

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

Regulation von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten  
durch  
Phosducin-ähnliche Proteine (PhLP)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von:

Christina Maria Bermel  
aus Jülich

Würzburg, Dezember 2005

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

Koreferent: Prof. Dr. med. Hermann Koepsell

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

17.Oktober 2006

Die Promovendin ist Ärztin.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.	Signalübertragung durch G-Proteine	1
2.	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	3
3.	Funktionsweise und Struktur der G-Proteine	6
3.1.	G-Proteinzyklus	6
3.2.	G-Protein $\alpha$ -Untereinheiten	9
3.3.	G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten	10
4.	G-Protein $\beta\gamma$ -abhängige Effektoren	11
5.	Regulatoren der G-Proteine	13
5.1.	Phosducin	14
5.2.	Phosducin-like-Protein (PhLP)	16
6.	Caseinkinase 2	20
7.	Zielsetzung dieser Arbeit	20
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>1.</b>	<b>Material</b>	<b>22</b>
1.1.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	22
1.2.	Enzyme	23
1.3.	Biologisches Material	23
1.3.1.	Bakterienstämme	23
1.3.2.	Zelllinien	24
1.3.3.	Plasmide	24
1.3.4.	Oligonukleotidprimer	25
1.3.5.	Antikörper	27
1.4.	Medien und Puffer	28
1.4.1.	Medien für die Kultur von E.coli	28
1.4.2.	Medien für die Kultur von HEK 293-Zellen	28

1.4.3. Allgemeine Puffer	28
<b>2. Methoden</b>	<b>29</b>
2.1. Kultur von Bakterien und Zellen	29
2.1.1. Kultur von <i>E. coli</i>	29
2.1.2. Kultur eukaryontischer Zellen (HEK 293-Zellen)	29
2.2. Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1. Amplifizierung von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.2.2. Auftrennung und Reinigung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.3. Extraktion von DNA aus Agarosegel	32
2.2.4. Enzymatische Behandlung von DNA	33
2.2.4.1. Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen	33
2.2.4.2. 5'-Dephosphorylierung des Vektors mittels SAP-Methode	33
2.2.4.3. Ligation von DNA-Fragmenten und Vektor-DNA	33
2.2.5. Isolation von Plasmid-DNA in größerer Menge	33
2.2.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
2.2.7. Transformation von E.coli nach der KCM-Methode	35
2.2.8. Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen nach der Calciumphosphatmethode	36
2.3. Proteinchemische Methoden	37
2.3.1. Herstellung eines Zellhomogenats	37
2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.3.3. Western-Blotting von Proteinen	38
2.3.3.1. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	38
2.3.3.2. Immunologische Detektion von immobilisierten Proteinen	38
2.3.4. Zellfraktionierung	39
2.3.5. Immunpräzipitation	40
2.3.6. Phosphorylierung von PhLP <sub>L</sub>	41

2.4.	Messung der G $\beta$ $\gamma$ -Funktion mittels Inositolphosphatbildung	42
2.4.1.	Kultur und Vorbereitung der eukaryontischen Zellen	42
2.4.2.	Beladung eukaryontischer Zellen mit Myo-[2- <sup>3</sup> H]-Inositol	42
2.4.3.	Stimulierung und Messung der Inositolphosphate	42
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>1.</b>	<b>Hemmung der G<math>\beta</math><math>\gamma</math>-Untereinheit durch PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> in Zellen</b>	<b>44</b>
1.1.	Klonierung von PhLP <sub>L</sub> und PhLP <sub>S</sub>	44
1.1.1.	Der pcDNA 3-Vektor	44
1.1.2.	Klonierung von PhLP <sub>L</sub> und PhLP <sub>S</sub> in den pcDNA 3-Vektor	45
1.1.3.	Subklonierung von PhLP <sub>L</sub> / PhLP <sub>S</sub> -EYFP-Fusionskonstrukten	48
1.2.	Inhibierung der G $\beta$ $\gamma$ -gekoppelten Inositolphosphatbildung in HEK 293-Zellen – Vergleich von PhLP <sub>L</sub> und PhLP <sub>S</sub>	50
1.2.1.	Hemmung der G $\beta$ $\gamma$ -gekoppelten Inositolphosphatbildung durch PhLP <sub>L</sub> und PhLP <sub>S</sub> im Vergleich mit der GRK2	50
1.2.2.	Expressionskontrolle mittels Western-Analyse	51
1.3	Dosis-Wirkungs-Kurven der Hemmung der G $\beta$ $\gamma$ -gekoppelten Inositolphosphatbildung durch PhLP <sub>L</sub> und PhLP <sub>S</sub> in HEK 293-Zellen	53
<b>2.</b>	<b>Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub></b>	<b>55</b>
2.1.	Trunkierung von PhLP <sub>L</sub>	56
2.1.1.	Klonierung trunkierter Formen von PhLP <sub>L</sub>	56
2.1.2.	Hemmung der G $\beta$ $\gamma$ -vermittelten Inositolphosphatbildung durch trunkierte Formen von PhLP <sub>L</sub>	58
2.2.	Einfluß vom Austausch der Aminosäuren Serin 18, Threonin 19 und Serin 20 bzw. Serin 25 auf die Funktion von PhLP <sub>L</sub> als G $\beta$ $\gamma$ -Inhibitor	61
2.2.1.	Konstruktion von Ser/Thr zu Ala-Mutanten	61

2.2.2.	Einfluß der Ser→Ala-Mutationen auf die Hemmung der Inositolphosphate	63
2.3.	Phosphorylierung von gereinigtem PhLP <sub>L</sub> und Nachweis von Caseinkinase 2 in HEK 293-Zellen	65
2.3.1.	Phosphorylierung von gereinigtem PhLP <sub>L</sub> durch die Caseinkinase 2	65
2.3.2.	Phosphorylierung von gereinigtem PhLP <sub>L</sub> durch die Caseinkinase 2 im Zeitverlauf	66
2.3.3.	Nachweis von mRNA der Caseinkinase 2 in HEK 293-Zellen durch RT-PCR	68
<b>3.</b>	<b>Nachweis der Bindung von Gβγ und PhLP<sub>L</sub> bzw. PhLP<sub>S</sub> durch Co-Immunpräzipitation</b>	<b>70</b>
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
1.	Gβγ-inhibitorische Effekte von PhLP <sub>L</sub> und PhLP <sub>S</sub> in Zellen	72
2.	Regulation von PhLP <sub>L</sub> durch Phosphorylierung	73
3.	Gβγ-Bindung durch PhLP <sub>L</sub> und PhLP <sub>S</sub> in Zellen – der Mechanismus der Inhibition?	75
4.	Erklärungsmodelle für die Gβγ-Inhibition durch PhLP <sub>S</sub>	77
4.1.	Downregulation	77
4.2.	Störung der Faltung von Gβγ	78
4.3.	Stabilisierung der Gβγ-Untereinheiten durch PhLP <sub>L</sub>	79
5.	Physiologische Relevanz von PhLP <sub>L</sub> und PhLP <sub>S</sub> als Gβγ-Inhibitoren	82
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>VII.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>98</b>

**VIII. Abkürzungsverzeichnis** **100**

**IX. Anhang** **105**

- 1. Lokalisation von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> 105
- 1.1. Auftrennung in Cytosol- und Membranfraktion PhLP-transfizierter Zellen  
durch Zellfraktionierung 106
- 1.2. Visualisierung von PhLP in HEK 293-Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie  
und konfokales Mikroskop nach Assoziation mit EYFP 108

Danksagung

Lebenslauf

# I. Einleitung

## 1. Signalübertragung durch G-Proteine

Warum schlägt unser Herz schneller und heftiger, wenn wir uns erschrecken oder Angst haben?

– Weil wir dann in einer Stresssituation sind und Adrenalin, das „Stresshormon“, ausgeschüttet wird!

weiß vielleicht der informierte Laie.

Aber wie kommt die Information vom Adrenalin, das im Blutkreislauf zirkuliert, ins Innere der Zelle zu den Schrittmacherzellen und den kontraktilen Elementen des Herzens, die durch die Zellmembran vom Blutkreislauf getrennt und für das Schnellerschlagen des Herzens verantwortlich sind?

Jeder vielzellige, arbeitsteilig organisierte Organismus, somit auch der Mensch, setzt sich aus einer großen Anzahl unterschiedlicher Organe und Gewebe zusammen, die jeweils hoch spezialisierte Funktionen ausüben. Zellen sind die kleinsten funktionellen Bestandteile von Organen und Geweben und meist imstande, spezifische Funktionen isoliert auszuüben (Löffler 1999). Im Zuge der Entstehung vielzelliger Lebewesen wurde die Entwicklung eines Kommunikationssystems zwischen den Zellen notwendig, um als Gesamtsystem zu fungieren. Der Organismus kann erst dann sinnvoll funktionieren, wenn die große Anzahl an Informationen, die sowohl aus ihm heraus (interne Stimuli) als auch von außen (externe Stimuli) kommt, erkannt, aufgenommen und adäquat verarbeitet wird.

Interne Stimuli sind solche, die der Organismus selbst in bestimmten Zellen ausschüttet und/ oder produziert, z.B. Ionen, Hormone (Adrenalin, Insulin, Cortisol etc.), Cytokine (Wachstumsfaktoren wie EGF, PDGF, TNF $\alpha$ ), Neurotransmitter (Glycin, Dopamin etc.), welche entweder endokrin über die Blutbahn, wie es meistens bei Hormonen der Fall ist, oder parakrin durch Diffusion, z.B. bei Cytokinen, die Zielzellen erreichen (Löffler 1999).

