisch und effizient hemmte. Um die Bedeutung dieser phosphorylierungsinduzierten Dimerisierung von RKIP für seine Interaktion mit Raf1 und GRK2 zu untersuchen, wurden eine phosphomimetische Mutante (RKIP^{SK153/7EE}) und eine Mutante von RKIP generiert, welche bereits unphosphoryliert dimerisiert (RKIP ^{Δ 143-6}). Folgende Ergebnisse legen nahe, dass die Dimerisierung von RKIP für die spezifische Interaktion mit Raf1 bzw. GRK2 entscheidend ist: (i) Die Dimerisierung von phosphoryliertem RKIP ging mit der Dissoziation von RKIP und Raf1 und der Assoziation von RKIP und GRK2 einher; (ii) die Mutanten RKIP^{SK153/7EE} und RKIP ^{Δ 143-6}, die bereits in unstimulierten Zellen eine starke Dimerisierung zeigten, hatten eine höhere Affinität zu GRK2 als zu Raf1; (iii) die Hemmung der RKIP-Dimerisierung interferierte nur mit der RKIP/GRK2- aber nicht mit der RKIP/Raf1-Interaktion; (iv) *in vitro* und in Maus Herzen konnte ein RKIP- und GRK2-immunreaktiver Komplex nachgewiesen werden; (v) Untersuchungen zur RKIP-vermittelten Hemmung der Kinaseaktivität von GRK2 und Raf implizierten, dass dimerisiertes RKIP nur die Aktivität von GRK2, nicht aber von Raf hemmt.

Diese Arbeit zeigt, dass die phosphorylierungsinduzierte Dimerisierung von RKIP die spezifische Interaktion von RKIP mit Raf1 und GRK2 koordiniert. Die Aufklärung dieses Mechanismus erweitert unser Verständnis der spezifischen Interaktion von Kinasen mit ihren Regulatorproteinen.

Summary

RKIP is a regulator of several distinct kinases and modulates diverse signal transduction cascades such as the signaling of G protein coupled receptors, of the Raf/MEK/ERK-cascade, of the transcription factor NF κ B, and of GSK3 β . Until now, it was not well understood how the specific interaction of RKIP with its diverse targets is achieved and regulated. Raf1 and GRK2 are the only known direct interaction partners of RKIP and were thus chosen to untangle the molecular mechanisms regulating the specific interaction of RKIP with these kinases.

In this dissertation it is shown that RKIP dimerizes upon PKC-mediated phosphorylation of serine153 and that this dimerization is essential for RKIP/Raf1-dissociation and RKIP/GRK2-association. *Co*-immunoprecipitation experiments with a phosphorylation-deficient mutant revealed that the dimerization of RKIP requires the phosphorylation of two RKIP molecules. The amino acids 127-146 of RKIP were identified as dimer-interface, since RKIP-dimerization was efficiently and specifically inhibited by the peptide RKIP¹²⁷⁻¹⁴⁶. To elucidate the implication of this phosphorylation-induced dimerization on the target specificity of RKIP, a phosphomimetic RKIP mutant (RKIP^{SK153/7EE}) and a dimeric RKIP mutant (RKIP ^{Δ 143-6}) were generated. The following results indicated that dimerization of RKIP controls its specific interaction with Raf1 or GRK2, respectively: (i) dimerization of phosphorylated RKIP occurred concomitantly with the release of RKIP from Raf1 and its association with GRK2; (ii) the RKIP mutants RKIP^{SK153/7EE} and RKIP ^{Δ 143-6}, which had a higher propensity for RKIP-dimerization already under basal conditions, had a higher affinity to GRK2 than to Raf1; (iii) inhibition of RKIP-dimerization prevented only RKIP/GRK2-binding but did not interfere with RKIP/Raf1-binding; (iv) an RKIP- and GRK2-immunoreactive complex was detected *in vitro* as well as in mouse hearts; (v) analyses of RKIP-mediated inhibition of GRK2 and Raf showed that a higher propensity for RKIP-dimerization translates into efficient GRK2-inhibition but not into Raf-inhibition.

The results of this thesis show that phosphorylation-induced dimerization of RKIP regulates its specific interaction with Raf1 and GRK2. The elucidation of this mechanism improves our understanding how specificity in the interaction of kinases and their regulatory proteins can be achieved.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
β₂-AR	beta2-adrenerger Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
EGF	Epidermal Growth Factor
sEGS	Sulfo-ethylenglycol-bis-(succinimidylsuccinat)
□RK	Extrazellulär-regulierte Kinase
FCS	Fetales Kälberserum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GFX	Bisindolylmaleimid I
GIRK	G-Protein-gekoppelte einwärtsgleichrichtende Kalium-Kanäle
G-Protein	Guanosintrisphosphat (GTP)-bindendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor/ G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase/ G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinasen
GSK	Glykogen Synthase Kinase
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
IB	Immunoblot
IκB	Inhibitor von κB
IKK	IκB Kinase
IL1β	Interleukin 1 beta
IP	Immunpräzipitation
Iso	Isoprenalin
JNK	c-jun N-terminale Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MEK	MAPK und ERK Kinase
NFκB	<i>Nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>

Abkürzung	Bedeutung
NIK	NFκB induzierende Kinase
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
PKA/ PKC	Protein Kinase A/C
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PEBP	Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PTH	Parathormon
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RIPA-Puffer	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> -Puffer
RKIP	Raf Kinase Inhibitor Protein
RKIP^{SK/EE}	RKIP ^{SK153/7EE}
ROS-Zellen	Ratten-Osteosarkom Zellen
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> -Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAK	<i>Transforming growth factor β-activated kinase</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRAF	TNFα Rezeptor-assoziiertes Faktor
wt	Wildtyp

7.2 Puffer und Stocklösungen

7.2.1 Proteinchemische Arbeiten

Blockmilch	Milchpulver	5 % (w/v)
	NaCl	100 mM
	TRIS-HCl	10 mM, pH 7,4
	Tween 20	0,1 % (v/v)
Coomassie-Färbelösung	Methanol	40% (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Coomassie Blue R250	0,1 % (w/v)
Entfärbelösung	Methanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
GRK2-Puffer, pH 7,2	HEPES	20 mM
	EDTA	2 mM
Lysepuffer	1x TSE-Puffer	
	1x Phosphataseinhibitormix	
	Triton X	1 % (v/v)
10x PBS-Puffer	NaCl	1,37 M
	KCl	27 mM
	KH ₂ PO ₄	15 mM
	Na ₂ HPO ₄	101 mM
10x Phosphataseinhibitormix	NaF	500 mM
	Na ₄ P ₂ O ₇	50 mM
	Na ₃ VO ₄	10 mM
	NaN ₃	3 mM
	β-Glycerolphosphat	50 mM
PKC-Puffer, pH 7,2	HEPES	20 mM
	MgCl ₂	10 mM
	CaCl ₂	0,1 mM
	β-Mercaptoethanol	3 mM
100x PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid in 99% Ethanol	100 mM

