

**Aus dem Institut für Pharmakologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Martin Lohse**

**Spatiotemporale Organisation der Interaktion von G_q Protein-Untereinheiten
und der Phospholipase C β 3**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Thomas Pollinger
aus Aschaffenburg
Würzburg, Juli 2012**

Referent: Prof. Dr. Moritz Bünemann

Koreferent: Prof. Dr. Andreas Friebe

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Februar 2013

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Signaltransduktion	1
1.2	G-Protein gekoppelte Rezeptoren	2
1.3	G-Proteine	3
1.3.1	Strukturelle und funktionelle Aspekte der G-Protein Untereinheiten	5
1.3.2	Mechanismus der G-Protein Aktivierung	7
1.4	Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C β	9
1.4.1	Struktur und physiologische Bedeutung	9
1.4.2	Interaktion von G-Protein Untereinheiten mit der PLC β	12
1.5	<i>Regulator of G-Protein signaling</i> (RGS)	16
1.5.1	Physiologische Funktion der RGS Proteine	16
1.5.2	Strukturelle und funktionelle Aspekte	17
1.6	Fragestellung dieser Arbeit	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Medien für eukaryote Zellen	20
2.2	Medien für prokaryote Zellen	20
2.3	Puffer für die Molekularbiologie	21
2.4	Biologisches Material	21
2.5	Molekularbiologische Methoden	22
2.5.1	Kompetente E. coli	22
2.5.2	DNA-Transformation	22
2.5.3	DNA-Präparation	23
2.6	Zellbiologische Methoden	24
2.6.1	Permanente Zellenkultur	24
2.6.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
2.6.3	Transiente DNA-Transfektion	25
2.6.4	Aussäen der Zellen auf Deckgläschen	25
2.6.5	Immunfluoreszenz	26
2.7	Fluoreszenzmikroskopie	27
2.7.1	TIRF-Mikroskopie	27

2.7.2	FRET-Messungen am Epifluoreszenz-Mikroskop	30
2.7.3	Konfokale Mikroskopie	31
2.8	Statistische Methoden	31
3.	Ergebnisse	
3.1	Die Interaktionspartner $G\alpha_q$ -CFP und YFP-PLC β 3 kommen sowohl an der Membran als auch zytoplasmatisch zur Expression	32
3.2	$G\alpha_q$ und die PLC β 3 interagieren Agonist-abhängig in lebenden Zellen	34
3.3	Die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der PLC β 3 führt zu geringen Änderungen der Membranlokalisation	38
3.4	Die PLC β 3 beschleunigt die Deaktivierung von G_q Proteinen in lebenden Zellen in vergleichbaren Ausmaß wie RGS Proteine	39
3.5	Von G_q freigesetzte $G\beta\gamma$ Untereinheiten interagieren mit der PLC β 3 nach Rezeptor-vermittelter Aktivierung	45
3.6	RGS2 verhindert die Interaktion von $G\alpha_q$ und der PLC β 3, aber nicht die Interaktion von $G\beta\gamma$ und PLC β 3	48
3.7	RGS2 interagiert mit aktiven $G\alpha_q$ in intakten Zellen	52
4.	Diskussion	
4.1	Zeitliche Organisation der G_q /PLC β 3-Interaktion	57
4.1.1	Agonist-abhängige Interaktion von $G\alpha_q$ mit der PLC β 3	57
4.1.2	Agonist-abhängige Interaktion der von G_q freigesetzten $G\beta\gamma$ Untereinheiten mit der PLC β 3	60
4.1.3	$G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ interagieren wahrscheinlich gleichzeitig mit der PLC β 3	61
4.2	Räumliche Organisation der G_q /PLC β 3 Interaktion	62
4.2.1	G_q Proteine interagieren mit der PLC β 3 erst nach Rezeptoraktivierung	62
4.2.2	Subzelluläre Lokalisation der PLC β 3	65
4.3	Regulation der G_q /PLC β 3 Interaktion	67
4.3.1	Die PLC β 3 ist ein potenter Beschleuniger der G_q Deaktivierung	67
4.3.2	RGS2 hemmt die Interaktion von $G\alpha_q$ und der PLC β 3 und beschleunigt die Deaktivierung der $G\beta\gamma$ /PLC β 3 Interaktion	70
4.4	Weitere Aspekte der Interaktion von G_q und RGS2	73

4.4.1	RGS2 führt möglicherweise zu einer vollständigen Separierung von aktiven $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$	73
4.4.2	Subzelluläre Lokalisation von RGS2	74
4.5	Methodendiskussion: TIRF-basiertes FRET-Imaging mit hoher zeitlicher Auflösung	75
4.6	Ausblick	78
5.	Zusammenfassung	79
6.	Anhang	80
6.1	Macro für <i>ImageJ</i> zur Stapelung von Bildern der YFP- und CFP-Emission	80
6.2	Macro für <i>ImageJ</i> zur Generierung von ratiometrischen TIRF-Bildern	80
7.	Literaturverzeichnis	84
8.	Abbildungsverzeichnis	94
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Signaltransduktion

In multizellulären Organismen ist die Aufrechterhaltung der Homöostase abhängig von einem kontinuierlichen Informationsfluss in einem komplexen Netzwerk von Zellen. Zusätzlich müssen die Signale einer sich stetig ändernden Umgebung integriert und in eine angemessene physiologische Antwort umgesetzt werden (Cabrera-Vera et al, 2003).

Diese Signalprozesse lassen sich in vier wesentliche Schritte untergliedern: (1) die extrazelluläre Signalpräsentation in Form von Liganden, (2) die zelluläre Signalaufnahme mittels Rezeptoren, (3) die intrazelluläre Signalweitergabe in der Signalkaskade und (4) die Umsetzung der Information in eine physiologische Antwort.

Reguliert der geordnete Ablauf der Signaltransduktion die natürlichen Lebensprozesse, so können Störungen der Informationsverarbeitung zu schweren Erkrankungen führen. Besonders eindrücklich wird dies bei Fehlern in der Regulation von Zellwachstum und – differenzierung, die zur Entstehung von malignen Neoplasien beitragen. Zugleich sind Prozesse der Signaltransduktion häufig Ansatzpunkte einer medikamentösen Therapie, wie z.B. die Blockade β -adrenerger Rezeptoren in der Therapie der Herzinsuffizienz. Erkenntnisse über die genauen Vorgänge der Signaltransduktion können somit das Verständnis der Pathogenese von Krankheiten fördern und zugleich mögliche Therapien aufzeigen (Birbaumer et al, 2003).

Eine Vielzahl dieser Signalprozesse wird durch die evolutionär hoch konservierte Gruppe der heterotrimeren G-Proteine vermittelt. Sie transduzieren die Signale von aktivierten G-Protein gekoppelten Rezeptoren zu Effektorproteinen und regulieren so zelluläre Funktionen wie Sekretion, Kontraktion, Chemotaxis oder elektrische Aktivität (Rosenbaum et al, 2009).

1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (engl. „G-Protein coupled receptors“, GPCR) stellen die größte bekannte Rezeptorfamilie dar. Allen GPCRs gemein sind sieben α -helicale transmembranäre Domänen mit einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus sowie je drei interhelikalen Schleifen auf beiden Seiten der Membran (Tuteja, 2009). Basierend auf den Sequenzähnlichkeiten innerhalb der Transmembrandomänen werden derzeit fünf Familien unterschieden: (1) die Rhodopsin Familie, welche mit ca. 700 Mitgliedern die mit Abstand größte Gruppe darstellt, (2) die Adhesion Familie, (3) die frizzled/taste Familie, (4) die Glutamat Familie, sowie (5) die Sekretin Familie (Kobilka, 2007).

Insgesamt über 800 Gene im menschlichen Genom kodieren für diese Rezeptoren mit zahlreichen extrazellulären Liganden, darunter Hormone, Neurotransmitter, lokale Mediatoren und sensorische Stimuli, wie Licht und Geruchs- oder Geschmacksreize (Pierce et al, 2002). In diesem weiten Spektrum von Liganden, das von kleinen Molekülen wie Acetylcholin, Noradrenalin oder ATP bis hin zu komplexen Peptidhormonen wie Parathormon reicht, spiegelt sich die Vielfalt der physiologischen Funktionen wider. Die Bedeutung dieser Proteinfamilie zeigt sich auch darin, dass sie das Ziel von etwa 30% aller derzeit auf dem Markt befindlichen Medikamente sind (Oldham & Hamm, 2008).

Die Bindung eines Liganden führt zur Konformationsänderung des Rezeptors, der dadurch vereinfacht betrachtet aus dem inaktiven in den aktiven Zustand gelangt. Im aktiven Zustand zeigt ein GPCR eine hohe Affinität zu inaktiven G-Proteinen, wo er nach Bindung den Austausch von GDP zu GTP erleichtert und somit G-Proteine aktiviert. Die für die Aktivierung entscheidende Konformationsänderung scheint eine Auswärtsbewegung der Helix VI zu sein, wodurch eine non-kovalente Bindung („ionic lock“) zwischen des Helices III und VI aufgebrochen wird (Kobilka, 2007). Dadurch werden Bindungsstellen der cytoplasmatischen Seite der Transmembrandomänen V und VI offengelegt, sodass der C-Terminus der $G\alpha$ -Untereinheit an den Rezeptor binden kann (Scheerer et al, 2008). Die molekulare Grundlage dieser Interaktion wurde

kürzlich anhand der Struktur der aktiven Konformation des Rezeptors im Komplex mit G-Proteinen weiter charakterisiert (Rasmussen et al, 2011).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind auf Schritte der Signaltransduktion nach der GPCR vermittelten G-Protein Aktivierung gerichtet. Zur Aktivierung des G-Proteins wurde hier der purinerge P2Y₁ Rezeptor verwendet. Die Eigenschaften dieses Rezeptors wurden anhand aufgereinigter Proteine untersucht (Waldo & Harden, 2004). Für den Agonisten ADP wurde dabei eine EC₅₀ = 1 µM gemessen. ADP zeigte in dieser Untersuchung eine etwa 20-fach höhere Affinität zum P2Y₁ Rezeptor als der partielle Agonist ATP. In der vorliegenden Arbeit wurde der niederaffine Agonist verwendet, wegen der schnellen Reversibilität der Rezeptoraktivierung. Das war wichtig für die Bestimmung der Aktivität von GTPase aktivierenden Proteinen.

1.3 G-Proteine

Heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) leiten die Signale aus dem weiten Spektrum der GPCRs intrazellulär spezifisch zu den Effektorproteinen weiter. Darunter befinden sich z.B. Ionenkanäle oder Enzyme, die die Produktion, Freisetzung oder Degradierung von intrazellulären sekundären Botenstoffen regulieren. Sie fungieren dabei als molekulare Zeitschalter, betrieben durch Austausch und Spaltung von Guaninnukleotiden, wobei im inaktiven Zustand ein GDP und im aktiven Zustand ein GTP gebunden ist und determinieren den zeitlichen Verlauf des übermittelten Signals (Cabrera-Vera et al, 2003).

Verglichen mit der großen Vielfalt der GPCRs, interagieren diese mit einer überschaubaren Anzahl von G-Proteinen: Es existieren 21 Gα Untereinheiten, die von 16 Genen kodiert werden, sechs Gβ Untereinheiten, kodiert von fünf Genen und zwölf Gγ Untereinheiten (Oldham & Hamm, 2008).

Die α-Untereinheiten werden klassischerweise entsprechend struktureller und funktioneller Aspekte in vier Familien unterteilt: Gα_s, die die Adenylylcyclase

stimulieren, während $G\alpha_{i/o}$ diese inhibiert; $G\alpha_{q/11}$ aktiviert die Phospholipase C β ; $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten stimulieren beispielsweise Rho-GEFs (Simon et al, 1991).

Die hier durchgeführten Untersuchungen konzentrieren sich auf die $G\alpha_q$ Untereinheit. Die Familie der $G\alpha_q$ Untereinheiten beinhaltet $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ und $G\alpha_{16}$, die sich in ihrer Gewebeverteilung und Primärstruktur unterscheiden. Dies zeigt sich vor allem am N-Terminus, woraus die biochemischen Diversität der unterschiedlichen $G\alpha_q$ Untereinheiten in der Regulation und Effektorspezifität abgeleitet wird (Hubbard & Hepler, 2006). Die im Fokus dieser Arbeit stehende $G\alpha_q$ Untereinheit ist die am besten untersuchte und wird ubiquitär exprimiert.

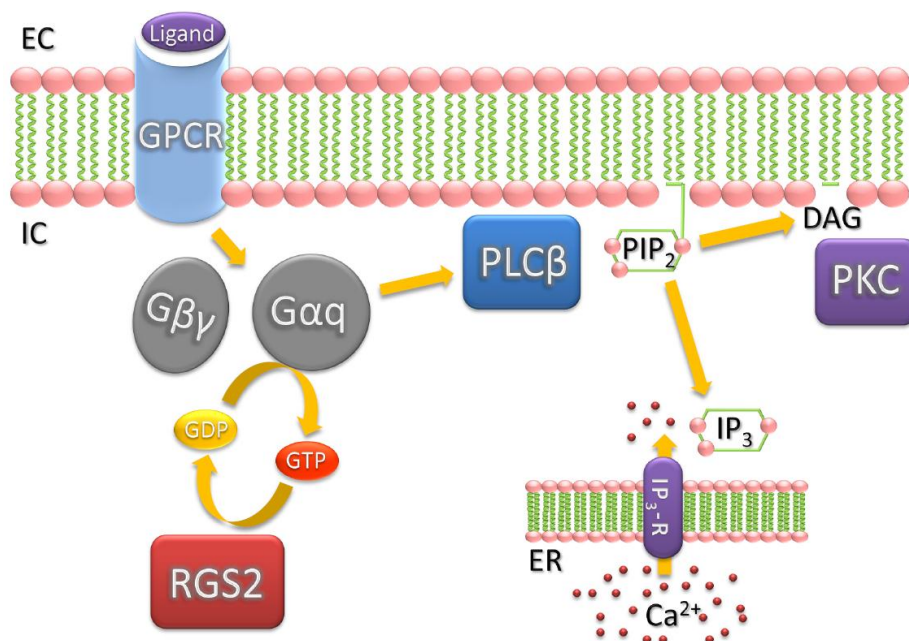


Abbildung 1. G_q abhängige Signalwege. Nach Aktivierung der $G\alpha_q$ -Untereinheit durch einen stimulierten GPCR spaltet die Phospholipase C β (PLC β) aus Phospholipiden Inositoltriphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). Über Aktivierung IP $_3$ -abhängiger Ca $^{2+}$ -Kanäle entleert IP $_3$ intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Speicher und erhöht somit die intrazelluläre Ca $^{2+}$ Konzentration. Ca $^{2+}$ reguliert entweder direkt oder nach Bindung an Calmodulin die Aktivität von Transportproteinen und Enzymen, sowie die Transkription von Genen. Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die wiederum durch Phosphorylierung weitere Proteine reguliert. Der *Regulator of G-Protein signaling 2* (RGS2) beschleunigt die Deaktivierung des G-Proteins in seiner Eigenschaft als GTPase aktivierendes Protein (GAP) (modifiziert nach Schmidt, 2005). EC, Extrazellularraum; IC, Zytosol; ER, endoplasmatisches Retikulum;

Über die Mitglieder der G_q Proteinfamilie werden eine Vielzahl zellulärer Reaktionen vermittelt: von Zellwachstum und –proliferation, über neuronale Signalprozesse und Thrombozytenaggregation bis hin zur Kontraktion glatter Muskelzellen. Haupteffektoren dieser Proteine sind die β -Isoformen der Phospholipase C. Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse von Phosphatidyinositol-Biphosphat, wodurch Inositol-Triphosphat und Diacylglycerol generiert wird (Mizuno & Itoh, 2009). Diese sekundären Botenstoffe amplifizieren das G_q -vermittelte Signal durch Mobilisation intrazellulärer IP_3 -regulierter Kalziumspeicher. Desweiteren aktiviert DAG die Proteinkinase C (PKC). Ca^{2+} und die PKC wiederum vermitteln weitere Signalwege und rufen somit verschiedene zelluläre Ereignisse hervor (Berridge, 1984). Zusätzlich zu diesen klassischen Signalwegen ereignen sich andere zelluläre Ereignisse, da die Aktivität vieler Membran-, Zytosol- und Zytoskelettproteine durch PIP_2 -Bindung reguliert werden (Suh & Hille, 2008; Yin & Janmey, 2003).

Die Regulation des G_q Signalweges erfolgt durch eine Reihe weiterer Proteine. Für diese Arbeit relevant sind die RGS Proteine (engl. „regulator of G-Protein signaling“), die als GTPase aktivierende Proteine fungieren und somit die Beendigung des G-Protein Zyklus beschleunigen (Mizuno & Itoh, 2009). Abbildung 1 zeigt ein Schema des G_q Protein-Signalweges mit denen für diese Arbeit relevanten Effektor- und Regulatorproteinen.

1.3.1 Strukturelle und funktionelle Aspekte der G-Protein Untereinheiten

$G\alpha$ Untereinheiten sind generell aus zwei Domänen aufgebaut: einer GTPase Domäne, die in die Bindung und Hydrolyse von GTP involviert ist und einer α -helikalen Domäne, die das GTP im Kern des Proteins bedeckt. Neben ihrer katalytischen Aktivität, stellt die GTPase Domäne die Bindungsoberflächen für das $G\beta\gamma$ -Dimer, den Rezeptor und die Effektoren. Diese Domäne enthält drei flexible Regionen, die sogenannte switch-Regionen I, II und III, die bei Austausch von GDP zu GTP eine deutliche Konformationsänderung zeigen (McCudden et al, 2005). Während die GTPase Domäne hoch konserviert und in allen Mitgliedern der G-Protein Superfamilie vorhanden ist,

zeigt die helikale Domäne eine große Diversität und scheint daher eine wichtige Rolle für die Spezifität der Rezeptor/ G-Protein- und G-Protein/ Effektor-Interaktion zu spielen (Mizuno & Itoh, 2009). $G\alpha$ -Untereinheiten sind im Gegensatz zu GPCRs keine Transmembranproteine. Jedoch werden sie post-translationell mit Lipidankern modifiziert und gelangen so an die Membran, wo sie die Mittlerrolle zwischen Rezeptor und Effektoren übernehmen. Für $G\alpha_q$ wurden zwei benachbarte Cysteinreste an den Positionen 9 und 10 identifiziert, die Ziel der Palmitoylierung sind (Milligan & Kostenis, 2006).

Bei der Analyse der subzellulären Lokalisation der G_q Proteine wurde eine verstärkte Konzentration in Mikrodomänen der Zellmembran beschrieben, insbesondere in Caveolae. Hierbei fand sich eine Bindung von $G\alpha_q$ an das für Caveolae entscheidende Strukturprotein Caveolin-1 (Oh & Schnitzer, 2001), die für eine effiziente Signalübermittlung von Bedeutung zu sein scheint (Bhatnagar et al, 2004).

Die $G\beta$ Untereinheit formt strukturell typischerweise einen sogenannten siebenblättrigen β -Propeller, der sich aus sieben WD40-Wiederholungen in der Sequenz zusammensetzt. N-terminal von diesem Propeller findet sich eine α -helicale Konformation die einen *coiled-coil* mit dem N-Terminus der $G\gamma$ Untereinheit formt. Der C-Terminus der $G\gamma$ -Untereinheit bindet an die Blätter 5 und 6 des β -Propellers (Clapham & Neer, 1997). Auch $G\gamma$ -Untereinheiten werden posttranslationaler Modifikationen unterzogen (Milligan & Kostenis, 2006). Die $G\beta$ und $G\gamma$ Untereinheiten formen eine funktionelle Einheit, die nur unter denaturierenden Bedingungen aufgehoben werden kann.

Die Interaktion der $G\beta\gamma$ Untereinheit mit der $G\alpha$ Untereinheit findet an zwei unabhängigen Stellen statt. Die N-terminale α -Helix der $G\alpha$ -Untereinheit interagiert mit dem β -Propeller an Blatt 1. Die $G\alpha$ switch II Region, die die Konformationsänderung nach GTP-Bindung vollführt, interagiert mit der Spitze des β -Propellers. Das $G\beta\gamma$ Dimer bindet also an eine hydrophobe Tasche des $G\alpha$ -GDP, die durch Bindung von GTP verschwindet und somit die Affinität von $G\alpha$ für $G\beta\gamma$ sinkt (Cabrera-Vera et al, 2003).

In den bisher aufgeklärten Strukturen von $G\beta\gamma$ zeigten sich insgesamt nur kleine Unterschiede in der generellen Struktur unabhängig von der Anwesenheit von $G\alpha$ -Untereinheiten oder anderen Bindungspartnern. Dieser offensichtliche Mangel einer signifikanter Konformationsänderung der $G\beta\gamma$ -Untereinheit führte zu dem Konzept, dass die $G\beta\gamma$ -Aktivität in Hinsicht auf die Effektoren durch aktivitätsabhängige Konformationsänderung der $G\alpha$ -Untereinheit reguliert wird: Durch Dissoziation oder Umlagerung der heterotrimeren G-Proteine sollen die relevanten Signaloberflächen auf $G\beta\gamma$ freigelegt werden. (Smrcka, 2008). Diese scheinbare Passivität der $G\beta\gamma$ Untereinheiten gab zunächst Grund zu der Annahme, dass $\beta\gamma$ -Untereinheit wenig mehr als ein Bindungspartner für $G\alpha$ seien, die eine spontane Signalgebung verhindern und möglicherweise die Membranbindung stärken sollte. Mit Entdeckung der muscarinergen Regulation der atrialen G-Protein aktivierten einwärts-gleichrichtenden K^+ (GIRK) Kanäle (Logothetis, 1987) und der Aktivierung der Isoformen der Phospholipase $C\beta$ (Camps, 1992) durch $G\beta\gamma$ Untereinheiten wurde jedoch klar, dass $G\beta\gamma$ -Untereinheiten zumindest ebenso viele Funktionen vermitteln wie α -Untereinheiten (Clapham & Neer, 1993).

1.3.2 Mechanismus der G-Protein Aktivierung

Die Aktivierung des G-Proteins besorgt ein aktivierter GPCR. Zur Klärung des Kopplungsmechanismus zwischen G-Protein und GPCR, also der Frage, wie G-Proteine einen aktivierten Rezeptor erreichen, existieren jedoch zwei unterschiedliche Modelle (Hein & Bünemann, 2009). Offensichtlich können diese Partner mittels katalytischer Kollision interagieren (Digby et al, 2006; Hein et al, 2005), was bedeutet, dass ein einzelner Rezeptor nacheinander mehrere G-Proteine aktivieren kann. Die Interaktion findet hier als Ergebnis der freien lateralen Diffusion in der Plasmamembran statt. Als alternatives Modell werden auch unterschiedliche Grade einer Vorkopplung (engl. „precoupling“) zwischen Rezeptor und G-Protein diskutiert (Bruheim et al, 2003; Drastichova & Novotny, 2012; Qin et al, 2011). Die Attraktivität dieses Modells liegt darin, dass es einen Teil der Spezifität der GPCR – G-Protein Kopplung sowie die rasche

Botenstoffe generierende Enzyme. Die intrinsische GTPase Aktivität beendet das Signal. GTPase aktivierende Proteine (GAP) beschleunigen die Hydrolyse von GTP zu GDP. Die Reassoziierung von $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ Untereinheit vollendet den Zyklus (nach McCudden, 2004.)

Die $G\alpha$ Untereinheit trägt eine intrinsische GTPase Aktivität, die GTP zu GDP hydrolysiert und somit die Reassoziierung der $G\alpha$ Untereinheit mit dem $G\beta\gamma$ Komplex ermöglicht und den Zyklus beendet. Allerdings ist diese GTPase Aktivität biochemisch gemessen an aufgereinigten Proteinen viel zu langsam für die Beendigung physiologischer Prozesse. Dieser Widerspruch führte zur Postulierung von regulatorischen Proteinen, die die GTPase Aktivität beschleunigen, die letztlich auch isoliert und ihr GTPase aktivierende Funktion nachgewiesen werden konnte (Ross & Wilkie, 2000). Abbildung 2 zeigt eine vereinfachte Darstellung des G-Protein Zyklus.

1.4 Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C β

1.4.1 Struktur und physiologische Bedeutung

Die Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C generiert zwei sekundäre Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2). Derzeit werden 13 PLC Isozyme unterschieden, die in sechs Subfamilien unterteilt werden: PLC- β , - γ , - δ , - ϵ , - ζ und - η (Katan, 1998).

In dieser Arbeit werden die Interaktionen von G_q Protein Untereinheiten mit ihrem Haupteffektor untersucht, der Phosphoinositid-spezifischen Phospholipase C β (PLC β). Die PLC β kann sowohl durch $G\beta\gamma$ als auch durch GTP gebundenes $G\alpha_q$ aktiviert werden (Park et al, 1993; Taylor et al, 1991) und existiert in vier Isoformen (PLC β 1-4). Die Isoformen unterscheiden sich in der Gewebeverteilung, ihrer physiologischen Rolle und ihrer Affinität gegenüber den aktivierten $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ Untereinheiten (Rhee, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die PLC β 3 verwendet, die ubiquitär exprimiert wird und sowohl stark durch $G\alpha_q$ als auch durch $G\beta\gamma$ aktiviert wird (Kozasa et al, 1993; Murthy et al, 1996).

Für die PLC β 3, PLC β 2 und die PLC δ 1 wurden die Strukturen aufgeklärt, z.T. im Komplex mit aktivierenden Proteinen (Essen et al, 1996; Jezyk et al, 2006; Waldo et al, 2010). Abbildung 3 zeigt die Struktur und eine Auswahl an Interaktionsstellen der PLC β Enzyme.

Die PLC Isozyme enthalten eine X und Y Domäne, die verantwortlich für die katalytische Aktivität sind. Diese Domäne ähnelt einem Triosephosphat-Isomerase α/β -Fass (engl. „TIM-Barrel“). Zudem wird hier Calcium gebunden, das ein essentieller Cofaktor der Reaktion ist. Die Hydrolyse des Substrates erfolgt in zwei Schritten: (1) Spaltung des PIP $_2$ zu Diacylglycerol und zyklischem Inositol-1,2-phosphat, worauf (2) die Konversion des zyklischen in ein azyklisches Inositolphosphat erfolgt. Die X- und Y-Domänen werden durch eine Linker-Sequenz verbunden. Diesem Linker besitzt wichtige regulatorische Funktionen, da er die basale Aktivität der PLC β inhibiert und eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Enzyms spielt (Harden et al, 2011).

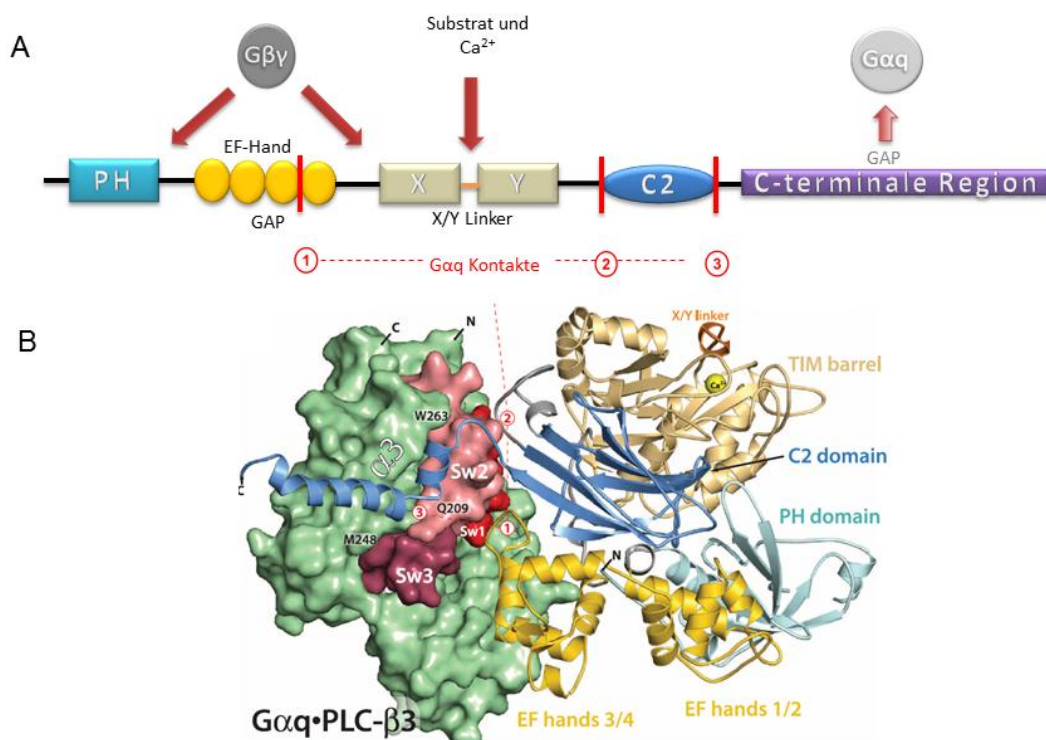


Abbildung 3. Struktur und Interaktionen der PLC β . (A) Die Organisation der Domänen ist den meisten PLC β Isozymen gemeinsam. Die Interaktionsstellen der G $\beta\gamma$ Untereinheit basieren auf Studien an der PLC β 2, die der G α_q Untereinheit und der GAP Aktivität an der PLC β 3 (nach Drin & Scarlata, 2007; Waldo, 2010). (B) Struktur des Komplexes der humanen PLC β 3 und der aktivierten G α_q Untereinheit (Waldo,

2010). Die roten Ziffern markieren die hier gefundenen Interaktionsstellen. Dabei ist zu beachten, dass die C-terminale Region nicht aufgelöst worden ist. Die $G\alpha_q$ Untereinheit ist grün, die switch Regionen der $G\alpha_q$ Untereinheit in unterschiedlichen Rottönen dargestellt. Der X/Y-Linker der PLC β 3 (orange), verbindet die beiden Hälften der katalytischen Domäne (TIM-Barrel) und verdeckt das aktive Zentrum der Lipase, das durch Ca^{2+} markiert ist (gelber Ball).

Die PH Domäne der PLC β zeigt keine hohe Affinität zu PIP_2 , im Gegensatz zur PH-Domäne der PLC δ 1 (Cifuentes et al, 1993). In Verbindung mit dem C-Terminus erlaubt sie jedoch eine unspezifische Interaktion mit der Membran (Drin & Scarlata, 2007). Die PH Domäne der PLC β scheint außerdem in der spezifischen Bindung der $G\beta\gamma$ Untereinheit involviert zu sein (Katan, 1998).

Insgesamt zeigt die PLC β eine hohe intrinsische Membranaffinität und liegt schon vor Aktivierung membrangebunden vor (Romoser et al, 1996). Jedoch zeigt eine auf TIRF Mikroskopie basierte Studie eine Dissoziation der PLC β 1a von der Membran nach Rezeptor vermittelter Stimulation und Verbrauch der Substrates (Adjobo-Hermans et al, 2008). Für die Membranlokalisation der PLC β 1 scheint also ein kooperativer Mechanismus, der die Bindung des Substrats PIP_2 und der G_q Untereinheiten involviert, verantwortlich zu sein (Razzini et al, 2000).

Genau N- und C-terminal der C2 Domäne der PLC β Isozyme finden sich die wichtigsten Bindungsorte für aktivierte $G\alpha_q$ -Untereinheiten (Waldo et al, 2010).

Spezifisch für die Isozyme der Phospholipase C β ist ein um etwa 450 Aminosäuren verlängerter C-Terminus, dem eine wichtige Bedeutung bei der Membranbindung beigemessen wird (Suh et al, 2008). Deletionsstudien des C-Terminus zeigen die Bedeutung dieser Region für die Bindung und Stimulation der PLC β durch aktiviertes $G\alpha_q$ (Mizuno & Itoh, 2009). Jedoch wurde der Bedeutung der C-terminalen Domäne für Bindung von aktivierten $G\alpha_q$ zuletzt stark angezweifelt (Waldo et al, 2010).