Bezüglich ihrer chemischen Struktur fungieren als Hormone Glykoproteine (z.B. TSH, FSH, LH, HCG), Steroide (Hormone der Nebennierenrinde wie Cortisol, Sexualhormo-

ne wie Testosteron), Aminosäuren (Glycin), Proteo- und Peptidhormone (u.a. Insulin, ACTH) und Amine (z.B. Adrenalin, Thyroxin) (Aktories et al. 2004). Als Neurotransmitter sind die Gruppen der Amine (Noradrenalin, Serotonin), Aminosäuren (Glutamat) und Oligopeptide (Substanz P) zu nennen. Beispiele für externe Stimuli sind Licht und Geruchsstoffe.

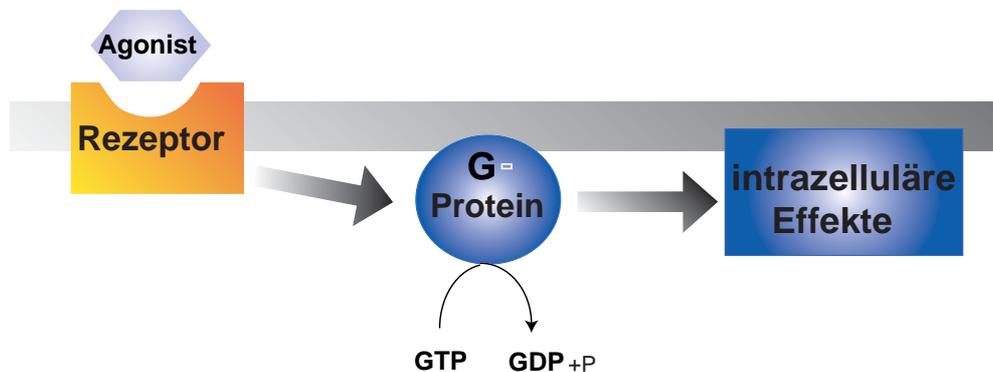
Die Aufnahme und Verarbeitung von Stimuli durch Zellen geschieht meistens über transmembranäre Signalübertragungskaskaden – molekulare Schaltkreise, die aus Rezeptoren, Enzymen, Kanälen und regulatorischen Proteinen bestehen. Einer solchen Kaskade bedarf es z. B. im Falle des Adrenalins, wo wir wieder beim Einstiegsthema sind: Es wird bei Streß über den Einfluß des sympathischen Nervensystems im Nebennierenmark ausgeschüttet, erreicht über die Blutbahn das Herz und trifft dort auf sogenannte  $\beta_1$ -Rezeptoren in der Zellmembran von Herzmuskel- und Sinusknotenzellen, welche an G-Proteine gekoppelt sind. Die  $\alpha_s$ -Untereinheit der G-Proteine aktiviert indirekt (über Adenylatcyclase, cAMP und Proteinkinase A)  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in den Herzmuskelzellen, was zu einer Steigerung der Kontraktilität (positiv inotrope Wirkung) führt (Golenhofen 1997, Lüllmann et al. 1999, Aktories et al. 2004). Die Steigerung der Herzfrequenz (positiv chronotrope Wirkung) wird über cAMP-getriggerte Aktivierung von HCN-Kanälen (hyperpolarization-activated cation channels) am Sinusknoten erreicht (Clapham 1998, Ludwig et al. 1999, Santoro und Tibbs 1999, Gauss und Seifert 2000, Biel et al. 2002).

Im allgemeinen gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Information vom Rezeptor ins Zellinnere zu bringen, wobei fünf Gruppen von Rezeptoren unterschieden werden:

1. Nukleäre Rezeptoren (Steroidhormone, Schilddrüsenhormone, Vit.D-Hormone)
2. Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren (z.B. nikotinischer Acetylcholinrezeptor an der motorischen Endplatte)
3. Rezeptoren mit enzymatischer Aktivität (z.B. Insulinrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, ANF-Rezeptor)
4. Enzymgekoppelte Rezeptoren (Cytokinrezeptoren)
5. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (z.B. Adrenalinrezeptor), die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen

Die überwältigende Mehrheit der Stimuli wechselwirkt mit dem System der G-Proteine (Tae et al. 1998), welches aus drei membrangebundenen Proteinkomponenten besteht: (1) einem Rezeptor auf der extrazellulären Seite zur Aufnahme des Stimulus und dem G-Protein (2), einem Guaninnukleotid-bindenden Protein, das den Rezeptor mit dem (3) Effektor koppelt, der sowohl ein Enzym (Adenylatzyklase, Phospholipase etc.) als auch ein Ionenkanal/-transporter sein kann (s.Abb.1, Löffler 1999).

Die sich daraus ergebende Veränderung in der Zelle, die in der Änderung des ionischen Milieus oder der erhöhten Konzentration an Botenstoffen (z.B. cAMP, Inositolphosphat) besteht, führt zur Übertragung der äußeren Erregung ins Zellinnere, wo letztlich die Zellantwort ausgelöst wird.



### Abb.1: Prinzip eines G-Protein-gekoppelten Signalweges

Extrazelluläre Agonisten, z.B. Hormone wie Adrenalin, bewirken in für sie spezifischen Rezeptoren Veränderungen, die zur Aktivierung nachgeschalteter G-Proteine unter Austausch von Guaninnukleotiden (GTP/GDP) führen. Durch Aktivierung der G-Proteine werden intrazelluläre membrannahere Effektorproteine (z.B. Adenylatcyclase) angeregt, um das Signal ins Zellinnere zu transformieren.

## 2. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Ein Rezeptor ist spezifisch für einen bestimmten Stimulus (Liganden) oder eine Gruppe ähnlicher Stimuli, und kann daher aus einer großen Anzahl von Einflüssen auf die Zelle spezifische Signale herausfiltern und weiterleiten. Der großen Vielfalt der Stimuli entsprechend existieren viele verschiedene Arten von Rezeptoren, wobei die Gruppe der

G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) mit mehreren hundert verschiedenen Molekülen in einer Spezies die größte darstellt (Tae et al. 1998). Bekannte Vertreter sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, die in autonom versorgten Organen, z.B. Herz oder Gefäßen, vorkommen und für Adrenalin bzw. Noradrenalin empfindlich sind. Die cDNA des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors wurde z.B. 1986 kloniert (Dixon et al. 1986).

Trotz der großen Vielfalt zeigen GPCRs in ihrer Topologie hochkonservierte Merkmale. Sie sind mit sieben hydrophoben Transmembrandomänen in Form von  $\alpha$ -Helices in der Membran verankert, weswegen sie auch Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren genannt werden (Tae et al. 1998). Die einzelnen Helices werden abwechselnd über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre hydrophile Schleifen miteinander verbunden (s.Abb.2). Der N-Terminus des Rezeptors befindet sich außerhalb der Zelle und besitzt zwei Glycosylierungsstellen. Der C-terminale Schwanz sitzt im Zellinnern und kann an mehreren Serin- und Threoninresten phosphoryliert werden, was die Bindung an G-Proteine verhindert. Dadurch erhöht sich seine Affinität für das inhibitorisch wirkende Protein  $\beta$ -Arrestin, wodurch der Rezeptor daran gehindert wird, G-Proteine und damit auch die entsprechenden Effektoren zu aktivieren (Lohse et al. 1990; Lohse et al. 1992). Die für die Struktur wesentliche Arbeit ist die Aufschlüsselung der Röntgenstruktur des Rhodopsins (Palczewski et al. 2000).

Zur Zeit werden die GPCRs in drei große Familien eingeteilt (Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants 2004): Familie 1 ist die größte Gruppe und beinhaltet Rezeptoren für Geruchsstoffe, Neurotransmitter wie Dopamin und Serotonin, Neuropeptide und Glycoprotein hormone. Rezeptoren dieser Familie sind durch mehrere hochkonservierte Aminosäuren charakterisiert und enthalten meistens einen Membrananker in Form eines palmitoylierten Cysteins im C-Terminus.

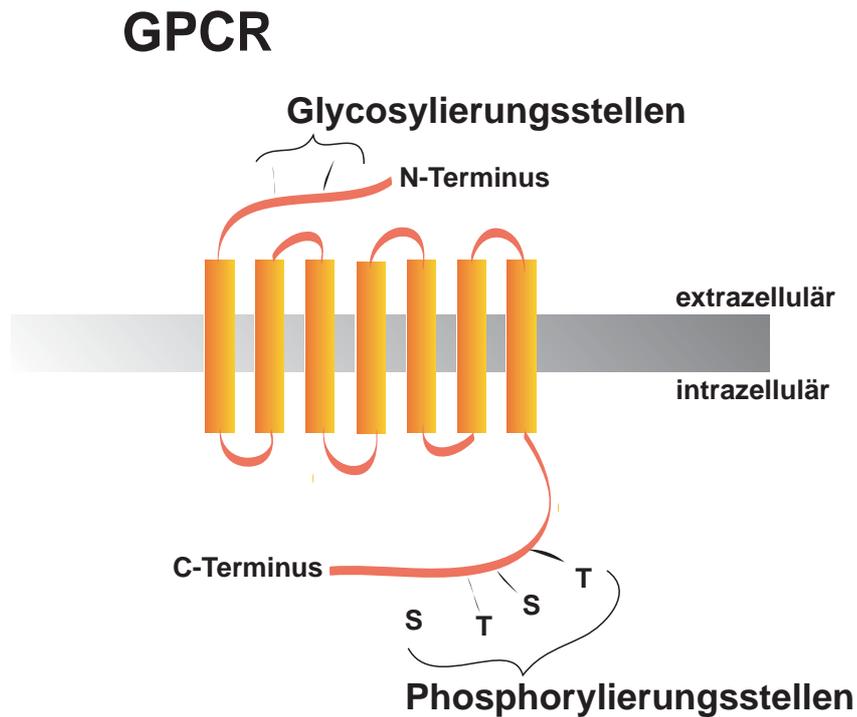
Familie 2 zeichnet sich durch einen relativ langen N-Terminus aus, in dem sich mehrere Disulfidbrücken befinden. Sie ist bezüglich ihrer Morphologie Familie 1 sehr ähnlich, hat jedoch keinen Membrananker und enthält andere konservierte Motive. Beispiele für Liganden der Familie 2 sind Hormone wie Glucagon, Secretin und Parathormon.