100x Proteaseinhibitormix	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	0,1 % (w/v)
	Benzamidin	25 mM
	in TRIS	50 mM, pH 7,4
RIA-Puffer, pH 7,3	NaCl	137 mM
	KCl	5 mM
	MgCl ₂	1 mM
	CaCl ₂	1 mM
	HEPES	15 mM
RIPA-Puffer	TRIS-HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	Nonidet P-40	1 % (v/v)
	Natriumdeoxycholat	0.5 % (w/v)
	SDS	0.1 % (w/v)
	EDTA	1 mM
Stripping-Puffer, pH 2,5	Glycin	100 mM
	SDS	0.1 % (w/v)
<u>TRIS-Glycin-SDS-Gelelektrophorese</u>		
10x SDS-Elektrophoresepuffer	TRIS-HCl	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	1% (w/v)
4x Sammelgelpuffer	TRIS-HCl	500 mM, pH 6,8
	SDS	0,4% (w/v)
4x Trenngelpuffer	TRIS-HCl	1,5 M, pH 8,8
	SDS	0,4% (w/v)
4x Auftragspuffer	TRIS-HCl	200 mM, pH 7,4
	Glycerin	40% (w/v)
	β-Mercaptoethanol	20% (v/v)
	SDS	8% (w/v)
Transferpuffer	Bromphenolblau	0,05% (w/v)
	TRIS-HCl	20 mM
	Glycin	150 mM
	Methanol	20 % (v/v)

TRIS-Tricin-SDS-Gelelektrophorese

10x Anodenpuffer, pH 8,9	TRIS-HCl	2 M
10x Kathodenpuffer, pH 8,25	TRIS-HCl	1 M
	Tricine	1 M
	SDS	1% (w/v)
Gelpuffer, pH 8,45	TRIS-HCl	3 M TRIS
	SDS	0.3% (w/v)
2x TSE-Puffer, pH 7,4	TRIS-HCl	100 mM
	NaCl	600 mM
	EDTA	10 mM
	NaN ₃	3 mM
Waschpuffer	Albumin Fraktion V	0,25 % (w/v)
	NaCl	150 mM
	TRIS-HCl	50 mM, pH 7,4
	Nonidet P40	0,2 % (v/v)

7.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

50x DNA-Laufpuffer	TRIS-HCl	2 M
	Essigsäure, konz.	6 % (w/v)
	EDTA	50 mM
5x DNA-Probenpuffer	EDTA	100 mM
	Glycerin	50 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,1 % (w/v) mM

7.2.3 Medien und Puffer für Zellkulturtechniken

2x BBS-Puffer, pH 6,95	BES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
Einfriermedium	DMSO	10 %
	FCS	20 %
	Medium	70 %
LB-Medium	Pepton aus Casein	1,6 % (w/v)
	Hefe-Extrakt	1 % (w/v)
	NaCl	0,5 % (w/v)

Transformationspuffer	CaCl ₂	150 mM
	MgCl ₂	250 mM
	KCl	500 mM

8 Literaturverzeichnis

- AGUERO J., ALMENAR L., MONTO F., OLIVER E., SANCHEZ-LAZARO I., VICENTE D., MARTINEZ-DOLZ L., D'OCON P., RUEDA J. & SALVADOR A. 2012. Myocardial G protein receptor-coupled kinase expression correlates with functional parameters and clinical severity in advanced heart failure. *J Card Fail* 18: 53-61.
- AHN J.H., MILLER D., WINTER V.J., BANFIELD M.J., LEE J.H., YOO S.Y., HENZ S.R., BRADY R.L. & WEIGEL D. 2006. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J* 25: 605-614.
- AKIVA E., ITZHAKI Z. & MARGALIT H. 2008. Built-in loops allow versatility in domain-domain interactions: lessons from self-interacting domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13292-13297.
- ANTICO ARCIUCH V.G., ALIPPE Y., CARRERAS M.C. & PODEROSO J.J. 2009. Mitochondrial kinases in cell signaling: Facts and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 1234-1249.
- AL-MULLA F., BITAR M.S., AL-MAGHREBI M., BEHBEHANI A.I., AL-ALI W., RATH O., DOYLE B., TAN K.Y., PITT A. & KOLCH W. 2011. Raf kinase inhibitor protein RKIP enhances signaling by glycogen synthase kinase-3beta. *Cancer Res* 71: 1334-1343.
- ALEXANDER H.E., KOCH G., MOUNTAIN I.M. & VAN DAMME O. 1958. Infectivity of ribonucleic acid from poliovirus in human cell monolayers. *J exp med* 108: 493-506.
- AKTORIES K., FÖRSTERMANN, U., HOFMANN, F.B. & STARKE, K. 2009. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Elsevier.
- ANGELONE T., GOUMON Y., CERRA M.C., METZ-BOUTIGUE M.H., AUNIS D. & TOTA B. 2006. The emerging cardioinhibitory role of the hippocampal cholinergic neurostimulating peptide. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 336-344.
- ANTICO ARCIUCH V.G., ALIPPE Y., CARRERAS M.C. & PODEROSO J.J. 2009. Mitochondrial kinases in cell signaling: Facts and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 1234-1249.
- ARBER W. 1978. Restriction endonucleases. *Angew Chem Int Ed Engl* 17: 73-79.
- ATMANENE C., LAUX A., GLATTARD E., MULLER A., SCHOENTGEN F., METZ-BOUTIGUE M.H., AUNIS D., VAN DORSSELAER A., STEFANO G.B., SANGLIER-CIANFERANI S. & GOUMON Y. 2009. Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry. *Med Sci Monit* 15: BR178-87.
- BANFIELD M.J., BARKER J.J., PERRY A.C. & BRADY R.L. 1998. Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure* 6: 1245-1254.
- BANFIELD M.J. & BRADY R.L. 2000. The structure of Antirrhinum centroradialis protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator. *J Mol Biol* 297: 1159-1170.
- BELMONTE S.L. & BLAXALL B.C. 2011. G protein coupled receptor kinases as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Circ Res* 109: 309-319.