Eine weitere Eigenschaft der PLC β ist die Verstärkung der GTPase Aktivität von $G\alpha_q$ (Berstein et al, 1992). Für das C-terminale Fragment der Aminosäuren 903-1042 der PLC β 1 wurde die GAP Aktivität als isoliertes Fragment nachgewiesen (Paulssen et al, 1996). Kürzlich wurde zusätzlich die Bedeutung der Schleife zwischen dem EF-Hand Motiv 3 und 4 für die Stimulation der GTPase Aktivität von $G\alpha_q$ deutlich: Ein Asparagin

Rest der PLC β an Position 260 stabilisiert ein Glutamat-Rest im katalytischen Zentrum von G α_q und beschleunigt so die GTP-Hydrolyse (Waldo et al, 2010). Diese GTPase aktivierende Eigenschaft der PLC β wurde überzeugend mittels biochemischer Ansätze, die das gereinigte Protein nutzen und auch *in vivo* im visuellen System von *Drosophila* demonstriert (Cook et al, 2000). Dabei scheinen die Isoformen 1 und 4 der PLC β ähnlich starke Aktivitäten als GAP Protein zu zeigen, während die PLC β 3 ein etwas schwächeres GAP Protein zu sein scheint (Ross & Wilkie, 2000). Der Einfluss auf die G q Protein Kinetik in intakten Säugetierzellen wurde jedoch bis dato nicht untersucht.

1.4.2 Interaktion von G-Protein Untereinheiten mit der PLC β

1.4.2.1 Mechanismus der Interaktion

Im Vergleich zur GPCR/ G-Protein Interaktion ist über den Kopplungsmechanismus zwischen G-Proteinen und ihren Effektoren weit weniger bekannt. Für G-Protein aktivierte einwärts gleichrichtende Kalium Kanäle (GIRK), welche ein Modellsystem für G $\beta\gamma$ Effektoren darstellen, führte der Einsatz von Resonanz-Energie-Transfer-Methoden zu Zweifeln an der allgemeinen Hypothese, dass G-Protein Untereinheiten nur nachfolgend einer Aktivierung Komplexe mit den Effektoren bilden (Riven et al, 2006). Auch für die Interaktion von G α_q und der PLC β 1 wurde eine stabile Assoziation in Abwesenheit von Agonisten postuliert (Dowal et al, 2006).

Sowohl aktivierte G α_q , als auch G $\beta\gamma$ Untereinheiten stimulieren die PLC β . Die maximale Stimulation ist dabei ähnlich, auch wenn die Konzentrationen von G $\beta\gamma$, die hierfür notwendig sind, wesentlich höher liegen als für G α_q . G α_q stimuliert die PLC β Isoformen gemäß der Rangfolge PLC β 1 \geq PLC β 3 > PLC β 2, wobei die PLC β 2 kaum von G α_q reguliert wird (Rebecchi & Pentylala, 2000).

Kürzlich wurde die Aktivierung der PLC β 3 durch G α_q strukturell aufgeklärt (Waldo et al, 2010). Dabei fanden sich 3 Interaktionsstellen zwischen G α_q und der PLC β 3. (1) eine Schleife zwischen dem dritten und vierten EF-Hand-Motiv interagiert mit für die GTP Hydrolyse entscheidenden Aminosäuren von G α_q ; (2) das Verbindungsstück von katalytischer und C2 Domäne interagiert mit den switch-Regionen 1 und 2 auf G α_q , also

jener Region, deren Konformation sich nach der G-Protein Aktivierung ändert; (3) ein C-terminal gelegenes Segment der C2 Domäne ruht zwischen der switch-Region 2 und der Helix $\alpha 3$ von $G\alpha_q$ (Abbildung 3B).

$G\alpha_q$ beeinflusst bei der Interaktion mit der Phospholipase nicht direkt deren aktives Zentrum, sondern führt zur Umorientierung der PLC β relativ zur Membran, wobei es durch sterische und elektrostatische Einflüsse zwischen negativ geladenem X/Y-Linker und der negativ-geladenen Membranoberfläche zur Freigabe des katalytischen Zentrums durch den inhibitorischen X/Y-Linker kommt (Waldo et al, 2010) (vgl. Abb. 4).

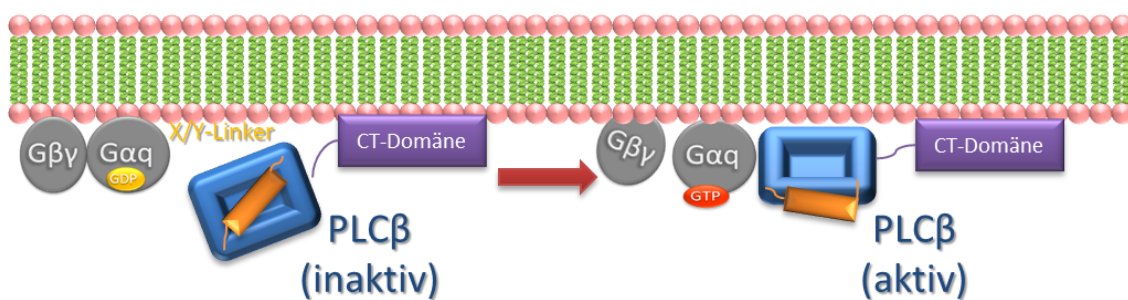


Abbildung 4 Modell der Aktivierung der PLC $\beta 3$ durch aktiviertes $G\alpha_q$. Im inaktiven Zustand verdeckt der autoinhibitorische X/Y-Linker das aktive Zentrum der PLC β . Die CT-Domäne vermittelt die Membranassoziiierung. Nach Aktivierung interagiert $G\alpha_q$ mit der PLC β . Die Komplexierung verändert die Orientierung der PLC β zur Membran, worauf der X/Y-Linker das katalytische Zentrum der Lipase freigeibt, sodass PIP $_2$ zu DAG und IP $_3$ hydrolysiert werden kann (nach Waldo et al, 2010).

Die PLC β Isoformen werden mit Ausnahme der PLC $\beta 4$ auch von G $\beta\gamma$ Dimeren aktiviert. Dabei unterscheidet sich die Sensitivität der Interaktion mit G $\beta\gamma$ von der mit der aktivierten $G\alpha_q$ Untereinheit. Die höchste Affinität zeigt sich gegenüber der PLC $\beta 2$, die niedrigste gegenüber PLC $\beta 1$ (Smrcka, 2008).

Die Stimulation der PLC β durch G $\beta\gamma$ wurde bislang den PTX-sensitiven G i/o -Proteinen zugeordnet, die normalerweise in großem Überschuss in der Zelle exprimiert sind und bis zu 1-3% der endogenen Membranproteine ausmachen können (Rebecchi & Pentylala, 2000). Die Frage, ob auch G $\beta\gamma$ Untereinheiten, die von aktivierten G q Proteinen freigesetzt werden, interagieren, wurde bislang nicht ausreichend beantwortet (Morris & Scarlata, 1997).

Für die Interaktion von $G\beta\gamma$ und der $PLC\beta$ existiert keine drei-dimensionale Struktur. Über die Interaktionsstellen ist dementsprechend weniger bekannt. Die Regionen der $PLC\beta$, die mit der $G\alpha_q$ Untereinheit interagiert, unterscheiden sich aber wohl von jenen, die für die Interaktion mit der $G\beta\gamma$ Untereinheit vermutet. Es kommen zwei Bindungsstellen infrage: eine in der katalytischen Domäne (Kuang et al, 1996), sowie eine weitere in der PH Domäne (Wang et al, 1999). Somit erscheint eine zeitgleiche Bindung von $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ möglich. Auch experimentell wurde eine solche synergistische Aktivierung der $PLC\beta$ durch $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ bestätigt (Philip et al, 2010; Rebres et al, 2010).

Der Mechanismus der Aktivierung der $PLC\beta$ durch $G\beta\gamma$ scheint aber jenem der Aktivierung durch $G\alpha_q$ zu ähneln: durch Neuorientierung der PLC führt die Interaktion letztlich zu einer Freigabe des aktiven Zentrum des Enzyms durch den inhibitorischen X-Y-Linker (Drin & Scarlata, 2007).

1.4.2.2 Kinetik der Interaktion

Nicht nur der strukturelle Mechanismus der Interaktion von G_q und der $PLC\beta$ wurde eingehend studiert: kinetische Analysen offenbarten viel über die Dynamik des $G\alpha_q/PLC\beta$ -Signalkomplexes. Anhand von Messungen an aufgereinigtem Protein in Phospholipid-Vesikeln wurde das Modell eines kinetischen Gerüsts (engl. *Kinetic scaffolding*) postuliert, also eine funktionelle und zeitliche Stabilisierung des Signalkomplexes. Der mACh-Rezeptor und $PLC\beta_1$ regulieren demnach gemeinschaftlich die Signalamplitude der PLC sowie die Signalinitiierung und – terminierung (Biddlecome et al, 1996). Die Eigenschaft des Rezeptors als GEF und des Effektors als GAP sollte demnach in Anwesenheit eines Agonisten zur Bildung eines über mehrere GTPase Zyklen stabilen 3-Protein-Komplexes führen: in Gegenwart von GAP Proteinen wie der $PLC\beta$ oder RGS4 erfolgt die rasche GTP Hydrolyse in einem Komplex der Interaktionspartner Rezeptor, G-Protein und GAP. Die Signalamplitude bleibt dabei erhalten, da in diesem System die Rate des Rezeptor-vermittelten GDP/GTP Austausches anstieg, wahrscheinlich als Folge der Tatsache, dass G-Protein und

Rezeptor auch nach Aktivierung assoziiert bleiben und so eine rasche Reaktivierung möglich wird, wie Abbildung 5 verdeutlicht. (Biddlecome et al, 1996).

Diese Hypothese konnte in einem kinetischen Modell der Rezeptor/ G_q /PLC β Interaktion basierend auf *in vitro* Messungen nachvollzogen werden (Turcotte et al, 2008). Hier fanden sich Hinweise, wie die GAP Aktivität der PLC β den Signalweg nach Beendigung der Aktivierung rasch beenden und gleichzeitig eine hohe Signalamplitude erhalten kann: Das GTPase aktivierende Protein potenzierte die GDP/GTP-Austausch katalysierende Aktivität des Rezeptors und aktivierte GPCRs bleiben mit $G\alpha_q$ durch den gesamten GTPase Zyklus verbunden. Abweichend vom ursprünglichen Modell bindet die PLC β hier aber hauptsächlich an den GTP-gebundenen Zustand von $G\alpha_q$, dissoziiert also im GDP-gebundenen Zustand.

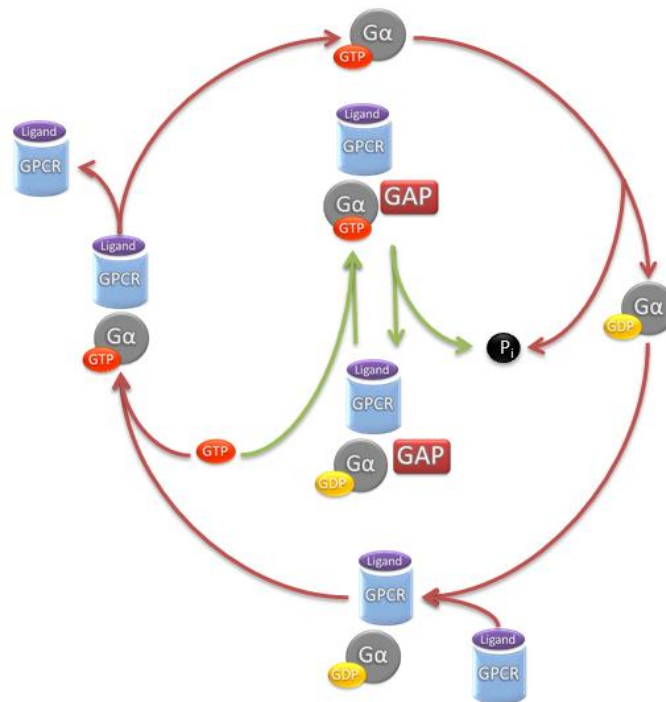


Abbildung 5. Kinetic scaffolding: Einfluss von GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) auf den G-Protein Zyklus. GAPs wie die PLC β oder RGS-Proteine beschleunigen den GTPase Zyklus und erhalten gleichzeitig einen signifikanten Pool von aktivierten, GTP gebundenen $G\alpha$ Untereinheiten. Ohne GAP ist die Hydrolyse von GTP langsam (roter Kreis) und der Rezeptor dissoziiert nach der G-Protein Aktivierung. Somit ist der limitierende Schritt die Reassoziierung von G-Protein und GPCR. In Gegenwart eines GAP (grüner Zyklus) wird GTP hydrolysiert bevor der Rezeptor dissoziiert. Somit ist eine rasche Reaktivierung

möglich. Wird der Agonist jedoch entzogen, wird das Signal prompt beendet (nach Biddlecome et al, 1996).

In anderen Studien wurde der Einfluss unterschiedlicher GAP Proteine anhand von Proteoliposomen verglichen (Mukhopadhyay & Ross, 1999). Dabei zeigte sich eine Beschleunigung der GTPase Aktivität von G_q um den Faktor 1000-2000 in Anwesenheit der PLC β 1 bzw. RGS4. Der Mechanismus der GTPase aktivierenden Eigenschaft der PLC β konnte kürzlich anhand der Struktur des PLC β 3/ $G\alpha_q$ -Komplexes aufgeklärt werden, wonach die EF-Domäne dafür entscheidend ist (Waldo et al, 2010).

Wurden die bisher genannten Untersuchungen *in vitro* an Membranvesikel durchgeführte, versuchten kürzlich mehrere Arbeiten die Kinetik von G_q -Signalwegen in lebenden Zellen mit Hilfe von FRET-Messungen aufzulösen, z.T. mit widersprüchlichen Ergebnissen (Adjobo-Hermans et al, 2011; Dowal et al, 2006; Jensen et al, 2009).

1.5 Regulator of G-Protein signaling (RGS)

1.5.1 Physiologische Funktion der RGS Proteine

G-Protein Signalwege zeichnen sich durch eine intrinsische Kinetik aus. Die Signalamplitude wird durch das Gleichgewicht der Austauschraten von GDP zu GTP (Aktivierung) und GTP Hydrolyse (Deaktivierung) bestimmt. Die Dauer eines Signals ist dabei durch die Spaltung von GTP zu GDP determiniert. Die intrinsische GTPase Aktivität von $G\alpha_q$ ist eher gering und insuffizient, um der Schnelle der Signalbeendigung *in vivo* Rechnung zu tragen. Für Proteine wie der Familie der *regulator of G-Protein signaling* (RGS) wurde gezeigt, dass sie die Enzymaktivität substanziell potenzieren (Ingi et al, 1998). Sie schärfen und fokussieren den Verlauf des Signals auch örtlich. Zudem fördern sie die Assoziation mit anderen regulatorischen Proteinen (Ross & Wilkie, 2000). *In vitro* wurde für gewisse RGS Proteine, hierbei am deutlichsten für RGS2, eine deutlich effektivere Beschleunigung der GTP Hydrolyse an

G α_q Proteinen im Vergleich zur PLC β gezeigt (Chidiac & Ross, 1999; Mukhopadhyay & Ross, 1999).

Der Einfluss von GAP Proteinen auf die G-Protein Kinetik in intakten Zellen wurde bislang vor allem am Modellsystem von G $\beta\gamma$ aktivierten einwärts gleichrichtenden Kalium Kanälen (GIRK) untersucht (Bünemann & Hosey, 1998; Doupnik et al, 1997b). Hierbei wurden sowohl die Agonist induzierte Aktivierung der GIRK Ströme als auch deren Deaktivierung nach Entzug des Agonisten durch RGS Proteine beschleunigt, wohingegen die GIRK Ströme im Gleichgewichtszustand nicht beeinflusst wurden (Doupnik et al, 1997b). Diese scheinbar paradoxe Eigenschaft wurde durch verschiedene Mechanismen erklärt, darunter die Vermittlung von weiteren regulatorischen Proteinen durch die RGS Proteine. Kürzlich gewonnene experimentelle Daten bevorzugen jedoch das Modell *kinetic scaffolding*, ähnlich wie oben für die PLC β beschrieben (Lambert et al, 2010).

Physiologisch spielen RGS Proteine eine wichtige Rolle in der Regulation der Herz-Kreislauf-Regulation (Stewart et al, 2012; Tsang et al, 2010) und gelten als mögliche Zielproteine neuer medikamentöser Therapien (Sjögren et al, 2010). In dieser Arbeit wird hauptsächlich der Einfluss von RGS2 auf die G $_q$ Protein Aktivität und der Interaktion von G $_q$ Protein Untereinheiten mit der PLC β 3 untersucht. RGS2 wurde ebenfalls mit der Blutdruckregulation (Gu, 2009; Gurley et al, 2010), bzw. Störungen der RGS2 Funktion mit arteriellen Hypertonus in Verbindung gebracht (Heximer et al, 2003).

1.5.2 Strukturelle und funktionelle Aspekte

Bislang wurden im humanen Genom 37 Gene identifiziert, die alle eine RGS oder RGS-like Domäne enthalten. Außerhalb dieser gemeinsamen Region zeigen die RGS Proteine jedoch große Unterschiede. Neben Proteinen, die mehr oder weniger lediglich aus der RGS Domäne bestehen, existieren auch Proteine, deren N- und C-terminale Verlängerungen Domänen enthalten, die die RGS Aktivität regulieren. RGS Proteine werden nach ihrer Sequenzhomologie in acht Unterfamilien eingeteilt: A/RZ, B/R4, C/R7, D/R12, E/RA, F/GEF, G/GRK und H/SNX (Willars, 2006). Die B/R4

Unterfamilie umfasst RGS1, RGS2, RGS3, RGS4, RGS8, RGS16 und RGS18. Diese sind mit 20-25 kDa vergleichsweise kleine Proteine, besitzen also neben der RGS Domäne keine zusätzlichen Domänen. Viele dieser Proteine binden die G_q Familie und hemmen Inositol- und Ca^{2+} -Signale. Die B/R4 Unterfamilie wurde zunächst als GAP für $G\alpha_{i/o}$ identifiziert, bevor auch die GAP Aktivität auf $G\alpha_q$ für RGS2, RGS3, RGS4 und RGS18 gezeigt wurde (Bansal et al, 2007). Lediglich RGS2 zeigt eine Selektivität für $G\alpha_q$ gegenüber $G\alpha_{i/o}$, mit einer zehnfach stärkeren Hemmung der $G\alpha_q$ vermittelten Aktivierung der PLC β als RGS4 (Kehrl & Sinnarajah, 2002). RGS2 ist somit das potenteste GTPase aktivierende Protein für G_q .

Die konservierte „RGS Box“ umfasst 120 Aminosäuren. Die RGS Domäne bildet neun α -Helices, die zwei Unterdomänen formen: einer terminalen Domäne und einem Bündel von vier Helices. Interhelikale Schleifen dieser Subdomäne interagieren mit der switch-Region der $G\alpha$ Untereinheit (Kehrl & Sinnarajah, 2002). Sie bindet $G\alpha$ -GTP vorzugsweise im Transitionszustand der GTP Hydrolyse und beschleunigt die endogene GTPase Aktivität. Der Mechanismus wurde anhand der Kristallstruktur der RGS Domäne von RGS4 im Komplex mit $G\alpha_{i1}$ unter Bedingungen, die dem Transitionszustand der GTPase Reaktion gleichen sollen, untersucht (Tesmer et al, 1997). Dabei fand sich kein direkter Kontakt des RGS Proteins mit dem gebundenen GTP. Dies spricht dafür, dass die RGS Domäne keinen direkten Anteil an der Hydrolyse nimmt. Vielmehr scheint der Transitionszustand der GTP Hydrolyse durch die Interaktion der switch-Region der $G\alpha$ Untereinheit mit der RGS Domäne stabilisiert zu werden, indem die Switch II Region in der katalytisch aktiven Konformation gehalten wird (Ross & Wilkie, 2000).

Die subzelluläre Lokalisation einiger RGS Proteine wird nicht nur konstitutiv durch posttranslationelle Modifikation bestimmt, sondern auch dynamisch durch Interaktionspartner. Rekombinantes RGS2 zeigt bei Expression in HEK293 Zellen eine überwiegend cytosolische Distribution, wird jedoch durch Coexpression von spezifischen $G\alpha$ oder GPCRs an die Membran rekrutiert (Roy et al, 2003).

RGS2 findet weite Verwendung als Inhibitor der $G\alpha_q$ Funktion (Ladds et al, 2007). Es wurde jedoch deutlich, dass RGS2 die $G\alpha_q$ Funktion durch kompetitive Blockade der

$G\alpha_q$ / Effektor Interaktion hemmen kann, eine Wirkung die somit nicht die GAP Aktivität benötigt (Anger et al, 2004). Auch die Bindungsstellen zwischen RGS4 und $G\alpha_i$ sind konsistent mit der Fähigkeit als Effektorantagonist zu wirken (Tesmer et al, 1997).

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht die Dynamik der G-Protein/ Effektor Interaktion des exzitatorischen $G\alpha_q$ Signalweges in einzelnen lebenden Zellen. Insbesondere werden die Interaktionen der $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ Untereinheiten mit der ubiquitär exprimierten Phosphoinositid-spezifischen Phospholipase $C\beta_3$ analysiert.

Dabei sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Formen die G_q Protein Untereinheiten stabile Komplexe mit der $PLC\beta_3$?
2. Binden sowohl $G\alpha_q$ als auch von $G\alpha_q$ abgeleitete $G\beta\gamma$ Untereinheiten den Effektor nach Rezeptor induzierten Aktivierung?
3. Wie werden diese Interaktionen und deren Kinetik durch das G_q -regulierende RGS2 beeinflusst?

Zur Beantwortung dieser Fragen werden neue *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET)-Assays in der *Total-Internal Reflection Fluorescence* (TIRF)-Mikroskopie angewandt. Dies soll die exklusive Darstellung der Geschehnisse an der Zellmembran in Echtzeit in lebenden Zellen ermöglichen und das Verständnis vertiefen, wie der G_q Signalweg orchestriert wird.

2. Material und Methoden

Die im Folgendem aufgeführten Chemikalien stammen von Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), falls nicht anders angegeben.

2.1 Medien für eukaryote Zellen

- DMEM-Vollmedium: Dulbecco's modified Eagle-Medium mit 4,5 g/l Glucose (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland); fetales Kälberserum, 10% (v/v); Streptomycin, 100 mg/l; Penicillin, 100000 U/l; Glutamin, 2mmol/l;
- Einfriermedium: DMEM (mit 4,5% Glucose), 70%; FCS, 20%; DMSO, 10%;
- FRET-Puffer (pH 7,3): NaCl, 137mM; KCl, 5,4 mM; HEPES, 10 mM; CaCl₂, 2 mM; MgCl₂, 1 mM;
- Agonistlösung: FRET-Puffer versetzt mit 100 µM ATP bzw. 10 µM Noradrenalin

2.2 Medien für prokaryote Zellen

- LB-Medium (Lysogeny Broth-Medium; autoklaviert): NaCl, 5 g; Pepton, 10 g; Hefeextrakt, 5 g; H₂O ad 1 l
- LB-Agar-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin: Agar, 1%, in LB-Medium; nach dem Autoklavieren Zusatz von 100 mg/l Ampicillin-Natriumsalz oder 30 mg/l Kanamycinsulfat und Gießen der Platten.
- SOC-Medium (pH 7; steril filtriert): Pepton, 2%; Hefe Extrakt, 0,5%; NaCl, 10 mM; KCl, 2,5 mM; MgCl₂, 10 mM; MgSO₄, 10 mM; Glucose, 20 mM;
- TB-Puffer (pH 6,7; steril filtriert): Pipes, 10 mM; CaCl₂, 15 mM; KCl, 250 mM; MnCl₂, 55 mM (nach pH-Wert Einstellung zugegeben);
- KCM-Puffer (5x): KCl, 500 mM; CaCl₂, 150 mM; MgCl₂, 250 mM;

2.3 Puffer für die Molekularbiologie

Die hier aufgelisteten Puffer stammen alle von Qiagen (Hilden, Deutschland).

- Resuspensionspuffer P1: Tris (pH 8,0), 50 mM; EDTA, 10 mM; RNase A, 100 µg/ml;
- Lysepuffer P2: NaOH, 200 mM; SDS, 1% (w/v);
- Neutralisationspuffer P3 (pH 5,0): Kaliumacetat, 3 M;
- Equilibrierungspuffer QBT: NaCl, 750 mM; MOPS (pH 7,0), 50 mM; Isopropanol, 15% (v/v); Triton X-100, 0,15% (v/v);
- Waschpuffer QC: NaCl, 1,0 M; MOPS (pH 7,0), 50 mM; Isopropanol, 15% (v/v);
- Elutionspuffer QF: NaCl, 1,25 M; Tris (pH 8,5), 50 mM; Isopropanol, 15% (v/v);

2.4 Biologisches Material

- Bakterienstämme: *E.coli* DH5α (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland);
- Eukaryotische Zelllinie: HEK 293 TSA-Zellen;
- Enzyme: Trypsin (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland), Konzentration 0,5 g/l in 0,2 g/l EDTA Lösung;
- Plasmide (für Transfektion einer 5 cm Kulturschale verwendete Menge in µg):
P2Y₁-R in pCDNA3-Vektor (0,4), zur Verfügung gestellt von C. Hoffmann, Würzburg;
α2A-R in pCDNA3-Vektor (0,4) (Bünemann et al, 2003)
Gα_q in pCDNA3-Vektor (1,0), zur Verfügung gestellt von C. Berlot, Danesville, USA;
Gα_q-CFP in pCDNA3-Vektor (1,0), zur Verfügung gestellt von C. Berlot, Danesville, USA;
Gα_q-YFP in pCDNA3-Vektor (1,0), zur Verfügung gestellt von C. Berlot, Danesville, USA;
Gα_o-91-YFP in pCDNA3 (1,0) (Frank et al, 2005)
Gβ₁ in pCDNA3-Vektor (0,5) (Bünemann et al, 2003)
CFP-Gγ₂ in C1-vector (0,2) (Bünemann et al, 2003)
RGS4 in pCDNA3-Vektor (0,6) (Bünemann & Hosey, 1998)

RGS2 in pCDNA3-Vektor (1,0) (cDNA.org)

RGS2-YFP in pEYFP-C1-Vektor (1,0), zur Verfügung gestellt von S. Gu, Toronto, Kanada;

m-YFP in pCDNA3-Vektor (1,0) (Hein et al, 2005)

PLC β 3 in pCDNA3-Vektor (1,0), zur Verfügung gestellt von P. Gierschick, Ulm;

YFP-PLC β 3 in pCDNA3-Vektor (1,0) kloniert von M. Frank, Würzburg: Hierfür wurde das 3-fragment Multisite Gateway® Pro cloning System von Invitrogen benutzt. Das Klonieren (Primer-Design und Reaktionsprotokoll) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Sequenz von vier zusätzlichen Aminosäuren wurde zum linking primer zwischen dem ersten Fragment (N-terminales YFP) und dem zweiten Fragment (PLC β 3) hinzugefügt. Ein dritter entry clone, der das C-terminale Fragment enthält, wurde freundlicherweise von S. Merckle und S. Engelhardt zur Verfügung gestellt. Das fertige Konstrukt wurde aus den entry clones in den Expressionsvektor pT-RExT-DEST30 rekombiniert. Die endgültige Aminosäuresequenz, die YFP und die PLC β 3 verbindet, lautet AGAGHPTFLYKVA. Der C-terminale Linker enthält das Stop-Kodon, die Aminosäuresequenz lautet TTYLNKVV.

- Antikörper: Anti-RGS2-Antikörper aus der Gans (sc-9933, Santa Cruz);
Anti-Gans IgG-Antikörper aus dem Kaninchen (A21086, Molecular Probes), gekoppelt an Alexa Fluor 633;

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Kompetente E. coli

E. coli Bakterien können zur Amplifikation von Plasmiden nur verwendet werden, wenn diese kompetent gemacht wurden. Hierfür wurden 250 ml SOC-Medium mit 20 μ l E. coli angeimpft. Die Kultur wurde bei 25 °C solange geschüttelt, bis eine optische Dichte von 0,6 bei 600 nm erreicht wurde. Daraufhin wurde die Bakteriensuspension für 10 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min bei 4°C und 1940 g zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach 10 min auf Eis wurde wiederum zentrifugiert (10 min, 4 °C, 1940 g), der Überstand verworfen und das Pellet nun in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1,6 ml DMSO wurde die Suspension nochmals für 10 min auf Eis gestellt. Aliquots der gewünschten Mengen wurden abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.2 DNA-Transformation

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden 100 µl kompetente DH5α *E. coli* in 100 µl KCM-Puffer suspendiert und mit ca. 0,1 µg Plasmid-DNA vermischt. Die Zellen wurden zunächst 20 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei Raumtemperatur gehalten. Danach wurde der Ansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Schließlich wurden die Zellen 5 min mit 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Rücklauf resuspendiert. 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden zur Selektion auf einer mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB-Medium Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.5.3 DNA-Präparation

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde ein Kit verwendet (Qiagen Plasmid Maxi Kit) und entsprechend dem Handbuch durchgeführt (Qiagen Plasmid Purification Handbook 11/2005).

Aus den über Nacht gewachsenen Kolonien der transformierten *E. coli* wurde eine Kolonie gepickt, um 200 ml LB-Medium mit Antibiotikumzusatz anzupflanzen und die Bakterien über Nacht bei 37 °C und 175 rpm im Schüttler zu kultivieren. Der Ansatz wurde am Folgetag für 15 min bei 4 °C und 5000 g abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Lysis-Puffer P2 wurde der Ansatz gut geschüttelt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich die Lyse durch

Zugabe von 4 ml Neutralisationspuffer P3 beendet. Danach wurde der Ansatz wiederum für 20 min auf Eis gelagert. Während erneuter Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 15000 g wurden die Qiatip 500 Säulen mit je 4 ml QBT-Puffer equilibriert. Auf die Ionenaustauschersäulen wurde dann der Überstand gegeben, der der Schwerkraft folgend durchlief. Die Säulen wurden nach vollständigem Durchlauf zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen und letztlich die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert und in 3,5 ml Isopropanol aufgefangen. Nach sofortiger Zentrifugation für 60 min bei 4 °C und 15000 g wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem das Pellet für 5 bis 10 min an der Luft trocknete, wurde es in 100 µl Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt.

Dazu wurden 5 µl der Plasmidlösung in 495 µl Wasser aufgenommen und die optische Dichte bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht einer optischen Dichte von 1 bei 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl. Um die Reinheit der DNA-Lösung zu bestimmen, wurde der Quotient der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm als Äquivalent der Proteinverunreinigung gebildet. Ein Quotient größer 1,8 wurde als ausreichend erachtet.

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Permanente Zellenkultur

HEK 293 TSA Zellen wurden bei 5 % CO₂ und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden nach 48-72 Stunden passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen einer 10 cm Kulturschale kurze Zeit 2,5 ml Trypsin-EDTA ausgesetzt. Nach Absaugen des Enzyms wurden die nun vom Untergrund gelockerten Zellen in 10 ml DMEM aufgenommen und in einer Verdünnung von 1:4 oder 1:5 in eine neue 10 cm Zellkulturschale überführt.

2.6.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen zu lagern und aufzubewahren, wurden Zellen wie oben beschrieben aus einer 10 cm Kulturschale gelöst, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein gekühltes Kryoröhrchen überführt. Nach Zwischenlagerung bei -20 °C für einige Stunden wurden die Zellen dann bei -80 °C gelagert oder für die langfristige Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Um diese Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, in 10 ml DMEM überführt und für 3 min bei 250 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml DMEM resuspendiert und in ein passendes Zellkulturgefäß überführt.

2.6.3 Transiente DNA-Transfektion

Am Tag der Transfektion wurden morgens 1 ml konfluenter HEK TSA Zellen in 2 ml DMEM-Vollmedium in einer 5 cm Zellkulturschale überführt. Die Transfektion mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI) fand mittags statt.

Der Transfektionsansatz für eine 5 cm Kulturschale setzte sich pro µg eingesetzter Plasmid-DNA aus 100 µl DMEM ohne Zusätze sowie 1 µg PEI zusammen. Der Ansatz wurde gut durchmischt und für eine halbe Stunde bei 20 °C im Dunklen inkubiert, da PEI sowohl temperatur- als auch lichtempfindlich ist. Dieser Ansatz wurde dann den Zellen zugesetzt, nachdem auch hier das DMEM-Vollmedium mit 3 ml DMEM ohne Zusätze ausgetauscht wurde, und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach etwa 20 h wurde der Transfektionsansatz von den Zellen abgesaugt und wiederum 3 ml DMEM-Vollmedium zugegeben.