Zur Familie 3 gehören Glutamat und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren. Sie ist charakterisiert durch einen langen N- und C-Terminus, während die ligandenbindende Domäne im N-Terminus liegt, der aus einem Disulfid-verketteten Dimer besteht, was anhand der Kristallstruktur des Glutamatrezeptors gezeigt wurde (He et al. 2002). Es scheint wie eine

Venusfliegenfalle zu funktionieren, die öffnet und mit dem Liganden in ihrem Innern schließt.

Aufgrund der Tatsache, daß die meisten Stimuli über einen GPCR empfangen und weitergeleitet werden, sind sie ein großer Gegenstand der pharmakologischen Forschung (Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants 2004). Je genauer man die Struktur und die Interaktionen der GPCRs mit ihren Liganden versteht, desto spezifischer kann man sie beeinflussen und als therapeutische Zielproteine nutzen. Besonderes Interesse gilt dabei auch den sogenannten orphan GPCRs, deren Name dadurch zustande kommt, daß sie zwar identifiziert wurden, aber der zugehörige Ligand unbekannt ist. Bei der sogenannten „Deorphanisierung“ werden orphan GPCRs in Zellsystemen exprimiert, mit Gewebeextrakten behandelt und daraus die den Rezeptor aktivierenden Liganden herausgefiltert (Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants 2004). So ergeben sich neue physiologische Erkenntnisse und pharmakotherapeutische Möglichkeiten.

Darüberhinaus gibt es immer mehr Erkenntnisse über die Bedeutung von GPCRs bei bestimmten Krankheiten. So spielen zum Beispiel Mutationen des TSH-Rezeptors in der Schilddrüse eine Rolle bei der Entstehung von Adenomen und Hyper- bzw. Hypothyreose (Davies et al. 2005). Als Beispiel für die Folge einer Mutation im FSH-Rezeptor ist das ovarielle Hyperstimulationssyndrom zu nennen (Montanelli et al. 2004). Bestimmte Mutationen im PTH-Rezeptor führen zu konstitutiver Aktivierung, was zu Kleinwuchs und Hyperkalzämie führt (Calvi et al. 2000). So könnten sich unter genauer Erforschung der verantwortlichen Komponenten neue therapeutische Wege öffnen.



**Abb.2: Modell eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR)**

Mit sieben Transmembrandomänen in Form von  $\alpha$ -Helices ist er in der Membran verankert. Die einzelnen Helices werden abwechselnd über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre hydrophile Schleifen miteinander verbunden.

Der N-Terminus des Rezeptors befindet sich außerhalb der Zelle und besitzt zwei Glycosylierungsstellen. Der C-terminale Schwanz im Zellinnern kann an mehreren Serin- und Threoninresten phosphoryliert werden. Dadurch erhöht sich seine Affinität für das inhibitorisch wirkende Protein  $\beta$ -Arrestin, wodurch der Rezeptor daran gehindert wird, G-Proteine und damit auch die entsprechenden Effektoren zu aktivieren (Lohse et al.1990; Lohse et al., 1992).

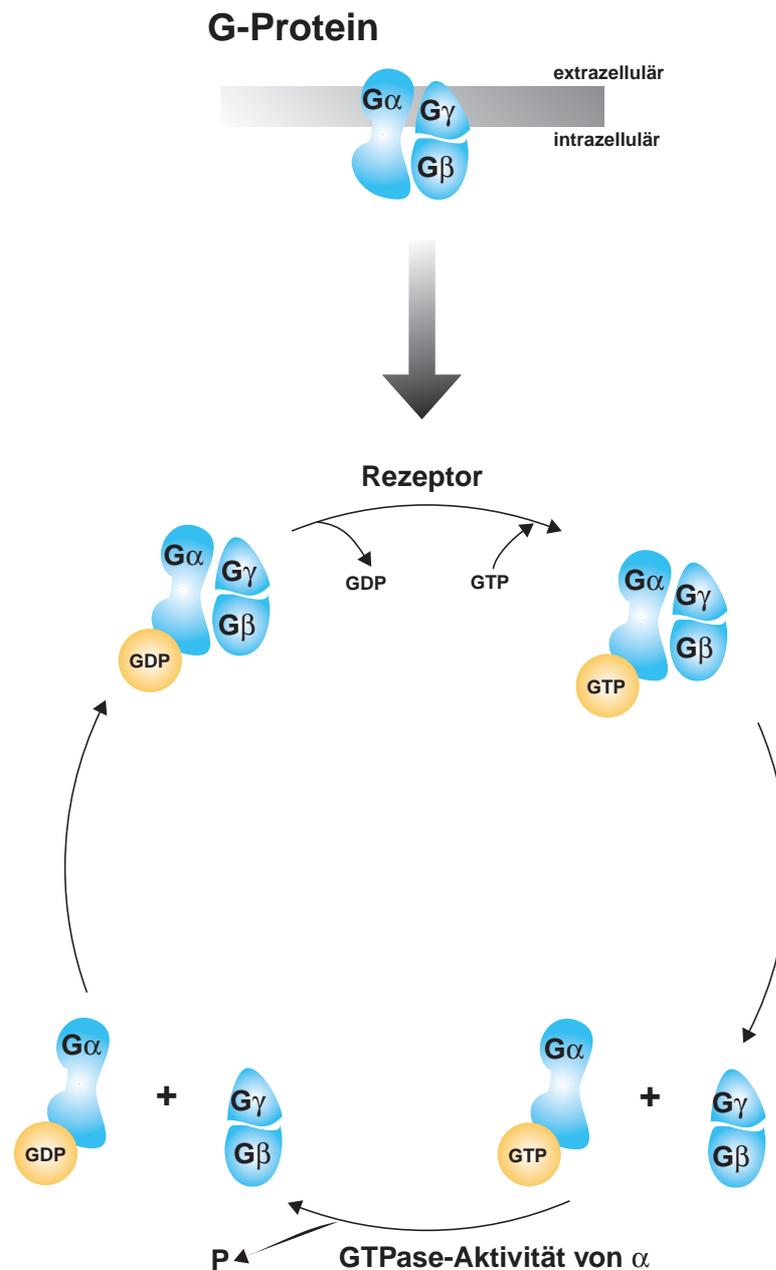
### 3. Funktionsweise und Struktur der G-Proteine

#### 3.1. G-Proteinzyklus

Heterotrimere G-Proteine setzen sich aus drei verschiedenen Polypeptiden zusammen: einer  $\alpha$ -Untereinheit (39-52 kDa), die Guaninnukleotide bindet und GTP hydrolysiert, einer  $\beta$ -Untereinheit (35-36 kDa) und einer  $\gamma$ -Untereinheit (6-8 kDa). Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten bilden zusammen ein Dimer, das sich nur unter denaturierenden

Bedingungen dissoziieren läßt und deshalb ein funktionelles Monomer darstellt (Hamm 1998, Cabrera-Vera et al. 2003).

G-Proteine wechseln in einem zyklischen Prozeß zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand. Im inaktiven Zustand bindet  $G\alpha$  GDP und bildet mit  $G\beta\gamma$  einen stabilen trimeren Komplex. Stimulierte Rezeptoren koppeln an das Trimer und katalysieren die Freisetzung von GDP, worauf GTP gebunden wird (Hamm 1998, Cabrera-Vera et al. 2003). Dies führt zu einer Konformationsänderung in der sogenannten „switch“- Region der  $G\alpha$ -Untereinheit mit anschließender Dissoziation des Heterotrimers in  $G\alpha$ - und  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten (Lambright et al. 1994, Lambright et al. 1996). Die getrennten Untereinheiten können nun unabhängig voneinander mit Effektoren wechselwirken. Wenn  $G\alpha$  GTP hydrolysiert hat, assoziiert es wieder mit  $G\beta\gamma$ , geht in die inaktive Form  $G\alpha$ -GDP über und der Zyklus kann von neuem beginnen (s.Abb.3).



**Abb.3: Der GTPase-Zyklus heterotrimerer G-Proteine**

In GDP-gebundener Konformation bildet  $G\alpha$  mit  $G\beta\gamma$  einen stabilen trimeren Komplex. Angeregte mit dem Trimer verbundene GPCRs katalysieren die Freisetzung von GDP. Darauf wird GTP gebunden, was zu einer Dissoziation von  $G\alpha$ -GTP und  $G\beta\gamma$  führt. Die einzelnen Untereinheiten vollziehen nun ihre verschiedenen Wechselwirkungen mit intrazellulären Effektorproteinen. Durch Hydrolyse von GTP wird  $G\alpha$  in die inaktive Form zurückgeführt und verbindet sich wieder mit  $G\beta\gamma$ . Der Zyklus kann nun von neuem beginnen.