- BENOVIC J.L., DEBLASI A., STONE W.C., CARON M.G. & LEFKOWITZ R.J. 1989a. Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science* 246: 235-240.
- BENOVIC J.L., MAYOR F.J., SOMERS R.L., CARON M.G. & LEFKOWITZ R.J. 1986. Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by beta-adrenergic receptor kinase. *Nature* 321: 869-872.
- BENOVIC J.L., ONORATO J., LOHSE M.J., DOHLMAN H.G., STANISZEWSKI C., CARON M.G. & LEFKOWITZ R.J. 1990. Synthetic peptides of the hamster beta 2-adrenoceptor as substrates and inhibitors of the beta-adrenoceptor kinase. *Br J Clin Pharmacol* 30 Suppl 1: 3S-12S.
- BENOVIC J.L., STONE W.C., CARON M.G. & LEFKOWITZ R.J. 1989b. Inhibition of the beta-adrenergic receptor kinase by polyanions. *J Biol Chem* 264: 6707-6710.
- BENOVIC J.L., STRASSER R.H., CARON M.G. & LEFKOWITZ R.J. 1986. Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 2797-2801.
- BERNIER I. & JOLLES P. 1984. Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain. *Biochim Biophys Acta* 790: 174-181.
- BERNIER I., TRESKA J.P. & JOLLES P. 1986. Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol. *Biochim Biophys Acta* 871: 19-23.
- BESHIR A.B., ARGUETA C.E., MENIKARACHCHI L.C., GASCON J.A. & FENTEANY G. 2011. Locostatin Disrupts Association of Raf Kinase Inhibitor Protein With Binding Proteins by Modifying a Conserved Histidine Residue in the Ligand-Binding Pocket. *For Immunopathol Dis Therap* 2: 47-58.
- BESHIR A.B., REN G., MAGPUSAO A.N., BARONE L.M., YEUNG K.C. & FENTEANY G. 2010. Raf kinase inhibitor protein suppresses nuclear factor-kappaB-dependent cancer cell invasion through negative regulation of matrix metalloproteinase expression. *Cancer Lett* 299: 137-149.
- BOLLENGIER F., BEECKMANS S., MAHLER A. & KANAREK L. 1989. Further physicochemical characterization of the novel human brain protein h3. *J Neurochem* 52: 1123-1126.
- BRINKS H., BOUCHER M., GAO E., CHUPRUN J.K., PESANT S., RAAKE P.W., HUANG Z.M., WANG X., QIU G., GUMPERT A., HARRIS D.M., ECKHART A.D., MOST P. & KOCH W.J. 2010. Level of G protein-coupled receptor kinase-2 determines myocardial ischemia/reperfusion injury via pro- and anti-apoptotic mechanisms. *Circ Res* 107: 1140-1149.
- BUCQUOY S., JOLLES P. & SCHOENTGEN F. 1994. Relationships between molecular interactions (nucleotides, lipids and proteins) and structural features of the bovine brain 21-kDa protein. *Eur J Biochem* 225: 1203-1210.
- BURNETTE W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203.
- CANAGARAJAH B.J., KHOKHLATCHEV A., COBB M.H. & GOLDSMITH E.J. 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90: 859-869.

- CARMAN C.V., LISANTI M.P. & BENOVIC J.L. 1999a. Regulation of G protein-coupled receptor kinases by caveolin. *J Biol Chem* 274: 8858-8864.
- CARMAN C.V., PARENT J.L., DAY P.W., PRONIN A.N., STERNWEIS P.M., WEDEGAERTNER P.B., GILMAN A.G., BENOVIC J.L. & KOZASA T. 1999b. Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* 274: 34483-34492.
- CARMAN C.V., SOM T., KIM C.M. & BENOVIC J.L. 1998. Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 273: 20308-20316.
- DEISS K., KISKER C., LOHSE M.J. & LORENZ K. 2012. Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) Dimer Formation Controls Its Target Switch from Raf1 to G Protein-coupled Receptor Kinase (GRK) 2. *J Biol Chem* 287: 23407-23417.
- CHATTERJEE D., BAI Y., WANG Z., BEACH S., MOTT S., ROY R., BRAASTAD C., SUN Y., MUKHOPADHYAY A., AGGARWAL B.B., DARNOWSKI J., PANTAZIS P., WYCHE J., FU Z., KITAGWA Y., KELLER E.T., SEDIVY J.M. & YEUNG K.C. 2004. RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279: 17515-17523.
- CHEN C. & OKAYAMA H. 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7: 2745-2752.
- CHOI D.J., KOCH W.J., HUNTER J.J. & ROCKMAN H.A. 1997. Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 272: 17223-17229.
- CHUANG T.T., PAOLUCCI L. & DE BLASI A. 1996. Inhibition of G protein-coupled receptor kinase subtypes by Ca²⁺/calmodulin. *J Biol Chem* 271: 28691-28696.
- CLAING A., LAPORTE S.A., CARON M.G. & LEFKOWITZ R.J. 2002. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 66: 61-79.
- COHEN C. & PARRY D.A.D. 1986. alpha-Helical coiled coils-a widespread motif in proteins. *Trends Biochem Scie* 11: 245-248.
- CORBIT K.C., TRAKUL N., EVES E.M., DIAZ B., MARSHALL M. & ROSNER M.R. 2003. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem* 278: 13061-13068.
- CRASTO C.J. & FENG J. 2001. Sequence codes for extended conformation: a neighbor-dependent sequence analysis of loops in proteins. *Proteins* 42: 399-413.
- DAYHOFF J.E., SHOEMAKER B.A., BRYANT S.H. & PANCHENKO A.R. 2010. Evolution of protein binding modes in homooligomers. *J Mol Biol* 395: 860-870.
- DICKER F., QUITTERER U., WINSTEL R., HONOLD K. & LOHSE M.J. 1999. Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5476-5481.
- ELORZA A., PENELA P., SARNAGO S. & MAYOR F.J. 2003. MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 278: 29164-29173.

- ENGELHARDT S., HEIN L., WIESMANN F. & LOHSE M.J. 1999. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7059-7064.
- ESCARA-WILKE J., YEUNG K. & KELLER E.T. 2012. Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in cancer. *Cancer Metastasis Rev*
- EVES E.M., SHAPIRO P., NAIK K., KLEIN U.R., TRAKUL N. & ROSNER M.R. 2006. Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint. *Mol Cell* 23: 561-574.
- EVRON T., DAIGLE T.L. & CARON M.G. 2012. GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends Pharmacol Sci* 33: 154-164.
- FELGNER P.L., GADEK T.R., HOLM M., ROMAN R., CHAN H.W., WENZ M., NORTHROP J.P., RINGOLD G.M. & DANIELSEN M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7413-7417.
- FERGUSON S.S. 2007. Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends Pharmacol Sci* 28: 173-179.
- FIRESTONE G.L. & WINGUTH S.D. 1990. Immunoprecipitation of proteins. *Methods Enzymol* 182: 688-700.
- FIRULLI B.A., HOWARD M.J., McDAID J.R., McILREAVEY L., DIONNE K.M., CENTONZE V.E., CSERJESI P., VIRSHUP D.M. & FIRULLI A.B. 2003. PKA, PKC, and the protein phosphatase 2A influence HAND factor function: a mechanism for tissue-specific transcriptional regulation. *Mol Cell* 12: 1225-1237.
- FONG J.H., SHOEMAKER B.A., GARBUZYNSKIY S.O., LOBANOV M.Y., GALZITSKAYA O.V. & PANCHENKO A.R. 2009. Intrinsic disorder in protein interactions: insights from a comprehensive structural analysis. *PLoS Comput Biol* 5: e1000316. 1-11.
- FRANKEL A.D. & PABO C.O. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55: 1189-1193.
- FREEMAN J.L., DE LA CRUZ E.M., POLLARD T.D., LEFKOWITZ R.J. & PITCHER J.A. 1998. Regulation of G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) by actin. *J Biol Chem* 273: 20653-20657.
- FREEMAN J.L., PITCHER J.A., LI X., BENNETT V. & LEFKOWITZ R.J. 2000. alpha-Actinin is a potent regulator of G protein-coupled receptor kinase activity and substrate specificity in vitro. *FEBS Lett* 473: 280-284.
- FU Z., KITAGAWA Y., SHEN R., SHAH R., MEHRA R., RHODES D., KELLER P.J., MIZOKAMI A., DUNN R., CHINNAIYAN A.M., YAO Z. & KELLER E.T. 2006. Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. *Prostate* 66: 248-256.
- FU Z., SMITH P.C., ZHANG L., RUBIN M.A., DUNN R.L., YAO Z. & KELLER E.T. 2003. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 95: 878-889.