2.6.4 Aussäen der Zellen auf Deckgläschen

In Vorbereitung der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen etwa 6 h nach Stoppen der Transfektion auf Deckgläschen überführt. Dazu wurden je 3 Deckgläschen in einer 5 cm Schale überlagerungsfrei positioniert und mit Ethanol gereinigt. Nach Absaugen des Alkohols wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und wiederum durch Absaugen getrocknet. Auf jedes Deckgläschen wurde schließlich etwa 0,1 ml Poly-D-Lysin in einer Konzentration von 0,1 mg/ml gegeben und für 30-45 min stehen gelassen. Nach Absaugen des Poly-D-Lysins und einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die transfizierten Zellen mit Hilfe von 0,5 ml Trypsin-EDTA aus ihrer 5 cm Kulturschale gelöst und unverdünnt etwa 750 µl der Zellsuspension auf die Deckgläschen gegeben. Abschließend wurden noch 2-3 ml DMEM-Vollmedium hinzugegeben und die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert, um am nächsten Morgen die Fluoreszenzmikroskopie durchzuführen.

2.6.5 Immunfluoreszenz

Der Nachweis von RGS2 in mit RGS2-Plasmid-DNA transfizierten Zellen wurde ähnlich wie bereits beschrieben durchgeführt (Roy et al, 2006).

Die auf Deckgläschen überführten Zellen wurden 24 Stunden nach transienter Transfektion für 10 min mit eiskalter 4 % Paraformaldehyd-Lösung auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit PBS gespült.

Um die intrazellulären Proteine der Antikörperfärbung zugänglich zu machen, musste die Zellmembran permeabilisiert werden. Dies geschah durch Inkubation mit einer 0,3 % Triton X-100 Lösung in PBS bei Raumtemperatur. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit einer 5 % Albumin-Lösung in PBS für 3 bis 5 h bei Raumtemperatur geblockt.

Als Erstantikörper wurde ein Anti-RGS2 Antikörper aus der Gans verwendet (sc-9933, Santa Cruz). Dabei wurden die Deckgläschen mit je 50 µl einer 1:250 Verdünnung in

PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach mehrmaligen Spülen mit PBS wurde der Zweitantikörper zugegeben, einem Anti-Gans-IgG Antikörper aus Kaninchen, der mit dem Fluorophor Alexa Fluor 633 markiert ist (A21086, Molecular Probes). Es wurde eine Verdünnung von 1:1000 in PBS gewählt und die Deckgläschen wiederum mit je 50 µl für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach mehrmals mit PBS gespült.

Abschließend wurden die Deckgläschen mit 5 µl Moviol-Lösung auf Objektträger umgebettet. Nach einer Aushärtungszeit von etwa einer halben Stunde, waren die Objektträger bereit zur Mikroskopie. In der TIRF-Mikroskopie wurde schließlich die mittlere Intensität der Zellen nach Anregung des Fluorophors Alexa Fluor 633 bei 635 nm ermittelt.

2.7 Fluoreszenzmikroskopie

2.7.1 TIRF-Mikroskopie

Die TIRF-Mikroskopie wurde bei Raumtemperatur an einem inversen Leica TIRF AM Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt, das mit einem Leica HCX Plan Apo Öl-Immersion-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 1,46 ausgestattet ist. Die Penetrationstiefe der evaneszenten Welle wurde auf 110 nm eingestellt. Die hierfür benötigten Winkel wurden an jedem Messtag mit Hilfe des Auto-Alignments ermittelt. Die CFP-Anregung erfolgte durch die 405 nm Laserlinie eines UV-Lasers, die YFP-Anregung bei 488 nm eines Argon-Lasers. Für die Bildaquirierung und -kontrolle wurde die Leica AF 6000 Software verwendet.

2.7.1.1 FRET-Messungen

Die einzelnen Zellen, die einer FRET-Messung ausgesetzt werden sollten, wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: Die CFP Emission musste im Mittel über 4000 A.U. liegen, wobei die Zelle mehr YFP als CFP exprimieren sollte, um zu ermöglichen, dass

jedes CFP-Molekül auch einen FRET-Partner finden könnte und das gemessene FRET-Signal nicht durch einen Mangel an Akzeptor-Molekül begrenzt würde. Für FRET-Messungen wurde mit Hilfe eines Strahlenteilers die CFP und die YFP Emission nach Anregung bei 405 nm simultan gemessen. Dazu wurde die CFP Emission bei 470 nm und einer Bandbreite von 24 nm, bzw. die YFP Emission bei 535 nm und einer Bandbreite von 30 nm von einer gekühlten CCD Kamera (Roper Scientific, Tucson, USA) aufgenommen. Während der Messung wurden die Zellen kontinuierlich mit FRET-Puffer superfundiert.

2.7.1.1.1 Dynamische FRET-Messungen

Mithilfe dynamischer FRET-Messungen sollten Agonist-abhängige Veränderung im FRET-Signal analysiert werden. Die Agonistlösungen wurden frisch hergestellt und unter Verwendung eines Superfusionssystems appliziert (ALA Scientific, Rhode Island, USA). Um Verfälschungen des FRET-Signals durch Bleichen der Fluorophore möglichst gering zu halten, wurde die Expositionszeit auf 20 ms begrenzt, der *Gain* maximal eingestellt und die Laserintensität auf 20 % begrenzt, soweit nicht anders angegeben. Die Frequenz der Bildaquirierung lag zwischen 0,1 und 5 Hz.

2.7.1.1.2 FRET-Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen

Um FRET in Abwesenheit von Agonist zu bestimmen, wurden *donor dequenching* Experimente nach *acceptor photobleaching* (APB) durchgeführt. Dazu wurden die mittlere CFP-Emission in jeweils 10 Bildern, aufgenommen im Abstand von 5 s vor und nach dem APB-Protokoll, bei 405 nm bestimmt und die absolute prozentuale Änderung der CFP-Emission ermittelt. Während des APB-Protokolls selbst wurde das YFP-Fluorophor durch Exposition gegenüber der 488 nm Laserlinie bei 30 % Laserintensität, einer Expositionszeit von 4950 ms und einer Frequenz von 0,2 Hz innerhalb von 3 Minuten gebleicht. Als Kontrolle des YFP-Bleicherfolges wurde in je 5 Bildern vor und nach dem APB die mittlere YFP-Emission nach Anregung bei 488 nm bestimmt. In

Zellen, die entweder nur $G\alpha_q$ -CFP oder nur YFP-PLC β 3 exprimierten, zeigte sich ein Verlust der Emission von CFP und YFP nach dem APB-Protokoll von unter 3 %, respektive über 90 %.

2.7.1.2 Datenprozessierung

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe der *ImageJ* Software (www.nih.gov). Dazu mussten zunächst die Bilder der CFP und YFP Emission der Zelle, die durch die Aquirierung mittels eines QuadView-Systems (Roper Scientific, Tucson, USA) in einem Bild gespeichert wurden, getrennt und schließlich exakt dem ermittelten Pixelshift entsprechend übereinandergelegt werden. Dies gelang unter Verwendung eines eigens hierfür programmierten Macros (siehe Anhang).

2.7.1.2.1 Analyse des FRET-Ratios

Danach wurde eine *region of interest* (ROI) definiert, in der die integrierte Intensität der YFP und CFP Emission der gesamten Zelle gemessen wurde, sowie die integrierte Intensität des Hintergrunds in einem Feld außerhalb der Zelle. Für die spätere Hintergrundkorrektur wurde auch die Fläche des ROI für die Messung der Intensität der Zelle und der Hintergrund-Intensität (A_{Zelle} , $A_{\text{Hintergrund}}$) aufgezeichnet.

Die weitere Datenprozessierung erfolgte mit der *Origin 8.0* Software (OriginLab, Northampton, USA). Die CFP Emission wurde um die Hintergrund-Intensität korrigiert:

$$F_{\text{CFP}} = F_{\text{CFP, gemessen}} - (A_{\text{Zelle}} / A_{\text{Hintergrund}}) \times F_{\text{CFP, Hintergrund}}$$

Die Werte der YFP Emission wurden sowohl für den Hintergrund, als auch für das sogenannte „Durchbluten“ der CFP Emission in den YFP-Kanal korrigiert. Das Durchbluten ist bedingt durch die Überlagerung der CFP-Emission mit dem Spektrum, in dem die YFP-Emission detektiert wird. Es wurde in diesem System in $n = 35$ Zellen bestimmt, die lediglich $G\alpha_q$ -CFP exprimierten. Die Analyse dieser Zellen ergab eine gemessene Intensität im YFP-Kanal nach Anregung bei 405 nm, die 89 % der gemessenen Intensität im CFP-Kanal entsprach. Ein weiteres mögliches Fehlerpotential

besteht in der Direktanregung von YFP bei 405 nm, was bei FRET-Messungen bei 405 nm in einem fälschlich hohen YFP-Emissionswert resultiert. Die gemessene Falschanregung von YFP bei 405 nm bei n = 20 Zellen, die lediglich YFP-PLC β 3 exprimierten, lag bei 5,7 % gegenüber der direkt bei 488 nm gemessenen YFP-Emission. Da es während der FRET-Messung allerdings methodisch bedingt nicht möglich war, Veränderungen im YFP-Pool an der Zellmembran in Echtzeit beobachtet werden konnten, wurde auf eine Korrektur dieses kleineren Fehlers verzichtet. Somit lautet die Korrekturformel für die YFP-Emission:

$$F_{\text{YFP}} = F_{\text{YFP,gemessen}} - 0,89 \times F_{\text{CFP}} - (A_{\text{Zelle}} / A_{\text{Hintergrund}}) \times F_{\text{YFP, Hintergrund}}$$

Nach diesen Korrekturen wurde das FRET-Ratio berechnet, definiert als der Quotient aus F_{YFP} und F_{CFP} , und als Auslese-Wert der dynamischen FRET-Messung verwendet.

$$\text{FRET}_{\text{Ratio}} = F_{\text{YFP}} / F_{\text{CFP}}$$

Das errechnete FRET Ratio im Grundzustand ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, darunter dem Expressionsverhältnis der Donor- und Akzeptormoleküle, und ist deshalb nicht geeignet, als Zeichen einer basalen Aktivitätsunabhängigen Interaktion der Moleküle gewertet zu werden. Diese Störanfälligkeit des errechneten basalen FRET Ratios ist auch der Grund, weshalb Änderungen im Ratio nicht relativ dazu wiedergegeben werden, sondern zur Auswertung die absolute Änderung im Ratio genutzt wird.

2.7.1.2.2 Generierung ratiometrischer TIRF-Bilder

Um Änderungen im FRET-Ratio auch bildlich darstellen zu können, wurden aus den während der Messung aufgenommenen TIRF-Bildern ratiometrische Bilder mit Hilfe der *ImageJ* Software generiert. Das Vorgehen hierbei orientierte sich an zuvor publizierten Protokollen (Dowal et al, 2006; Xia & Liu, 2001). Zunächst wurde wiederum der Hintergrund sowohl im CFP als auch im YFP Bild korrigiert. Danach wurden Masken dieser Bilder mit Hilfe der Funktion *binary thresholding* erstellt. Nach Division der Bilder durch 255 entstanden dadurch Bilder, in denen alle Pixel innerhalb der Zelle den Wert 1 zugewiesen bekamen, während die Pixel außerhalb der Zelle dem

Wert 0 glichen. Wurden diese binären Bilder mit den ursprünglichen Bildern multipliziert, erhielt man Bilder, in denen die Pixel innerhalb der Zelle unverändert waren, während der Hintergrund auf Null gesetzt wurden. Diese Bilder wurden genutzt, um das Durchbluten des CFP-Bildes in das YFP-Bild zu korrigieren. Abschließend wurde dieses bereinigte YFP-Bild durch das CFP-Bild geteilt und die Bilder in Fehlfarben dargestellt (*look up table*: 16 Farben) (Skript siehe Anhang).

2.7.2 FRET-Messungen am Epifluoreszenz-Mikroskop

Einige FRET-Messungen wurden nicht am TIRF-Mikroskop durchgeführt, sondern an einem inversen Zeiss-Epifluoreszenz Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit einer Quecksilber-Dampflampe.

Hier erfolgte die CFP-Anregung bei 436 nm, die YFP-Anregung bei 500 nm. Im Gegensatz zum TIRF-Mikroskop werden hier keine Bilder aquiriert, sondern die Intensität direkt durch Leuchtdioden gemessen und von der *Clampex* Software aufgezeichnet. Für die Berechnung des FRET-Ratios wird somit keine Hintergrundkorrektur durchgeführt. Jedoch ist es hier möglich, die YFP-Direktanregung bei 436 nm zu korrigieren. Die Korrekturformel für die YFP-Emission lautet hier (nach M. Milde, Uni Würzburg):

$$F_{\text{YFP}} = F_{\text{YFP, gemessen}} - 0,035 \times F_{\text{YFP, Direktanregung}} - 0,4 \times F_{\text{CFP}}$$

Die Auswertung erfolgt in Origin ähnlich wie oben für die TIRF-Mikroskopie beschrieben.

2.7.3 Konfokale Mikroskopie

Um die Lokalisation der fluoreszierenden Proteine zu studieren, wurden Zellen mittels eines Leica TCS SP5 Laser Scanning Konfokalmikroskops (Leica, Wetzlar, Deutschland) bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Anregung von CFP wurde die 405 nm Laserlinie eines UV-Lasers verwendet und die Emission im Bereich von 461-488 nm detektiert. YFP wurde bei 514 nm angeregt (Linie eines Argon-Ionen Lasers) und die Emission

zwischen 518-600 nm gemessen. Die Aufnahmen wurden mit dem 63x 1.4 Öl-Immersionsoobjektiv und einem *Pinhole* von 95,55 μm durchgeführt.

2.8 Statistische Methoden

Zusammengefasste Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's t-Test in *Origin 8.0*. Das Ergebnis des Tests wurde bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant betrachtet. Signifikante Ergebnisse werden in den Abbildungen dieser Arbeit mit * gekennzeichnet, Ergebnisse mit $p < 0,01$ mit **.

3. Ergebnisse

3.1. Die Interaktionspartner $G\alpha_q$ -CFP und YFP-PLC β 3 kommen sowohl an der Membran als auch zytoplasmatisch zur Expression

Um die Interaktion von $G\alpha_q$ und der PLC β 3 zu analysieren, wurde ein FRET basierter Ansatz gewählt. Als FRET-Donor diente ein Cyan fluoreszierendes Protein (CFP), das in die α_q Untereinheit inseriert wurde und in vergleichbarer Form bereits für ähnliche Untersuchungen genutzt wurde (Jensen et al, 2009). Akzeptor war ein Gelb fluoreszierendes Protein (YFP), das an den N-Terminus der PLC β 3 gekoppelt wurde. Ein YFP-Konstrukt der PLC β 1, in denen das Fluorophor an entsprechender Stelle inseriert wurde, zeigte eine basale Aktivität und Aktivierung durch $G\alpha_q$ wie die Wildtyp PLC β 1 (Dowal et al, 2006).

Für Untersuchungen des Signalweges ist die native subzelluläre Lokalisation der Interaktionspartner Voraussetzung. Zur Bestimmung der Lokalisation der fusionierten Proteine in lebenden Zellen, wurden HEK TSA Zellen transient mit $G\alpha_q$ -CFP- und YFP-PLC β 3-Konstrukten transfiziert und unter dem Konfokalmikroskop betrachtet (Abb. 6B). Dabei zeigte sich, dass beide Proteine gut an der Membran zur Expression kamen. Es zeigte sich jedoch auch, dass von beiden fluoreszierenden Proteinen beträchtliche intrazelluläre Pools bestanden. Gemessen an 5 Zellen zeigte sich zwar eine deutliche Konzentrierung der Fluorophore an der Membran: Die mittlere Intensität der Fluorophore betrug gut das Doppelte bzw. das Dreifache der zytosolischen Intensität für $G\alpha_q$ -CFP, respektive YFP-PLC β 3 (Abb. 6C, D). Der Anteil der zytosolischen Proteine an der über die gesamte Zelle integrierten Intensität betrug aber jeweils über 60% (Abb. 6E).

Deswegen wurde entschlossen, die Untersuchung der Interaktion von G_q -Proteinen und der Phospholipase $C\beta$ 3 mit dem TIRF Mikroskop durchzuführen. Dieses erlaubt im Wesentlichen nur fluoreszierende Proteine an der basolaterale Membran anzuregen (Axelrod et al, 1984) (Abb. 6A). So sollte es möglich sein, stabilere FRET-Messungen mit einer größeren Amplitude als in der Epifluoreszenz-Mikroskopie durchzuführen. Ein weiterer Vorteil der TIRF-Mikroskopie bestand in der Möglichkeit, das Verhalten der

PLC β nach Aktivierung zu beobachten und eine eventuell stattfindende Translokation zu detektieren.

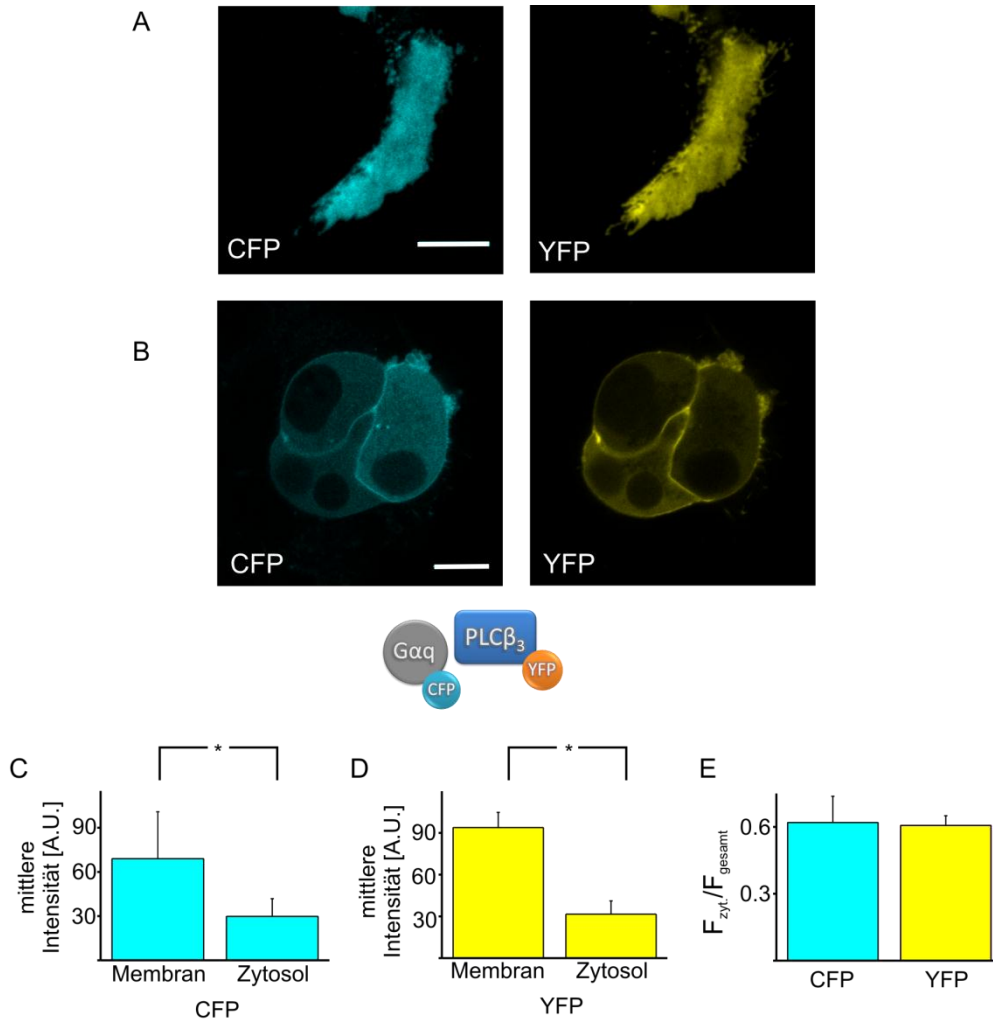


Abbildung 6 Vergleich der Lokalisation der fluoreszierenden Proteine in konfokaler und TIRF Mikroskopie (A, B). HEK TSA Zellen wurden mit P2Y₁-Rezeptor-, G α_q -CFP- und YFP-PLC β 3-Konstrukten transient transfiziert. Dargestellt ist die CFP- und YFP-Emission auf direkter CFP-Anregung bei 405 nm, respektive YFP-Anregung bei 488 nm aufgenommen. (A) In der Konfokalmikroskopie fiel die deutliche Membranlokalisation der fluoreszierenden Proteine auf. Daneben finden sich aber auf beträchtliche zytosolische Protein Pools. (B) Im TIRF-Modus zeigte sich ein homogenes Verteilungsmuster des FRET-Paares über die basolaterale Membran. Die Balken entsprechen 10 μ m. **Subzelluläre Pools der fluoreszierenden Interaktionspartner (C-E).** Messung der mittleren Intensität von G α_q -CFP (A) und YFP-PLC β 3 (B) an der Membran und im Zytosol in der Konfokalmikroskopie in n = 5 Zellen. (C) Anteil der zytosolischen Fluorophoren an der integrierten Gesamtintensität für G α_q -CFP und YFP-PLC β 3.

3.2 $G\alpha_q$ und die PLC β 3 interagieren Agonist-abhängig in lebenden Zellen

Um nun die Interaktion von $G\alpha_q$ und PLC β 3 in der TIRF-Mikroskopie zu analysieren, wurden HEK TSA Zellen mit purinergem P2Y $_1$ -Rezeptoren, $G\alpha_q$ -CFP und YFP-PLC β 3 kotransfiziert. Nach kurzer Anregung bei 405 nm wurde zeitgleich das Bild der CFP-Emission als auch der YFP-Emission aufgenommen (Abb. 7A). Nach Korrektur des gemessenen Signals durch Abzug der Hintergrund-Intensität und des Durchblutens der CFP-Emission in den YFP-Kanal, wurde das F_{YFP}/F_{CFP} -Emissionsratio zur Analyse der Interaktion von $G\alpha_q$ und der PLC β 3 verwendet (Abb. 7B). Um schnelle Aktivierungskinetiken aufzulösen, wurden zur Stimulation der P2Y $_1$ -Rezeptoren sättigende Agonistkonzentrationen von 100 μ M ATP verwendet (Waldo & Harden, 2004). Applikation des Agonisten mittels eines Superfusion-Systems resultierte bei der Messung einzelner intakter Zellen in entgegengesetzten Änderungen der YFP und CFP Emission. Der daraus folgende Anstieg des FRET-Ratios war voll reversibel nach Entzug des Agonisten.

Abbildung 7C stellt den Verlauf des F_{YFP}/F_{CFP} -Quotienten in ratiometrischen Bildern dar. Diese wurden aus TIRF Bildern generiert, die während der Messung aufgenommen worden sind. Für die dazu notwendige Bildbearbeitung mussten Bilder akquiriert werden, die einen starken Kontrast von Zelle zu Hintergrund aufwiesen. Hierfür wurde die Belichtungszeit bei diesem Experiment von den sonst üblichen 20 ms auf 160 ms heraufgesetzt. Um ein übermäßiges Bleichen der Fluorophore zu vermeiden, wurde zum Ausgleich die Bildfrequenz auf 0,2 Hz gesenkt. Im Ergebnis zeigte sich, dass der Anstieg des FRET-Ratios auch in diesen Bildern deutlich erkennbar und ebenfalls reversibel war. Außerdem schienen die Veränderungen im YFP/CFP-Emissionsratio homogen an der gesamten Membran stattzufinden. Es fand sich hier also kein Hinweis auf eine mögliche Bildung eines Signalkomplexes der Interaktionspartner an der Membran.

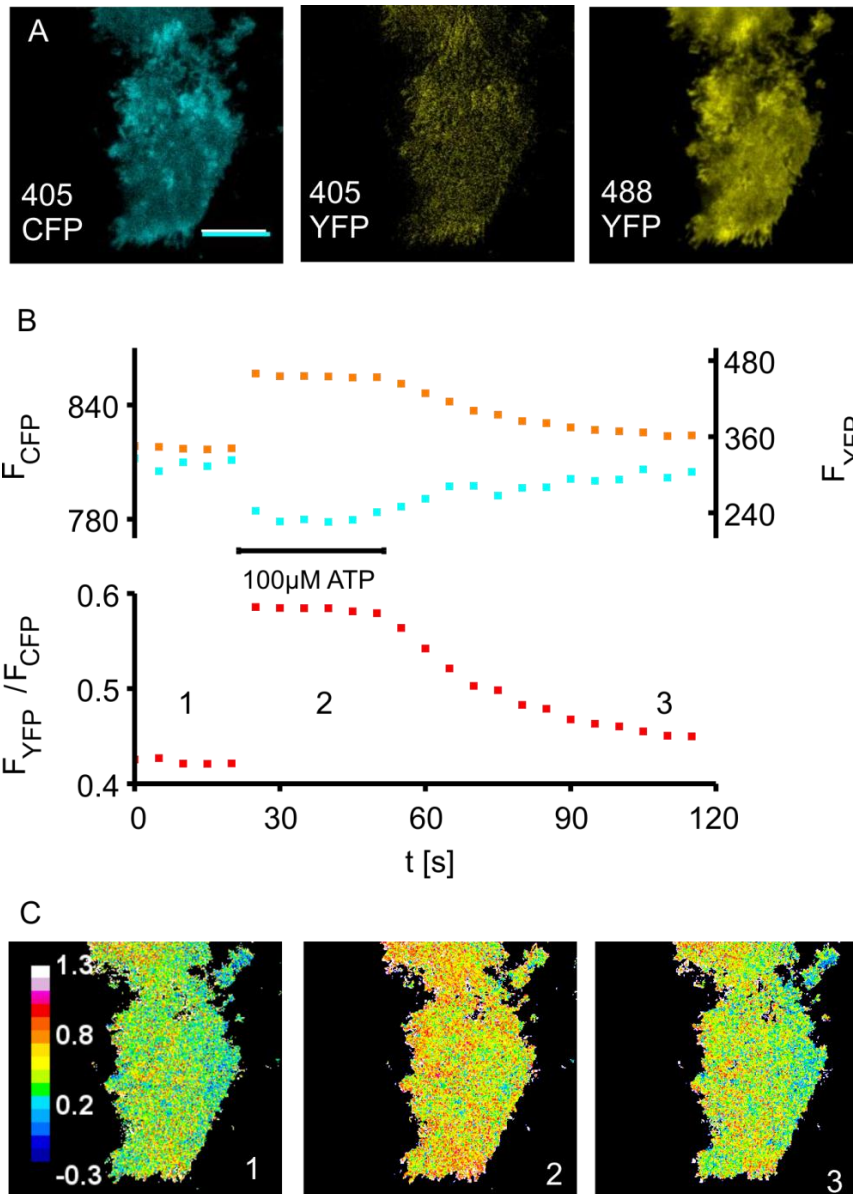


Abbildung 7 Interaktion von $G\alpha_q$ -CFP und YFP-PLC β 3 gemessen mittels FRET. (A) Die TIRF Bilder einer HEK TSA Zelle, die P2Y₁-Rezeptor, $G\alpha_q$ -CFP und YFP-PLC β 3 koexprimierte, wurden in Abwesenheit von Agonist aufgenommen. Nach Anregung bei 405 nm wurde simultan sowohl die CFP (links) als auch die YFP-Emission (Mitte) aufgenommen. Das rechte Bild zeigt die YFP-Emission nach direkter Anregung bei 488 nm. (B) Die Analyse der TIRF Bilder über die Zeit zeigte die ATP-induzierten Änderungen im FRET-Ratio. Die Anregung fand bei 405 nm mit einer Expositionszeit von 160 ms statt. (C) Diese Bilder zeigen das Ratio der YFP- und CFP-Emission zu den in (B) markierten Zeitpunkten.

Die Zusammenfassung von 24 Messungen und die Betrachtung der absoluten Änderung des FRET-Ratios zeigte als Antwort auf die Exposition gegenüber 100 μ M ATP für 30 s einen robusten und verlässlichen Anstieg von 14 % über der Grundlinie (Abb. 8A). Während Zugabe des Agonisten hielt sich dieser Wert stabil als Plateau. Der aufsteigende Schenkel erfolgt dabei rasch nach Zugabe des Agonisten, während die Relaxation nach Auswaschen des Agonisten wesentlich länger dauerte. Dieses Verhalten spiegelt Kinetiken wider, die typisch für G-Protein Aktivität sind (Bünemann et al, 2003; Frank et al, 2005)

Eine Interaktion von inaktiven G-Proteinen mit ihren Effektoren wird im Allgemeinen als Vorkopplung (*precoupling*) bezeichnet und wurde bereits für GIRK Kanäle (Riven et al, 2006) und für die Interaktion von G_q und der PLC β 1 (Dowal et al, 2006) postuliert.

Um eine Vorkopplung von $G\alpha_q$ und PLC β 3 zu detektieren, wurde hier das konstitutive FRET-Signal zwischen $G\alpha_q$ -CFP und YFP-PLC β 3 in Abwesenheit von Agonist untersucht. Durch Bleichen des FRET-Akzeptors YFP (engl. *acceptor photobleaching*, APB) sollte der strahlungsfreie Energietransfer vom FRET-Donor CFP beendet werden. Wenn FRET stattfand, sollte dies zu einem Anstieg der CFP Emission führen (engl. *donor dequenching*). Zur Kontrolle muss ein unspezifisches FRET-Signal ausgeschlossen werden. Solch ein Energietransfer kann zwischen Fluorophoren die keine spezifische Interaktion vollführen rein durch zufällige räumliche Nähe stattfinden, v.a. in Systemen, die mit Überexpression der fraglichen Interaktionspartner arbeitet. Außerdem unterliegt jedes optisches System Beschränkungen, die eine Negativkontrolle erzwingen, um ein falsch positives basales FRET-Signal zu entlarven. Dazu wurden Zellen mit $G\alpha_q$ -CFP und einem Membran-verankerten YFP (m-YFP) transfiziert. Für das FRET-Paar $G\alpha_q$ -CFP und YFP-PLC β 3 zeigte sich kein Anstieg der CFP Emission, der den Anstieg unter Kontrollbedingungen signifikant übertreffen konnte (Abb. 8B).

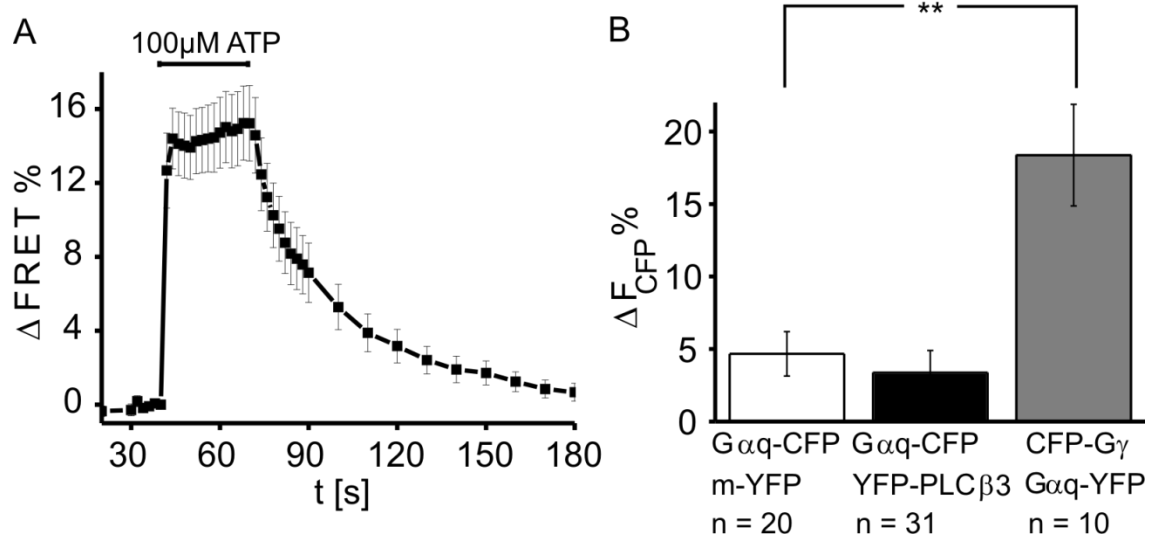


Abbildung 8 Agonist abhängige und unabhängige Interaktion von $G\alpha_q$ und der PLC β_3 . (A) Gemittelte Werte für die Änderungen im YFP/CFP-Emissionsratio nach Exposition von Zellen, die P2Y $_1$ -Rezeptoren, $G\alpha_q$ -CFP und YFP-PLC β_3 koexprimierten gegenüber 100 μ M ATP für eine Dauer von 30 s. (n = 24, Anregung bei 0,1 - 0,5 Hz). (B) In Abwesenheit von Agonist wurde FRET durch Donor-Dequenching nach Photobleichen des Akzeptors (APB) bestimmt. Die Zellen exprimierten $G\alpha_q$ -CFP entweder zusammen mit einem Membran-verankerten YFP (m-YFP; Kontrollbedingung) oder der YFP-fusionierten PLC β_3 (Versuchsbedingung). Außerdem wurde als Positivkontrolle FRET in Abwesenheit von Agonist für Zellen bestimmt, die $G\alpha_q$ -YFP, CFP-G γ_2 und G β_1 koexprimierten.