### 3.2. G-Protein $\alpha$ -Untereinheiten

$\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine gehören zu einer großen Superfamilie regulatorischer GTPasen, die funktionell sehr verschiedene Familien umfaßt wie Ras- (Zellproliferation und -differenzierung), Rab- (Vesikeltransport) und Rho-Proteine (Cytoskelettorganisation), Elongationsfaktoren (Proteinsynthese) etc. Von den G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten wurden in Säugern über 20 verschiedene Formen identifiziert, die sich von 16 Genen (darauf bezieht sich die Spalte „Typ“ in Tab.1) ableiten, darunter einige durch alternatives Spleißen (Downes et al. 1999).

Die Einteilung der G-Proteine in vier Hauptklassen ( $G_s$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{12}$ ) beruht auf Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz der  $G\alpha$ -Untereinheiten. Sie richtet sich nach den  $\alpha$ -Untereinheiten, da die Funktion der  $\beta\gamma$ -Untereinheit erst später entdeckt wurde (Logothetis et al. 1987). Abgesehen von einigen sehr speziellen G-Proteinen wie denen der Sinnesorgane ( $G_{olf}$ ,  $G_{gust}$ ,  $G_t$ ), sind die meisten  $\alpha$ -Untereinheiten sehr weit im Gewebe verbreitet. Hervorzuheben ist  $\alpha_t$ , welches Bestandteil von Transducin, dem G-Protein der Retina, ist, und vermutlich ein Zielprotein des weiter unten erwähnten Phosducins darstellt. Die  $G\alpha$ -Untereinheit besteht aus zwei Domänen: der GTPase-Domäne, die für die Bindung und Hydrolyse von GTP verantwortlich ist, und der helikalen Domäne. Die Einteilung und Verteilung weiterer  $\alpha$ -Untereinheiten ist in folgender Tabelle dargestellt.

**Tabelle 1: Verschiedene Klassen von  $G\alpha$ -Untereinheiten (nach Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants 2004)**

Klasse	Typ	Effektoren	Vorkommen
$\alpha_s$	$\alpha_{s(S)}^a$	Adenylatcyclase (+)	ubiquitär
	$\alpha_{s(L)}^a$	Adenylatcyclase (+)	neuronal, neuroendokrin
	$\alpha_{olf}$	Adenylatcyclase (+)	Riechepithel
$\alpha_i$	$\alpha_{i1}$	Adenylatcyclasen I, V, VI (-) GIRK-Kanäle (+)	weit verbreitet, v.a. im Gehirn
	$\alpha_{i2,3}$	Adenylatcyclasen I, V, VI (-) GIRK-Kanäle (+)	ubiquitär ( $\alpha_{i2}$ ); außer neuronalem

	$\alpha_{01,02,03}$	PLC(+) PI3K(+)  AC (-), VDCC (-), GIRK (+), PLC $\beta$ (+)	Gewebe weit verbreitet( $\alpha_{i3}$ )  neuronal, neuroendokrin
	$\alpha_{t(r)}$ $\alpha_{t(c)}$	cGMP-PDE (+) cGMP-PDE (+)	Stäbchen Zapfen
	$\alpha_z$	AC I, V (-) GIRK (+) VDCC (+)	neuronal, neuroendokrin, Thrombozyten
	$\alpha_{gust}$	PDE?	Geschmacksepithel
$\alpha_q$	$\alpha_q$ , $\alpha_{11}$	Phospholipase C $\beta$ (+), Rho-GEF Phospholipase C $\beta$ (+), Rho-GEF	ubiquitär weit verbreitet, nicht in Thrombozyten
	$\alpha_{14}$	Phospholipase C $\beta$ (+)	hämatopoetische Zellen, Hoden
	$\alpha_{15,16}$	Phospholipase C $\beta$ (+)	hämatopoetische Zellen
$\alpha_{12}$	$\alpha_{12}$	Rho-GEF (+), Btk(+), Gap1 <sup>m</sup> (+), Cadherin	ubiquitär
	$\alpha_{13}$	Rho-GEF (+), Radixin	ubiquitär

Abkürzungen: + stimuliert, - inhibiert, AC Adenylatcyclase, GIRK G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, VDCC voltage dependent Ca<sup>2+</sup> channel, cGMP-PDE c-GMP-abhängige Phosphodiesterase, Rho-GEF Guaninnukleotid-Austausch-Faktor für die Rho-GTPase, Btk Bruton's Tyrosinkinase, Gap1<sup>m</sup> Ras GTPase-aktivierendes Protein, ? unbekannt

a: kurze (s), lange (l) Spleißvariante von G $\alpha_s$

### 3.3. G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten

Bislang sind fünf  $\beta$ -Isoformen und zwölf  $\gamma$ -Isoformen bekannt (Downes et al. 1999). Da der Komplex, den die beiden Untereinheiten miteinander bilden, auf ionischen Wechselwirkungen beruht, lassen sich die Dimere nur unter denaturierenden Bedin-

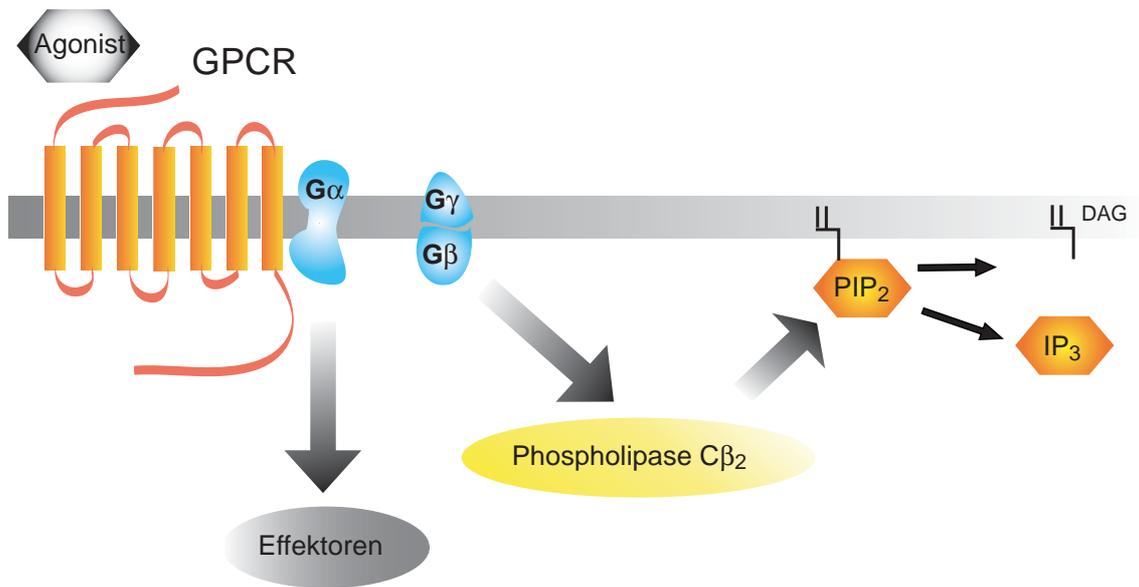
gungen dissoziieren. Von einigen Ausnahmen abgesehen, interagieren die unterschiedlichen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoformen unselektiv miteinander.

#### 4. G-Protein $\beta\gamma$ -abhängige Effektoren

Die Funktionen der  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten wurden später entdeckt als die der  $G\alpha$ -Untereinheit, sodaß ihnen zunächst eine passive Rolle zugewiesen wurde, die bestenfalls in der Membranassoziation von  $G\alpha$  und der Kopplung an Sieben-Transmembranhelix-Rezeptoren bestand (Neer 1995). Mit der Zeit wurden jedoch analog zu der  $G\alpha$ -Untereinheit viele eigene Signalfunktionen beschrieben.

Im folgenden wird der Einfluß von  $G\beta\gamma$  auf die Phospholipase  $C\beta_2$  (Camps et al. 1992, Boyer et al. 1992) genauer beschrieben, da er für diese Arbeit relevant ist, während die restlichen Funktionen nur aufgelistet werden (Tab.2).

**Phospholipase  $C\beta$ :** Es gibt drei Klassen von PLC-Proteinen,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , wobei G-Proteine lediglich Isoformen der  $\beta$ -Klasse aktivieren. Phospholipasen vom Typ C spalten  $PIP_2$  aus der Zellmembran in  $IP_3$  und DAG (s.Abb.4).  $IP_3$  aktiviert einen ligandenabhängigen Calciumkanal des endoplasmatischen Retikulums, woraus eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels resultiert. DAG reguliert PKC-Isoenzyme, die in aktiviertem Zustand Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren u.a. phosphorylieren.



#### Abb.4: Wirkung von Gβγ auf die Phospholipase C β<sub>2</sub> (PLCβ<sub>2</sub>)

Nach Aktivierung des G-Proteins durch den GPCR ist die Aktivierung der PLC β<sub>2</sub> ein möglicher Effekt der Gβγ-Untereinheit. Die PLCβ<sub>2</sub> spaltet PIP<sub>2</sub> aus der Membran in DAG und IP<sub>3</sub>.

In dieser Arbeit wird die Inositolphosphatmenge, die durch Gβγ stimuliert wird, als Parameter der Inhibition von Gβγ-Untereinheiten benutzt (s. III.1.2.).

Weitere Effektoren von Gβγ-Untereinheiten sind Adenylatzyklasen, K<sup>+</sup>-Kanäle, Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, MAP-Kinase-Kaskaden etc.

Folgende Tabelle bietet eine Übersicht bislang bekannter Gβγ-abhängiger Effektoren, die hier nur aufgelistet und nicht näher erläutert werden, da sie nicht unmittelbar Bestandteil dieser Arbeit sind.