- GEORGE A.J., HOLSINGER R.M., McLEAN C.A., TAN S.S., SCOTT H.S., CARDAMONE T., CAPPAI R., MASTERS C.L. & LI Q.X. 2006. Decreased phosphatidylethanolamine binding protein expression correlates with Abeta accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27: 614-623.
- GILMORE T.D. & WOLENSKI F.S. 2012. NF-kappaB: where did it come from and why? *Immunol Rev* 246: 14-35.
- GOODSELL D.S. & OLSON A.J. 2000. Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 105-153.
- GOUMON Y., ANGELONE T., SCHOENTGEN F., CHASSEROT-GOLAZ S., ALMAS B., FUKAMI M.M., LANGLEY K., WELTERS I.D., TOTA B., AUNIS D. & METZ-BOUTIGUE M.H. 2004. The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine-binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology. *J Biol Chem* 279: 13054-13064.
- GOUMON Y., MULLER A., GLATTARD E., MARBAN C., GASNIER C., STRUB J.M., CHASSEROT-GOLAZ S., ROHR O., STEFANO G.B., WELTERS I.D., VAN DORSELAER A., SCHOENTGEN F., AUNIS D. & METZ-BOUTIGUE M.H. 2006. Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. *J Biol Chem* 281: 8082-8089.
- GRAHAM F.L., SMILEY J., RUSSELL W.C. & NAIRN R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74.
- GRANDY D.K., HANNEMAN E., BUNZOW J., SHIH M., MACHIDA C.A., BIDLACK J.M. & CIVELLI O. 1990. Purification, cloning, and tissue distribution of a 23-kDa rat protein isolated by morphine affinity chromatography. *Mol Endocrinol* 4: 1370-1376.
- GRANOVSKY A.E., CLARK M.C., McELHENY D., HEIL G., HONG J., LIU X., KIM Y., JOACHIMIAK G., JOACHIMIAK A., KOIDE S. & ROSNER M.R. 2009. Raf kinase inhibitory protein function is regulated via a flexible pocket and novel phosphorylation-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 29: 1306-1320.
- GRANOVSKY A.E. & ROSNER M.R. 2008. Raf kinase inhibitory protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Res* 18: 452-457.
- GRAVES J.D. & KREBS E.G. 1999. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol Ther* 82: 111-121.
- GRONENBORN A.M. 2009. Protein acrobatics in pairs-dimerization via domain swapping. *Curr Opin Struct Biol* 19: 39-49.
- GROS R., BENOVIC J.L., TAN C.M. & FELDMAN R.D. 1997. G-Protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J Clin Invest* 99: 2087-2093.
- GULTEKIN H. & HEERMANN K.H. 1988. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* 172: 320-329.
- GUREVICH E.V., TESMER J.J., MUSHEGIAN A. & GUREVICH V.V. 2012. G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol Ther* 133: 40-69.

- HAGA K., OGAWA H., HAGA T. & MUROFUSHI H. 1998. GTP-binding-Protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) binds and phosphorylates tubulin. *Eur J Biochem* 255: 363-368.
- HAGAN S., AL-MULLA F., MALLON E., OIEN K., FERRIER R., GUSTERSON B., GARCIA J.J. & KOLCH W. 2005. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11: 7392-7397.
- HAGAN S., GARCIA R., DHILLON A. & KOLCH W. 2006. Raf kinase inhibitor protein regulation of raf and MAPK signaling. *Methods Enzymol* 407: 248-259.
- HAMDANI N. & VAN DER VELDEN J. 2009. Lack of specificity of antibodies directed against human beta-adrenergic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 403-407.
- HANAHAH D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- HARDING V.B., JONES L.R., LEFKOWITZ R.J., KOCH W.J. & ROCKMAN H.A. 2001. Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5809-5814.
- HASHIMOTO K., NISHI H., BRYANT S. & PANCHENKO A.R. 2011. Caught in self-interaction: evolutionary and functional mechanisms of protein homooligomerization. *Phys Biol* 8: 035007. 1-10.
- HASHIMOTO K. & PANCHENKO A.R. 2010. Mechanisms of protein oligomerization, the critical role of insertions and deletions in maintaining different oligomeric states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20352-20357.
- HAURI H.P. & BUCHER K. 1986. Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution. *Anal Biochem* 159: 386-389.
- HAWKES R., NIDAY E. & GORDON J. 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* 119: 142-147.
- HEIN P., ROCHAIS F., HOFFMANN C., DORSCH S., NIKOLAEV V.O., ENGELHARDT S., BERLOT C.H., LOHSE M.J. & BUNEMANN M. 2006. Gs activation is time-limiting in initiating receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* 281: 33345-33351.
- HELLMANN J., ROMMELSPACHER H., MUHLBAUER E. & WERNICKE C. 2010. Raf kinase inhibitor protein enhances neuronal differentiation in human SH-SY5Y cells. *Dev Neurosci* 32: 33-46.
- HENGST U., ALBRECHT H., HESS D. & MONARD D. 2001. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem* 276: 535-540.
- HICKOX D.M., GIBBS G., MORRISON J.R., SEBIRE K., EDGAR K., KEAH H.H., ALTER K., LOVELAND K.L., HEARN M.T., DE KRETZER D.M. & O'BRYAN M.K. 2002. Identification of a novel testis-specific member of the phosphatidylethanolamine binding protein family, pebp-2. *Biol Reprod* 67: 917-927.
- HILL S.J. 2006. G-Protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S27-37.