Als Positivkontrolle, um die Sensitivität des Messprotokolls zu testen, wurde ebenfalls das *donor dequenching* nach APB für heterotrimere YFP/CFP markierte G $_q$ -Proteine in Zellen bestimmt, die mit P2Y $_1$ -Rezeptoren, CFP-G γ_2 , G β_1 und $G\alpha_q$ -YFP transfiziert worden waren. Unter diesen Bedingungen konnte ein solider Anstieg der CFP Emission von 18 % beobachtet werden. Nach diesen Daten war eine Interaktion von G $_q$ -Proteinen und der Phospholipase C β_3 in Abwesenheit von Agonist entweder nicht vorhanden oder aber der dabei bestehende *Förster Resonanz Energie Transfer* war zu gering, um ihn mit diesem Messprotokoll zu detektieren.

3.3 Die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der PLC β 3 führt zu geringen Änderungen der Membranlokalisation

Die Assoziation von PLC β Enzymen mit der Membran wurde in Zusammenhang mit dem Substratgehalt der Membran (Adjobo-Hermans et al, 2008) und der Interaktion mit G-Protein Untereinheiten (Gutman et al, 2009) gebracht. Daher war es ein Ziel dieser Untersuchung eine stattfindende Translokation der PLC β 3 nach Aktivierung sichtbar zu machen.

Weiterhin galt es zu beachten, dass eine Translokation des YFP-fusionierten Effektors, die Menge des Akzeptor-Fluorophors an der Membran entscheiden verändern könnte. Ein solches Ereignis würde die FRET-Messung erheblich stören. So könnte eine plötzlich erheblich größere Menge an YFP-PLC β 3 die gemessene YFP-Emission durch zwei unterschiedliche Mechanismen beeinflussen: Einerseits durch die direkte Anregung durch die 405 nm Laserline, die bei etwa 5 % verglichen zur Emission nach Anregung bei 488 nm liegt; und andererseits auch durch ein vermehrtes unspezifisches FRET, das zwischen überexprimierten FRET-Partnern an der Membran auftreten kann.

Um eine mögliche Translokation zu beobachten und um auszuschließen, dass das gemessene FRET-Signal lediglich eine Verschiebung im Pool des YFP-fusionierten Proteins reflektiert, wurde die Translokation nach Stimulation mit 100 μ M ATP bei direkter YFP-Anregung mit 488 nm gemessen (Abb. 9). Hierbei zeigten sich nur kleine Veränderungen, wobei die relative Änderung im Mittel unter 5 % lagen. Darüber hinaus stellte sich eine Kinetik dar, die grundverschieden zu der beobachteten Kinetik der Interaktion von G α_q und PLC β 3 war: es zeigte sich ein langsamer Anstieg und ein ebenso langsamer Abfall der Änderung. Somit war davon auszugehen, dass diese Änderungen in keinem direkten Zusammenhang mit der G α_q /PLC β 3-Interaktion standen. Außerdem fand sich keine robuste Translokation der PLC β 3, die die FRET-Messung wesentlich beeinflusst haben könnte.

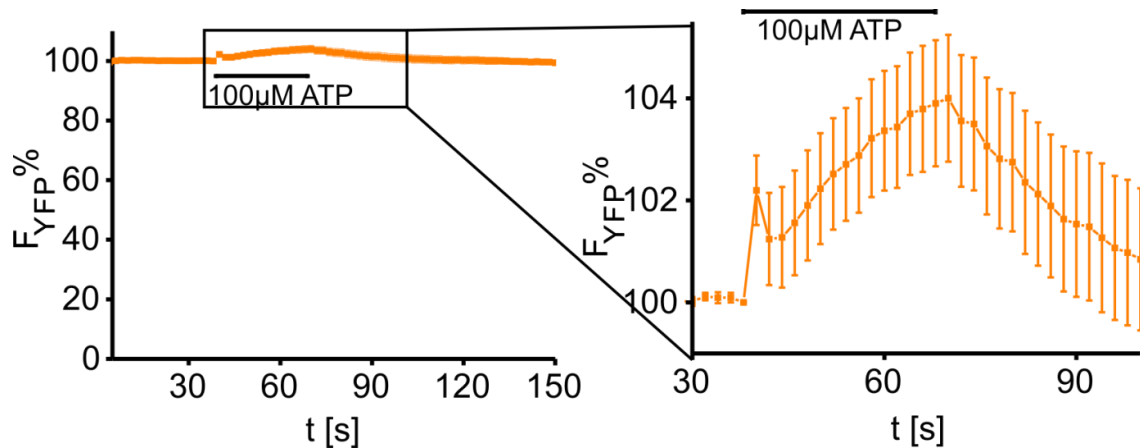


Abbildung 9 Änderung in der Membranlokalisation der PLCβ3 nach Agoniststimulation. Die relative Veränderung der Menge von YFP-PLCβ3 an der Membran nach Exposition gegenüber 100 µM ATP für 30 s wurde bei direkter YFP-Anregung mit der 488 nm Laserlinie gemessen. Links ist die relative Menge YFP-PLCβ3 gegenüber der Zeit dargestellt. Der rechte Ausschnitt zeigt die beobachteten Veränderungen nach Stimulation (n = 25, Anregung bei 0,5 Hz). Die Penetrationstiefe der evaneszenten Wellen betrug 110 nm.

3.4 Die PLCβ3 beschleunigt die Deaktivierung von G_q Proteinen in lebenden Zellen in vergleichbarem Ausmaß wie RGS Proteine

Für die Phospholipase Cβ3 wurde *in vitro* demonstriert, dass sie die GTPase Aktivität von G_q Proteinen beschleunigt. Sie teilt diese Eigenschaft mit den RGS Proteine (*regulator of G-protein signaling*), wenn auch nicht so stark ausgeprägt (Chidiac & Ross, 1999). *In vivo* konnte die GAP Aktivität der PLCβ bisher nur indirekt beobachtet werden, etwa durch Messung der elektrischen Antwort der Netzhaut von *Drosophila* auf Lichtreize (Cook et al, 2000). In der vorliegenden Arbeit sollte deswegen mittels FRET-Messungen direkt der Einfluss der Phospholipase Cβ auf die G_q Aktivität in intakten Zellen analysiert werden.

Zur direkten Beobachtung der G_q Aktivität in einzelnen, intakten Zellen wurden FRET-Messungen zwischen Gα_q-YFP und der Gy₂-Untereinheit, die N-terminal mit einem Cyan fluoreszierenden Protein fusioniert worden ist, durchgeführt. Ein ähnlicher Ansatz wurde kürzlich bereits zu FRET Messungen der G_q Aktivität genutzt (Adjobo-

Hermans et al, 2011; Jensen et al, 2009). Aktivierung der fluoreszierenden G-Proteine durch Stimulation der koexprimierten P2Y₁-Rezeptoren mit 100 μM ATP führte zu einem Anstieg der CFP Emission und einem Abfall der YFP Emission, was insgesamt zu einem rasantem Abfall im FRET-Ratio führte (Abb. 10). Wiederum zeigten sich deutliche Unterschieden in der Geschwindigkeit der der FRET-Änderungen nach Agonistgabe und nach Entzug des Agonisten. Um diesen Unterschieden gerecht zu werden, wurde die Phase direkt nach Agonistgabe mit einer Bildfrequenz von 5 Hz, die langsamere Phase nach Entzug des Agonisten jedoch mit einer Bildfrequenz von 0,25 Hz aufgenommen. Die entgegengesetzte Entwicklung der YFP- und CFP-Emission repräsentiert am ehesten die Dissoziation von Gα_q und Gβγ Untereinheiten, bzw. deren Neuordnung nach Stimulation. Diese Änderungen werden im Folgenden vereinfacht als Aktivierung der G_q Proteine betrachtet. Die Reassoziierung der G_q Proteine nach Auswaschen des Agonisten scheint sich in der Reversibilität der Änderungen im FRET Ratio widerzuspiegeln. Auf sie werden analog im Folgenden als Deaktivierung der G_q Proteine Bezug genommen.

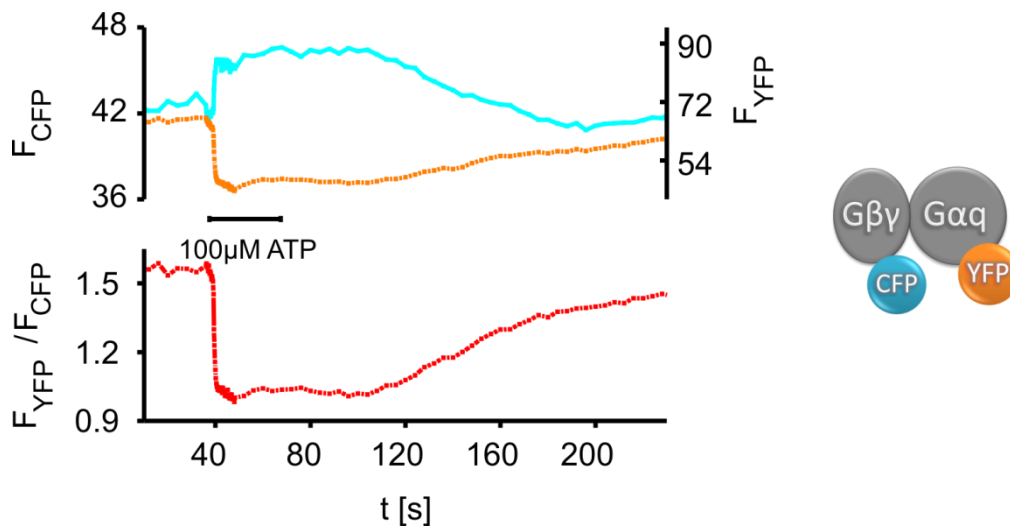


Abbildung 10 Agonist-abhängiges FRET-Signal für G_q-Proteine. (A) Dargestellt ist eine repräsentative FRET-Messung der Antwort auf 30 s Exposition gegenüber 100 μM ATP einer einzelnen Zelle, die P2Y₁-Rezeptoren, Gα_q-YFP, CFP-Gγ₂ und Gβ₁ koexprimierte. Bildakquirierungsrate 0,25 Hz, während der Aktivierungsphase 5 Hz.

Erste Hinweise auf die GAP-Aktivität der PLC β 3 lieferte ein Vergleich der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik der G $_q$ Proteine und der Interaktion von G α_q und der PLC β 3 (Abb. 11). Für die *on*-Kinetik der G $_q$ -Proteine fand sich eine Halbwertszeit bis zur maximalen FRET-Antwort von etwa $t_{1/2} = 0,5$ s. Die Aktivierung der G $_q$ Proteine verläuft somit genauso rasch wie die Aktivierung der G α_q /PLC β 3-Interaktion, die ebenfalls eine Halbwertszeit $t_{1/2} = 0,5$ s aufweist (Abb 12A). Dahingegen fanden sich große Unterschiede in der Dauer der Deaktivierung, vergleichbar mit den Ergebnissen der Hille-Gruppe (Jensen et al, 2009): Für die Interaktion von G α_q und der Phospholipase C β 3 zeigte sich eine signifikant schnellere Deaktivierung als für das fluoreszierende G $_q$ Protein (Abb. 12B). Für erstere kehrte das FRET-Ratio nach Auswaschen des Agonisten mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 17 \pm 1,9$ s zur Grundlinie zurück. Die Deaktivierung des G $_q$ Proteins erfolgte dahingegen mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 62 \pm 6,5$ s, beanspruchte also mehr als das Dreifache der Zeit. Diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse könnten mit der GTPase aktivierenden Eigenschaft der PLC β 3 erklärt werden.

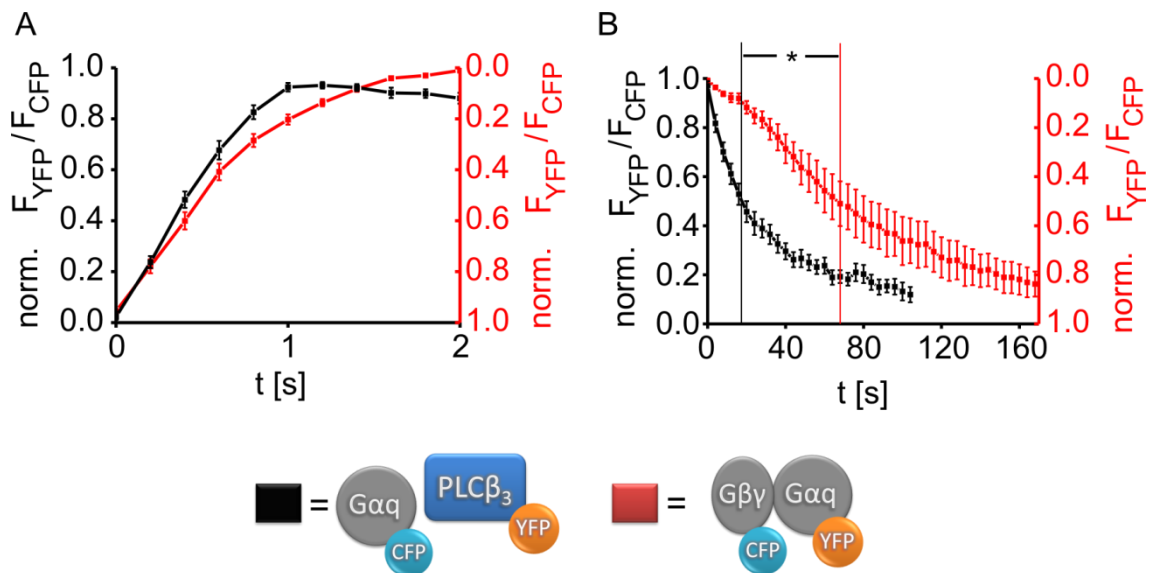


Abbildung 11. Vergleich der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik der Interaktion von G α_q -YFP/CFP-G γ_2 (rot) und G α_q -CFP/YFP-PLC β 3 (schwarz). (A) Das YFP/CFP-Emissionsratio wurde auf den letzten Zeitpunkt vor der ersten signifikanten Änderung im Ratio nach Zugabe von 100 μ M ATP normalisiert und zeigt den zeitlichen Verlauf bis zur maximalen Änderung im FRET-Ratio (n = 19-24, Anregung bei 5 Hz).

(B) Dargestellt ist das normalisierte YFP/CFP-Emissionsratio ab dem Zeitpunkt, an dem der Agonist ausgewaschen wurde ($n_{\text{rot}} = 8$, $n_{\text{schwarz}} = 24$, Anregung bei 0.25 Hz).

Um diese Hypothese weiter zu testen, sollte der Einfluss der Phospholipase auf das G_q Protein direkt beobachtet werden. Dazu wurde die Kinetik der $G\alpha_q/G\beta\gamma$ -Interaktion mit Hilfe von FRET in der Gegenwart und Abwesenheit der Wildtyp PLC β 3 gemessen. Um die GAP Eigenschaft der PLC β 3 darüber hinaus besser zu charakterisieren und vergleichbar zu machen, wurde der Effekt der Phospholipase mit der Auswirkung von RGS2 auf die G_q Aktivität verglichen (Abb. 12A). RGS2 zeichnet sich durch eine hohe Spezifität für G_q Proteine aus und ist das potenteste GAP-Protein, das bisher für G_q -Proteine beschrieben worden ist. Bei Transfektion der Zellen wurden die Unterschiede in der DNA-Menge pro Transfektionsansatz durch Zugabe des leeren pCDNA3-Vektors ausgeglichen. Ein Vergleich der Aktivierungskinetik der G_q Proteine in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen zeigte keinen signifikanten Effekt der Koexpression von PLC β 3 oder RGS2 (Abb. 12B). Die gemessenen Halbwertszeiten lagen wiederum alle im Bereich von etwa einer halben Sekunde.

Erneut wurden jedoch starke Effekte auf die Deaktivierung beobachtet (Abb. 12C). Sowohl die Koexpression der Phospholipase C β 3, als auch von RGS2 beschleunigten die Deaktivierung signifikant. In Gegenwart der Phospholipase betrug der Halbwertszeit der Deaktivierung $t_{1/2} = 27 \pm 2,6$ s. Koexpression von RGS2 resultierte in einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 18 \pm 2,6$ s. RGS2 führte somit noch zu einer weiteren, signifikanten Beschleunigung der G_q Deaktivierung im Vergleich zur Wirkung der PLC β 3. Wurden sowohl Wildtyp PLC β 3 als auch RGS2 in HEK TSA Zellen transfiziert, konnte keine weitere Beschleunigung der Deaktivierung von G_q Proteinen beobachtet werden (Abb. 12D).

Ein weiteres gut untersuchtes GAP Protein mit Einfluss auf G_q ist RGS4. Für $n = 17$ Zellen, die RGS4 koexprimierten, wurde eine Halbwertszeit der Deaktivierung von G_q mit $t_{1/2} = 25 \pm 3,7$ s gemessen (Abb. 12D). Die Unterschiede zur G_q Kinetik in Gegenwart von RGS2 bzw. PLC β 3 waren allerdings nicht signifikant, außerdem wurden zur Analyse einige Zellen mit deutlich längerer Deaktivierungszeit außen vorgelassen (s.

Diskussion). Insgesamt muss also aufgrund der nachträglichen Auswahl der Zellen die Aussagekraft dieser Versuch eingeschränkt werden.

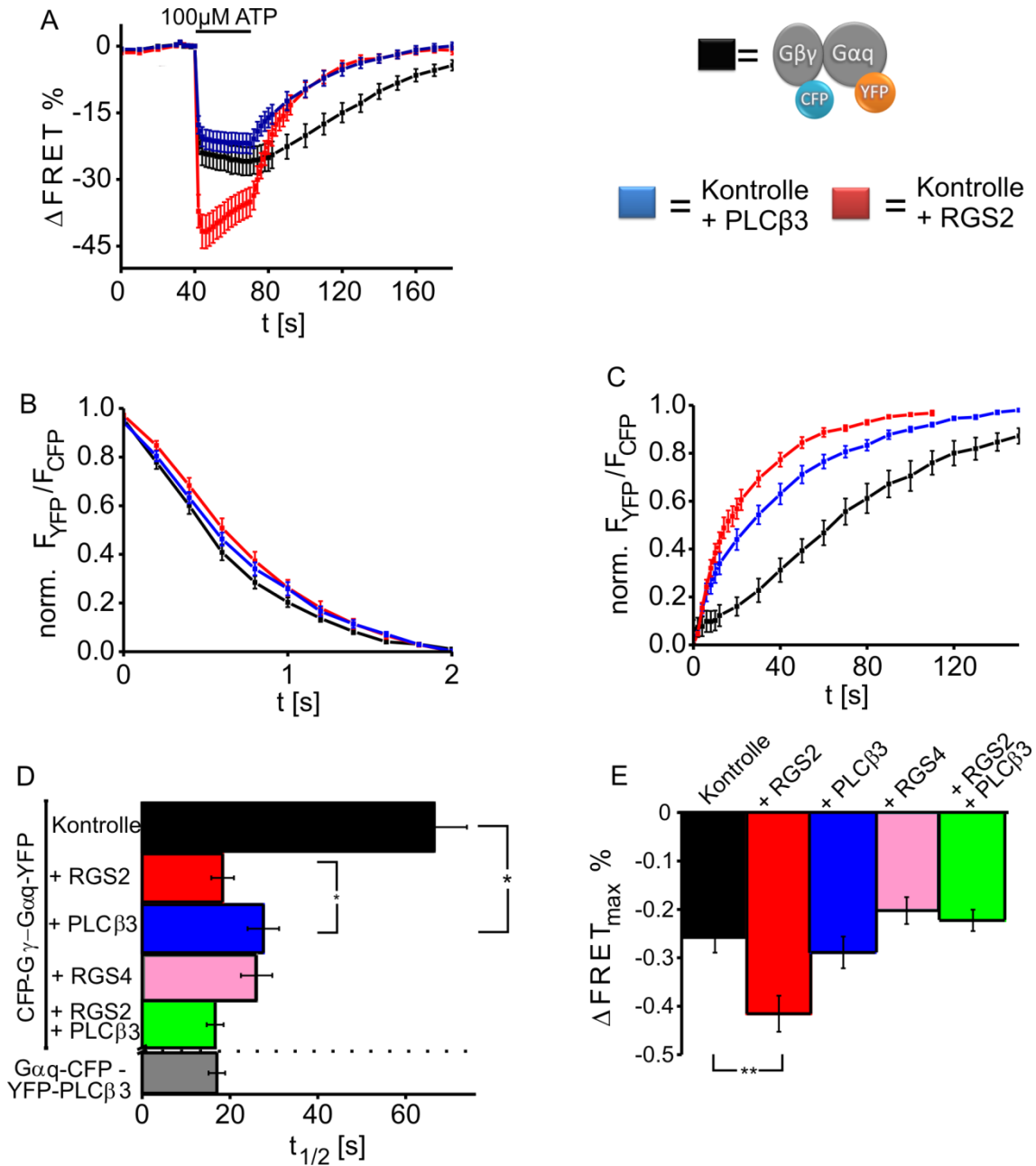


Abbildung 12. Kinetik der Interaktion von G α_q -YFP und CFP-G γ_2 unter dem Einfluss von GTPase aktivierenden Proteinen. (A) Die unterschiedlichen Kurven zeigen die gemittelte absolute Änderung im FRET-Ratio nach Stimulation mit 100 μ M ATP von HEK TSA Zellen, die P2Y $_1$ -Rezeptoren, G α_q -YFP, CFP-G γ_2 und G β_1 exprimierten (schwarz) im Vergleich zu Zellen die darüber hinaus auch Wildtyp PLC β 3 (blau), bzw. Wildtyp RGS2 (rot) koexprimierten (n = 29 – 32, Anregung bei 0.1 – 0.5 Hz). (B) Das YFP/CFP-

Emissionsratio wurde auf den letzten Zeitpunkt vor einer signifikanten Änderung im FRET-Ratio nach Zugabe des Agonisten normalisiert (n = 19 – 24, Anregung bei 5 Hz). (C) Das normalisierte YFP/CFP-Emissionsratio nach Auswaschen des Agonisten (n = 29 – 32, Anregung bei 0,1 – 0,5 Hz). (D) Dargestellt sind die Halbwertszeiten für die Deaktivierung (n = 24 – 32). Die Kontrolle zeigt $t_{1/2}$ für die $G\alpha_q/G\beta\gamma$ -Interaktion im Vergleich zur Halbwertszeit in Anwesenheit von RGS2, RGS4 (rosa; n = 17), PLC β 3 oder die Kombination von RGS2 und PLC β 3 (grün, n = 25). Zusätzlich ist zum Vergleich die Halbwertszeit der Deaktivierung der Interaktion von $G\alpha_q$ und PLC β 3 aufgetragen. (E) Dargestellt ist die maximale Signalamplitude nach Aktivierung von G_q in Gegenwart von RGS2, RGS4 (rosa), PLC β 3 oder der Kombination von RGS2 und PLC β 3 (grün). Für die Ergebnisse in Gegenwart von RGS4 (rosa) wurden einige Zellen nachträglich selektioniert (s. Abb. 23).

Neben Veränderungen der Kinetik fanden sich auch andere interessante Veränderungen der G_q Aktivität durch die Koexpression der verschiedenen interagierenden Proteine. So führte die Anwesenheit von RGS2 zu einer Vergrößerung der Amplitude der FRET-Antwort (Abb. 12A). Unter Kontrollbedingungen lag der absolute Verlust im FRET-Ratio im Mittel bei 25 %, bei Koexpression von RGS2 jedoch bei etwa 40 %. Im Gegensatz dazu führte die Anwesenheit PLC β 3 lediglich zu Änderungen der Kinetik, nicht jedoch der Amplitude der FRET-Antwort. Zu beachten ist dabei, dass keine signifikante Änderung im Ausgangs-FRET-Ratio zu beobachten war. Die bemerkenswerten Unterschiede in der Signalamplitude scheinen also offensichtlich nicht durch unterschiedliche Ausgangsbedingungen in Bezug auf die $G\alpha_q/G\beta\gamma$ -Assoziierung bedingt zu sein. Interessanterweise hob sich der Effekt von RGS2 auf die Höhe der Signalamplitude auf, wenn zusätzlich die PLC β 3 exprimiert wurde. Auch das dem RGS2 verwandte RGS4 erzeugte keine signifikante Änderung in der Signalamplitude (Abb. 12E).

Auffällig an der FRET-Kurve in Gegenwart von RGS2 war auch die Tatsache, dass im Gegensatz zu den Kontrollbedingungen kein stabiles Plateau des YFP/CFP-Emissionsratios nach Zugabe des Agonisten mehr erreicht wurde. In Anwesenheit von RGS2, erfuhr das FRET-Ratio innerhalb weniger Sekunden nach Aktivierung eine maximale absolute Änderung von etwa 40 %, um dann noch unter Agonistengabe wieder stetig anzusteigen. Diese Erholung des FRET-Ratios unter Stimulation, das als

Desensitivierung gedeutet werden kann, führte letztlich zu einem Wert, der nur noch etwa 33 % unterhalb der Ausgangslinie lag.

3.5 Von G_q freigesetzte $G\beta\gamma$ Untereinheiten interagieren mit der $PLC\beta_3$ nach Rezeptor-vermittelter Aktivierung

Bislang wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von FRET Assays gezeigt, dass die $G\alpha_q$ Untereinheit abhängig von der Rezeptoraktivierung mit der Phospholipase $C\beta_3$ interagiert und diese die Deaktivierung der G_q Proteine beschleunigt – ein Ergebnis, das konsistent mit der für die Phospholipase beschriebenen GAP Aktivität ist. Nun sollte auch die Interaktion von $G\beta\gamma$ und der $PLC\beta_3$ getestet werden. Biochemische Versuche zeigen, dass auch $G\beta\gamma$ -Untereinheit zu einer Aktivierung der $PLC\beta$ führen kann (Camps, 1992). Dieser Aktivierungsweg der $PLC\beta$ wurde bisher den Pertussistoxin-sensitiven $G_{i/o}$ Proteinen zugeordnet. In dieser Arbeit galt es daher zu überprüfen, ob auch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten, die von G_q -Proteinen freigesetzt werden, mit der $PLC\beta_3$ interagieren.

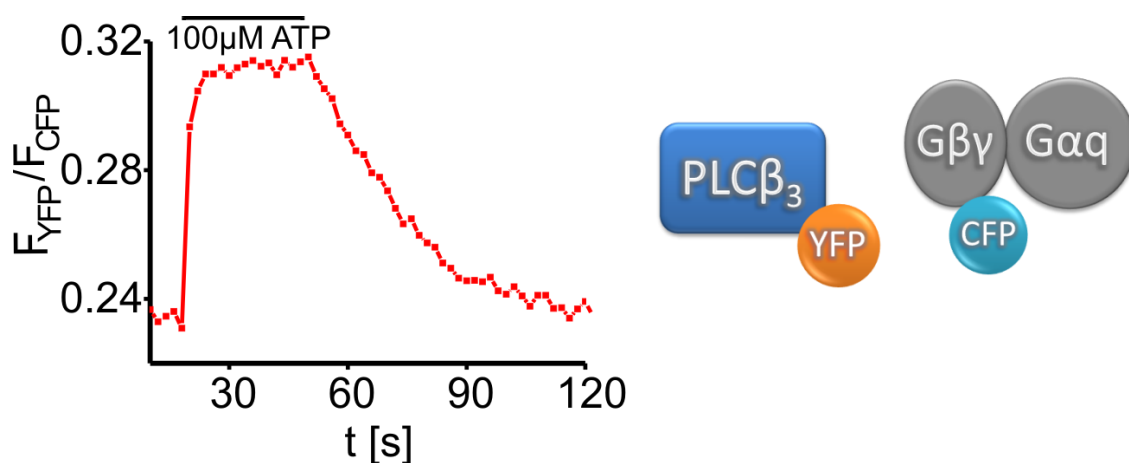


Abbildung 13. Interaktion von G_q -abhängigen $\beta\gamma$ -Untereinheiten mit der $PLC\beta_3$. (A) Repräsentative FRET-Messung einer Zelle, die $P2Y_1$ -Rezeptoren, $CFP-G\gamma_2$, $G\beta_1$, $G\alpha_q$ und $YFP-PLC\beta_3$ koexprimiert, nach Stimulation mit $100\mu\text{M}$ ATP.

Dazu wurden HEK TSA Zellen mit cDNA transfiziert, die für P2Y₁-Rezeptoren, CFP-Gy₂, Gβ₁, Gα_q und YFP-PLCβ₃ kodieren. Wie Abbildung 13 zeigt, führte die Stimulation dieser Zellen mit 100 μM ATP zu einem raschen Anstieg im YFP/CFP-Emissionsratio, der nach Auswaschen des Agonisten reversibel war. Dieses Ergebnis deutet auf eine aktivitätsabhängige Interaktion von Gβγ und der Phospholipase Cβ₃ hin.

Die Messung mehrerer Zellen und die daraus gemittelten Werte zeigten, dass die Kinetik für den Anstieg im FRET-Ratio nach Stimulation (Abb. 14A) und den Abfall nach Entzug des Agonisten (Abb. 14B) in hohem Maße identisch waren mit der Kinetik, die für die Interaktion von Gα_q und PLCβ₃ beobachtet wurden.

Bei der Messung in n = 40 Zellen ergab sich die *off*-Kinetik eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 19 \pm 2,2$ s. Bei der Messung von n = 4 Zellen mit einer Bildfrequenz von 5 Hz zeigte sich eine halbmaximale Aktivierung nach $t_{1/2} = 0,4$ s. Die große Übereinstimmung in der Kinetik der Gα_q/ PLCβ₃- und der Gβγ/ PLCβ₃-Interaktion ist ein starker Hinweis dafür, dass die hier interagierenden Gβγ-Untereinheiten tatsächlich von aktivierten G_q-Proteinen stammen.

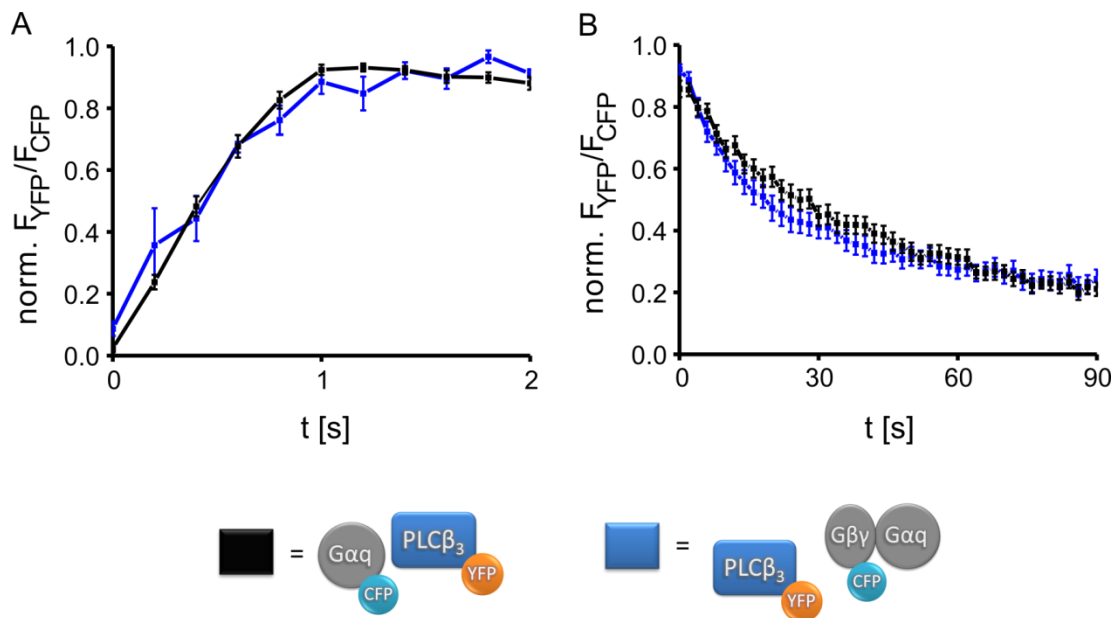


Abbildung 14 Kinetik der Interaktion G_q abhängiger Gβγ Untereinheiten und der PLCβ₃. Vergleich der Änderung im YFP/CFP Emissionsratio nach Aktivierung mit 100 μM ATP (A) und nach Auswaschen des Agonisten (B) für die Interaktion von YFP-PLCβ₃ und Gα_q-CFP (schwarz), bzw. CFP-Gy₂ (blau). Für (A)

wurde das Ratio auf den letzten Zeitpunkt vor signifikanter Änderung nach Stimulation normalisiert. Interaktion von $G\beta\gamma$ und $PLC\beta_3$ gemessen in $n = 4$ Zellen mit einer Bildfrequenz von 5 Hz (A), bzw. $n = 40$ Zellen mit 0,5 Hz (B).