**Tabelle2: Gβγ-abhängige Effektoren (modifiziert nach Cabrera-Vera et al. 2003)**

Effektor	Modulation durch Gβγ
Adenylatcyclase Typ I	–
Typ II	+, direkt
Typ IV	+, direkt
Typ VII	+
Phospholipase A2	+
Phospholipase C-β β 1-3	+, direkt

G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen	+ , direkt
K <sup>+</sup> -Kanäle GIRK1 GIRK2 GIRK4	+ , direkt + , direkt + , direkt
Ca <sup>2+</sup> -Kanäle N-Typ p/Q-Typ	– –
Plasmamembran- Ca <sup>2+</sup> -Pumpen	+
MAP-Kinase-Kaskade Phosphorylierung von Shc Raf-1 Ras exchange factor	+ ?indirekt nur Bindung, kein Effekt auf Aktivität + ?indirekt
Phosphoinositid-3-kinase (PI3K)	+
Brutontyrosinkinase	+
Tsk-Thyrosinkinase	+
Proteinkinase D	+
Calmodulin	Inhibierung
Dynamamin I	Erhöhte GTPase-Aktivität
Tubulin	Erhöhte GTPase-Aktivität

Abkürzungen: + stimuliert, – inhibiert

## 5. Regulatoren der G-Proteine

G-Proteine unterliegen als wichtige Schnittstelle zwischen Rezeptor und verschiedenen Signalwegen einer Regulation, damit es nicht zur dauerhaften Stimulation in der Zelle kommt. Dabei findet die Kontrolle sowohl auf Ebene der G $\alpha$ - als auch der G $\beta\gamma$ -Untereinheit statt.

Zu den Regulatoren der G $\alpha$ -Untereinheit der G-Proteine zählen die RGS-Proteine (regulators of G-protein signaling). G-Protein-gekoppelte Signale werden durch RGS-Proteine gehemmt, indem diese direkt mit der G $\alpha$ -Untereinheit interagieren und als GTPase-aktivierende Proteine die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit erhöhen. Dadurch kommt es zur Hydrolyse von GTP zu GDP an der G $\alpha$ -Untereinheit,

wodurch die Signalweiterleitung in der Zelle beendet wird, da die GDP-bindende Form der  $G\alpha$ -Untereinheit inaktiv ist (De Vries und Farquhar 1999). Auch für die GRKs, die bei der Rezeptordesensibilisierung eine Rolle spielen, wurde im Aminoterminus aller sechs bisher bekannten Formen eine Domäne homolog zur RGS-Domäne identifiziert (Siderovski et al. 1996). Später wurde nachgewiesen, dass der Aminoterminus der GRK2 an  $G\alpha_q$  sowohl *in vitro* als auch in Zellen bindet und so die  $G\alpha_q$ -vermittelte Aktivierung der Phospholipase C $\beta$  hemmt (Carman et al. 1999). Als  $G\beta\gamma$ -Regulatoren sind Phosducin und PhLP bekannt, die im folgenden Abschnitt gesondert behandelt werden. Daneben bindet auch Raf-1, eine Serin/Threonin-Kinase, die am Anfang der Mitogen-aktivierten Protein(MAP-)kinasekaskade steht,  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten (Pumiglia et al. 1995). Der MAP-Kinaseweg wird über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert und beeinflusst Wachstum und Differenzierung von Zellen. Im weiteren wurde beobachtet, daß eine Bindung von Raf-1 an  $G\beta_1\gamma_2$  zwar besteht, aber keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität von Raf-1 hat. Die  $G\beta\gamma$ -stimulierte Aktivität der PLC $\beta_2$  jedoch wurde durch Raf-1 gehemmt, womit auch Raf-1 in die Regulation  $G\beta\gamma$ -vermittelter Signale involviert ist (Slupsky et al. 1999). Ebenfalls im Rahmen des MAP-Kinase-Signalweges spielt die Proteinkinase KSR-1, welche Teil des Ras-Signalweges ist, eine Rolle als  $G\beta\gamma$ -Regulator. Es wurde eine  $G\beta_1\gamma_3$ -Bindung beschrieben, die zur Translokation von KSR-1 an die Zellmembran führt. Dadurch wird die  $G\beta_1\gamma_3$ -induzierte Aktivierung der MAP-Kinase inhibiert (Bell et al. 1999).

## 5.1. Phosducin

Phosducin wird als Regulator von G-Proteinen angesehen, da es  $G\beta\gamma$  bindet (Hawes et al. 1994), aber keine Effektorfunktionen bekannt sind. Daher gehört es nicht direkt zur transmembranären Signalkaskade. Phosducin hat ein Molekulargewicht von 33 kDa, liegt als phosphorylierbares Protein im Cytosol vor und wurde als Komplex mit  $G\beta\gamma$  aus *retinalen Photorezeptorzellen* (Sehstäbchen) gereinigt (Lee et al. 1987, 1990b, Kuo et al. 1989). Dort und in der den Retinarezeptorzellen phylogenetisch verwandten *Epiphyse* (Reig et al. 1990, Craft et al. 1991, Lolley et al. 1992) gehört es zu den am

häufigsten vorkommenden Proteinen und ist vermutlich an der Regulation der lichtabhängigen Vorgänge beteiligt.

Phosducin ist einer phosphorylierungsabhängigen Regulation unterworfen (Lee et al. 1987, 1990a, Reig et al. 1990). Die Phosphorylierung durch die PKA am Serinrest 73 (Lee et al. 1990a) führt zu einem Verlust der G $\beta\gamma$ -inhibitorischen Funktion (Bauer et al. 1992, Lee et al. 1992, Yoshida et al. 1994) und wird durch die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Adenylatzyklase reguliert (Willardson et al. 1996). Thulin et al. zeigten 2001, daß auch die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaM-KinaseII) Phosducin phosphoryliert und seine G $\beta\gamma$ -Bindung stärker hemmt als die PKA.

Später wurde durch Analyse von RNA und Proteinen verschiedener Gewebe belegt, daß Phosducin ein ubiquitär vorkommendes Protein ist (Danner und Lohse 1996, Bauer et al. 1998). Durch die Bindung von G $\beta\gamma$  wird der oben beschriebene Aktivierungszyklus der G-Proteine unterbrochen, was bedeutet, daß auch G $\alpha$ -Effekte gehemmt werden. So bindet bei lichtadaptierten Sehstäbchen unphosphoryliertes Phosducin G $\beta\gamma$ , verhindert dadurch die Reassoziaton mit G $\alpha$  und dämpft somit die Signalübertragung von lichtaktivierten Rhodopsin zum Effektorenzym Phosphodiesterase (Yoshida et al. 1994).

Bei verschiedenen G $\beta\gamma$ -abhängigen Prozessen konnte ein Einfluß von Phosducin nachgewiesen werden. So wirkt Phosducin der GRK2-katalysierten Phosphorylierung von Rhodopsin entgegen, indem es der GRK2 durch G $\beta\gamma$ -Bindung den Zutritt unmöglich macht (Müller et al. 1996). Ebenso ist die Unterdrückung der Aktivität des G $\beta\gamma$ -abhängigen Enzyms Phospholipase C $\beta$  in COS7-Zellen dokumentiert (Hawes et al. 1994, Xu et al. 1995).

Voraussetzung für die G $\beta\gamma$ -Hemmung ist die Bindung von Phosducin an G $\beta\gamma$ . Bei der Untersuchung dieser Bindung fiel zunächst der N-Terminus, die ersten 63 Aminosäuren, ins Auge, in dem sich eine hochkonservierte elf Aminosäuren lange Sequenz befindet, die auch im PhLP<sub>L</sub> (s.u.) enthalten ist (Hawes et al. 1994, Xu et al. 1995). Die Aminosäuresubstitution in diesem Abschnitt führte zur Aufhebung der Hemmung der G $\beta\gamma$ -vermittelten PLC $\beta$ -Aktivierung (Xu et al. 1995). Ebenso fand Hemmung bei Überexpression des N-Terminus statt, bei Überexpression des C-Terminus nicht (Xu et al. 1995). Eine zweite G $\beta\gamma$ -bindende Region konnte mittels Deletionsanalysen im C-Terminus identifiziert werden (Blüml et al. 1997, Schröder et al. 1997).

## **5.2. Phosducin-like-Protein (PhLP)**

Bei der Untersuchung des Einflusses von Alkohol auf Signalkaskaden konnten Miles et al. (1993) verschiedene Gene identifizieren und isolieren, deren Expression in neuronalen Rattenzellen von Alkohol induziert wird. Das Produkt eines dieser Gene hatte deutliche Homologien zu Phosducin bezüglich der Aminosäuresequenz aufzuweisen, weshalb es „Phosducin-ähnliches Protein“ (phosducin-like protein, PhLP) genannt wurde.

Die Autoren beschrieben vier verschiedene Transkripte dieses Gens, die sich in ihren 5'-terminalen Abschnitten voneinander unterscheiden und deren Entstehung auf alternatives Spleißen zurückgeführt wurde. Aus dieser Sequenzvariation ergab sich die Vermutung, daß zwei Isoformen existieren: eine kurze, aus 218 Aminosäuren bestehende Variante (PhLP short, PhLP<sub>S</sub>) und eine lange aus 301 Aminosäuren (PhLP long, PhLP<sub>L</sub>). Beide stimmen in ihrer Sequenz, abgesehen vom zusätzlichen Teil des PhLP<sub>L</sub>, überein.