- HOCHULI E., DOBELI H. & SCHACHER A. 1987. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* 411: 177-184.
- HUANG C.C. & TESMER J.J. 2011. Recognition in the face of diversity: interactions of heterotrimeric G proteins and G protein-coupled receptor (GPCR) kinases with activated GPCRs. *J Biol Chem* 286: 7715-7721.
- HUFF J.P., GRANT B.J., PENNING C.A. & SULLIVAN K.F. 1990. Optimization of routine transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *Biotechniques* 9: 570-2, 574, 576-7.
- INO M., FURUGORI T., MORI T., MORIYAMA S., FUKUZAWA A. & SHIBANO T. 2002. Rational design and evaluation of new lead compound structures for selective betaARK1 inhibitors. *J Med Chem* 45: 2150-2159.
- JANSOHN M. 2011. *Gentechnische Methoden*. Elsevier.
- JIA B., LIU H., KONG Q. & LI B. 2012. RKIP expression associated with gastric cancer cell invasion and metastasis. *Tumour Biol*
- JONES S. & THORNTON J.M. 1995. Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures. *Prog Biophys Mol Biol* 63: 31-65.
- KASSACK M.U., HOGGER P., GSCHWEND D.A., KAMEYAMA K., HAGA T., GRAUL R.C. & SADEE W. 2000. Molecular modeling of G-Protein coupled receptor kinase 2: docking and biochemical evaluation of inhibitors. *AAPS PharmSci* 2: E2.
- KIM C.M., DION S.B., ONORATO J.J. & BENOVIC J.L. 1993. Expression and characterization of two beta-adrenergic receptor kinase isoforms using the baculovirus expression system. *Receptor* 3: 39-55.
- KLEMM J.D., SCHREIBER S.L. & CRABTREE G.R. 1998. Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annu Rev Immunol* 16: 569-592.
- KLINKE, R., PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGEL, S. 2009. *Physiologie*. Georg Thieme Verlag.
- KLOCKENBUSCH C. & KAST J. 2010. Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin beta1. *J Biomed Biotechnol* 2010: 927585. 1-13.
- KOCH W.J., ROCKMAN H.A., SAMAMA P., HAMILTON R.A., BOND R.A., MILANO C.A. & LEFKOWITZ R.J. 1995. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science* 268: 1350-1353.
- KOLCH W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2: 289-305.
- KOLCH W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 827-837.
- KRASEL C., DAMMEIER S., WINSTEL R., BROCKMANN J., MISCHAK H. & LOHSE M.J. 2001. Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J Biol Chem* 276: 1911-1915.

- KRUPNICK J.G., GUREVICH V.V. & BENOVIC J.L. 1997. Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. *J Biol Chem* 272: 18125-18131.
- LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LANGLAND J.O. & JACOBS B.L. 1992. Cytosolic double-stranded RNA-dependent protein kinase is likely a dimer of partially phosphorylated Mr = 66,000 subunits. *J Biol Chem* 267: 10729-10736.
- LEMAIRE P.A., LARY J. & COLE J.L. 2005. Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA. *J Mol Biol* 345: 81-90.
- LI H., WANG X., LI N., QIU J., ZHANG Y. & CAO X. 2007. hPEBP4 resists TRAIL-induced apoptosis of human prostate cancer cells by activating Akt and deactivating ERK1/2 pathways. *J Biol Chem* 282: 4943-4950.
- LIFSCHITZ E. & ESHED Y. 2006. Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *J Exp Bot* 57: 3405-3414.
- LIGGETT S.B., TEPE N.M., LORENZ J.N., CANNING A.M., JANTZ T.D., MITARAI S., YATANI A. & DORN G.W.N. 2000. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* 101: 1707-1714.
- LIU S., PREMONT R.T., KONTOS C.D., ZHU S. & ROCKEY D.C. 2005. A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nat Med* 11: 952-958.
- LOHSE M.J., BENOVIC J.L., CODINA J., CARON M.G. & LEFKOWITZ R.J. 1990. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248: 1547-1550.
- LOHSE M.J., ENGELHARDT S. & ESCHENHAGEN T. 2003. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93: 896-906.
- LORENZ K., LOHSE M.J. & QUITTERER U. 2003. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* 426: 574-579.
- LORENZ K., SCHMITT J.P., SCHMITTECKERT E.M. & LOHSE M.J. 2009. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* 15: 75-83.
- LOYTER A., SCANGOS G.A. & RUDDLE F.H. 1982. Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 422-426.
- LYMPERPOULOS A. & BATHGATE A. 2012. Pharmacogenomics of the heptahelical receptor regulators G-Protein-coupled receptor kinases and arrestins: the known and the unknown. *Pharmacogenomics* 13: 323-341.
- LYMPERPOULOS A., RENGO G. & KOCH W.J. 2012. GRK2 inhibition in heart failure: something old, something new. *Curr Pharm Des* 18: 186-191.

- MADHANI H.D. 2001. Accounting for specificity in receptor tyrosine kinase signaling. *Cell* 106: 9-11.
- MAKI M., MATSUKAWA N., YUASA H., OTSUKA Y., YAMAMOTO T., AKATSU H., OKAMOTO T., UEDA R. & OJIKI K. 2002. Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 176-185.
- MANNING G., WHYTE D.B., MARTINEZ R., HUNTER T. & SUDARSANAM S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.
- MANNSTADT M., JUPPNER H. & GARDELLA T.J. 1999. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol* 277: F665-75.
- MARCHESE A., CHEN C., KIM Y.M. & BENOVIC J.L. 2003. The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci* 28: 369-376.
- MARIANAYAGAM N.J., SUNDE M. & MATTHEWS J.M. 2004. The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci* 29: 618-625.
- MARTIN J. & LAVERY R. 2012. Arbitrary protein-protein docking targets biologically relevant interfaces. *BMC Biophys* 5: 7.
- MARTINHO O., FALOPPA C.C., NETO C.S., LONGATTO-FILHO A., BAIOCCHI G., DA CUNHA I.W., SOARES F.A., FREGNANI J.H. & REIS R.M. 2012a. Loss of RKIP expression during the carcinogenic evolution of endometrial cancer. *J Clin Pathol* 65: 122-128.
- MARTINHO O., GRANJA S., JARAQUEMADA T., CAEIRO C., MIRANDA-GONCALVES V., HONAVAR M., COSTA P., DAMASCENO M., ROSNER M.R., LOPES J.M. & REIS R.M. 2012b. Downregulation of RKIP is associated with poor outcome and malignant progression in gliomas. *PLoS One* 7: e30769. 1-9.
- MAURER G., TARKOWSKI B. & BACCARINI M. 2011. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* 30: 3477-3488.
- MCGARRY R.C. & AYRE B.G. 2012. Manipulating plant architecture with members of the CETS gene family. *Plant Sci* 188-189: 71-81.
- McMURRAY J.J., ADAMOPOULOS S., ANKER S.D., AURICCHIO A., BOHM M., DICKSTEIN K., FALK V., FILIPPATOS G., FONSECA C., GOMEZ-SANCHEZ M.A., JAARSMAN T., KOBER L., LIP G.Y., MAGGIONI A.P., PARKHOMENKO A., PIESKE B.M., POPESCU B.A., RONNEVIK P.K., RUTTEN F.H., SCHWITTER J., SEFEROVIC P., STEPINSKA J., TRINDADE P.T., VOORS A.A., ZANNAD F., ZEIHNER A., BAX J.J., BAUMGARTNER H., CECONI C., DEAN V., DEATON C., FAGARD R., FUNCK-BRENTANO C., HASDAI D., HOES A., KIRCHHOF P., KNUUTI J., KOLH P., McDONAGH T., MOULIN C., POPESCU B.A., REINER Z., SECHTEM U., SIRNES P.A., TENDERA M., TORBICKI A., VAHANIAN A., WINDECKER S., McDONAGH T., SECHTEM U., BONET L.A., AVRAAMIDES P., BEN LAMIN H.A., BRIGNOLE M., COCA A., COWBURN P., DARGIE H., ELLIOTT P., FLACHSKAMPF F.A., GUIDA G.F., HARDMAN S., IUNG B., MERKELY B., MUELLER C., NANAS J.N., NIELSEN O.W., ORN S., PARISSIS J.T. & PONIKOWSKI P. 2012. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 14: 803-869.