Ebenfalls denkbar war aber auch, dass die Stimulation mit ATP zu einer Aktivierung von endogenen $G_{i/o}$ -Proteinen über endogene $G_{i/o}$ gekoppelte Rezeptoren führt. Unter diesen Umständen könnten die fluoreszierenden $G\beta\gamma$ Untereinheit auch von $G_{i/o}$ freigesetzt werden. Zum Ausschluss dieser Möglichkeit wurde Zellen mit $P2Y_1$ - und α_{2A} -Rezeptor, sowie $G\alpha_o$ -YFP und CFP- $G\beta_1\gamma_2$ koexprimiert. Für diese Zellen wurde gezeigt, dass die Zugabe von 100 μM ATP nicht zu einer Aktivierung von G_o führte. Als Positivkontrolle wurden die fluoreszierenden G_o Proteine durch den koexprimierten, adrenergen α_{2A} -Rezeptor nach Stimulation mit 10 μM Noradrenalin aktiviert. Dies führte zu gegenläufigen, reversiblen Änderungen der YFP- und CFP-Emission und einem raschen Abfall des FRET-Ratios (Abb. 15A).

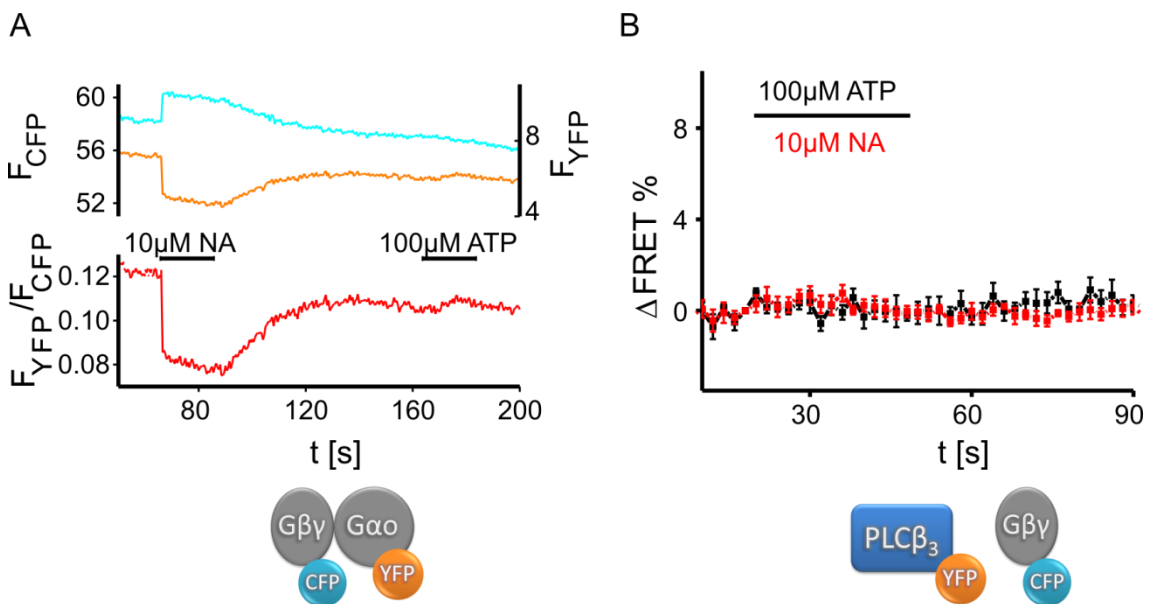


Abbildung 15 Die interagierenden $G\beta\gamma$ Untereinheiten werden von G_q Proteinen freigesetzt (A) Analyse der Agonist-abhängigen Aktivierung der Interaktion von $G\alpha_o$ -YFP und CFP- $G\beta_1\gamma_2$ in einer Zelle, die sowohl adrenerge α_{2A} - als auch purinerge $P2Y_1$ -Rezeptoren koexprimiert. Zur Stimulation wurde 10 μM Noradrenalin und 100 μM ATP verwendet. Diese Messung ist repräsentativ für $n = 5$ und wurde auf einem inversen Zeiss-Mikroskop durchgeführt (Anregung bei 436 nm und 2 Hz). (B) Gemittelte

Änderung im FRET-Ratio nach Stimulation mit 10 μM Noradrenalin und 100 μM ATP von Zellen, die CFP- $\text{G}\gamma_2$, $\text{G}\beta_1$, YFP-PLC β_3 und α_{2A} - und P2Y $_1$ -Rezeptoren koexprimieren, aber nicht wt- $\text{G}\alpha_q$ (n = 5, Anregung bei 0,5 Hz)

Als weiterer Hinweis auf die Freisetzung der $\text{G}\beta\gamma$ Untereinheiten von aktivierten G_q Proteinen wurde gezeigt, dass Zellen, die nicht mit der Wildtyp $\text{G}\alpha_q$ -cDNA kotransfiziert wurde, keine FRET-Antwort zeigten: weder nach Stimulation des P2Y $_1$ -Rezeptors mit ATP, noch nach Stimulation des koexprimierten α_{2A} -Rezeptors mit Noradrenalin konnte eine Interaktion zwischen CFP- $\text{G}\beta\gamma$ und der YFP fusionierten Phospholipase beobachtet werden (Abb. 15B). Es scheinen also keine endogenen $\text{G}\alpha_{i/o}$ Pools zu bestehen, die eine ausreichende $\text{G}\beta\gamma$ Freisetzung nach Rezeptorstimulation für eine messbare Interaktion mit der Phospholipase bedingen könnten. Diese Ergebnisse machen es insgesamt sehr plausibel, dass es in diesem System tatsächlich zu einer Agonist-abhängigen Interaktion von G_q -abhängigen $\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheiten und der Phospholipase $\text{C}\beta_3$ kommt.

3.6 RGS2 verhindert die Interaktion von $\text{G}\alpha_q$ und der PLC β_3 , aber nicht die Interaktion von $\text{G}\beta\gamma$ und PLC β_3

RGS2 wurde in dieser Arbeit in Hinsicht auf dessen GTPase aktivierende Eigenschaft und die Auswirkung auf die G_q Kinetik untersucht. Darüber hinaus ist RGS2 aber auch als Inhibitor der $\text{G}\alpha_q$ Funktion bekannt (Heximer et al, 1997). Deswegen sollte auch den Auswirkungen von RGS2 auf die G_q / PLC β_3 Interaktion nachgegangen werden.

Dazu wurden Zellen, die den P2Y $_1$ Rezeptor, $\text{G}\alpha_q$ -CFP, die YFP fusionierte Phospholipase und Wildtyp RGS2 exprimierten, untersucht. Wie erwartet wurde der Anstieg im FRET-Ratio, der nach Agonistgabe für die Interaktion von $\text{G}\alpha_q$ -CFP und YFP-PLC β_3 beobachtet werden konnte, durch die Koexpression von RGS2 ausgelöscht (Abb. 16A). Der kleine Anstieg des FRET Ratios von etwa 2 %, der in der gemittelten Kurve noch gesehen werden kann, stammt am ehesten von Zellen, die nur wenig, bzw. kein RGS2 exprimierten.

Bemerkenswerterweise blieb aber die Interaktion der G $\beta\gamma$ Untereinheit und der PLC β_3 erhalten, wenn sie dem Einfluss von RGS2 ausgesetzt wurden (Abb. 16B). Zu betonen ist hier auch, dass RGS2 offensichtlich nicht zu einer Verminderung der Signalantwort, d.h. der Signalamplitude, führte. Die maximale absolute Änderung im FRET-Ratio für die Interaktion von G $\beta\gamma$ und der PLC β_3 betrug $7,3 \pm 0,7$ % für $n = 40$ Zellen. Für ebenso viele Zellen die auch mit RGS2 transfiziert wurden fand sich eine maximale Änderung von $9,3 \pm 1,1$ %. Tendentiell war die Signalamplitude in Gegenwart von RGS2 also sogar größer, dieser Unterschied war aber nicht signifikant.

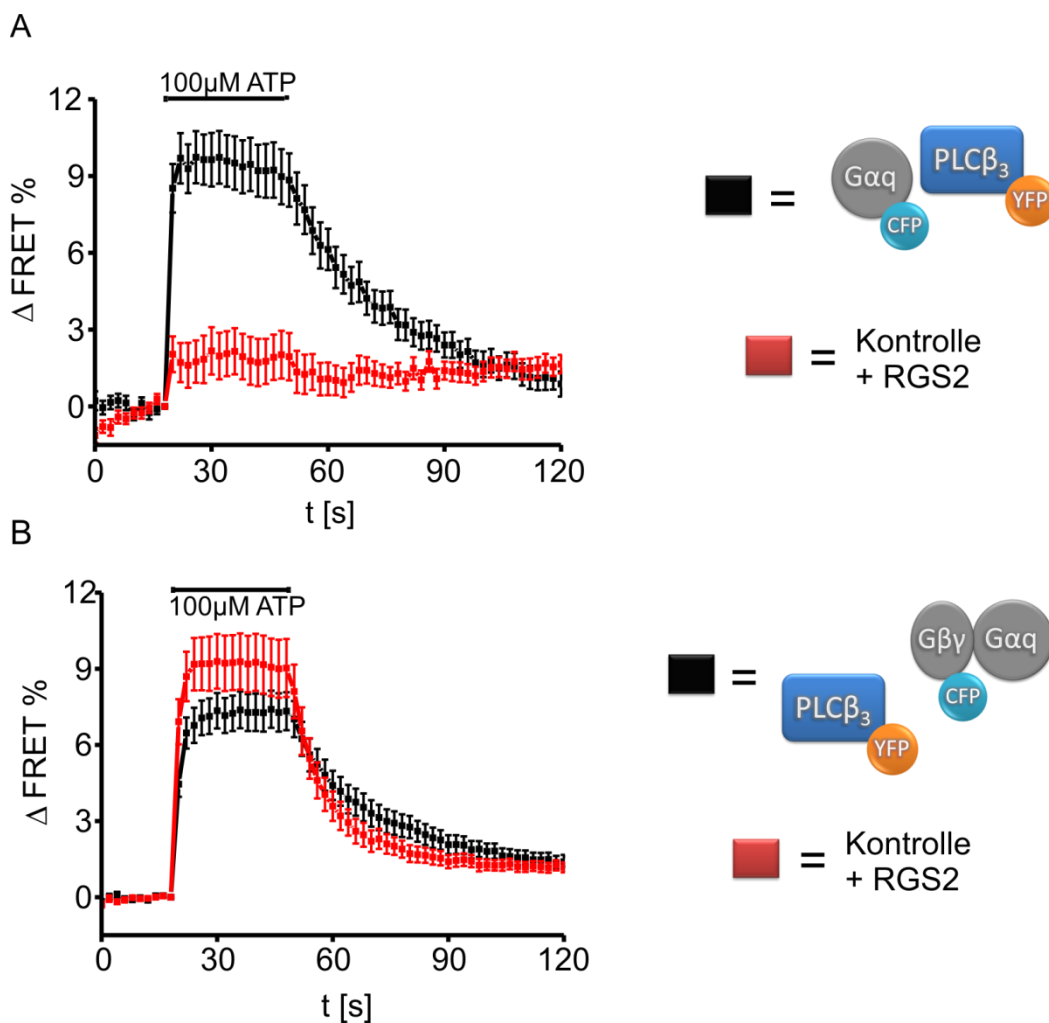


Abbildung 16 Effekt von RGS2 auf die Interaktionen von G $_q$ -Protein-Untereinheiten und der PLC β_3 . (A) Gemittelte Änderungen im YFP/CFP-Emissionsratio nach Stimulation mit 100 μ M ATP über 30 s für HEK TSA Zellen, die P2Y $_1$ -Rezeptoren, YFP-PLC β_3 und G α q-CFP (A) oder CFP-G γ_2 , G β_1 und Wildtyp G α_q (B)

koexprimierten. Diese Interaktionen sind als Kontrolle (schwarz) und in Anwesenheit von RGS2 (rot) gemessen worden (n = 40, Anregung bei 0.5 Hz).

Die beobachtete Inhibition der $G\alpha_q/PLC\beta_3$ Interaktion scheint also nicht allein durch die Beschleunigung der G_q Kinetik bedingt zu sein. Dieses Ergebnis lässt sich mit der Beobachtung in Einklang bringen, dass die inhibitorische Wirkung von RGS2 nicht von dessen GAP Aktivität abhängig ist, sondern dafür die Eigenschaft von RGS2 als Effektorantagonist ausreichend ist (Anger et al, 2004; Ladds et al, 2007).

Ein Effekt von RGS2 auf die Interaktion von CFP- G_{γ_2} und $PLC\beta_3$ war dennoch sichtbar: Es zeigte sich eine signifikante Beschleunigung der Deaktivierung der Interaktion von $G\beta\gamma$ und der Phospholipase in Anwesenheit von RGS2. Die Halbwertszeit für die Rückkehr des FRET-Ratios zu Grundlinie wurde von $t_{1/2} = 19 \pm 2,2$ s auf $13 \pm 1,6$ s durch die Koexpression von RGS2 reduziert (Abb. 17B). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Messung der Aktivierungskinetik mit einer hohen Bildfrequenz von 5 Hz in jeweils 4 Zellen kein signifikanter Unterschied (Abb. 17A).

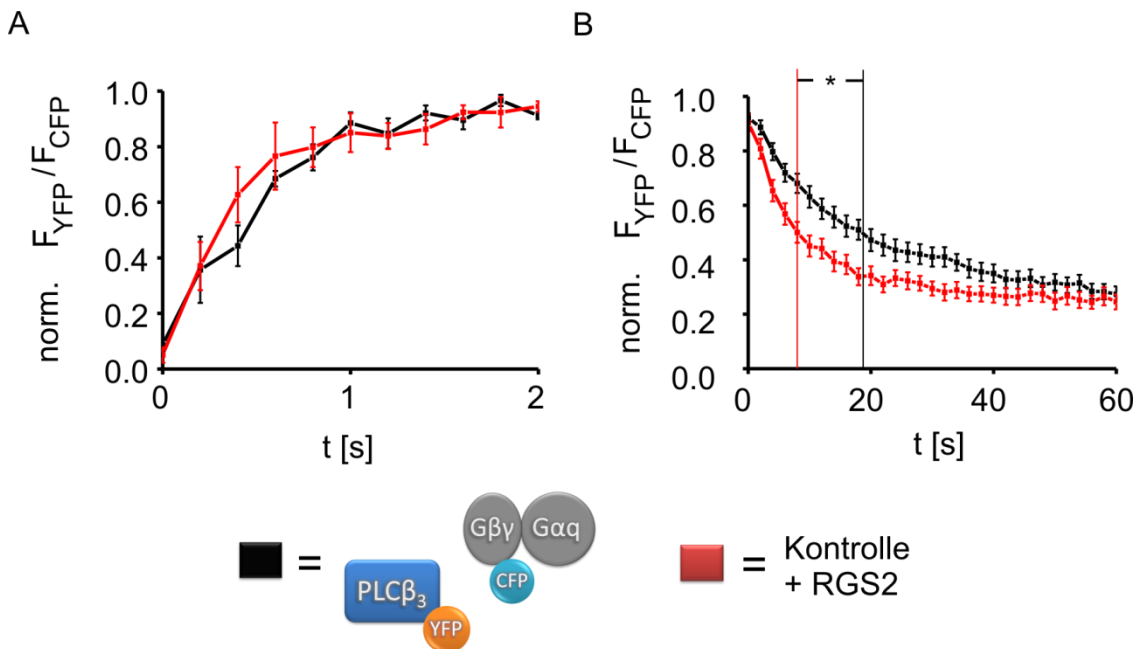


Abbildung 17 Einfluss von RGS2 auf die Kinetik der Interaktion $G\beta\gamma/PLC\beta_3$. Vergleich der Änderung im YFP/CFP Emissionsratio nach Aktivierung mit 100 μ M ATP (A) und nach Auswaschen des Agonisten (B) für die Interaktion von CFP- G_{γ_2} und YFP- $PLC\beta_3$ ohne (schwarz) und mit Koexpression von RGS2 (rot). Für

(A) wurde das Ratio auf den letzten Zeitpunkt vor signifikanter Änderung nach Stimulation normalisiert.
(A) n = 4, Bildakquirierungsrate 5 Hz, (B) n = 40, 0,5 Hz.

Dieser Effekt auf die Kinetik kann auch als Hinweis darauf gesehen werden, dass RGS2 in den gemessenen Zellen auch tatsächlich zur Expression kam. Um dies darüber hinaus sicherzustellen, wurde ein direkter Nachweis von RGS2 mittels Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Dazu wurden sowohl Zellen die P2Y₁-Rezeptoren, CFP-Gγ₂, Gβ₁, Gα_q und YFP-PLCβ₃ als auch Zellen, die zusätzlich noch RGS2 koexprimierten mit Methanol fixiert und mit dem gegen RGS2 gerichteten Erst-Antikörper inkubiert. Die Markierung erfolgte mittels eines Alexa Fluor 633 gekoppelten Zweit-Antikörpers, der unter dem TIRF Mikroskop bei 635 nm angeregt werden konnte (Abb. 18A).

Im Ergebnis zeigte sich eine signifikant höhere Fluoreszenz in Zellen, die mit RGS2-cDNA transfiziert wurden. Die gemessene Emission des Alexa Fluor 633 Fluorophors in diesen Zellen übertraf die gemessene Emission in den Kontrollzellen um etwa den Faktor 3 (Abb. 18B). Eine Möglichkeit, wie RGS2 unabhängig von seiner GAP-Aktivität die Interaktion von Gα_q und der PLCβ₃ inhibieren könnte, besteht darin, dass RGS2 Komplexe mit Gα_q bildet und somit die Phospholipase Cβ₃ von der direkten Interaktion ausschließt. Um festzustellen, ob Gα_q-CFP und RGS2-YFP in Abwesenheit von Agonist miteinander Komplexe bilden, wurden wiederum Donor Dequenching Experimente nach Akzeptorphotobleichen durchgeführt (Abb. 20B). Unter Kontrollbedingungen fand sich ein Anstieg der CFP Emission nach APB von 4,5 % über 22 Zellen gemittelt. Dazu wurden Zellen, die Gα_q-CFP und ein membrangebundenes YFP koexprimierten als Referenzkonstrukt für unspezifisches FRET dem APB-Protokoll unterzogen. Der Anstieg der CFP Emission nach Bleichen des YFPs in Zellen, die P2Y₁-Rezeptoren, Gα_q-CFP und RGS2-YFP exprimierten, wurde in 24 Zellen bestimmt und betrug 5,7 %. Somit fand sich kein signifikanter Unterschied im Anstieg der CFP Emission nach APB zwischen der Konstellation Gα_q-CFP und RGS2-YFP und den Kontrollbedingungen.

In dieser Arbeit konnte also kein Hinweis dafür gefunden werden, dass RGS2 schon in Abwesenheit von Agonist Komplexe mit Gα_q bildet und so möglicherweise die Phospholipase Cβ₃ von der Interaktion mit Gα_q ausschließt.

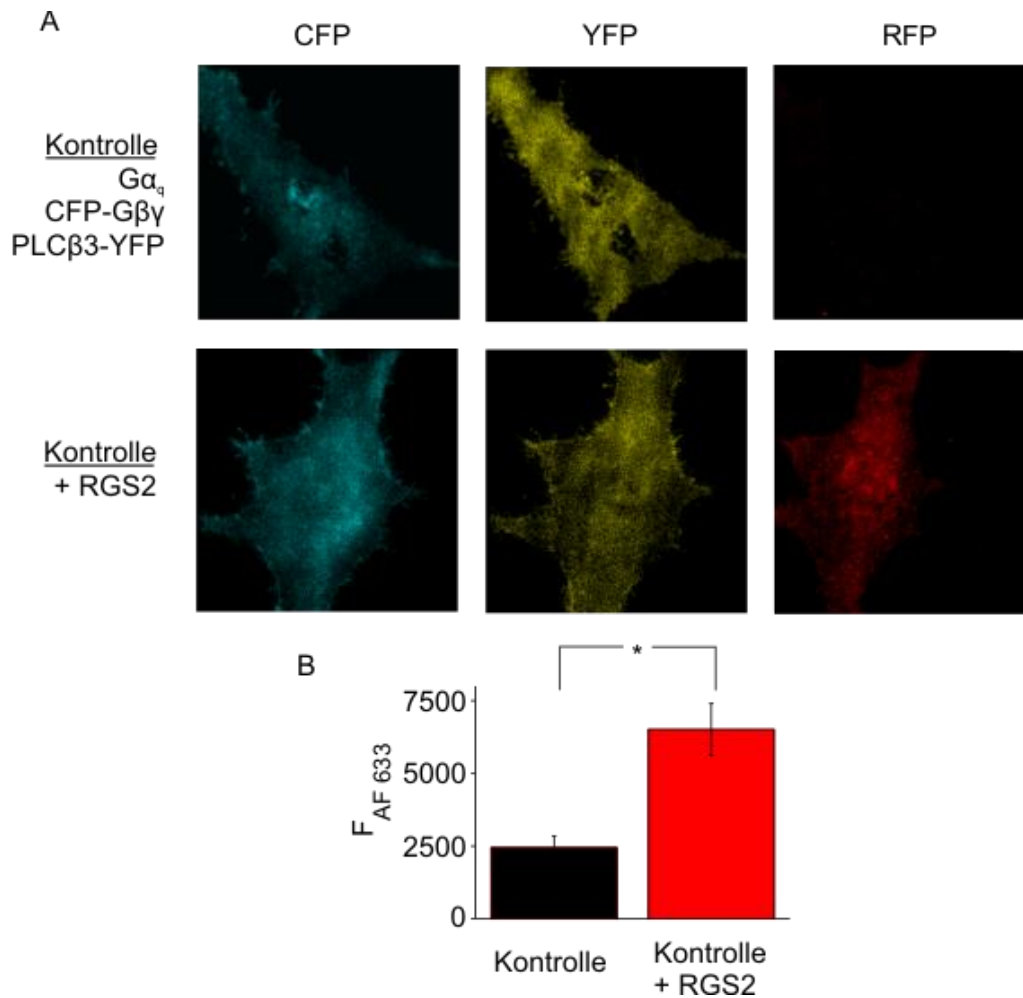


Abbildung 18 Nachweis von RGS2 in fixierten Zellen mittels Immunfluoreszenz. (A) Dargestellt sind repräsentative Zellen nach Fixation und Immunfluoreszenz-Färbung. Kontrollzellen exprimierten G α_q , CFP-G $\beta_1\gamma_2$ und PLC β 3 (oben). Die unteren Zellen wurden zusätzlich mit RGS2 kotransfiziert (B) Für je 18 Zellen wurde die Intensität des an den Zweitantikörper gekoppelten Fluorophors Alexa Fluor 633 nach Anregung bei 635 nm im TIRF Modus gemessen.

3.7 RGS2 interagiert mit aktiven G α_q in intakten Zellen

Fand sich in dieser Arbeit zwar kein Hinweis auf eine Komplexbildung von RGS2 und G α_q im inaktiven Zustand, so ist doch ausgehend von biochemischen Untersuchungen bekannt, dass die Affinität von RGS Proteinen gegenüber G α -Untereinheiten nach Aktivierung von G α -Untereinheiten zunimmt (Dowal et al, 2001). Bisher fanden sich

jedoch keine experimentellen Daten, die diese Überlegung in intakten Zellen bestätigen konnten. Um diese Erwartung zu bestätigen, war es ein Ziel dieser Arbeit die Interaktion zwischen RGS2 Proteinen und $G\alpha_q$ -Untereinheiten nach Stimulation des Rezeptors in lebenden Zellen sichtbar zu machen.

Dazu wurden $P2Y_1$ -Rezeptoren, $G\alpha_q$ -CFP und RGS2-YFP Konstrukte in HEK TSA Zellen transfiziert und einzelne Zellen mittels dualer Emissions-TIRF Mikroskopie untersucht. Tatsächlich offenbarten die FRET-Messungen einen Agonist-abhängigen Anstieg des F_{YFP}/F_{CFP} -Emissionsratios für die Interaktionspartner $G\alpha_q$ -CFP und RGS2-YFP (Abb. 19).

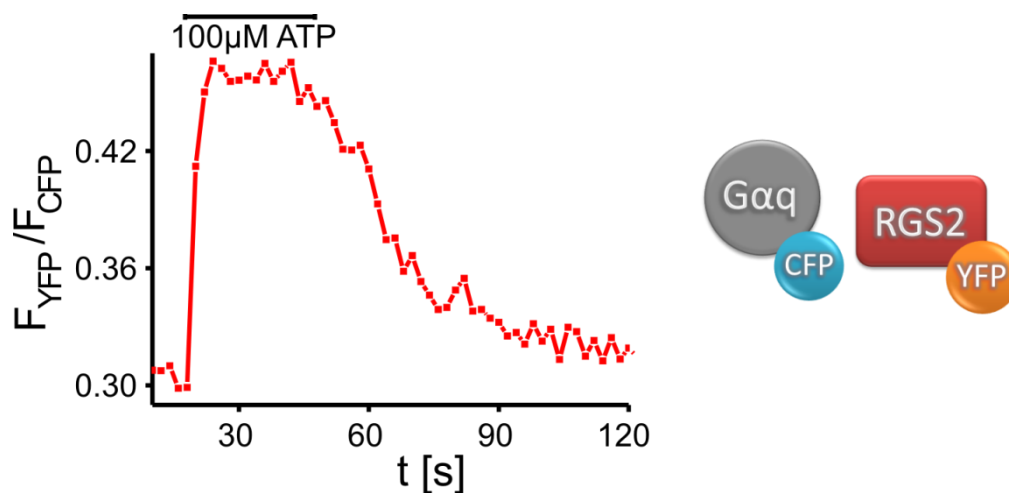


Abbildung 19 . Interaktion von $G\alpha_q$ -CFP und RGS2-YFP. Analyse der ATP-induzierten Änderungen im YFP/CFP-Emissionsratio in einer Zelle, die $P2Y_1$ -Rezeptoren, $G\alpha_q$ -CFP und YFP-PLC β_3 koexprimierten. Anregung bei 0,5 Hz;

Über 24 Zellen gemittelt zeigte sich eine maximale absolute Änderung des FRET-Ratios um $9\pm 1\%$ gegenüber der Grundlinie nach Stimulation mit $100\ \mu\text{M}$ ATP. Interessanterweise pendelte sich das FRET-Ratio nach Erreichen eines Maximums wiederum nicht auf ein stabiles Plateau ein, sondern begann noch unter andauernder Zugabe von Agonist stetig zu fallen (Abb. 20A). Dies spiegelt die Situation wieder, die schon für die G_q Protein Aktivität in Anwesenheit von RGS2 zu beobachten war.

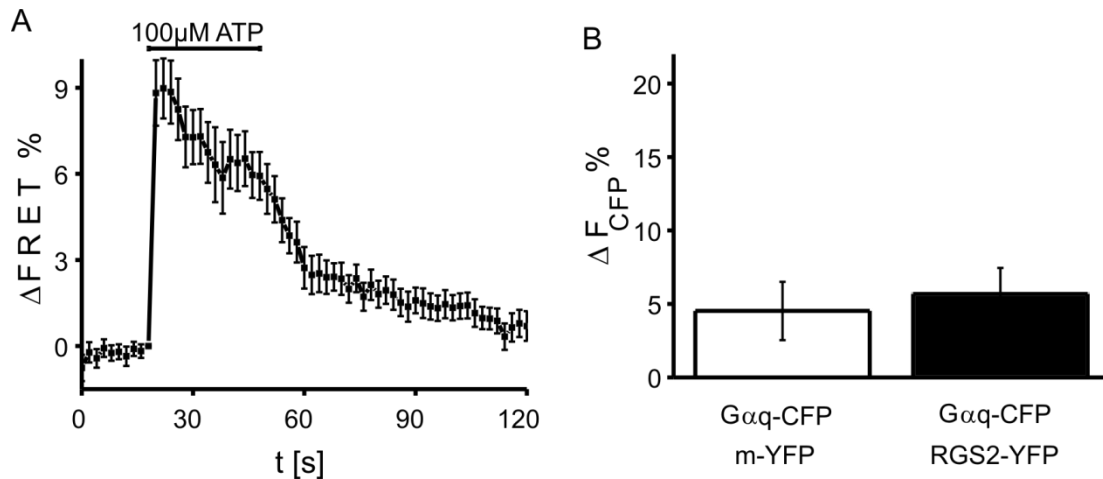


Abbildung 20 Agonist-abhängige und –unabhängige Interaktion von G α_q und RGS2. (A) Gemittelte Änderungen im FRET-Ratio nach 30 s Stimulation mit 100 μM ATP ($n = 24$, Anregung bei 0,5 Hz). (B) In der Abwesenheit von Agonist wurde FRET mittels Donor Dequenching nach Akzeptorphotobleichen in Zellen, die G α_q -CFP und entweder ein Membran-verankertes YFP oder RGS2-YFP exprimierten, ermittelt ($n = 22 - 24$).

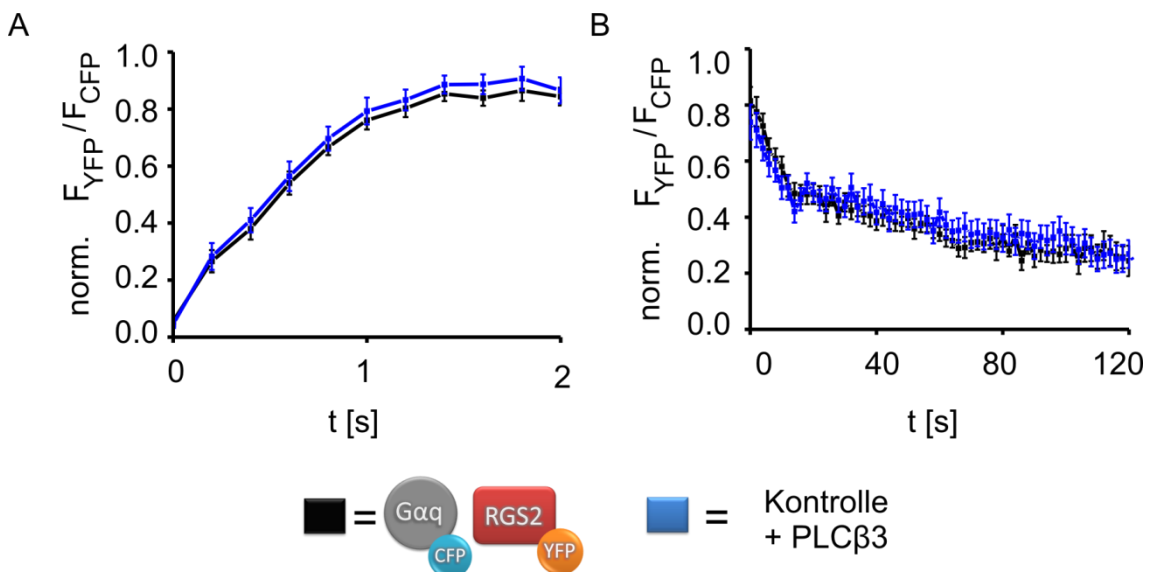


Abbildung 21 . Kinetik der Interaktion von G α_q -CFP und RGS2-YFP (schwarz) in Anwesenheit der PLC β_3 (blau). (A) Darstellung der Aktivierungskinetik der Interaktion G α_q / RGS2 \pm PLC β_3 . Das YFP/CFP-Emissionsratio wurde auf den letzten Zeitpunkt vor der ersten signifikanten Änderung im Ratio nach Zugabe von 100 μM ATP normalisiert ($n = 24$, Anregung bei 5 Hz). (B) Dargestellt ist das normalisierte YFP/CFP-Emissionsratio ab dem Auswaschen des Agonisten ($n = 24$, Anregung bei 0.5 Hz).