In Abbildung 5 sind die für PhLP<sub>S</sub> und PhLP<sub>L</sub> aus der Ratte vorhergesagten Sequenzen Phosducin und einem Hefe-Phosducinhomolog gegenübergestellt. PhLP<sub>L</sub> ist mit dem Phosducin aus der Ratte mit 114 von 301 Aminosäuren (38%) identisch und mit 166 von 301 homolog (55%). Die Homologie konzentriert sich vor allem auf die zentralen und C-terminalen Regionen. Im variablen N-Terminus von PhLP<sub>L</sub> findet sich ein zwischen ihm und allen Phosducinformen gut konservierter 11-Aminosäuren-Abschnitt. Durch Northernblotanalyse der Gewebe aus verschiedenen Organen der Maus wurde eine weite Verbreitung von PhLP festgestellt. Mit einer Hybridisierungssonde detektierten Miles et al. (1993) Transkripte in Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Skelettmuskel, Niere, Leber und Hoden. Besonders deutlich waren die Signale in Gehirn und Niere, besonders schwach in Skelettmuskel und Hoden. Bemerkenswert sind außerdem Southernblotanalysen, die zeigen, daß PhLP während der Evolution von der Hefe bis zum Menschen konserviert wurde (Miles et al. 1993).

Die Induktion von PhLP durch Alkohol wurde von Miles et al. (1993) in Neuroglioma-NG108-15-Zellen untersucht und das Verhältnis von Alkoholkonzentration und zellulärer mRNA mittels Northernblotanalyse bestimmt. Im Konzentrationsbereich von 25 bis 100 mM war ein Anstieg der mRNA sichtbar bis auf das Dreifache bei 100 mM.

Neben der morphologischen Ähnlichkeit zum Phosducin ließ sich auch funktionelle Ähnlichkeit nachweisen, im wesentlichen die Hemmung der G $\beta\gamma$ -Untereinheit, was sich anhand verschiedener G $\beta\gamma$ -stimulierter Effekte nachweisen ließ. Schröder und Lohse zeigten 1996 unter Verwendung von aus *E.coli* gereinigtem PhLP<sub>S</sub>, daß es die G $\beta\gamma$ -stimulierte Pertussistoxin-katalysierte ADP-Ribosylierung von G $\alpha$  hemmt sowie die durch G $\beta\gamma$  geförderte Aktivität der GTPase von G $\alpha_0$ , wobei PhLP<sub>S</sub> ein schlechterer Inhibitor war als Phosducin. Die Hemmung der G $\beta\gamma$ -vermittelten Rhodopsin-Phosphorylierung durch GRK2 festigte die Vermutung, daß PhLP an G $\beta\gamma$  und nicht an G $\alpha$  bindet. Daß PhLP<sub>S</sub> G $\beta\gamma$  überhaupt hemmt, verwundert, da der hochkonservierte 11-Aminosäuren-Abschnitt (s.o.) als besonders wichtig für die G $\beta\gamma$ -Bindung angesehen wurde (Xu et al. 1995).

Allerdings wurde 1997 ein C-terminales Fragment in PhLP<sub>S</sub> (AS 168 bis 195) anhand von schrittweisen N-terminalen Trunkierungen identifiziert, welches isoliert zur Hemmung eines G $\beta\gamma$ -abhängigen Effekts *in vitro* fähig war (Schröder et al. 1997). Die hierbei getesteten Effekte waren die G $\beta\gamma$ -abhängige GTPase-Aktivität und die Rhodopsinphosphorylierung durch GRK. Mit gereinigten GST-PhLP<sub>L</sub> und GST-PhLP<sub>S</sub>-Fusionsproteinen wurde *in vitro* eine direkte Bindung zu gereinigtem G $\beta\gamma$  aus bovinem Hirn gezeigt (Thibault et al. 1997). Zudem wurde eine Bindung mittels Immunpräzipitation in mit Expressionsvektoren für PhLP<sub>L</sub>-HA, G $\beta$  und G $\gamma$  transfizierten COS-7-Zellen *in vivo* gezeigt. Dies war auch mit endogenem PhLP<sub>L</sub> in NG108-15-Zellen möglich (Thibault et al. 1997).

Unter der Fragestellung, wie relevant die G $\beta\gamma$ -Hemmung durch PhLP *in vivo* ist, wurde die Gewebsverteilung und Menge von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> ermittelt. Es zeigte sich, daß in Organen wie ZNS, Herz, Lunge, Niere und Leber PhLP<sub>S</sub> in 20fach niedrigerer Menge vorliegt als PhLP<sub>L</sub> – zu niedrig, um *in vivo* signifikanten Einfluß auszuüben (Schröder und Lohse 2000). Zudem ergab sich im Vergleich, daß bei der Hemmung der G $\beta\gamma$ -vermittelten ADP-Ribosylierung von G $\alpha_1$ , durchgeführt mit aus *E.coli* gereinigtem Phosducin, PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub>, PhLP<sub>S</sub> ein schlechterer Inhibitor als PhLP<sub>L</sub> und Phosducin war, welche beide gleich stark hemmten (Schröder und Lohse 2000).

Es ergaben sich jedoch Hinweise auf eine physiologische Rolle der kurzen Form PhLP<sub>S</sub> in bovinen chromaffinen Nebennierenmarkzellen. Es wurde in diesen Zellen exprimiert und lag in unstimulierten Zellen membrangebunden vor. Auf einen Stimulationsreiz hin

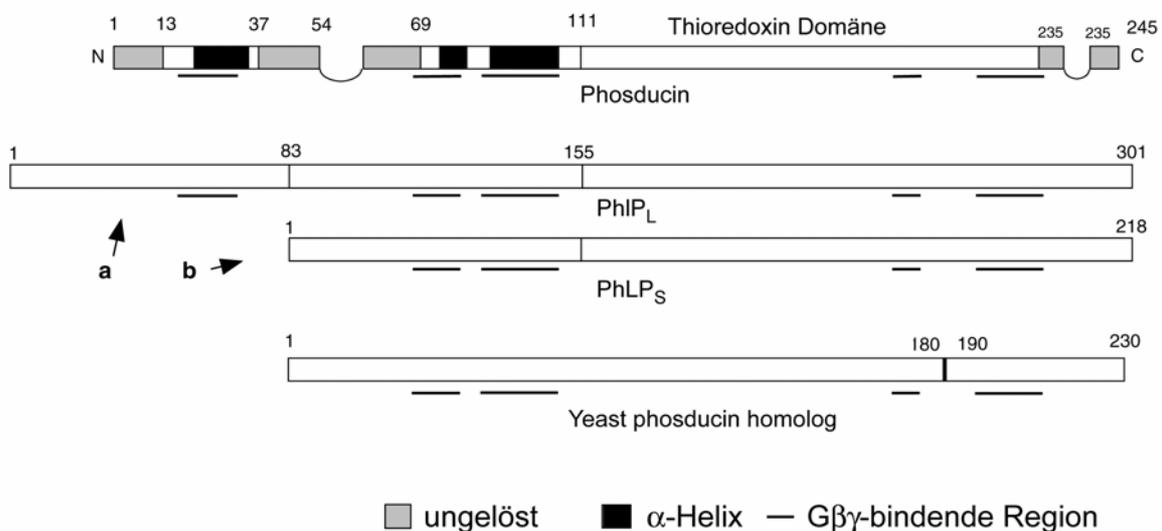
wurde eine Umverteilung ins Zytoplasma beobachtet. Nach Mikroinjektion von rekombinantem PhLP<sub>S</sub> in chromaffine Zellen wurde die nikotinstimulierte, calcium-abhängige Exozytose von Katecholaminen gehemmt (Gensse et al. 2000). Der genaue Mechanismus, d.h. ob und an welcher Stelle des Exozytosevorgangs eine G-Protein-hemmung durch PhLP<sub>S</sub> stattfindet, wurde nicht gezeigt. Jedoch ist bekannt, daß bei verschiedenen Schritten der Exozytose G-Proteine beteiligt sind, was eine Einflussnahme von PhLP auf diesem Wege wahrscheinlich macht: Aktivierung von plasmamembranassoziiertem Gai3-Protein spielt beim späten ATP-unabhängigen Fusions-schritt der Exozytose eine Rolle (Vitale et al. 1996). Auch für Gβγ-Effektoren wie Phosphatidylinositol-3-Kinase und Rac1 wird eine Beteiligung an der Katecholaminsekretion vermutet (Chasserot-Golaz et al. 1998). Letztlich könnte auch die Bildung eines Gβγ-ADP-Ribosylierungsfaktor6-Komplexes zur Inhibierung der Sekretion führen (Galas et al. 1996, Vitale et al. 2002).

PhLP<sub>L</sub> scheint auch an der Regulation von Opioidrezeptoren (GPCRs) beteiligt zu sein, was an Mäusehirn untersucht wurde. Die Versuche wurden mit PhLP<sub>L</sub>-knockdown-Mäusen durchgeführt, die weniger PhLP<sub>L</sub> besitzen als der Wildtyp. Es zeigte sich, daß es bei der Knockdown-Maus zu längerer Rezeptordesensibilisierung nach Morphinbehandlung kam als beim Wildtyp. Dies könnte auf eine Rolle von PhLP<sub>L</sub> bei der Suchtentwicklung hinweisen (Garzon et al. 2002).

Auf einem weiteren Gebiet scheint PhLP eine Bedeutung zu haben: CCT 1 (Chaperonin containing TCP (tailless complex polypeptide)) ist ein cytosolischer Chaperonkomplex, der für die Faltung von zellulären Proteinen wie Aktin und Tubulin notwendig ist. Es ließ sich nachweisen, daß PhLP<sub>L</sub> an dieses Polypeptid direkt bindet und mit Substraten konkurriert. Überexpression von PhLP<sub>L</sub> in CHO-Zellen hemmte die Faltung von β-Aktin um 80% (McLaughlin et al. 2002). Kürzlich wurde die dreidimensionale Struktur des PhLP-CCT-Komplexes durch Kryoelektronmikroskopie aufgelöst (Martin-Benito et al. 2004). Dabei fiel jedoch auf, daß PhLP am oberen Ende der apikalen Domäne über der Bindungsstelle für zu faltende Proteine bindet, ähnlich wie Prefoldin, ein CCT-Cochaperon, das bei der Faltung von Aktin unterstützend mitwirkt (Martin-Benito et al. 2002). Diese Befunde weisen darauf hin, daß PhLP durch seine Interaktion an der Regulation des CCT beteiligt ist und kein Substrat darstellt.