- MIMA J., HAYASHIDA M., FUJII T., NARITA Y., HAYASHI R., UEDA M. & HATA Y. 2005. Structure of the carboxypeptidase Y inhibitor IC in complex with the cognate proteinase reveals a novel mode of the proteinase-protein inhibitor interaction. *J Mol Biol* 346: 1323-1334.
- MOFFIT J.S., BOEKELHEIDE K., SEDIVY J.M. & KLYSIK J. 2007. Mice lacking Raf kinase inhibitor protein-1 (RKIP-1) have altered sperm capacitation and reduced reproduction rates with a normal response to testicular injury. *J Androl* 28: 883-890.
- MONTAGUT C. & SETTLEMAN J. 2009. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett* 283: 125-134.
- NEUHOFF V., AROLD N., TAUBE D. & EHRHARDT W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262.
- NISHI H., HASHIMOTO K. & PANCHENKO A.R. 2011. Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure* 19: 1807-1815.
- NOBLE M.E., ENDICOTT J.A. & JOHNSON L.N. 2004. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 303: 1800-1805.
- NOOREN I.M. & THORNTON J.M. 2003. Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J* 22: 3486-3492.
- NOTREDAME C., HIGGINS D.G. & HERINGA J. 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302: 205-217.
- OGATA K., ARAKAWA M., KASAHARA T., SHIOIRI-NAKANO K. & HIRAOKA K. 1983. Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. *J Immunol Methods* 65: 75-82.
- OJIKI K., MITAKE S., TOHDOH N., APPEL S.H., OTSUKA Y., KATADA E. & MATSUKAWA N. 2000. Hippocampal cholinergic neurostimulating peptides (HCNP). *Prog Neurobiol* 60: 37-83.
- OLDHAM W.M. & HAMM H.E. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-Protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 60-71.
- PALCZEWSKI K. & BENOVIĆ J.L. 1991. G-Protein-coupled receptor kinases. *Trends Biochem Sci* 16: 387-391.
- PALCZEWSKI K., BUCZYŁKO J., KAPLAN M.W., POLANS A.S. & CRABB J.W. 1991. Mechanism of rhodopsin kinase activation. *J Biol Chem* 266: 12949-12955.
- PALCZEWSKI K., KAHN N. & HARGRAVE P.A. 1990. Nucleoside inhibitors of rhodopsin kinase. *Biochemistry* 29: 6276-6282.
- PARK S., RATH O., BEACH S., XIANG X., KELLY S.M., LUO Z., KOLCH W. & YEUNG K.C. 2006. Regulation of RKIP binding to the N-region of the Raf-1 kinase. *FEBS Lett* 580: 6405-6412.
- PARK S., YEUNG M.L., BEACH S., SHIELDS J.M. & YEUNG K.C. 2005. RKIP downregulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells. *Oncogene* 24: 3535-3540.

- PENELA P., ELORZA A., SARNAGO S. & MAYOR F.J. 2001. Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-Protein-coupled receptor kinase 2. *EMBO J* 20: 5129-5138.
- PENELA P., MURGA C., RIBAS C., LAFARGA V. & MAYOR F.J. 2010. The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. *Br J Pharmacol* 160: 821-832.
- PIERCE K.L., PREMONT R.T. & LEFKOWITZ R.J. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 639-650.
- PING P., GELZER-BELL R., ROTH D.A., KIEL D., INSEL P.A. & HAMMOND H.K. 1995. Reduced beta-adrenergic receptor activation decreases G-Protein expression and beta-adrenergic receptor kinase activity in porcine heart. *J Clin Invest* 95: 1271-1280.
- PITCHER J.A., FREEDMAN N.J. & LEFKOWITZ R.J. 1998a. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67: 653-692.
- PITCHER J.A., HALL R.A., DAAKA Y., ZHANG J., FERGUSON S.S., HESTER S., MILLER S., CARON M.G., LEFKOWITZ R.J. & BARAK L.S. 1998b. The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. *J Biol Chem* 273: 12316-12324.
- PITZSCHKE A., SCHIKORA A. & HIRT H. 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 12: 421-426.
- PNUELI L., GUTFINGER T., HAREVEN D., BEN-NAIM O., RON N., ADIR N. & LIFSCHITZ E. 2001. Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell* 13: 2687-2702.
- PYLAYEVA-GUPTA Y., GRABOCKA E. & BAR-SAGI D. 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 11: 761-774.
- RAAKE P.W., TSCHESCHNER H., REINKOBER J., RITTERHOFF J., KATUS H.A., KOCH W.J. & MOST P. 2011. Gene therapy targets in heart failure: the path to translation. *Clin Pharmacol Ther* 90: 542-553.
- RAAKE P.W., VINGE L.E., GAO E., BOUCHER M., RENGU G., CHEN X., DEGEORGE B.R.J., MATKOVICH S., HOUSER S.R., MOST P., ECKHART A.D., DORN G.W.N. & KOCH W.J. 2008. G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ Res* 103: 413-422.
- RAMOS-RUIZ R., PENELA P., PENN R.B. & MAYOR F.J. 2000. Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation* 101: 2083-2089.
- RATH O., PARK S., TANG H.H., BANFIELD M.J., BRADY R.L., LEE Y.C., DIGNAM J.D., SEDIVY J.M., KOLCH W. & YEUNG K.C. 2008. The RKIP (Raf-1 Kinase Inhibitor Protein) conserved pocket binds to the phosphorylated N-region of Raf-1 and inhibits the Raf-1-mediated activated phosphorylation of MEK. *Cell Signal* 20: 935-941.
- RAUSCHER S., BAUD S., MIAO M., KEELEY F.W. & POMES R. 2006. Proline and glycine control protein self-organization into elastomeric or amyloid fibrils. *Structure* 14: 1667-1676.