Messungen bei 5 Hz ergaben eine Halbwertszeit für das Erreichen der maximalen FRET-Antwort von $t_{1/2} = 0,5 \pm 0,04$ s (Abb. 21A). Nach Entzug des Agonisten ergab sich eine Halbwertszeit für den Rückgang des FRET-Ratios von $t_{1/2} = 13 \pm 1$ s (Abb. 21B). Hier fand sich eine gute Übereinstimmung mit der Kinetik der Interaktion von $G\beta\gamma$ und der PLC β 3. Diese hatte durch Koexpression von RGS2 eine Beschleunigung erfahren, woraus eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 13 \pm 1,6$ s resultierte. Koexpression der Wildtyp PLC β 3 führte weder für die Aktivierung noch für die Deaktivierung zu einem messbaren Effekt auf die Kinetik der Interaktion von $G\alpha_q$ und RGS2.

In diesem Zusammenhang wurde wiederum die Möglichkeit kontrolliert, ob das beobachtete FRET-Signal lediglich ein verstärktes unspezifisches FRET widerspiegelt, das einer Agonist-abhängigen Translokation von RGS2-YFP an die Membran geschuldet ist. Die direkte Darstellung von RGS2-YFP bei 488 nm in der TIRF-Mikroskopie zeigte jedoch lediglich einen durchschnittlichen Anstieg der YFP Fluoreszenz von weniger als 5 % (Abb. 22). Ebenfalls wurde deutlich, dass die Kinetik dieser Veränderung eine völlig andere war, als die für die Interaktion von $G\alpha_q$ -CFP und RGS2-YFP beobachtete. Somit war nicht davon auszugehen, dass die Änderung des FRET-Ratios für die Interaktion von $G\alpha_q$ -CFP und RGS2-YFP auf Änderungen im Verhältnis der FRET-Partner zurückzuführen war.

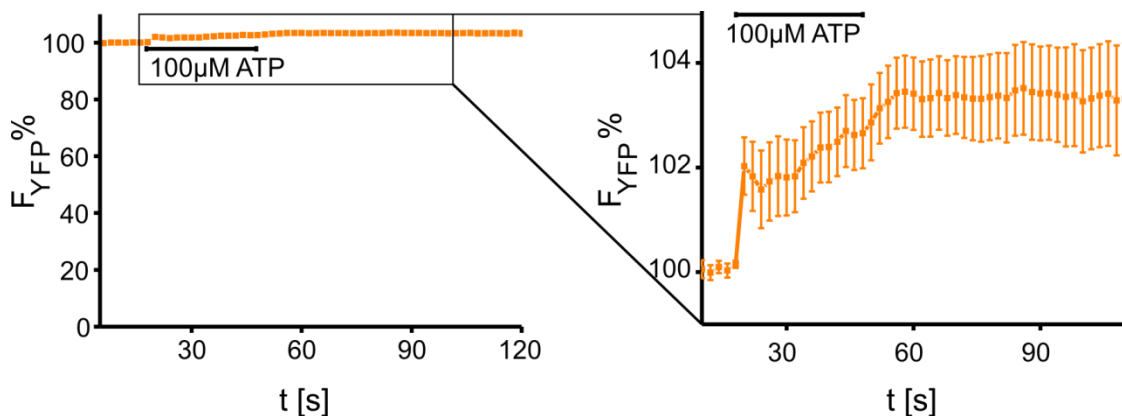


Abbildung 22 Änderung in der Membranlokalisation von RGS2 nach Agoniststimulation Die relative Veränderung der Menge von YFP-gekoppeltem RGS2 an der Membran nach Exposition gegenüber 100 μ M ATP wurde bei direkter YFP-Anregung mit 488 nm gemessen. Der rechte Ausschnitt zeigt die beobachteten kleinen Veränderungen nach Stimulation (n = 20, Anregung bei 0,5 Hz).

In Zellen, die P2Y₁-Rezeptoren, CFP-Gγ₂, Gβ₁, Gα_q und RGS2-YFP koexprimierten, fanden sich keinerlei Agonist-induzierten Änderungen im YFP/CFP-Emissionsratio (n = 24). Es konnte also kein Hinweis auf eine Agonist-abhängige Interaktion von Gβγ und RGS2 gefunden werden. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass in Anwesenheit von RGS2 eine vollständige Separation von aktivem Gα_q und Gβγ-Untereinheiten stattfindet.

4. Diskussion

Mittels FRET basierter Ansätze konnten bereits $G_{i/o}$ - (Bünemann et al, 2003) und G_s -gekoppelten Signalwege (Hein et al, 2005; Hein et al, 2006) in lebenden Zellen in Echtzeit sichtbar gemacht und analysiert werden. Zu G_q gekoppelten Signalwegen fanden sich bisher wenige, zum Teil widersprüchliche Arbeiten (Adjobo-Hermans et al, 2011; Dowal et al, 2006; Jensen et al, 2009). Ziel dieser Untersuchungen war es daher, verschiedene Schritte des G_q Signalweges sichtbar zu machen und deren zeitliche und räumliche Auflösung in lebenden Zellen in Echtzeit mittels FRET zu untersuchen. Als wesentliche Befunde zeigten sich dabei:

- eine Agonist-abhängige Interaktion von $G\alpha_q$ -Untereinheiten und auch von G_q -abstammende $G\beta\gamma$ -Untereinheiten mit der PLC β 3
- eine deutlich schnellere Dissoziation von $G\alpha_q$ und PLC β 3 nach Entzug purinerner Agonisten verglichen mit der Deaktivierung von G_q Proteinen in der Abwesenheit der PLC β 3
- ein ähnlich starker Effekt von PLC β 3 auf die G_q Protein Kinetik wie RGS2
- eine Agonist-abhängige Interaktion von $G\alpha_q$ und RGS2
- keine Hinweise auf ein spezifisches FRET-Signal zwischen G_q Proteinen und der PLC β 3 oder RGS2 bereits im Vorfeld einer Rezeptorstimulation

4.1 Zeitliche Organisation der G_q /PLC β 3-Interaktion

4.1.1 Agonist abhängige Interaktion von $G\alpha_q$ mit der PLC β 3

Die G-Protein induzierte Aktivierung der PLC β führt zu IP $_3$ – Ca $^{2+}$ Signalen und ist ein ubiquitärer Ca $^{2+}$ regulierender Signalweg, der in praktisch allen Zellen eine wichtige Rolle spielt. Für die PLC β 3 wurde *in vitro* eine direkte Regulation durch aktive $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ Untereinheiten demonstriert (Barr et al, 2000).

Mittels FRET konnte hier die Dynamik der Interaktion von $G\alpha_q$ mit der PLC β 3 nach Rezeptoraktivierung in einzelnen lebenden Zellen visualisiert werden. Es zeigte sich

eine rascher Anstieg im FRET nach Agonistzugabe sowie ein langsamerer Abfall nach Agonistentzug. Das hier aufgezeichnete FRET Signal spiegelt somit wahrscheinlich die $G\alpha_q$ /PLC β 3-Bindung wider, bzw. die Konformationsänderung, die mit der Aktivierung der PLC assoziiert ist.

Die beobachteten Kinetiken finden sich in guter Übereinstimmung mit den Kinetiken der $G\alpha_q$ / PLC β 1 Interaktion nach Stimulation des muscarinergen M1 Acetylcholinrezeptors, die kürzlich von der Hille Gruppe beschrieben wurde (Jensen et al, 2009), wie die Gegenüberstellung in Tabelle 1 zeigt. Auffällig hierbei ist ein deutlicher Unterschied in der gemessenen Deaktivierungsdauer der $G\alpha_q$ /PLC β -Interaktion in den hier durchgeführten Experimenten. Gegenüber den Ergebnissen der Hille-Gruppe findet sich in dieser Arbeit eine ca. siebenfach längere Dauer bis zur halbmaximalen Deaktivierung. Dieser Unterschied könnte verschiedene Ursachen haben, etwa die verschiedenen verwendeten Rezeptoren und Liganen. Ein weiterer Grund könnte die Verwendung unterschiedlicher PLC β Isoformen sein: In der vorliegenden Arbeit kam die PLC β 3 zum Einsatz, und nicht die PLC β 1 wie in der Arbeit von Jensen. Die GTPase beschleunigende Aktivität der PLC β 3 scheint nämlich schwächer ausgeprägt zu sein als die der PLC β 1 (Ross & Wilkie, 2000). Möglicherweise können auch Unterschiede der G_q -Expression zu unterschiedlichen Konzentrationen an exprimierten G_q führen, die Einfluss auf die Deaktivierung nehmen. Bei sehr hohen G_q Konzentrationen kommt die eher langsame intrinsische GTPase Aktivität von G_q zum Tragen, während bei niedrigeren Konzentrationen endogene regulatorische Proteine wie GAPs eine wichtigere Rolle spielen und die Deaktivierung beschleunigen können. Letztlich könnten die gefundenen Unterschiede auch auf ein unterschiedliches experimentelles Setup zurückzuführen sein, wie z.B. die Verwendung unterschiedlicher Superfusionssysteme. Desweiteren wurden die Messungen von Jensen et al am Epifluoreszenzmikroskop durchgeführt. Vorstellbar ist daher auch, dass der Lösungsaustausch, also das vollständige Auswaschen des Agonisten, in der TIRF-Mikroskopie länger dauern könnte. Denn schließlich muss der Lösungsaustausch hier im stark begrenzten Raum zwischen basolateraler Zellmembran und Glasoberfläche stattfinden.

Gα_q/PLCβ - Interaktion		
	t_{1/2 on} [s]	t_{1/2 off} [s]
<i>Vorliegende Arbeit</i>	0,5	17
<i>Jensen et al 2009</i>	0,9	2,5

Tabelle 1 Vergleich der gemessenen Kinetik der G α_q / PLC β Interaktion. In der Arbeit von Jensen et al 2009 wurde zur Beschreibung des exponentiellen Verlaufs der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik die Zeitkonstante τ gewählt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde daraus die Halbwertszeit nach der Formel $t_{1/2} = \tau * \ln(2)$ berechnet. Jensen et al verwendeten im Gegensatz zu vorliegender Arbeit die PLC β 1, den cholinergen M1-Rezeptor und 10 μ M Oxotremorin-Methiodid als Agonisten.

Es bleibt unklar, warum andere keinen Agonist-induzierten Anstieg im FRET zwischen G α_q und der PLC β 1 in PC12 und HEK293 Zellen gesehen haben (Dowal et al, 2006). Zwei Unterschiede im experimentellen Design, auf die bereits Jensen et al 2009 aufmerksam gemacht haben, könnten jedoch hierfür verantwortlich sein. (1) In oben genannter Arbeit wurde keine Rezeptor-cDNA kotransfiziert, die Stimulation des G α_q Signalweges erfolgte also ausschließlich über die endogenen Rezeptoren. Eventuell war die endogene Rezeptorkonzentration zu niedrig, um eine Antwort zu provozieren. (2) Möglicherweise lief die Antwort so schnell ab, dass sie der vergleichsweise niedrigen Belichtungsfrequenz von einer Messung in 15 s entgehen konnte.

Im Vergleich zu *in vitro* Experimenten zur Aktivierungskinetik nach Zugabe von Agonist zeigt sich eine deutlich raschere Kinetik in den vorliegenden Messungen in lebenden Zellen. Ross und Kollegen (Biddlecome et al, 1996; Mukhopadhyay & Ross, 1999) unterscheiden in ihrer Arbeit eine schnelle und langsame Aktivierung der PLC β 1 gemessen an der IP $_3$ -Produktion in Vesikelpräparationen, die den M1-Rezeptor, G α_q und die Phospholipase enthalten. Nach Präinkubation des Ansatzes mit Agonisten und Stimulation durch Zugabe von GTP erfolgte die schnelle Aktivierung innerhalb von 2 s. Bei Aktivierung nach Präinkubation mit GTP und Zugabe von Agonisten zeigte sich eine deutlich langsamere Aktivierung in 12 s. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass der GTP Austausch rasch stattfindet und die Rezeptor/ G α_q -Interaktion der limitierende Schritt

in der Aktivierung der PLC sei. Wie schon Hille und Kollegen anhand ihrer Daten bemerkt haben, kann diese langsame Aktivierung auch mit der vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen werden: Die vollständige Aktivierung der PLC β nach Zugabe des Agonisten vollzog sich in einem Zeitraum von < 2 s. Die hier beobachtete Interaktion entspricht also eher der raschen Aktivierung, die Rezeptor/ $G\alpha_q$ -Interaktion scheint nicht der limitierende Faktor zu sein.

Beim Vergleich der hier durchgeführten Versuche mit den *in vitro* Experimenten ist jedoch folgendes zu bedenken: die Konzentrationsverhältnisse der Interaktionspartner in lebenden Zellen müssen nicht jenen gleichen, die in den Vesikelpräparationen mit aufgereinigten Proteinen eingestellt worden ist. So ist es vorstellbar, dass alleine die Überexpression der Interaktionspartner eine raschere Aktivierung auch ohne Präinkubation des Agonisten ermöglicht hat. Bei Versuchen in lebenden Zellen muss auch berücksichtigt werden, dass auch endogen exprimierte Proteine die Interaktion beeinflussen kann.

4.1.2 Agonist-abhängige Interaktion der von G_q freigesetzten $G\beta\gamma$ Untereinheiten mit der PLC β 3

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Rezeptor-induzierte Interaktion von $G\beta\gamma$ und der PLC β 3 in intakten Zellen beobachtet. Diese Interaktion war sowohl abhängig von der Koexpression von $G\alpha_q$, als auch von Expression eines G_q gekoppelten Rezeptors. Die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik der $G\beta\gamma$ / PLC β 3 Interaktion waren identisch zu denen, die für die $G\alpha_q$ / PLC β 3 Interaktion gemessen wurden. Zusammengefasst erscheint es also plausibel, dass hier $G\beta\gamma$ nicht von $G_{i/o}$ Proteinen, sondern eher von $G\alpha_q$ freigesetzt wurde.

Bis dato wurde die Regulation der PLC β 3 durch $G\beta\gamma$ in intakten Zellen entweder durch $G\beta\gamma$ Überexpression oder durch Hemmung der $G_{i/o}$ Protein Aktivierung gezeigt (Vanhauwe et al, 2002). Die Aktivierung der PLC β , die mit $G\beta\gamma$ Untereinheiten verbunden ist, wurde primär dem $G_{i/o}$ Signalweg zugeschrieben. $G_{i/o}$ -Proteine sind normalerweise in großem Überschuss in der Zelle exprimiert (Rebecchi & Pentylala,

2000). Ob $G\beta\gamma$, die von Pertussistoxin-insensitiven $G\alpha$ Untereinheiten abstammen, ebenfalls die $PLC\beta$ binden können, blieb unklar.

Es muss aber betont werden, dass auch die hier gezeigten Ergebnisse die physiologische Relevanz einer G_q -abhängigen $G\beta\gamma$ -Stimulation der $PLC\beta$ offen lassen. Die für die Aktivierung der $PLC\beta$ nötige höhere Konzentrationen von $G\beta\gamma$ Untereinheiten im Vergleich zur Aktivierung durch $G\alpha_q$ Untereinheiten, könnte eine Form der Spezifität herstellen: So könnte nur die Aktivierung ein großen Anzahl von G -Proteine, wie sie nur für Proteine der $G_{i/o}$ Familie möglich sein könnte, zu einer ausreichenden Freisetzung von $G\beta\gamma$ Untereinheiten und letztlich zur Aktivierung der $PLC\beta$ führen (Morris & Scarlata, 1997). In der Studie von Ross und Kollegen (Philip et al, 2010) wurde *in vitro* für eine in etwa gleich starke Aktivität der $PLC\beta_3$ eine um zwei Größenordnungen höhere Konzentration von $G\beta\gamma$ als aktiviertes $G\alpha_q$ benötigt. Dieselbe Arbeit zeigt auch, dass *in vitro* die Zugabe von $G\alpha_{i1}$ -GDP zu einer Sequestrierung von $G\beta\gamma$ führt und die $G\beta\gamma$ vermittelte Stimulation verhindert. Zusammenfassend scheint es also nach der Literatur so, dass nur die heterotrimeren Proteine der G_i Familie in einer ausreichend hohen Konzentration vorliegen, um die für eine starke Aktivierung der $PLC\beta$ nötigen Mengen $G\beta\gamma$ freizusetzen (Clapham & Neer, 1997).

Allerdings zeigt die in der vorliegenden Arbeit gefundene G_q abhängige Interaktion von $G\beta\gamma$ Untereinheiten mit der $PLC\beta_3$, dass hierzu nicht zwingend ein hundertfacher Überschuss von $G\beta\gamma$ über $G\alpha_q$ notwendig ist und in dieser Form durchaus auch *in vivo* stattfinden kann. Außerdem wurde bereits eine synergistische Aktivierung der $PLC\beta$ durch $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ gezeigt (Philip et al, 2010). Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die G_q vermittelte Aktivierung der $PLC\beta_3$ in lebenden Zellen wesentlich auf diesem Synergismus beruht. Zudem ist es denkbar, dass in lebenden Zellen die Mikrokompartimentierung einen erheblichen Einfluss auf die lokale Konzentration der Interaktionspartner haben kann, die *in vitro* nicht nachempfunden wird. So wurde für den G_q Signalweg eine deutlich Anreicherung in Mikrodomänen wie Membranflößen und Caveolae gezeigt werden (Ando et al, 2010; Oh & Schnitzer, 2001). Hier könnte die $G\beta\gamma$ vermittelte Aktivierung über G_q Proteine wiederum eine größere Bedeutung

erlangen. Die Vermittlung einer solchen Spezifität durch Kollokalisierung der Interaktionspartner in Caveolae wurde bereits für die Regulierung von GIRK-Kanälen durch G_q gekoppelten Rezeptoren gezeigt (Cui et al, 2010). Die Regulierung fand hierbei allerdings nicht durch $G\beta\gamma$, sondern durch PIP_2 statt, dem Substrat von $G\alpha_q$.

4.1.3 $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ interagieren wahrscheinlich gleichzeitig mit der PLC β 3

Die Bindungsstellen für $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ auf der PLC β wurde auf Regionen kartiert, die eindeutig getrennt sind. Interaktionsstellen der $G\beta\gamma$ Untereinheit finden sich in der N-terminalen PH-Domäne, sowie in der Y-Box der katalytischen Domäne der PLC β . Für $G\alpha_q$ finden sich Interaktionsstellen im C-Terminus, dem EF-Hand-Motiv und der C2 Domäne (Rhee, 2001; Waldo et al, 2010). Daher scheint es prinzipiell möglich, dass $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ die PLC β gleichzeitig binden. Die Existenz der getrennten Bindungsstellen von $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ zeigt sich in dieser Arbeit indirekt im Verhalten der Interaktion von $G\alpha_q$ bzw. $G\beta\gamma$ und der PLC β 3 in Anwesenheit von RGS2. Während RGS2 die $G\alpha_q$ Interaktion vollständig unterdrückt, wird die $G\beta\gamma$ Interaktion nicht beeinflusst.

Dieses Ergebnis lässt sich mit der Hypothese vereinbaren, dass die PLC β $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ gleichzeitig binden kann, auch wenn hier kein direkter Beweis gelungen ist. Die Schwierigkeit mit dem in dieser Arbeit gewählten Ansatz besteht in der gleichzeitigen Beobachtung von drei Bindungspartnern in einem Zwei-Farben-FRET. Eine direkte Beobachtung dieser Interaktion mittels eines Drei-Farben-FRET-Ansatzes könnte möglich sein. Die Durchführung und Interpretation eines solchen Versuches ist sicherlich anspruchsvoll und zur Zeit auch noch kein gut etabliertes Verfahren (Sun et al, 2010).

In der Literatur finde sich verschiedene indirekte und direkte Hinweise, die das Konzept der gleichzeitigen Bindung der PLC β unterstützen: Die Birnbaumer Gruppe schlugen bereits vor mehr als einem Jahrzehnt vor, dass $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ die Aktivität der PLC β kooperativ regulieren (Zhu & Birnbaumer, 1996). Ebenfalls in den Neunziger Jahren zeigte Smrcka, dass die PLC β 3 abhängig von der Mg^{2+} -Konzentration additiv von $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ Untereinheiten aktiviert wird (Smrcka AV, 1993). Wie bereits erwähnt, ist

es kürzlich auch gelungen eine synergistische Aktivierung der PLC β 3 durch G α_q und G $\beta\gamma$ experimentell *in vitro* (Philip et al, 2010) und *in vivo* (Rebres et al, 2010) zu zeigen.

4.2 Räumliche Organisation der G $_q$ /PLC β 3 Interaktion

4.2.1 G $_q$ Proteine interagieren mit der PLC β 3 erst nach Rezeptoraktivierung

In Abwesenheit der Rezeptor-vermittelten Aktivierung von G-Proteinen konnte kein spezifisches FRET Signal zwischen G α_q und der PLC β 3 oder G $\beta\gamma$ und der PLC β 3 mittels Akzeptorphotobleichen detektiert werden. Dieses Ergebnis spricht für eine Diffusionskontrollierte Kopplung von G $_q$ Proteinen mit dem Effektor und unterstützt nicht die Hypothese eines dauerhaften Komplex zwischen G $_q$ und der PLC β , die kürzlich vorgeschlagen wurde (Dowal et al, 2006). Die Schlussfolgerung, die von der Scarlata Gruppe gezogen wurde, basierte auf der Messung des steady state FRET. Dowal et al berechneten das Ruhe-FRET basierend auf der gemessenen CFP und YFP Emission zwischen eCFP-G α_q und eYFP-PLC β 1. Hierfür ergaben sich Werte von 40%. Als Negativkontrolle dienten nicht interagierende YFP-CFP Paare: eCFP-G α_q und eYFP-PLC δ 1, sowie freies CFP und freies YFP. Hierfür wurden FRET Werte unter 20% berechnet. Bei der Interpretation dieser Signale bestehen jedoch mehrere Fallgruben, hauptsächlich aufgrund suboptimaler FRET-Akzeptor Kontrollproteine. Hier besteht die Schwierigkeit eine aussagekräftige Negativkontrolle zu etablieren (Hein & Bünemann, 2009): Um auszuschließen, dass das basale FRET tatsächlich eine spezifische Interaktion widerspiegelt und nicht aufgrund der Bindung beider Moleküle an die Zellmembran besteht, müssen Experimente zur Negativkontrolle durchgeführt werden. Dabei sollte das Protein, das zur Negativkontrolle eingesetzt wird idealerweise dieselbe Lokalisation innehaben, wie das Protein, das es ersetzt. Weiterhin sollte das fusionierte Fluorophor dieselbe Entfernung und Orientierung zur Zellmembran besitzen, wie im ursprünglichen Fusionsprotein. Dies ist nicht einfach zu gewährleisten, daher sollten die Unterschiede der Ergebnisse dieser Studie zu zuvor publizierten nicht zu hoch bewertet werden.

Zudem scheint das in der vorliegenden Arbeit gewählte Protokoll zur Messung des *donor dequenching* nach Bleichen des Akzeptors nur geeignet, ein sehr robustes basales FRET Signal zu messen. Möglicherweise existierende kleine basale FRET Werte könnten in der vergleichsweise großen Streuung der Messwerte untergehen. Auch für das hier angewandte Verfahren gilt natürlich das Problem der adäquaten FRET-Akzeptorkontrolle. Das verwendete m-YFP könnte dazu führen, das tatsächliche spezifische FRET zu unterschätzen. Ein weiteres Problem der Analyse von *Precoupling vs Collision Coupling* in diesem und vergleichbaren System entsteht durch die Notwendigkeit der Transfektion und somit Überexpression der Interaktionspartner. Allein die Überexpression kann die Formation von Komplexen begünstigen und somit ein *Precoupling* vortäuschen. Sind dagegen zur Komplexbildung *in vivo* weitere Proteine notwendig, die nicht kotransfiziert werden, wird fälschlicherweise ein *Collision coupling* angenommen. Zuletzt beweist das Nicht-Vorhandensein von basalem FRET auch nicht das Nicht-Vorhandensein einer Interaktion, da die FRET-Effizienz nicht nur auf dem Abstand zwischen den Fluorophoren beruht, sondern auch auf der relativen Orientierung der Fluorophor Dipole (Förster, 1948).

Ein geeigneterer Ansatz um die Vorkopplung von Interaktionspartnern zu untersuchen, könnte die FRAP Methode sein (engl., *fluorescence recovery after photobleaching*). Mittels dieser Methode wurde bereits die Interaktion β -adrenerger Rezeptoren untersucht (Dorsch et al, 2009), sowie kürzlich die Assoziation von inaktiven M3-Acetylcholinrezeptoren und G_q Proteinen nachgewiesen (Qin et al, 2011). In diesen Studien war allerdings mindestens ein Interaktionspartner ein transmembranöses Protein. Bei rein zytosolisch, bzw. lediglich membran-assoziierten Interaktionspartnern besteht bei diesem Ansatz das Problem einer selektiven Fixierung eines Interaktionspartners. Es wurden bereits FRAP-Studien ohne eine solche Fixierung durchgeführt, um die Aktivierung und Rekrutierungsmechanismen der PLC β 2 durch unterschiedliche Aktivatoren zu untersuchen (Gutman et al, 2009). In dieser Arbeit führte Koexpression von $G\alpha_q$ (Wildtyp und konstitutiv-aktive Mutante) zu einer Einschränkung der Mobilität der PLC β 2 in FRAP-Experimenten, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß als das ebenfalls untersuchte Rac2. Fanden sich in dieser Arbeit

also Hinweise auf dynamische Interaktionen von $G\alpha_q$ und PLC β , scheinen diese aber nicht zur Formation stabiler Komplexe ausreichend zu sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit favorisieren in diesem Zusammenhang die Hypothese, dass G_q Untereinheiten die PLC β 3 nur nach Aktivierung binden und steht somit im Gegensatz zur derzeitigen Sichtweise, wie $G_{i/o}$ Proteine an GIRK Kanäle koppeln (Sadjja et al, 2003). Untersuchungen, in denen FRET exklusiv an der Plasmamembran mittels TIRF Mikroskopie gemessen wurde, zeigten eine robuste Interaktion von inaktiven heterotrimeren G_i Proteinen mit GIRK Kanälen (Riven et al, 2003). Bei dieser Studie ist jedoch zu bedenken, dass für die Aktivierung eine Inkubationszeit mit dem Agonisten von mindestens einer Stunde gewählt wurde, sodass zur Interpretation dieser Daten eine Vielzahl von Ereignissen denkbar ist, wie z.B. das Membran-Trafficking der beteiligten Proteine.

4.2.2 Subzelluläre Lokalisation der PLC β 3

Die Auswertung der konfokalen und TIRF-Bilder der vorliegenden Arbeit zeigte die Lokalisation der YFP-PLC β 3 in Ruhe sowohl zytosolisch als auch an der Membran. Die Verteilung der PLC β 3 an der Membran erschien homogen, es zeigten sich keine Hinweise auf Membranbezirke mit einer erhöhten Intensität. Auch die Veränderungen im YFP/CFP-Emissionsratio schienen homogen an der gesamten Membran stattzufinden, d.h. es fanden sich hier keine Hinweise auf eine mögliche Komplexbildung. Nach Agonist-Simulation zeigte sich allerdings eine langsame Zunahme der Intensität der YFP-PLC β 3 an der Membran. Der gemessene Anstieg lag dabei im Mittel unter 5%.

Die Assoziation von PLC β Enzymen mit der Membran wurde in Zusammenhang mit dem Substratgehalt der Membran (Adjobo-Hermans et al, 2008) und der Interaktion mit G-Protein Untereinheiten (Gutman et al, 2009) gebracht.

In der TIRF Studie von Gadella und Kollegen zeigte sich nach Histamin-Stimulation ein rascher Abfall der GFP-PLC β 1a Intensität an der Membran im TIRF-Modus. Diese Translokation der PLC β 1a nach Stimulation von der Zellmembran in das Zytosol wurde

auf den Verbrauch des Substrats Phosphatidyinositol-4,5-bisphosphat zurückgeführt. Interessanterweise sind in dieser Studie im TIRF-Modus Membranregionen mit erhöhter Intensität sichtbar, was mit dem Vorliegen von submikroskopischen „Membranflößen“ erklärt wurde. Die von Gadella und Kollegen beobachtete Translokation der PLC β ins Zytosol nach Stimulation, sowie die Organisation in Mikrokompimente der Membran, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen werden. Gründe hierfür mögen wiederum die verwendeten unterschiedlichen Isoformen der PLC β und Unterschiede in den verwendeten Zelllinien sein. Möglicherweise war in der vorliegenden Arbeit das Expressionslevel der YFP-PLC β 3 so hoch, dass auch Membranregionen mit einer eigentlich geringeren Bindungskapazität besetzt wurden und ein eventuell translozierender Anteil der PLC β 3 im Hintergrundsignal des starken Membranpools der PLC β 3 untergehen konnte.

Die hier vorliegenden Ergebnisse sind aber durchaus mit den Ergebnissen von Gutman et al zu vereinbaren. Gutman et al zeigten in Fraktionierungsstudien, dass die GFP-fusionierte PLC β 2 vor Aktivierung überwiegend zytosolisch vorliegt und nach Zugabe von Aktivatoren die Rekrutierung an die Membran erfolgt. Koexpression von G α_q führte zu einem deutlichen Anstieg des membrangebundenen Anteils der PLC β 2, wesentlich stärker als G $\beta\gamma$. Koexpression von konstitutiv-aktivem G α_q im Vergleich zu Wildtyp-G α_q führte aber nur noch zu einem leichten Anstieg von PLC β 2 in der Membranfraktion, kleiner 5 %. Insgesamt scheint die PLC β 3 also bei Koexpression von G α_q schon größtenteils an der Membran gebunden vorzuliegen, die G α_q Aktivierung hat nur noch eine geringe Rekrutierung an die Membran zur Folge.

Darüber hinaus fand sich in dieser Studie interessanterweise für unterschiedliche Aktivator-Proteine ein unterschiedliches Verhalten der PLC β 2 an der Membran in den durchgeführten FRAP-Experimenten. Während Stimulation durch Rac2 offenbar zu einer Rekrutierung der PLC β 2 zu räumlich stark begrenzten Membranbezirken führte, resultierte die Aktivierung durch G $\beta\gamma$ in einer freien lateralen Beweglichkeit der PLC β 2. Aktivierung durch G α_q führte zu einem intermediären Ergebnis. Es zeigten sich also weitere Aspekte der räumlichen Organisation des PLC β Signalweges, die über die in der vorliegenden Arbeit untersuchte allgemeine Membrantranslokation hinausgehen.

4.3 Regulation der G_q/PLCβ3 Interaktion

4.3.1 Die PLCβ3 ist ein potenter Beschleuniger der G_q Deaktivierung

Die Veränderungen im FRET Ratio, die für die Dissoziation oder Umlagerung der G_q Protein Untereinheiten gemessen wurden, sind vereinbar mit jenen, die für andere G-Proteine gemessen wurde, wie G_i (Bünemann et al, 2003) oder G_s (Hein et al, 2005; Hein et al, 2006). Es zeigt sich eine rasche Aktivierung mit Halbwertszeiten von etwa einer halben Sekunde und eine wesentlich langsamere Deaktivierung (Vgl. Tabelle 2). Auffällig ist auch hier die in dieser Arbeit gemessene relative lange Deaktivierungszeit der G-Protein Aktivität. Da dies die einzige Arbeit ist, die am TIRF-Mikroskop durchgeführt worden ist, könnte dieser Unterschied wiederum mit einem länger dauernden Lösungsaustausch an der basolateralen Membran erklärt werden.

	t _{1/2 on} [s]	t _{1/2 off} [s]
G_q		
<i>Vorliegende Arbeit</i>	0,5	62
<i>Jensen et al 2009</i>	1,4	24
<i>Adjobo-Hermans et al 2011</i>	0,35	--
G_i		
<i>Bünemann et al 2003</i>	0,69	29,7
G_s		
<i>Hein et al 2006</i>	0,34	27

Tabelle 2 Vergleich der Kinetik unterschiedlicher G-Protein Aktivitäten. Alle Zeiten wurden mit vergleichbaren Methoden in transient transfizierten Zellen gemessen. Jedoch wurde nur in der vorliegenden Arbeit im TIRF-Modus gemessen, die anderen Arbeiten bedienten sich der Epifluoreszenz-Mikroskopie. Jensen et al nutzten zur G_q Aktivierung den cholinergen M1-Rezeptor und 10 μM Oxotremorin-Methiodid als Agonisten, Adjobo-Hermans et al den H1 Histamin-Rezeptor und 100 μM Histamin. Bünemann et al führten die Messung der G_i Aktivität nach Stimulation des koexprimierten adrenergen α_{2A}-Rezeptors mit 1 μM Noradrenalin durch. Die Zeiten für G_s wurden nach Stimulation des purinergen A_{2A}-Rezeptors mit 100 μM Adenosin gemessen. In den Arbeiten von Hein et al 2006 und Jensen et al 2009 wurde zur Beschreibung des exponentiellen Verlaufs der Aktivierungs- und

Deaktivierungskinetik die Zeitkonstante τ gewählt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde daraus die Halbwertszeit nach der Formel $t_{1/2} = \tau * \ln(2)$ berechnet und auf zwei gültige Ziffern gerundet.