Die Fragestellung der G $\beta\gamma$ -Inhibierung durch PhLP wurde in unserer Arbeitsgruppe weiterverfolgt, da für unphosphoryliertes und gespleißtes PhLP (=PhLP<sub>S</sub>) keine direkte G $\beta\gamma$ -Bindung gezeigt werden konnte (s. Ergebnisse, Diskussion). Es wurde stattdessen eine Interaktion mit dem Tailless Complex Polypeptide-1 $\alpha$  (TCP-1 $\alpha$ ) des cytosolischen Chaperonkomplexes (CCT) gefunden, der die Faltung der G $\beta\gamma$ -Untereinheiten beeinflusst (Humrich et al. 2005), was einen alternativen Mechanismus der G $\beta\gamma$ -Inhibierung darstellt.

Neben dem Einfluß auf die Proteinfaltung scheint PhLP auch am Abbau von Proteinen beteiligt zu sein: in Yeast two hybrid-Systemen wurde eine Interaktion von PhLP mit einem Maushomolog von yeast-SUG1 nachgewiesen, einer Untereinheit des 26S-Proteasoms, das auch indirekt Transkription moduliert. Diese Interaktion wurde durch in vitro-Bindungsassays und Co-Immunpräzipitation bestätigt. Daher wird vermutet, daß PhLP durch seine Bindung an SUG1 zum proteasomalen Abbau vorbereitet wird (Barhite et al. 1998).



**Abb.5: Topologiemodell von Phosducin, PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> und Hefe-Phosducin Homolog, entsprechend der Kristallstruktur des Phosducin-G $\beta\gamma$ -Komplexes (Gaudet et al. 1996):**

Gezeigt sind die strukturellen Domänen von Phosducin: der N-Terminus besteht aus drei  $\alpha$ -Helices mit G $\beta\gamma$ -bindenden Regionen und langen ungelösten Abschnitten. Der C-Terminus ist eine Thioredoxin-Domäne bestehend aus fünf  $\beta$ -Helices und drei flankierenden  $\alpha$ -Helices (nicht gekennzeichnet) mit G $\beta\gamma$ -bindenden Regionen. PhLP<sub>L</sub>

besitzt alle fünf G $\beta$  $\gamma$ -Bindungsstellen, während PhLP<sub>S</sub> nur vier hat. Es ähnelt dem Hefe-Phosducin Homolog, welchem ebenfalls die erste  $\alpha$ -Helix und die erste G $\beta$  $\gamma$ -Bindungsstelle fehlen.

## 6. Caseinkinase 2

In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, daß PhLP<sub>L</sub> in vivo größtenteils phosphoryliert vorliegt und daß die Caseinkinase 2 (CK2) das zuständige Enzym ist (Humrich et al. 2003), während Phosducin von der PKA phosphoryliert wird (Lee et al. 1990a).

Die CK2 ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das Serin und Threonin als Phosphorylierungsstellen nutzt (Allende et al. 1995, Pinna und Meggio 1997) und während der Evolution hoch konserviert wurde. Humane CK2 besteht aus vier Untereinheiten (Faust und Montenarh 2000; Niefind et al. 1998, 2001): zwei identische katalytische  $\alpha$ -Untereinheiten sind für die Phosphorylierung zuständig mit der Besonderheit, daß sowohl ATP als auch GTP als Substrat genutzt werden kann. Die katalytische Untereinheit kann durch verschiedene physiologische und nichtphysiologische Substanzen, z.B. Heparin, gehemmt werden (Sarno et al. 2002b). Die beiden  $\beta$ -Untereinheiten gelten als regulatorische Einheiten. Ihre Aufgaben sind die Stabilisierung des Holoenzym (Meggio et al. 1992), die mögliche Bindung an die Plasmamembran (Sarrouilhe et al. 1998) und die Modulation (Sarno et al. 2000) der Enzymaktivität.

Bestimmte Mutationen in der  $\alpha$ -Untereinheit führen zum Verlust der Aktivität des Enzyms, z.B. eine G48K- (Chaillot et al. 2000) oder eine K68R-Mutation (Sarno et al. 2002a). Im Vergleich zur PKA, die cAMP-abhängig funktioniert (Reig et al. 1990), ist über eine Regulation der CK2-Aktivität innerhalb der Zelle nichts bekannt, weshalb angenommen wird, daß sie konstitutiv aktiv ist.

## 7. Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte der bei gereinigten Proteinen gesehene Effekt der G $\beta$  $\gamma$ -Inhibierung durch PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub>, der anhand der G $\beta$  $\gamma$ -abhängigen ADP-Ribosylierung von G $\alpha$ <sub>i1</sub> gezeigt wurde (Schröder und Lohse 2000), auf Zellsysteme übertragen

werden, wobei die Fragestellung war, ob PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> in intakten Zellen die Gβγ-Untereinheit hemmen. Hierzu wurden beide Formen aus cDNA, die ursprünglich aus Rattenhirn kloniert wurde, in pcDNA3-Vektoren kloniert, um in Zellsystemen exprimiert zu werden. Als Modell wurde die Gβγ-abhängige Inositolphosphatbildung durch die Phospholipase Cβ<sub>2</sub> gewählt (s.o.), wobei anhand der Menge an IP<sub>3</sub> die Gβγ-Hemmung durch PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> gemessen wurde. Darauf sollten Dosis-Wirkungsbeziehungen dargestellt werden.

Eine konstitutive Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> konnte kürzlich nachgewiesen werden. Als zuständiges Enzym wurde jedoch nicht die PKA, sondern die CK2 identifiziert (Humrich et al. 2003). Um die verantwortliche Phosphorylierungsstelle in PhLP<sub>L</sub> herauszufinden, sollten anhand von Trunkierungen bzw. Aminosäureaustausch mögliche Phosphorylierungsstellen schrittweise entfernt werden.

Darüberhinaus wurde die Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> durch CK2 *in vitro* gezeigt und anhand von Zeit-Wirkungskurven dargestellt. Zusätzlich sollte die Anwesenheit von CK2 in menschlichen Zellen durch RT-PCR nachgewiesen werden, um eine Bedeutung des Phänomens *in vivo* zu demonstrieren.

Im weiteren war es Ziel, eine direkte Bindung von PhLP<sub>L</sub> bzw. PhLP<sub>S</sub> und Gβγ in intakten Zellen nachzuweisen, da sie als Voraussetzung für die Hemmung von Gβγ angenommen wird. Zu diesem Zweck wurden PhLP<sub>L</sub>/PhLP<sub>S</sub>-, Gβ- und Gγ-überexprimierende Zellsysteme genutzt, um eine Bindung mittels Immunpräzipitation nachzuweisen.

Darüberhinaus sollten die räumlichen Verhältnisse von PhLP innerhalb der Zelle genauer untersucht werden. Ein derartiges Phänomen wurde im Falle der kurzen Spleißvariante PhLP<sub>S</sub> beobachtet, die nach Stimulation von Zellen eine Translokation von der Membran ins Cytoplasma vollzieht (Gensse et al. 2000). Da wir annahmen, daß PhLP mit den bekannterweise membranassoziierten Proteinen Gβγ interagiert und selbst als cytosolisches Protein angesehen wird, wäre eine solche Translokation denkbar.

Die räumliche Verteilung der in Zellsystemen überexprimierten Proteine wurde durch Zellfraktionierung dargestellt.

## II. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die Chemikalien von Merck, Boehringer Mannheim oder Sigma im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

Agarose, Elektrophoresegrad	Gibco BRL
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH
[ <sup>32</sup> P]ATP	New England Nuclear Corp.
Blottingpapier GB 002/ GB 004	Schleicher & Schüll
DNA-Längenstandards:	
100bp-Ladder (500µg/µl)	New England Biolabs
1kb-Ladder (500µg/µl)	Gibco BRL
Dulbecco`s modified Eagle`s Medium, 0,1% Glukose	PAN™
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma
Myo-[2- <sup>3</sup> H]-Inositol	New England Nuclear Corp.
Kaliumchlorid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
PBS (steril, Zellkultur)	PAN™
Penicillin/Streptomycin (Zellkultur)	PAN™
Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen IgG	Dianova
Ponceau S-Lösung	Serva
Protein Assay-Reagenz Bradford	Biorad
Protein G-Sepharose	Amersham
Proteinlängenstandard	peQLab
PVDF-Membranen (ImmobilonP)	Millipore
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN

Rotiphorese® – Gel 30	Roth
RPMI 1640 Medium ohne i-Inositol	Life Technology
Säulen und Filter für die Plasmidpräparation	QIAGEN
Select Agar	Gibco BRL
Select Peptone 140	Gibco BRL
Select Yeast Extract	Gibco BRL
Tris (hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid	Merck
Trypsin	PAN™
Western Blotting Detection Kit	Pierce

## 1.2. Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Shrimps	Roche
<u>Restriktionsendonukleasen:</u>	
BamHI	New England Biolabs
EcoRI	New England Biolabs
NotI	New England Biolabs
XhoI	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase (Rapid Ligation Kit)	Roche
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf
Pfu-DNA-Polymerase	Eppendorf
Caseinkinase 2	Roche