- RAVEH A., COOPER A., GUY-DAVID L. & REUVENY E. 2010. Nonenzymatic rapid control of GIRK channel function by a G protein-coupled receptor kinase. *Cell* 143: 750-760.
- REITER E. & LEFKOWITZ R.J. 2006. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17: 159-165.
- RENGO G., LYMPEROPOULOS A., LEOSCO D. & KOCH W.J. 2011. GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 50: 785-792.
- RENGO G., LYMPEROPOULOS A., ZINCARELLI C., DONNIACUO M., SOLTYS S., RABINOWITZ J.E. & KOCH W.J. 2009. Myocardial adeno-associated virus serotype 6-betaARKct gene therapy improves cardiac function and normalizes the neurohormonal axis in chronic heart failure. *Circulation* 119: 89-98.
- RENGO G., PERRONE-FILARDI P., FEMMINELLA G.D., LICCARDO D., ZINCARELLI C., DE LUCIA C., PAGANO G., MARSICO F., LYMPEROPOULOS A. & LEOSCO D. 2012. Targeting the beta-adrenergic receptor system through G-Protein-coupled receptor kinase 2: a new paradigm for therapy and prognostic evaluation in heart failure: from bench to bedside. *Circ Heart Fail* 5: 385-391.
- ROCKMAN H.A., KOCH W.J. & LEFKOWITZ R.J. 2002. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415: 206-212.
- ROSENBAUM D.M., RASMUSSEN S.G. & KOBILKA B.K. 2009. The structure and function of G-Protein-coupled receptors. *Nature* 459: 356-363.
- ROSKOSKI R.J. 2010. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 399: 313-317.
- RUAN L., WANG G.L., YI H., CHEN Y., TANG C.E., ZHANG P.F., LI M.Y., LI C., PENG F., LI J.L., CHEN Z.C. & XIAO Z.Q. 2010. Raf kinase inhibitor protein correlates with sensitivity of nasopharyngeal carcinoma to radiotherapy. *J Cell Biochem* 110: 975-981.
- RUIZ-GOMEZ A., HUMRICH J., MURGA C., QUITTERER U., LOHSE M.J. & MAYOR F.J. 2000. Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 275: 29724-29730.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. & ERLICH H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SAMBROOK F., EF, MANIATIS, T 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHAGGER H. & VON JAGOW G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-379.
- SCHINDLER T., BORNMANN W., PELLICENA P., MILLER W.T., CLARKSON B. & KURIYAN J. 2000. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289: 1938-1942.
- SCHMITZ S. 2009. *Der Experimentator Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag.

- SCHOENTGEN F., SEDDIQI N., BUCQUOY S., JOLLES P., LEMESLE-VARLOOT L., PROVOST K. & MORNON J.P. 1992. Main structural and functional features of the basic cytosolic bovine 21 kDa protein delineated through hydrophobic cluster analysis and molecular modelling. *Protein Eng* 5: 295-303.
- SCHUIERER M.M., BATAILLE F., HAGAN S., KOLCH W. & BOSSERHOFF A.K. 2004. Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines. *Cancer Res* 64: 5186-5192.
- SERRE L., PEREIRA DE JESUS K., ZELWER C., BUREAUD N., SCHOENTGEN F. & BENEDETTI H. 2001. Crystal structures of YBHB and YBCL from *Escherichia coli*, two bacterial homologues to a Raf kinase inhibitor protein. *J Mol Biol* 310: 617-634.
- SERRE L., VALLEE B., BUREAUD N., SCHOENTGEN F. & ZELWER C. 1998. Crystal structure of the phosphatidylethanolamine-binding protein from bovine brain: a novel structural class of phospholipid-binding proteins. *Structure* 6: 1255-1265.
- SETYAWAN J., KOIDE K., DILLER T.C., BUNNAGE M.E., TAYLOR S.S., NICOLAOU K.C. & BRUNTON L.L. 1999. Inhibition of protein kinases by balanol: specificity within the serine/threonine protein kinase subfamily. *Mol Pharmacol* 56: 370-376.
- SGARAMELLA V., VAN DE SANDE J.H. & KHORANA H.G. 1970. Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67: 1468-1475.
- SHEMON A.N., HEIL G.L., GRANOVSKY A.E., CLARK M.M., McELHENY D., CHIMON A., ROSNER M.R. & KOIDE S. 2010. Characterization of the Raf kinase inhibitory protein (RKIP) binding pocket: NMR-based screening identifies small-molecule ligands. *PLoS One* 5: e10479.
- SHOEMAKER B.A. & PANCHENKO A.R. 2007. Deciphering protein-protein interactions. Part I. Experimental techniques and databases. *PLoS Comput Biol* 3: e42. 1-8.
- SHUAI K., HORVATH C.M., HUANG L.H., QURESHI S.A., COWBURN D. & DARNELL J.E.J. 1994. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76: 821-828.
- SIMISTER P.C., BANFIELD M.J. & BRADY R.L. 2002. The crystal structure of PEBP-2, a homologue of the PEBP/RKIP family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 1077-1080.
- STEINER A.L., WEHMANN R.E., PARKER C.W. & KIPNIS D.M. 1972. Radioimmunoassay for the measurement of cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 2: 51-61.
- TAN C.S. 2011. Sequence, structure, and network evolution of protein phosphorylation. *Sci Signal* 4: mr6. 1-5.
- TANG H., PARK S., SUN S.C., TRUMBLY R., REN G., TSUNG E. & YEUNG K.C. 2010. RKIP inhibits NF-kappaB in cancer cells by regulating upstream signaling components of the IkappaB kinase complex. *FEBS Lett* 584: 662-668.
- TARRANT M.K. & COLE P.A. 2009. The chemical biology of protein phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 78: 797-825.

- TAVEL L., JAQUILLARD L., KARSISIOTIS A.I., SAAB F., JOUVENSAL L., BRANS A., DELMAS A.F., SCHOENTGEN F., CADENE M. & DAMBLON C. 2012. Ligand Binding Study of Human PEBP1/RKIP: Interaction with Nucleotides and Raf-1 Peptides Evidenced by NMR and Mass Spectrometry. *PLoS One* 7: e36187. 1-10.
- TESMER J.J., TESMER V.M., LODOWSKI D.T., STEINHAGEN H. & HUBER J. 2010. Structure of human G protein-coupled receptor kinase 2 in complex with the kinase inhibitor balanol. *J Med Chem* 53: 1867-1870.
- THAL D.M., YEOW R.Y., SCHOENAU C., HUBER J. & TESMER J.J. 2011. Molecular mechanism of selectivity among G protein-coupled receptor kinase 2 inhibitors. *Mol Pharmacol* 80: 294-303.
- THEROUX S., PEREIRA M., CASTEN K.S., BURWELL R.D., YEUNG K.C., SEDIVY J.M. & KLYSIK J. 2007. Raf kinase inhibitory protein knockout mice: expression in the brain and olfaction deficit. *Brain Res Bull* 71: 559-567.
- THOMPSON M.D., COLE D.E. & JOSE P.A. 2008. Pharmacogenomics of G protein-coupled receptor signaling: insights from health and disease. *Methods Mol Biol* 448: 77-107.
- TORSHIN I. 1999. Activating oligomerization as intermediate level of signal transduction: analysis of protein-protein contacts and active sites in several glycolytic enzymes. *Front Biosci* 4: D557-70.
- TRAKUL N., MENARD R.E., SCHADE G.R., QIAN Z. & ROSNER M.R. 2005. Raf kinase inhibitory protein regulates Raf-1 but not B-Raf kinase activation. *J Biol Chem* 280: 24931-24940.
- UNGERER M., BOHM M., ELCE J.S., ERDMANN E. & LOHSE M.J. 1993. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87: 454-463.
- UNGERER M., KESSEBOHM K., KRONSBELN K., LOHSE M.J. & RICHARDT G. 1996. Activation of beta-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia. *Circ Res* 79: 455-460.
- UNGERER M., PARRUTI G., BOHM M., PUZICHA M., DEBLASI A., ERDMANN E. & LOHSE M.J. 1994. Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* 74: 206-213.
- WANG X., LI N., LI H., LIU B., QIU J., CHEN T. & CAO X. 2005. Silencing of human phosphatidylethanolamine-binding protein 4 sensitizes breast cancer cells to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and cell growth arrest. *Clin Cancer Res* 11: 7545-7553.
- WANG X., LI N., LIU B., SUN H., CHEN T., LI H., QIU J., ZHANG L., WAN T. & CAO X. 2004. A novel human phosphatidylethanolamine-binding protein resists tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathway activation and phosphatidylethanolamine externalization. *J Biol Chem* 279: 45855-45864.
- WEBER A., WASILEW P. & KRACHT M. 2010. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* 3: cm1-6.
- WELLER M., VIRMAUX N. & MANDEL P. 1975. Light-stimulated phosphorylation of rhodopsin in the retina: the presence of a protein kinase that is specific for photobleached rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 381-385.