Die hier aufgeführten Deaktivierungszeiten sind allesamt deutlich länger, als sie klassischerweise für physiologische G-Protein Zyklen diskutiert werden (Ross & Wilkie, 2000). Dabei besteht offensichtlich eine Diskrepanz zwischen den gemessenen Halbwertszeiten der G_q Proteine und G-Protein/ Effektor-Interaktion. In dieser Arbeit wurde eine Halbwertszeit für die Reassoziierung der $G\alpha_q/ G\beta\gamma$ Untereinheiten von 62 s für G_q Proteine und eine Halbwertszeit für die Deaktivierung der $G\alpha_q/ PLC\beta_3$ Interaktion von nur 17 s gemessen. Da für beide Schritte die Hydrolyse von $G\alpha_q$ gebundenem GTP notwendig ist, scheint die wesentlich schnellere Dissoziation von $G\alpha_q$ und der $PLC\beta_3$ nach Entzug des Agonisten der GTPase aktivierenden Eigenschaft der $PLC\beta$ geschuldet zu sein (Berstein et al, 1992). Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Koexpression von nicht-fluoreszierender $PLC\beta_3$ zu einer signifikanten Beschleunigung der Reassemblierung der G_q Proteinuntereinheiten führte, mit einer halbmaximalen G_q Deaktivierung nach 27 s. Die Geschwindigkeit der Deaktivierung wurde hier also etwa verdoppelt.

Dieses Ergebnis ist einer der direktesten Hinweise auf die GAP Aktivität der $PLC\beta_3$ in lebenden Zellen. Zuvor wurde die GAP Aktivität der $PLC\beta$ in Photorezeptorzellen von *Drosophila* anhand des Elektroretinogramms (ERG) gezeigt, das die elektrische Antwort der gesamten Retina auf einen Lichtreiz aufzeichnet (Cook et al, 2000; Waldo et al, 2010). Mittels Mutationsstudien, die die GAP Eigenschaft der $PLC\beta$ aufheben bzw. verringern sollten, wurde hier eine Verlängerung der Deaktivierung der Antwort im ERG auf das zehn- bis hundertfache gefunden.

Interessanterweise deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die GAP Aktivität der $PLC\beta_3$ in intakten Zellen einen vergleichbaren Effekt auf die Deaktivierungskinetik der G_q Proteine hat, wie die in vitro ungleich stärkere GAP Aktivität von RGS Proteinen. Während die $PLC\beta_3$ zur Reduktion der Halbwertszeit der Deaktivierung des G_q Proteins von 62 s auf 27 s führte, hatte die Koexpression von RGS4 eine Halbwertszeit der Deaktivierung von 23 s zur Folge (spezifische Diskussion dieser Daten s.u.). Koexpression von RGS2 führte zu einer Halbwertszeit von 18 s.

RGS2 ist das potentesten GTPase aktivierenden Protein von G_q , das bisher beschrieben worden ist (Kimple et al, 2009), es zeigt *in vivo* eine etwa fünffache Potenz als RGS4 in der Inhibition G_q -stimulierte Phosphoinositid-Hydrolyse in HEK293 Zellen (Heximer et al, 1999; Heximer et al, 1997). In vorangegangenen biochemischen Versuchen wurde dagegen die PLC β als vergleichsweise schwaches GAP Protein beschrieben. Die GTPase Aktivität von G_q wurde durch die PLC β 1 etwa 10- bis 20-fach stimuliert (Berstein et al, 1992; Chidiac & Ross, 1999), während Ross und Kollegen eine Beschleunigung der Hydrolyse-Rate um das 100-fache durch RGS4 fanden. Für den Effekt der GAP Proteine auf die Hydrolyse-Rate von G_q -gebundenem GTP während des steady-state GTPase Zyklus fand sich gar eine 2000-fache Stimulation für die PLC β 1 (Mukhopadhyay & Ross, 1999). In dieser Studie war RGS4 etwa 2,5-fach effektiver als die PLC β 1. Dabei scheint die PLC β 3 insgesamt eher ein etwas schwächeres GAP Protein zu sein als die PLC β 1 (Ross & Wilkie, 2000)

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen der G_q Kinetik in Anwesenheit von RGS4 ergaben im Mittel keine sehr klaren Effekte bezüglich der Deaktivierungskinetik ($t_{1/2} = 41 \pm 5,7s$, $n = 25$ Zellen). Die Analyse der Einzelmessungen zeigte die offensichtliche Existenz von zwei getrennten Pools von Zellen: solchen mit einer deutlich schnelleren Deaktivierung, und solchen mit einer sehr langsamen (s. Abb. 23), wobei die langsameren Zellen eine ähnliche Kinetik aufwiesen wie die Zellen ohne RGS4. Von daher ist zu vermuten, dass einige der gemessenen Zellen kein funktionelles RGS in ausreichenden Mengen exprimiert haben. Da für das G_q Protein alleine eine Halbwertszeit der Deaktivierung von $t_{1/2} = 62 \pm 6,5$ s gemessen wurde, wurden zur vorsichtigen Abschätzung der Deaktivierungskinetik von G_q unter Einfluss von RGS4 deshalb lediglich Zellen mit $t_{1/2} < 70$ s herangezogen. Von zunächst 24 Zellen wurden aufgrund dieser Überlegung 7 Zellen aus der Berechnung entfernt. (Deaktivierungshalbwertszeit für diese Zellen $t_{1/2} = 79 \pm 2,2$ s)

Unter diesen Voraussetzung fand sich für $n = 17$ Zellen eine Halbwertszeit der Deaktivierung G_q von $t_{1/2} = 25 \pm 3,7$ s, also einem Wert der tatsächlich in der Tendenz zwischen dem für RGS2 und der PLC β 3 gefundenen Werten liegt (Abb. 13E). Die Unterschiede zur G_q Kinetik in Gegenwart von RGS2 bzw. PLC β 3 waren allerdings nicht

signifikant. Aufgrund der nachträglichen Auswahl der Zellen muss die Aussagekraft dieses Versuches aber eingeschränkt werden.

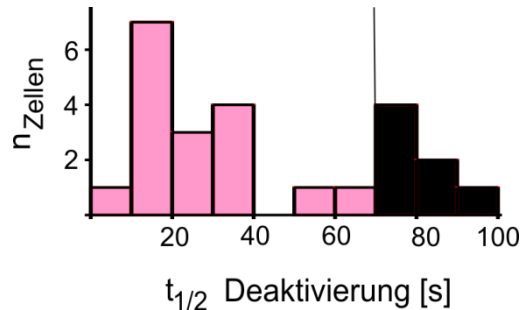


Abbildung 23. Verteilung der Ergebnisse bei Messung von $t_{1/2}$ für die G_q Deaktivierung in Gegenwart von RGS4. Zur Auswertung des Einflusses der Kinetik von RGS4 auf G_q in Abb. 12 wurden lediglich die Zellen mit $t_{1/2} < 70$ s herangezogen (rosa Balken).

Insgesamt scheinen jedoch die Auswirkungen der GTPase aktivierenden Proteine in dem hier genutzten System von lebenden Zellen wesentlich enger beieinander zu liegen als in biochemischen *in vitro* Analysen. Problematisch bei der Bewertung ist, dass in lebenden Zellen die Versuchsbedingungen nicht in dem Maße kontrolliert werden können wie *in vitro*. Gleichzeitig werfen diese Ergebnisse aber die Frage auf, welche tatsächliche Bedeutung die *in vitro* gefundenen Unterschiede in der GAP Aktivität unter physiologischen Umständen haben.

4.3.2 RGS2 hemmt die Interaktion von $G\alpha_q$ und der $PLC\beta_3$ und beschleunigt die Deaktivierung der $G\beta\gamma/ PLC\beta_3$ Interaktion

Für Zellen die RGS2 koexprimierten zeigte sich in dieser Arbeit eine komplette Aufhebung der Interaktion von $G\alpha_q$ und der $PLC\beta_3$ bei Koexpression von RGS2. Dies entspricht der Funktion von RGS2 als potenter Inhibitor der $G\alpha_q$ Funktion (Heximer & David, 2004) Für RGS2 wurde eine komplette Inhibition der G_q -vermittelten Aktivierung der Phospholipase $C\beta_1$ in Zellmembranen und rekonstituierten

Phospholipid-Vesikeln gezeigt (Heximer et al, 1997). Die Inhibition der Agonist-stimulierten Produktion von Inositol-triphosphat fand sich auch in RGS2-exprimierenden HEK293-Zellen (Heximer et al, 1999).

Dagegen wurde die Interaktion zwischen $G\beta\gamma$ und der $PLC\beta 3$ durch die Koexpression von RGS2 nicht gestört. Jedoch fand sich hier eine signifikante Beschleunigung der Deaktivierung der $G\beta\gamma/ PLC\beta 3$ Interaktion mit einer Reduktion der Halbwertszeit der Deaktivierung von 18 s zu 13 s. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit der GAP Aktivität von RGS2, welche sich schon in der Beschleunigung der G_q Deaktivierung zeigte. Die Amplitude der FRET-Antwort für die $G\beta\gamma/ PLC\beta 3$ Interaktion blieb dabei unverändert.

Die RGS-induzierte Beschleunigung der G-Protein Deaktivierung nach Entzug des Agonisten wurde erstmals für $G_{i/o}$ Proteine beschrieben, mit Hilfe der Aufzeichnung von $G\beta\gamma$ -gekoppelten GIRK Kanälen als indirektes Maß für die G-Protein Aktivität (Doupnik et al, 1997a). In dieser Arbeit und später auch in weiteren wurde nicht nur eine beschleunigte Deaktivierung von G-Proteinen, sondern auch eine Beschleunigung der Aktivierungskinetik gefunden (Saitoh et al, 1997). Dahingegen wurde die Amplitude der GIRK Kanal Aktivierung im Gleichgewichtszustand nicht reduziert. Als eine Erklärung hierfür, dient das Model des *kinetic scaffolding*. Die Anwesenheit eines GAP Proteins fördert dabei die Formation einer Proteinassoziation zwischen GPCR, G-Protein und GAP. In diesem Komplex wird durch die GTPase aktivierende Komponente GTP zu GDP gespalten noch bevor das G-Protein vom Rezeptor dissoziieren kann. Dieser kann somit wiederum einen raschen GDP/ GTP Austausch fördern, bevor das GAP Protein oder der Rezeptor dissoziieren kann. Dadurch soll durch schnellen GDP/ GTP Austausch trotz hoher GTPase Aktivität ein ausreichender GTP-gebundener $G\alpha$ Pool erhalten bleiben (Biddlecome et al, 1996; Ross & Wilkie, 2000). Offen bleibt dabei bisher, ob RGS Proteine dabei gegebenenfalls durch Interaktion mit GPCR und G-Protein als physikalisches Adapterprotein wirkt (Sierra et al, 2000). Eine Arbeit von Siderovski und Kollegen legt aber die Vermutung nahe, dass dazu schon alleine die GTPase Aktivität ausreicht (Lambert et al, 2010).

Im Gegensatz zur Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen konnte in der vorliegenden Arbeit keine Beschleunigung der Rezeptor vermittelten Aktivierung von G_q durch die

Koexpression von GAPs wie RGS2 oder PLC β 3 beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass im vorliegenden System bereits im inaktiven Zustand eine Assoziation von Rezeptor und G $_q$ Protein vorliegt. Analog zu dieser Hypothese wurde kürzlich anhand von FRAP-Studien gezeigt, dass muscarinerge M3-Acetylcholinrezeptoren im inaktiven Status mit G $_q$ Proteinen assoziiert sind (Qin et al, 2011). Als Substrat dieser transienten Komplexbildung wurde eine C-terminale polybasische Sequenz von sechs Aminosäuren identifiziert. Da sich diese polybasische Sequenz häufiger in G $_q$ gekoppelten GPCRs findet, wurde diese polybasische Sequenz als weiter verbreiteter Mechanismus der Assoziation von inaktivem GPCR und G $_q$ vorgeschlagen. Der P2Y $_1$ Rezeptor wurde hierbei allerdings nicht explizit erwähnt, ein direkter Nachweis einer solchen Vorkopplung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht. Weiterhin muss in diesem System bedacht werden, dass durch die P2Y $_1$ -Rezeptor- und G $_q$ -Überexpression bereits eine vergleichsweise enge Assoziation zwischen den koexprimierten Proteinen bestehen könnte. Ein möglicher Effekt eines GAP Proteins auf die Aktivierungsphase der Interaktion von Rezeptor und G-Protein könnte hier also relativ gering ausfallen und unter dem hier erreichten zeitlichen Auflösungsvermögen liegen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit über den Einfluss von RGS2 auf die Interaktion der G $_q$ Protein-Untereinheiten mit der PLC β 3 lassen den Schluss zu, dass der inhibitorische Effekt von RGS2 auf die G α_q Funktion nicht abhängig von der GAP Aktivität ist. Dies folgt aus der Beobachtung, dass die G α_q / PLC β 3 Interaktion verhindert wird, nicht jedoch die Interaktion zwischen G $\beta\gamma$ und der Phospholipase. Diese Schlussfolgerung findet sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Mende und Kollegen (Anger et al, 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RGS2 die G α_q -vermittelte PLC β Stimulation auch unter Bedingungen verhindern konnte, in denen aufgrund einer konstitutiv aktiven G α_q Mutante die GTPase Aktivierung nicht möglich war. Somit wurde hier gezeigt, dass GAP-unabhängige Mechanismen wie beispielsweise Effektor-Antagonismus für den inhibitorischen Effekt von RGS2 ausreichend sind. Dies konnte in einer weiteren Arbeit bestätigt werden (Ladds et al, 2007). Als Ausdruck eines solchen Effektor-Antagonismus kann die Beobachtung gewertet werden, dass die

Bindungsstellen von RGS Proteinen teilweise mit denen von PLC β auf G α_q überlappen (Waldo et al, 2010). Eine mögliche Funktion von RGS2 als Effektor-Antagonist lässt sich auch mit der Beobachtung einer Agonist-abhängigen Interaktion von G α_q und RGS2 in der vorliegenden Arbeit vereinbaren. Dahingegen konnte hier zwischen der G $\beta\gamma$ Untereinheit und RGS2 keine Interaktion festgestellt werden, weder basal noch nach Agonist-Gabe. Dies ist vereinbar mit der Beobachtung, dass RGS Proteine zwar durchaus mit G $\beta\gamma$ interagieren können, beispielsweise RGS3, dies jedoch nicht für RGS2 oder RGS4 gefunden werden konnte (Kehrl, 1998; Shi et al, 2001)

4.4 Weitere Aspekte der Interaktion von G $_q$ und RGS2

4.4.1 RGS2 führt möglicherweise zu einer vollständigen Separierung von aktiven G α_q und G $\beta\gamma$

Interessanterweise führte die Koexpression von RGS2, aber nicht die Koexpression der PLC β_3 , zu einem signifikant stärkeren Abfall des FRET Signals zwischen aktivierten G α_q und G $\beta\gamma$ Untereinheiten. Dabei wurde das Ausgangs-FRET Ratio nicht verändert. Für diese Beobachtung sind mehrere Erklärungen denkbar: (1) eine verstärkte G $_q$ Aktivität oder (2) eine vergrößerten Distanz zwischen aktiven G α_q und G $\beta\gamma$ in Anwesenheit von RGS2. Bei der ersten Möglichkeit erscheint es schwierig zu erklären, wie RGS2 die Amplitude der G $_q$ Aktivierung erhöhen könnte und gleichzeitig die G $_q$ Deaktivierung beschleunigt, ohne die Aktivierungskinetik zu beeinflussen. Somit scheint es leichter vorstellbar zu sein, wie eine Sequestrierung von aktiven G α_q durch RGS2 zu einer vollständigen Separation von G α_q und G $\beta\gamma$ führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Agonist-abhängige Interaktion von RGS und G-Proteinen in intakten Zellen beobachtet. Bisher war lediglich durch biochemische Daten bekannt, dass die Affinität von RGS Proteinen gegenüber G α -Untereinheiten nach Aktivierung von G α -Untereinheiten durch Austausch von GDP durch GTP zunimmt (Dowal et al, 2001). Während die Interaktion von RGS2 und G α_q die Interaktion von G α_q mit der PLC β_3 inhibierte, fand sich keine Interaktion zwischen

G β γ und RGS2. Gleichzeitig wurde das Ausmaß des Agonist-induzierten FRET Signals zwischen G β γ und der PLC β 3 durch Koexpression von RGS2 nicht minimiert. Dies ist ein weiterer Aspekt, der gegen eine verstärkte G $_q$ Aktivierung in Anwesenheit von RGS2 spricht. Daher ist am ehesten von einer kompletten Separation von aktivem G α_q und G β γ in Anwesenheit von RGS2 auszugehen.

Ob G α_q und G β γ vollständig nach Aktivierung dissoziieren, wenn kein passender Effektor anwesend ist, bleibt unklar. Jedoch wurde wie von einer unabhängigen Studie erwähnt (Jensen et al, 2009), für die Koexpression der G-Protein gekoppelten Rezeptor-Kinase 2 (GRK2), ein Protein, das G α_q und G β γ Bindungsdomänen mehr als 8 nm räumlich voneinander getrennt trägt, eine stark und spezifisch reduziertes FRET Signal zwischen G α_q und G β γ nach Rezeptoraktivierung gefunden (Bünemann et al, unveröffentlichte Daten). Die vollständige Dissoziation der G $_q$ Protein-Untereinheit mit einer deutlichen Reorientierung der G α_q Untereinheit in Anwesenheit der GRK2 wurde anhand der atomaren Struktur des G α_q -GRK2-G β γ Komplex aufgelöst (Tesmer et al, 2005). Ist die erhöhte FRET-Amplitude der G $_q$ Aktivierung in Anwesenheit von GRK2, bzw. RGS2 Folge einer Separierung der G $_q$ Protein Untereinheiten, so lautet der Umkehrschluss, dass in Abwesenheit solcher Proteine, aktivierte G α_q und G β γ nicht vollständig dissoziieren, ähnlich wie es zuvor für G $_i$ Proteine vorgeschlagen wurde (Bünemann et al, 2003).

Weitere Hinweise für eine fortgesetzte Assoziation von G α_q und G β γ nach Aktivierung bietet eine Studie von Wedegaertner und Kollegen, die anhand von Mutationsstudien in HEK293 Zellen darauf hindeutet, dass an G α_q gebundenes G β γ entscheidend die Interaktion von aktivierten G α_q mit der PLC β 1 fördert (Evanko et al, 2005). In einer weiteren FRET-basierten Studie fanden sich ebenfalls Hinweise darauf, das G α_q und G β γ 2 nach Aktivierung nicht dissoziieren (Chisari et al, 2009).

4.4.2 Subzelluläre Lokalisation von RGS2

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit auch das Verhalten von RGS2 während der Agonistgabe beobachtet. In der TIRF Mikroskopie zeigte sich bei direkter Anregung von

RGS2-YFP lediglich eine Zunahme der YFP Emission von etwa 3 %. Die dabei beobachtete Kinetik unterschied sich wesentlich von der Aktivierungskinetik der $G\alpha_q$ /RGS2 Interaktion. Insgesamt zeigte sich in diesem System also keine wesentliche Translokation von RGS2 an die Membran nach Aktivierung. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie von Chidiac und Kollegen. In dieser Arbeit war die Rekrutierung von GFP getagtem RGS2 abhängig von der Expression von G_q oder Rezeptorproteinen (Roy et al, 2003). Die G-Protein Aktivierung spielte dabei keine wesentliche Rolle. Die Rekrutierung von RGS2 an die Membran wird als Folge der Zunahme und Affinität an Zielproteinen gedeutet. Deswegen schlagen Roy et al vor, dass die Interaktion zwischen diesen Proteinen stabil und unabhängig gegenüber dem Aktivierungszustand der G-Proteine sein müsste. Für die Hypothese der Komplexbildung von RGS2 und $G\alpha_q$ Protein fand sich in der vorliegenden Arbeit allerdings kein Hinweis. In den *acceptor photobleaching* Experimenten zwischen $G\alpha_q$ -CFP und RGS2-YFP zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollexperimenten zwischen $G\alpha_q$ -CFP und m-YFP. Wie bereits oben erwähnt, beweist jedoch ein negatives APB-Ergebnis nicht die Nicht-Existenz einer Proteininteraktion.

4.5 Methodendiskussion: TIRF-basiertes FRET-Imaging mit hoher zeitlicher Auflösung

Als Neuerung wurden in der vorliegenden Arbeit dynamische FRET Messungen auf die TIRF Mikroskopie übertragen. Der Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) ermöglicht eine optische Methode, die auf strahlungsfreier Energieübertragung zwischen zwei Fluorophoren beruht, deren Exzitations- und Emissionspektren sich überlappen. Für den Energietransfer ist räumliche Nähe ($<100 \text{ \AA}$) und die relativen Orientierung der Fluorophore entscheidend. Die FRET Effizienz verringert sich mit der sechsfachen Potenz der Distanz der beiden Interaktionspartner und ist somit dazu prädestiniert, molekulare Interaktionen zu untersuchen (Wouters & Bastiaens, 2001).

Veränderungen im FRET Signal können die Kinetik von intermolekularen Proteininteraktionen in Echtzeit in lebenden Zellen sichtbar machen. FRET wurde bereits genutzt, um die Kinetik einer Reihe von GPCR abhängigen Signalwegen zu untersuchen, unter anderem vom $G_{i/o}$ - und G_s -System (Bünemann et al, 2003; Hein et al, 2006; Lohse et al, 2007) und auch für das G_q -System (Adjobo-Hermans et al, 2011; Jensen et al, 2009).

Die TIRF Mikroskopie (engl., *Total-Internal Reflection Fluorescence Microscopy*) nutzt eine evaneszente Welle, die entsteht, wenn der einfallende Lichtstrahl vollständig an der Glas-Wasser-Grenze reflektiert wird. Dieses evaneszente (lat. „verschwinden, sich verflüchtigen“) elektromagnetische Feld schwindet exponentiell mit dem Abstand zur Glas-Wasser-Grenze, also der Deckgläschenoberfläche, sodass nur eine dünne Schicht von etwa 100 nm oberhalb des Deckgläschens beleuchtet wird (Axelrod et al, 1984). TIRF ermöglicht so die exklusive Untersuchung von Proteinen an der Plasmamembran. Im Epifluoreszenz-Modus tragen sowohl zytosolische als auch Membran-gebundene Proteine zum Fluoreszenzsignal bei. Eine Rezeptor-induzierte Interaktion ist jedoch nur im Membran-gebundenen Protein-Pool zu erwarten. Aufgrund dessen besteht bei der Untersuchung solcher Interaktionen die Möglichkeit, dass das Signal der Membranpopulation bei Messungen im Epifluoreszenz-Modus im Hintergrundsignal der zytosolischen fluoreszierenden Proteine untergeht. Die zytosolisch vorliegenden Proteine bewirken dabei ein ungünstiges Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis in konventionellen FRET-Messungen.

Jedoch wurde die zeitliche Auflösung von FRET Messungen mit TIRF bislang noch nicht in den Subsekunden-Bereich gebracht. In dieser Arbeit wurde ratiometrisches FRET im TIRF Modus mit einer zeitlichen Auflösung im Bereich unter einer Sekunde gemessen. Dies bringt zwei Vorteile gegenüber der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie: (1) das Andocken und Ablösen von fluoreszierenden Proteinen an die Membran kann überwacht werden. Dies ermöglicht die Beobachtung von Translokationsvorgängen der Interaktionspartner nach Aktivierung. Diese Translokationsvorgänge sind zudem wichtig für die Beurteilung, ob die beobachteten Veränderungen im F_{YFP}/F_{CFP} Ratio Veränderungen im FRET oder der lokalen Proteinkonzentration widerspiegeln.

(2) Darüber hinaus reduziert die exklusive Messung von FRET an der Plasmamembran im TIRF Modus die Variabilität der gemessenen FRET Amplituden, da die nicht an der Interaktion teilnehmenden zytosolischen Proteinpools ausgespart werden. Zum einem vermindert dies das Hintergrundsignal, zum anderen wird unspezifisches FRET-Signal, das durch Akkumulation der exprimierten Protein in intrazellulären Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum entsteht, nicht miterfasst (Fernández-Duenas et al, 2012). Abbildung 24 zeigt eine schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Methode.

Probleme zeigten sich vor allem bei den Messungen der Aktivierungsphase der Protein-Protein Interaktion. Zum einem sind die Aktivierungsprozesse offensichtlich so schnell, dass eine noch höhere zeitliche Auflösung wünschenswert wäre, v.a. um eine mögliche Beschleunigung der Aktivierungskinetik durch GTPase aktivierende Proteine zu detektieren. Hier setzte jedoch v.a. das rasche Ausbleichen der Fluorophore bei Erhöhung der Belichtungsfrequenz Grenzen. Desweiteren war mit dem vorhandenen experimentellen Setup keine Messung der Latenz zwischen Agonistgabe und resultierendem FRET Signal möglich. Hierfür fehlte die technische Möglichkeit der zeitlich synchronisierten Agonistgabe.

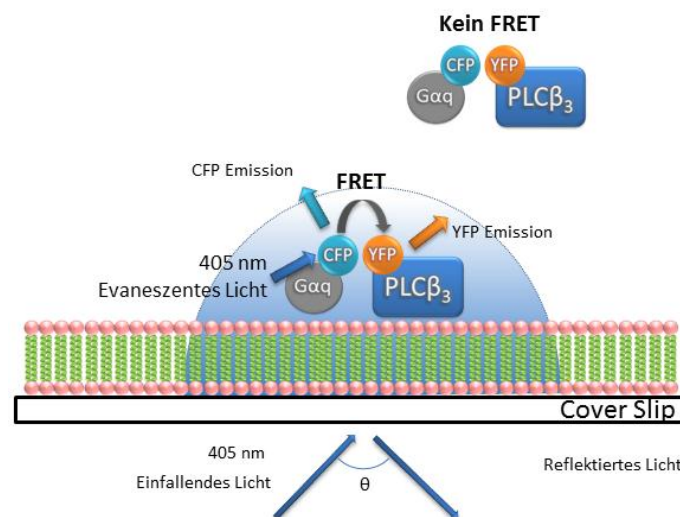


Abbildung 24 TIRF-FRET. Schematische Darstellung der TIRF-FRET Methode. Die Total-internal reflection fluorescense (TIRF)-fluorescence resonance energy Transfer (FRET) Mikroskopie ermöglicht die

zeitgleiche Untersuchung mehrerer Moleküle an Zellmembranen lebender Zellen in hoher zeitlicher und örtlicher Auflösung. Übertrifft der einfallende Lichtstrahl den Winkel ϑ , wird das Licht komplett reflektiert. Dabei wird ein evaneszentes Feld generiert, dessen Licht exponentiell abfällt und ca. 100 nm in die Zelle penetriert. Dieses Feld kann ein Fluorophor an den Zellmembran und der unmittelbaren Umgebung anregen. Finden Protein-Protein Interaktionen statt, kann ein FRET Signal gemessen werden. Proteine, die im Inneren der Zelle akkumulieren können die Messung nicht beeinflussen, wodurch ein besserer Kontrast und eine höhere Genauigkeit erreicht werden (nach Fernández-Duenas et al, 2012).

Zusammenfassend ermöglichte die Kombination von TIRF-basiertem FRET-Imaging mit einem schnellen Lösungsaustausch-System die Messung von Protein-Protein Interaktionen meines Wissens erstmals in Subsekunden-Auflösung. Das bedeutet eine deutliche Ausweitung von FRET-Methoden in der TIRF-Mikroskopie im Vergleich zu bislang vorliegenden Studien (Riven et al, 2003).

4.6 Ausblick

Gerade durch die Auflösung der dreidimensionalen Struktur des $G\alpha_q/PLC\beta_3$ -Komplexes (Waldo et al, 2010) sind in letzter Zeit große Fortschritte im Verständnis der Interaktion von G_q Proteinen und der Phospholipase gelungen. Die spannende Frage nach Auflösung einer solchen Momentaufnahme bleibt, wie all dies dynamisch in Echtzeit ineinander greift.

Während der zeitliche Verlauf einiger Interaktionen des $G_q/PLC\beta$ -Signalweges offenbar wurde, können andere Aspekte der Organisation dieses Signalweges nur vermutet werden: So konnte die Frage, ob $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ die $PLC\beta_3$ gleichzeitig binden nicht direkt beantwortet werden. Auch die Frage, ob RGS2 tatsächlich zur vollständigen Separierung der G_q Protein Untereinheiten führt, bleibt offen. Interessant bleibt auch, welche Bedeutung die hier erstmals beobachtete Interaktion von $G\beta\gamma$ mit der $PLC\beta$ nach Aktivierung von G_q Proteinen unter physiologischen Umständen hat. Es stellt sich auch die Frage, welche Rolle dabei die Organisation der Zellmembran in Mikrokompimente spielt.

Andere Fragen, die seit Jahrzehnten diskutiert werden, stellt Ross auch noch 2011 (Ross, 2011): Warum entwickelt sich ein Signalweg, in dem ein nachgeordneter Effektor seinen eigenen Aktivator abschaltet? Wie stehen Rezeptoraktivierung und die rasche Hydrolyse-Rate im Gleichgewicht?

Um diese Fragen anzugehen und insbesondere auch das lange diskutierte Model des *kinetic scaffolding* weiter zu prüfen, wäre es sicherlich notwendig auch die Dynamik der Rezeptoraktivierung und Rezeptor/ G-Protein-Interaktion zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Die G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β) stellt einen primären Mechanismus dar, um eine Vielzahl von physiologischen Ereignissen zu regulieren, z.B. die Kontraktion glatter Muskelzellen, Sekretion oder die Modulation der synaptischen Transmission. Sowohl G α_q - als auch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten sind dafür bekannt mit PLC β Enzymen zu interagieren und diese zu aktivieren. Über die Dynamik dieser Interaktion und den relative Beitrag der G-Protein Untereinheiten ist jedoch nur wenig bekannt. Unter Verwendung Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-basierter Methoden in lebenden Zellen, wurde die Kinetik der Rezeptor-induzierten Interaktion zwischen G $\beta\gamma$ und G α_q Untereinheiten, die Interaktion von sowohl der G α_q als auch der G $\beta\gamma$ -Untereinheit mit der PLC β_3 und die Interaktion des *regulator of G-Protein signaling 2* (RGS2) mit G α_q -Untereinheiten untersucht. Um die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion auf die Zellmembran zu beschränken, wurde die *Total-Internal Reflection Fluorescence* (TIRF) Mikroskopie angewandt. Zeitlich hoch auflösendes, ratiometrisches FRET-Imaging offenbarte eine deutlich schnellere Dissoziation von G α_q und PLC β_3 nach Entzug purinerge Agonisten verglichen mit der Deaktivierung von G $_q$ Proteinen in der Abwesenheit der PLC β_3 . Dieser offensichtliche Unterschied in der Kinetik kann durch die GTPase-aktivierende Eigenschaft der PLC β_3 in lebenden Zellen erklärt werden. Weiterhin zeigte es sich, dass PLC β_3 die G $_q$ Protein Kinetik in einem ähnlich Ausmaß beeinflusst wie RGS2, welches *in vitro* deutlich effizienter darin ist, die intrinsische GTPase Aktivität der G α_q -Untereinheit zu beschleunigen. Als Antwort auf die Rezeptorstimulation wurde sowohl eine Interaktion von G α_q -Untereinheiten als auch von G $_q$ -abstammende G $\beta\gamma$ -Untereinheiten mit der PLC β_3 beobachtet. Darüber hinaus zeigte sich auch eine Agonist-abhängige Interaktion von G α_q und RGS2. In Abwesenheit einer Rezeptorstimulation konnte kein spezifisches FRET-Signal zwischen G $_q$ Proteinen und der PLC β_3 oder RGS2 detektiert werden. Zusammengefasst ermöglichte das ratiometrische FRET-Imaging in der TIRF Mikroskopie neue Einsichten in die Dynamik und Interaktionsmuster des G $_q$ -Signalwegs.