- WILDEN U. 1995. Duration and amplitude of the light-induced cGMP hydrolysis in vertebrate photoreceptors are regulated by multiple phosphorylation of rhodopsin and by arrestin binding. *Biochemistry* 34: 1446-1454.
- WILDEN U. & KUHN H. 1982. Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites. *Biochemistry* 21: 3014-3022.
- WINSTEL R., IHLENFELDT H.G., JUNG G., KRASEL C. & LOHSE M.J. 2005. Peptide inhibitors of G protein-coupled receptor kinases. *Biochem Pharmacol* 70: 1001-1008.
- WOODS IGNATOSKI K.M., GREWAL N.K., MARKWART S.M., VELLAICHAMY A., CHINNAIYAN A.M., YEUNG K., RAY M.E. & KELLER E.T. 2008. Loss of Raf kinase inhibitory protein induces radioresistance in prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72: 153-160.
- WU D. & PAN W. 2010. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* 35: 161-168.
- YEUNG K., JANOSCH P., MCFERRAN B., ROSE D.W., MISCHAK H., SEDIVY J.M. & KOLCH W. 2000. Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol* 20: 3079-3085.
- YEUNG K., SEITZ T., LI S., JANOSCH P., MCFERRAN B., KAISER C., FEE F., KATSANAKIS K.D., ROSE D.W., MISCHAK H., SEDIVY J.M. & KOLCH W. 1999. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401: 173-177.
- YEUNG K.C., ROSE D.W., DHILLON A.S., YAROS D., GUSTAFSSON M., CHATTERJEE D., MCFERRAN B., WYCHE J., KOLCH W. & SEDIVY J.M. 2001. Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 21: 7207-7217.
- ZENG L., IMAMOTO A. & ROSNER M.R. 2008. Raf kinase inhibitory protein (RKIP): a physiological regulator and future therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 12: 1275-1287.
- ZHANG Y., WANG X., XIANG Z., LI H., QIU J., SUN Q., WAN T., LI N., CAO X. & WANG J. 2007. Promotion of cellular migration and apoptosis resistance by a mouse eye-specific phosphatidylethanolamine-binding protein. *Int J Mol Med* 19: 55-63.

9 Publikationsverzeichnis

Zeitschriftenbeiträge

Deiss, K., Kisker, C., Lohse, M., Lorenz, K., (2012) *Raf kinase inhibitor protein (RKIP) dimer formation controls its target switch from Raf1 to G protein coupled receptor kinase (GRK) 2*. J Biol Chem 287: 23407 – 23417 (Originalarbeit).

Konferenzbeiträge

Deiss, K., Fischer, M., Emami, A., Lohse, M., Lorenz, K.: *The substrate switch of RKIP from Raf1 to GRK2 involves RKIP phosphorylation and oligomerization*. 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, 23. – 25. März 2010 (Poster).

Deiss, K., Kisker, C., Lohse, M., Lorenz, K.: *Phosphorylation and dimerization of RKIP are both mandatory to induce RKIP-mediated GRK2 inhibition*. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Frankfurt, 30. März – 01. April 2011 (Poster).

Deiss, K., Kisker, C., Lohse, M., Lorenz, K.: *RKIP dimers are responsible for GRK2 inhibition*. 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Dresden, 20. – 22. März 2012 (Poster).

Deiss, K., Kisker, C., Lohse, M., Lorenz, K.: *Identification of RKIP dimers as an important mechanistic feature in the substrate switch from Raf1 to GRK2*. 4th Focused Meeting on Cell Signaling of the British Pharmacological Society, Leicester, England, 23. – 24. April 2012 (Poster).

Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin J. Lohse für die Möglichkeit der Promotion an seinem Institut und bei Dr. Kristina Lorenz für die Möglichkeit der Promotion in ihrer Arbeitsgruppe bedanken. Dr. Kristina Lorenz, Prof. Dr. Martin J. Lohse und Prof. Dr. Caroline Kisker danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die anregenden und kritischen Diskussionen und ihre stete Unterstützung. Bei Prof. Dr. Caroline Kisker möchte ich mich auch für die nette Zusammenarbeit mit ihrer Arbeitsgruppe bedanken. Prof. Dr. Susanna Cotecchia danke ich für die externe Betreuung dieser Arbeit. Ferner danke ich Prof. Dr. Manfred Gessler für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lorenz, insbesondere Martina Fischer, danke ich für ihre Hilfe, ihre Einführung in zahlreiche Methoden und das angenehme Arbeitsklima.

Bei Michaela Hoffmann habe ich die Assays zur Bestimmung sekundärer Botenstoffe gelernt und möchte mich dafür herzlich bedanken. Weiterhin danke ich Christian Dees für die Präparation von Rhodopsin und die Reinigung von GRK2.

Dr. Ulrike Zabel danke ich sehr herzlich für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge beim Verfassen dieser Arbeit sowie die nette Büropartnerschaft.

Allen Mitgliedern des Instituts für Pharmakologie danke ich für ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit und die nette Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Michael Korth danke ich für seine interessante Pharmakologievorlesung an der Universität Hamburg, die wesentlich zu meiner Entscheidung beitrug, das Fach Pharmakologie für meine Dissertation zu wählen.

Für ihre Unterstützung und ihr Verständnis bedanke ich mich bei meinem Freund Luigi, meinen Eltern und meinen Geschwistern.