6. Anhang

6.1 Macro für *ImageJ* zur Stapelung von Bildern der YFP- und CFP-Emission

Crop_YFPCFP

```
run("Set Measurements...", "area integrated redirect=None decimal=0");
run("Set Scale...", "distance=0 known=1 pixel=1 unit=pixel");
run("Duplicate...", "title=DD duplicate");
makeRectangle(262, 12, 249, 235);
run("Crop");
rename("YFP");
run("Save", "save=C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\YFP.tif");
close();
makeRectangle(263, 275, 249, 235);
run("Crop");
rename("CFP");
open("C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\YFP.tif");
run("Concatenator ", "stack1=YFP.tif stack2=CFP title=[YFP-CFP]");
```

6.2 Macro für *ImageJ* zur Generierung ratiometrischer TIRF-Bilder

Um eine manuelle Korrektur des Hintergrundes zu ermöglichen, wurde das Protokoll in drei Schritte untergliedert:

Ratio 1

Isoliert das YFP- und CFP-Bild und ermittelt das zu subtrahierende Hintergrundsignal im CFP-Bild.

```
run("Set Measurements...", "mean redirect=None decimal=0");
run("Set Scale...", "distance=0 known=1 pixel=1 unit=pixel");
run("Duplicate...", "title=DD duplicate");
makeRectangle(262, 12, 250, 235);
```

```
run("Crop");
rename("YFP");
run("Save", "save=C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\ratio\\YFP.tif");
close();
makeRectangle(237, 277, 250, 235);
run("Crop");
rename("CFP");
makeRectangle(1, 1, 50, 50);
run("Measure Stack");
run("Select None");
String.copyResults();
run("Subtract...");
```

Ratio 2

Ermittelt das zu subtrahierende Hintergrundsignal im YFP-Bild.

```
run("Save", "save=C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\ratio\\CFP.tif");
close();
open("C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\ratio\\YFP.tif");
makeRectangle(1, 1, 50, 50);
run("Measure Stack");
run("Select None");
String.copyResults();
run("Subtract...");
```

Ratio 3

```
run("Duplicate...", "title=YFP-1.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setAutoThreshold();
run("Convert to Mask");
```

```

setThreshold(255, 255);
run("Invert LUT");
run("Divide...", "value=255");
imageCalculator("Multiply create 32-bit", "YFP.tif", "YFP-1.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=YFP.tif operation=Multiply image2=YFP-1.tif
create 32-bit");
run("Save", "save=C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\ratio\\maskYFP.tif");
close();
close();
close();
open("C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\ratio\\CFP.tif");
run("Duplicate...", "title=CFP-1.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setAutoThreshold();
run("Convert to Mask");
setThreshold(255, 255);
run("Invert LUT");
run("Divide...", "value=255");
imageCalculator("Multiply create 32-bit", "CFP-1.tif", "CFP.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=CFP-1.tif operation=Multiply image2=CFP.tif
create 32-bit");
run("Save", "save=C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\ratio\\maskCFP.tif");
close();
close();
close();
open("C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\ratio\\maskCFP.tif");
run("Duplicate...", "title=maskCFP-1.tif");
run("Multiply...", "value=0.9");
open("C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\ratio\\maskYFP.tif");

```

```
imageCalculator("Subtract create 32-bit", "maskYFP.tif", "maskCFP-1.tif");  
//run("Image Calculator...", "image1=maskYFP.tif operation=Subtract  
image2=maskCFP-1.tif create 32-bit");  
rename("nakedFRET");  
imageCalculator("Divide create 32-bit", "nakedFRET", "maskCFP.tif");  
//run("Image Calculator...", "image1=nakedFRET operation=Divide image2=maskCFP.tif  
create 32-bit");  
run("Save", "save=C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\ratio\\Ratio.tif");  
close();  
close();  
close();  
close();  
close();  
open("C:\\Users\\Thomas\\Desktop\\ratio\\Ratio.tif");  
run("16_colors");  
run("Brightness/Contrast...");
```

7. Literaturverzeichnis

Adjobo-Hermans M, Goedhart J, van Weeren L, Nijmeijer S, Manders E, Offermanns S, Gadella T (2011) Real-time visualization of heterotrimeric G protein Gq activation in living cells. *BMC Biology* **9**(1): 32

Adjobo-Hermans MJW, Goedhart J, Gadella TWJ, Jr (2008) Regulation of PLC β 1a membrane anchoring by its substrate phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate. *J Cell Sci* **121**(22): 3770-3777

Ando K, Obara Y, Sugama J, Kotani A, Koike N, Ohkubo S, Nakahata N (2010) P2Y2 Receptor-Gq/11 Signaling at Lipid Rafts Is Required for UTP-Induced Cell Migration in NG 108-15 Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **334**(3): 809-819

Anger T, Zhang W, Mende U (2004) Differential Contribution of GTPase Activation and Effector Antagonism to the Inhibitory Effect of RGS Proteins on Gq-mediated Signaling *in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **279**(6): 3906-3915

Axelrod D, Burghardt TP, Thompson NL (1984) Total Internal Reflection Fluorescence. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **13**(1): 247-268

Bansal G, Druey KM, Xie Z (2007) R4 RGS proteins: Regulation of G-protein signaling and beyond. *Pharmacology & Therapeutics* **116**(3): 473-495

Barr AJ, Ali H, Haribabu B, Snyderman R, Smrcka AV (2000) Identification of a Region at the N-Terminus of Phospholipase C- β 3 That Interacts with G Protein β gamma Subunits *Biochemistry* **39**(7): 1800-1806

Berridge MJ (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* **220**: 345-360

Berstein G, Blank J, John D, Exton J, Rhee S, Ross E (1992) Phospholipase C- β 1 is a GTPase-activating protein for G_{q/11}, its physiologic regulator. *Cell* **70**(3): 411-418

Bhatnagar A, Sheffler DJ, Kroeze WK, Compton-Toth B, Roth BL (2004) Caveolin-1 Interacts with 5-HT_{2A} Serotonin Receptors and Profoundly Modulates the Signaling of Selected G_q-coupled Protein Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **279**(33): 34614-34623

Biddlecome GH, Berstein G, Ross EM (1996) Regulation of Phospholipase C- β 1 by G_q and m1 Muscarinic Cholinergic Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **271**(14): 7999-8007

Birbaumer N, Kurtz A, Scharl M, Schmidt R, Unsicker K (eds) (2003) *Lehrbuch der Vorklinik: Anatomie, Biochemie und Physiologie der Zelle*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag

Bruheim S, Krobot KA, Andressen KW, Levy FO (2003) Unaltered Agonist Potency upon Inducible 5-HT₇(a) but not 5-HT₄(b) Receptor Expression Indicates Agonist-Independent Association of 5-HT₇(a) Receptor and Gs. *Receptors and Channels* **9**: 107-116

Bünemann M, Frank M, Lohse MJ (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(26): 16077-16082

Bünemann M, Hosey MM (1998) Regulators of G Protein Signaling (RGS) Proteins Constitutively Activate G_{βγ}-gated Potassium Channels. *J Biol Chem* **273**(47): 31186-31190

Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE (2003) Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocr Rev* **24**(6): 765-781

Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker P, Gierschick P. (1992) Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β_2 by G protein $\beta\gamma$ -subunits. *Nature* **360**: 684-686

Chidiac P, Ross EM (1999) Phospholipase C- β_1 Directly Accelerates GTP Hydrolysis by G α_q and Acceleration Is Inhibited by G $\beta\gamma$ Subunits. *J Biol Chem* **274**(28): 19639-19643

Chisari M, Saini DK, Cho J-H, Kalyanaraman V, Gautam N (2009) G Protein Subunit Dissociation and Translocation Regulate Cellular Response to Receptor Stimulation. *PLoS ONE* **4**(11): e7797

Cifuentes ME, Honkanen L, Rebecchi MJ (1993) Proteolytic fragments of phosphoinositide-specific phospholipase C- δ_1 . Catalytic and membrane binding properties. *Journal of Biological Chemistry* **268**(16): 11586-11593

Clapham D, Neer E (1993) New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**: 403-406

Clapham DE, Neer EJ (1997) G Protein $\beta\gamma$ Subunits. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **37**(1): 167-203

Cook B, Bar-Yaacov M, Cohen Ben-Ami H, Goldstein RE, Paroush Ze, Selinger Z, Minke B (2000) Phospholipase C and termination of G-protein-mediated signalling in vivo. *Nat Cell Biol* **2**(5): 296-301

Cui S, Ho W-K, Kim S-T, Cho H (2010) Agonist-induced Localization of Gq-coupled Receptors and G Protein-gated Inwardly Rectifying K⁺ (GIRK) Channels to Caveolae Determines Receptor Specificity of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **285**(53): 41732-41739

Digby GJ, Lober RM, Sethi PR, Lambert NA (2006) Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(47): 17789-17794

Dorsch S, Klotz K-N, Engelhardt S, Lohse MJ, Bunemann M (2009) Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat Meth* **6**(3): 225-230

Doupnik CA, Davidson N, Lester HA, Kofuji P (1997a) RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of G $\beta\gamma$ -activated inwardly rectifying K⁺-channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(19): 10461-10466

Doupnik CA, Davidson N, Lester HA, Kofuji P (1997b) RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of G $\beta\gamma$ -activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(19): 10461-10466

Dowal L, Elliott J, Popov S, Wilkie TM, Scarlata S (2001) Determination of the Contact Energies between a Regulator of G Protein Signaling and G Protein Subunits and Phospholipase C β 1. *Biochemistry* **40**(2): 414-421

Dowal L, Provitera P, Scarlata S (2006) Stable Association between G α q and Phospholipase C β 1 in Living Cells. *J Biol Chem* **281**(33): 23999-24014

Drastichova Z, Novotny J (2012) Identification of a Preassembled TRH Receptor-Gq/11 Protein Complex in HEK293 Cells. *Cell Structure and Function* **37**(1): 1-12

Drin G, Scarlata S (2007) Stimulation of phospholipase C β by membrane interactions, interdomain movement, and G protein binding -- How many ways can you activate an enzyme? *Cellular Signalling* **19**(7): 1383-1392

Essen L-O, Perisic O, Cheung R, Katan M, Williams RL (1996) Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C δ . *Nature* **380**(6575): 595-602

Evanko DS, Thiyagarajan MM, Takida S, Wedegaertner PB (2005) Loss of association between activated G α q and G $\beta\gamma$ disrupts receptor-dependent and receptor-independent signaling. *Cellular Signalling* **17**(10): 1218-1228

Fernández-Duenas V, Llorente J, Gandia J, Borroto-Escuela DO, Agnati LF, Tasca CI, Fuxe K, Ciruela F (2012) Fluorescence resonance energy transfer-based technologies in the study of protein-protein interactions at the cell surface. *Methods*(0)

Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang C-S, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE (1998) Molecular Basis for Interactions of G Protein β Subunits with Effectors. *Science* **280**(5367): 1271-1274

Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **437**(1-2): 55-75

Frank M, Thümer L, Lohse MJ, Bünemann M (2005) G Protein Activation without Subunit Dissociation Depends on a $G\alpha_i$ -specific Region. *Journal of Biological Chemistry* **280**(26): 24584-24590

Gu SC, Carlo; Wang, Sean; Heximer, Scott P.; (2009) RGS proteins: identifying new GAPs in the understanding of blood pressure regulation and cardiovascular function. *Clin Sci* **116**: 391-399

Gurley SB, Griffiths RC, Mendelsohn ME, Karas RH, Coffman TM (2010) Renal Actions of RGS2 Control Blood Pressure. *Journal of the American Society of Nephrology* **21**(11): 1847-1851

Gutman O, Walliser C, Piechulek T, Gierschik P, Henis YI (2009) Differential regulation of phospholipase C- β_2 activity and membrane interaction by $G\alpha_q$, $G\beta_1\gamma_2$, and Rac2. *Journal of Biological Chemistry*: -

Harden TK, Waldo GL, Hicks SN, Sondek J (2011) Mechanism of Activation and Inactivation of Gq/Phospholipase C-beta Signaling Nodes. *Chemical Reviews* **111**(10): 6120-6129

Hein P, Bünemann M (2009) Coupling mode of receptors and G proteins. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **379**(5): 435-443

Hein P, Frank M, Hoffmann C, Lohse MJ, Bunemann M (2005) Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *EMBO J* **24**(23): 4106-4114

Hein P, Rochais F, Hoffmann C, Dorsch S, Nikolaev VO, Engelhardt S, Berlot CH, Lohse MJ, Bunemann M (2006) GS Activation Is Time-limiting in Initiating Receptor-mediated Signaling. *J Biol Chem* **281**(44): 33345-33351

Hepler JR, Gilman AG (1992) G proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **17**(10): 383-387

Heximer S, Srinivasa S, Bernstein L, Bernard J, Linder M, Hepler J, Blumer K (1999) G Protein Selectivity Is a Determinant of RGS2 Function *J Biol Chem* **274**: 34253-34259

Heximer SP, David PS (2004) RGS2-Mediated Regulation of Gq[alpha]. In *Methods in Enzymology* Vol. Volume 390, pp 65-82. Academic Press

Heximer SP, Knutsen RH, Sun X, Kaltenbronn KM, Rhee M-H, Peng N, Oliveira-dos-Santos A, Penninger JM, Muslin AJ, Steinberg TH, Wyss JM, Mecham RP, Blumer KJ (2003) Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation* **111**(4): 445-452

Heximer SP, Watson N, Linder ME, Blumer KJ, Hepler JR (1997) RGS2/GOS8 is a selective inhibitor of Gq α function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(26): 14389-14393

Hubbard KB, Hepler JR (2006) Cell signalling diversity of the Gq[alpha] family of heterotrimeric G proteins. *Cellular Signalling* **18**(2): 135-150

Ingi T, Krumins AM, Chidiac P, Brothers GM, Chung S, Snow BE, Barnes CA, Lanahan AA, Siderovski DP, Ross EM, Gilman AG, Worley PF (1998) Dynamic Regulation of RGS2 Suggests a Novel Mechanism in G-Protein Signaling and Neuronal Plasticity. *J Neurosci* **18**(18): 7178-7188

Jensen J, Lyssand J, Hague C, Hille B (2009) Fluorescence Changes Reveal Kinetic Steps of Muscarinic Receptor-Mediated Modulation of Phosphoinositides and Kv7.2/7.3 K⁺ Channels. *J Gen Physiol*

Jezyk MR, Snyder JT, Gershberg S, Worthylake DK, Harden TK, Sondek J (2006) Crystal structure of Rac1 bound to its effector phospholipase C- β 2. *Nat Struct Mol Biol* **13**(12): 1135-1140

Katan M (1998) Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1436**(1-2): 5-17

Kehrl JH (1998) Heterotrimeric G Protein Signaling: Roles in Immune Function and Fine-Tuning by RGS Proteins. *Immunity* **8**(1): 1-10

Kehrl JH, Sinnarajah S (2002) RGS2: a multifunctional regulator of G-protein signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34**(5): 432-438

Kimple AJ, Soundararajan M, Hutsell SQ, Roos AK, Urban DJ, Setola V, Temple BRS, Roth BL, Knapp S, Willard FS, Siderovski DP (2009) Structural determinants of G-protein alpha subunit selectivity by regulator of G-protein signaling 2(RGS2). *J Biol Chem*: M109.024711

Kobilka BK (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**(4): 794-807

Kozasa T, Hepler JR, Smrcka AV, Simon MI, Rhee SG, Sternweis PC, Gilman AG (1993) Purification and characterization of recombinant G16 alpha from Sf9 cells: activation of purified phospholipase C isozymes by G-protein {alpha} subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(19): 9176-9180

Kuang Y, Wu Y, Smrcka A, Jiang H, Wu D (1996) Identification of a phospholipase C {beta}2 region that interacts with G{beta-gamma}. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(7): 2964-2968

Ladds G, Goddard A, Hill C, Thornton S, Davey J (2007) Differential effects of RGS proteins on G{alpha}_q and G{alpha}₁₁ activity. *Cellular Signalling* **19**(1): 103-113

Lambert NA, Johnston CA, Cappell SD, Kuravi S, Kimple AJ, Willard FS, Siderovski DP (2010) Regulators of G-protein Signaling accelerate GPCR signaling kinetics and govern sensitivity solely by accelerating GTPase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(15): 7066-7071

Logothetis D, Kurachi, Y., Galper, J., Neer, EJ., Clapham DE. (1987) The {betagamma} subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* **325**: 321-326

Lohse MJ, Hoffmann C, Nikolaev VO, Vilardaga J, BÜnemann M, Stephen RS (2007) Kinetic Analysis of G Protein-Coupled Receptor Signaling Using Fluorescence Resonance Energy Transfer in Living Cells. In *Advances in Protein Chemistry* Vol. Volume 74, pp 167-188. Academic Press

McCudden C, Hains M, Kimple R, Siderovski D, Willard F (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**(5): 551-577

Milligan G, Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology* **147**(S1): S46-S55

Mizuno N, Itoh H (2009) Functions and Regulatory Mechanisms of Gq-Signaling Pathways. *Neurosignals* **17**(1): 42-54

Morris AJ, Scarlata S (1997) Regulation of effectors by G-protein [alpha]- and [beta][gamma]-Subunits : Recent insights from studies of the phospholipase C-[beta] isoenzymes. *Biochemical Pharmacology* **54**(4): 429-435

Mukhopadhyay S, Ross EM (1999) Rapid GTP binding and hydrolysis by G_q promoted by receptor and GTPase-activating proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(17): 9539-9544

Murthy KS, Coy DH, Makhoul GM (1996) Somatostatin Receptor-mediated Signaling in Smooth Muscle. *Journal of Biological Chemistry* **271**(38): 23458-23463

Oh P, Schnitzer JE (2001) Segregation of Heterotrimeric G Proteins in Cell Surface Microdomains. G_q Binds Caveolin to Concentrate in Caveolae, whereas G_i and G_s Target Lipid Rafts by Default. *Mol Biol Cell* **12**(3): 685-698

Oldham WM, Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 60-71

Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG (1993) Activation of phospholipase C isozymes by G protein {beta gamma} subunits. *Journal of Biological Chemistry* **268**(7): 4573-4576

Paulssen RH, Woodson J, Liu Z, Ross EM (1996) Carboxyl-terminal Fragments of Phospholipase C- β 1 with Intrinsic G_q GTPase-activating Protein (GAP) Activity. *Journal of Biological Chemistry* **271**(43): 26622-26629

Philip F, Kadamur G, Silos RG, Woodson J, Ross EM (2010) Synergistic Activation of Phospholipase C- β 3 by G α _q and G $\beta\gamma$ Describes a Simple Two-State Coincidence Detector. *Current Biology* **20**(15): 1327-1335

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 639-650

Qin K, Dong C, Wu G, Lambert NA (2011) Inactive-state preassembly of G_q-coupled receptors and G_q heterotrimers. *Nat Chem Biol* **7**(10): 740-747

Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah STA, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK (2011) Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**(7366): 549-555

Razzini G, Brancaccio A, Lemmon MA, Guarnieri S, Falasca M (2000) The Role of the Pleckstrin Homology Domain in Membrane Targeting and Activation of Phospholipase C β 1. *J Biol Chem* **275**(20): 14873-14881

Rebecchi MJ, Pentylala SN (2000) Structure, Function, and Control of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C. *Physiol Rev* **80**(4): 1291-1335

Rebres RA, Roach TIA, Fraser IDC, Philip F, Moon C, Lin K-M, Liu J, Santat L, Cheadle L, Ross EM, Simon MI, Seaman WE (2010) Synergistic Ca²⁺ responses by G α _i- and G α _q-coupled GPCRs require a single PLC β isoform that is sensitive to both G $\beta\gamma$ and G α _q. *Journal of Biological Chemistry*

- Rhee SG (2001) Regulation of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C. *Annual Review of Biochemistry* **70**(1): 281-312
- Riven I, Iwanir S, Reuveny E (2006) GIRK Channel Activation Involves a Local Rearrangement of a Preformed G Protein Channel Complex. *Neuron* **51**(5): 561-573
- Riven I, Kalmanzon E, Segev L, Reuveny E (2003) Conformational Rearrangements Associated with the Gating of the G Protein-Coupled Potassium Channel Revealed by FRET Microscopy. *Neuron* **38**(2): 225-235
- Romoser V, Ball R, Smrcka AV (1996) Phospholipase C β 2 Association with Phospholipid Interfaces Assessed by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Journal of Biological Chemistry* **271**(41): 25071-25078
- Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**(7245): 356-363
- Ross EM (2011) G α q and Phospholipase C- β : Turn On, Turn Off, and Do It Fast. *Sci Signal* **4**(159): pe5-
- Ross EM, Wilkie TM (2000) GTPase-Activating Proteins for Heterotrimeric G Proteins: Regulators of G Protein Signaling (RGS) and RGS-Like Proteins. *Annual Review of Biochemistry* **69**(1): 795-827
- Roy AA, Lemberg KE, Chidiac P (2003) Recruitment of RGS2 and RGS4 to the Plasma Membrane by G Proteins and Receptors Reflects Functional Interactions. *Molecular Pharmacology* **64**(3): 587-593
- Roy AA, Nunn C, Ming H, Zou M-X, Penninger J, Kirshenbaum LA, Dixon SJ, Chidiac P (2006) Up-regulation of Endogenous RGS2 Mediates Cross-desensitization between G $_s$ and G $_q$ Signaling in Osteoblasts. *J Biol Chem* **281**(43): 32684-32693
- Sadja R, Alagem N, Reuveny E (2003) Gating of GIRK Channels: Details of an Intricate, Membrane-Delimited Signaling Complex. *Neuron* **39**(1): 9-12
- Saitoh O, Kubo Y, Miyatani Y, Asano T, Nakata H (1997) RGS8 accelerates G-protein-mediated modulation of K⁺ currents. *Nature* **390**(6659): 525-529
- Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krausz N, Choe H-W, Hofmann KP, Ernst OP (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**(7212): 497-502
- Shi C-S, Lee SB, Sinnarajah S, Dessauer CW, Rhee SG, Kehrl JH (2001) Regulator of G-protein Signaling 3 (RGS3) Inhibits G $\beta\gamma$ -induced Inositol Phosphate Production,

Mitogen-activated Protein Kinase Activation, and Akt Activation. *Journal of Biological Chemistry* **276**(26): 24293-24300

Sierra DA, Popov S, Wilkie TM (2000) Regulators of G-protein Signaling in Receptor Complexes. *Trends in Cardiovascular Medicine* **10**(6): 263-268

Simon M, Strathmann M, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**(5007): 802-808

Sjögren B, Blazer LL, Neubig RR, Charles AL (2010) Chapter 4 - Regulators of G Protein Signaling Proteins as Targets for Drug Discovery. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* Vol. Volume 91, pp 81-119. Academic Press

Smrcka A (2008) G protein $\beta\gamma$ subunits. Central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci*

Smrcka AV SP (1993) Regulation of Purified Subtypes of Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C β by G Protein α and $\beta\gamma$ Subunits. *The Journal of Biological Chemistry* **268**(13): 9667

Stewart A, Huang J, Fisher RA (2012) RGS proteins in heart: brakes on the vagus. *Frontiers in Physiology* **3**

Suh B-C, Hille B (2008) PIP2 Is a Necessary Cofactor for Ion Channel Function: How and Why? *Annual Review of Biophysics* **37**(1): 175-195

Suh P, Park J, Mazoli L, Cocco L, Peak J, Katan M, Fukami K, Kataoka T, Yun S, Ryu S (2008) Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* **41**(6): 415-434

Sun Y, Wallrabe H, Booker CF, Day RN, Periasamy A (2010) Three-Color Spectral FRET Microscopy Localizes Three Interacting Proteins in Living Cells. *Biophysical Journal* **99**(4): 1274-1283

Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG, Exton JH (1991) Activation of the β_1 isozyme of phospholipase C by α subunits of the G $_q$ class of G proteins. *Nature* **350**(6318): 516-518

Tesmer JJG, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR (1997) Structure of RGS4 Bound to AlF $_4^-$ -Activated G α_1 : Stabilization of the Transition State for GTP Hydrolysis. *Cell* **89**(2): 251-261

Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, Tesmer JJG (2005) Snapshot of Activated G Proteins at the Membrane: The G α_q -GRK2-G $\beta\gamma$ Complex. *Science* **310**(5754): 1686-1690

- Tsang S, Woo AY-H, Zhu W, Xia R-P (2010) Deregulation of RGS2 in cardiovascular diseases. *Front Biosci (Schol Ed)* **2**(547)
- Turcotte M, Tang W, Ross EM (2008) Coordinate Regulation of G Protein Signaling via Dynamic Interactions of Receptor and GAP. *PLoS Comput Biol* **4**(8): e1000148
- Tuteja N (2009) Signaling through G protein coupled receptors. *Plant signaling & behavior* **4**(10): 942-947
- Vanhouwe JF, Thomas TO, Minshall RD, Tirupathi C, Li A, Gilchrist A, Yoon E-j, Malik AB, Hamm HE (2002) Thrombin Receptors Activate G_o Proteins in Endothelial Cells to Regulate Intracellular Calcium and Cell Shape Changes. *Journal of Biological Chemistry* **277**(37): 34143-34149
- Waldo GL, Harden TK (2004) Agonist Binding and Gq-Stimulating Activities of the Purified Human P2Y₁ Receptor. *Molecular Pharmacology* **65**(2): 426-436
- Waldo GL, Ricks TK, Hicks SN, Cheever ML, Kawano T, Tsuboi K, Wang X, Montell C, Kozasa T, Sondek J, Harden TK (2010) Kinetic Scaffolding Mediated by a Phospholipase C- β and G_q Signaling Complex. *Science* **330**(6006): 974-980
- Wang T, Pentylala S, Rebecchi MJ, Scarlata S (1999) Differential Association of the Pleckstrin Homology Domains of Phospholipases C- β 1, C- β 2, and C- δ 1 with Lipid Bilayers and the $\beta\gamma$ Subunits of Heterotrimeric G Proteins. *Biochemistry* **38**(5): 1517-1524
- Willars GB (2006) Mammalian RGS proteins: Multifunctional regulators of cellular signalling. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **17**(3): 363-376
- Wouters FS, Bastiaens PIH (2001) *Imaging Protein-Protein Interactions by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy*: John Wiley & Sons, Inc.
- Xia Z, Liu Y (2001) Reliable and Global Measurement of Fluorescence Resonance Energy Transfer Using Fluorescence Microscopes. *Biophysical Journal* **81**(4): 2395-2402
- Yin HL, Janmey PA (2003) PHOSPHOINOSITIDE REGULATION OF THE ACTIN CYTOSKELETON. *Annual Review of Physiology* **65**(1): 761-789
- Zhu X, Birnbaumer L (1996) G protein subunits and the stimulation of phospholipase C by G_s- and G_i-coupled receptors: Lack of receptor selectivity of G α ₁₆ and evidence for a synergic interaction between G $\beta\gamma$ and the α subunit of a receptor activated G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(7): 2827-2831

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	G_q-abhängige Signalwege (nach Schmidt et al, 2005)	4
Abb. 2	Der G-Protein Zyklus (nach McCudden et al, 2004)	8
Abb. 3	Struktur und Interaktionen der PLCβ (nach Drin & Scarlata, 2007; Waldo et al, 2010)	10
Abb. 4	Modell der Aktivierung der PLCβ3 durch aktiviertes Gα_q (nach Waldo et al, 2010)	13
Abb. 5	Kinetic Scaffolding: Einfluss von GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) auf den G-Protein Zyklus (nach Biddlecome et al, 1996)	15
Abb. 6	Vergleich der Lokalisation der fluoreszierenden Proteine in konfokaler und TIRF-Mikroskopie	33
Abb. 7	Interaktion von Gα_q-CFP und YFP-PLCβ3 gemessen mittels FRET	35
Abb. 8	Agonist abhängige und unabhängige Interaktion von Gα_q und der PLCβ3	37
Abb. 9	Änderung in der Membranlokalisation der PLCβ3 nach Agoniststimulation	39
Abb. 10	Agonist-abhängiges FRET-Signal für G_q Proteine	40
Abb. 11	Vergleich der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik der Interaktion von Gα_q-YFP/CFP-Gy2 und Gα_q-CFP/YFP-PLCβ3	41
Abb. 12	Kinetik der Inteaktion von Gα_q-YFP und CFP-Gy2 unter dem Einfluss von GTPase aktivierenden Proteinen	43
Abb. 13	Interaktion von G_q-abhängigen βγ-Untereinheiten und der PLCβ3	45
Abb. 14	Kinetik der Interaktion G_q abhängiger Gβγ Untereinheiten und der PLCβ3	46
Abb. 15	Die interagierenden Gβγ Untereinheiten werden von G_q Proteinen Freigesetzt	47
Abb. 16	Effekt von RGS2 auf die Interaktionen von G_q Protein Untereinheiten und der PLCβ3	49
Abb. 17	Einfluss von RGS2 auf die Kinetik der Interaktion Gβγ/PLCβ3	50

Abb. 18	Nachweis von RGS2 in fixierten Zellen mittels Immunfluoreszenz	51
Abb. 19	Interaktion von $G\alpha_q$-CFP und RGS2-YFP	53
Abb. 20	Agonist-abhängige und –unabhängige Interaktion von $G\alpha_q$ und RGS2	54
Abb. 21	Kinetik der Interaktion von $G\alpha_q$-CFP und RGS“-YFP in Anwesenheit der PLCβ3	54
Abb. 22	Änderung in der Membranlokalisation von RGS2 nach Agoniststimulation	55
Abb. 23	Verteilung der Ergebnisse bei Messung von $t_{1/2}$ für die G_q Deaktivierung in Gegenwart von RGS4	69
Abb. 24	Schematische Darstellung der TIRF-FRET Methode <i>(nach Fernández-Duenas et al, 2012)</i>	77

Danksagung

Ich danke Prof. Moritz Bünemann, mir dieses Thema anzuvertrauen und mich seitdem fortwährend zu betreuen.

Ich danke Kerstin Hadamek für die Einarbeitung in die Molekularbiologie.

Ich danke Monika Frank für die Klonierung und Bereitstellung zahlreicher Plasmide.

Ich danke Markus Milde für die Einarbeitung in die Zellbiologie und Fluoreszenzmikroskopie und hilfreiche Diskussionen.

Ich danke meiner Frau Juana für ihre Geduld und Unterstützung.

Ich danke meiner Tochter Marie und meinem Sohn Henry für etwas weniger Geduld und viel Aufmunterung.

Ich danke meinen Eltern, die meinen gesamten Bildungsweg ermöglicht haben.

Ich danke Prof. Martin Lohse für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren.

Lebenslauf

Thomas Pollinger

verheiratet, 2 Kinder

geboren am 17. April 1985 in Erlenbach am Main.

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

seit 09/2012 Assistenzarzt an der Neurologischen Klinik, Klinikum
Aschaffenburg

STUDIENVERLAUF

2005-2012 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
2011/12 Praktisches Jahr am Klinikum Aschaffenburg, Wahlfach
Neurologie
2008-2010 Begleitstudiengang „Experimentelle Medizin“

WISSENSCHAFTLICHE VORTRÄGE

Dynamics of Gq protein interactions with PLC β 3 studied by TIRF Microscopy. Pollinger
T, Milde M, Frank M, Bünemann M, Biophysical Society 54th Annual Meeting, San
Francisco 2010

Spatiotemporal patterns of interaction of Gq protein subunits and phospholipase C β 3.
Pollinger T, Milde M, Frank M, Bünemann M, 51st Annual Meeting Deutsche
Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie,
Mainz 2010

SCHULAUSSBILDUNG

1995-2004 Hermann-Staudinger-Gymnasium in Erlenbach a.M.
1991-1995 Konrad-Wiegand-Volksschule, Klingenberg a.M.

Aschaffenburg, den 8. Februar 2013