## 1.3. Biologisches Material

### 1.3.1. Bakterienstämme

<i>E.coli</i> XL1-Blue	F <sup>-</sup> , Tn10( <i>tetR</i> ), proAB, Δ <sup>+</sup> ( <i>lacI</i> <sup>q</sup> ZΔM15, <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> A96, <i>gyrA1</i> , <i>relA1</i> , (Nal r) thi, <i>hsdR17</i> (r(k) <sup>-</sup> m(k) <sup>+</sup> ), <i>sup</i> E44, <i>endA1</i> , lac <sup>-</sup> Stratagene
------------------------	---



pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> 36	enthält PhLP <sub>L</sub> ohne die ersten 35 AS	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> 46	enthält PhLP <sub>L</sub> ohne die ersten 45 AS	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> 58	enthält PhLP <sub>L</sub> ohne die ersten 57 AS	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> A18-20	PhLP <sub>L</sub> -Variante mit Punktmutation der AS 18-20 von Ser zu Ala	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> A25	PhLP <sub>L</sub> -Variante mit Punktmutation der AS 25 von Ser zu Ala	diese Arbeit
pcDNA3-CK2 alpha	pcDNA3-Vektor mit der kodierenden Region von CK2 alpha	diese Arbeit
pcDNA3-CK2 beta	pcDNA3-Vektor mit der kodierenden Region von CK2 beta	diese Arbeit
pcDNA3-CK2 alpha K68A	pcDNA3-Vektor mit der kodierenden Region von CK2 alpha K68A	Sarno et al. 2002a

#### 1.3.4. Oligonukleotidprimer

Zur Klonierung der beiden PhLP-Formen in pcDNA3-Vektoren wurden in folgender Tabelle aufgeführte Primer eingesetzt. Die Primer enthalten von 5' nach 3' gelesen je eine nichtbindende Sequenz, eine Schnittstelle für Restriktionsenzyme und die Anfangs- bzw. die Endsequenz von PhLP. Die Vorwärts-Primer enthalten eine Schnittstelle für BamHI, der Rückwärts-Primer enthält eine Schnittstelle für EcoRI zur späteren Einfügung in den Vektor (s.II.2.2.4.3.).

Zur Erzeugung der EYFP-Konstrukte wurden für PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> Rückwärts-Primer ohne Stopcodon verwendet, damit bei der Transkription die cDNA für PhLP und EYFP hintereinander abgelesen werden (genaue Erklärung s.III.1.1.3.). Die für die Trunkierungen (s.III.2.1.) eingesetzten Primer wurden vom Prinzip her wie die Primer für PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> konstruiert, setzen jedoch in ihrem Anfangsteil an der entsprechenden Schnittstelle an. Die Primer für die Ser → Ala-Mutanten enthalten keine Restriktionsschnittstellen, was in III.2.2. genauer erläutert wird. Beim Design der Primer für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der CK2 wurde nach dem gleichen Prinzip wie für PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> verfahren, z.T. mit anderen Restriktionsschnittstellen. Die Primer wurden bezogen von der Firma MWG-Biotech AG.

<u>PhLP-Primer :</u>	
PhLP <sub>L</sub> fwd (BamHI)	5'-AGG AGA <u>GGA TCC ATG</u> ACA ACC CTG GAT G-3'
PhLP <sub>L</sub> fwd2 (BamHI)	5'-TA <u>GGA TCC ATG</u> ACA ACC CTG GAT GAC-3'
PhLP <sub>S</sub> fwd (BamHI)	5'-AGG AGA <u>GGA TCC ATG</u> GAG CGG CTG ATC-3'
PhLP rev (EcoRI) (für PhLP <sub>L</sub> und PhLP <sub>S</sub> gleich)	5'-GCA GCC <u>GAA TTC TCA</u> ATC TAT TTC TAG-3'
PhLP rev (EcoRI), <u>ohne</u> Stopcodon → EYFP-Konstrukte (s.III.1.1.3.)	5'-GCA GCC <u>GAA TTC</u> ATC TAT TTC TAG ATC GC-3'
<u>EYFP- Primer:</u>	
EYFP fwd (EcoRI)	5'-CCG <u>GAA TTC ATG</u> GTG AGC AAG GGC GAG- 3'
EYFP rev (NotI)	5'-T ATC AAA <u>TGC GGC CGC TTA</u> CTT GTA CAG CT-3'
<u>Gγ<sub>2</sub>-Primer:</u>	
Gγ <sub>2</sub> fwd (BamHI)	5'-TA <u>GGA TCC ATG</u> GCC AGC AAC AAC AC-3'
Gγ <sub>2</sub> rev (EcoRI), ohne Stopcodon	5'-GCA GCC <u>GAA TTC</u> AAG GAT AGC ACA G-3'
<u>PhLP<sub>L</sub> -Trunkierungen:</u>	
PhLP <sub>L</sub> 5 fwd (BamHI)	5'-CC <u>GGA TCC ATG</u> GAT GAC AAG TTG CTG-3'
PhLP <sub>L</sub> 26 fwd (BamHI)	5'-CC <u>GGA TCC ATG</u> GAT GAC AAG TTG CTG-3'
PhLP <sub>L</sub> 29 fwd (BamHI)	5'-CC <u>GGA TCC ATG</u> GAC AAA GAC AGA GG-3'
PhLP <sub>L</sub> 36 fwd (BamHI)	5'-CC <u>GGA TCC ATG</u> GCC CCA GCC AGT AG-3'
PhLP <sub>L</sub> 46 fwd (BamHI)	5'-CC <u>GGA TCC ATG</u> GCT GAG CTG CGA G-3'
PhLP <sub>L</sub> 58 fwd (BamHI)	5'-CC <u>GGA TCC ATG</u> GGT CCA AAA GGG GTG-3'
<u>PhLP<sub>L</sub> Ser→Ala Mutationen:</u>	
PhLP 18/19/29 fwd	5'-C TAC <u>GCC GCC GCT</u> * GAG GAT GAG GAC-3'

PhLP 18/19/20 rev	5'-C CTC <u>AGC GGC GGC</u> * GTA GTA GTA CTG-3'
PhLP A25 fwd	5'-GAT GAG GAC <u>GCT</u> * GAC CAT GAA GAC-3'
PhLP A25 rev	5'-TTC ATG GTC <u>AGC</u> * GTC CTC ATC CTC-3'
<u>Caseinkinase 2:</u>	
CK2 $\alpha$ fwd (BamHI)	5'-TA <u>GGA TCC ATG</u> TCG GGA CCC GTG CC-3'
CK2 $\alpha$ rev (EcoRI)	5'-A <u>GAA TTC TTA</u> CTG CTG AGC GCC AGC-3'
CK2 $\beta$ fwd (BamHI)	5'-TA <u>GGA TCC ATG</u> AGC AGC TCG GAG GAG-3'
CKII $\beta$ rev (XhoI)	5'-ATG <u>CTC GAG TCA</u> GCG AAT CGT CTT GAC TGG -3'

**Leserichtung:**

**Fwd = vorwärts**

**Rev = rückwärts**

**In Klammern ist die Schnittstelle angegeben. In der Sequenz sind Schnittstelle und Start (ATG)- bzw. Stopcodon unterstrichen, außer bei den Primern für PhLP 18/19/29 und PhLP A25. Dort sind die eingefügten Mutationen (\*) gekennzeichnet.**

**1.3.5. Antikörper**

Zur Detektion sämtlicher in dieser Arbeit hergestellter PhLP-Varianten wurde als primärer Antikörper der polyklonale Kaninchenantikörper anti-CTPP (C-terminal PhLP-peptide) benutzt, da die Varianten dieser Arbeit nur im N-Terminus verändert sind. Das als Antigen dienende synthetische Peptid wurde aus dem C-Terminus von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> (Sequenz: CHSESDLEID) hergestellt (Schröder, Lohse 1995; Humrich et al. 2003). Da es aufgrund seines geringen Molekulargewichts (unter 3 kDa) nicht unmittelbar zur Immunisierung brauchbar ist, wurde es an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) als Trägerprotein kovalent gekoppelt. Es wurde daraufhin Kaninchen injiziert, die durch zwei boost-Injektionen zur Antikörperproduktion angeregt wurden, welche aus dem Serum extrahiert wurden.

ANTIGEN	EIGENSCHAFTEN	REFERENZ
PhLP <sub>S</sub>	Kaninchen, polyklonal	Schröder 2000

CTPP 208-218 mit KLH	Kaninchen, polyklonal	Humrich 2003
Goat anti rabbit POD	Peroxidase-gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper	Dianova
G $\beta$ <sub>1</sub> , G $\beta$ common	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology

## 1.4. Medien und Puffer

In der Regel wurde für Medien und Puffer vollentsalztes und pyrogenfreies Wasser aus einer Barnstead-Anlage verwendet. Für die Zellkultur wurden Medien, Medienzusätze und Puffer von den entsprechenden Firmen bezogen.

### 1.4.1. Medien für die Kultur von E.coli

LB-Medium:                    1%    Pepton  
                                       0,5% Hefeextrakt (Yeast extract)  
                                       1%    NaCl

Agarplatten:                    Zusatz von 1,5% Agar und 100 $\mu$ g/ml Ampicillin (Selektion)

### 1.4.2. Medien für die Kultur von HEK 293-Zellen

DMEM-Medium mit Zusätzen:    DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s Medium, 0,1% Glucose)  
     + 10 % FCS  
     + 1:100 Penicillin, 1:100 Streptomycin

### 1.4.3. Allgemeine Puffer

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

5 x Laemmli-Puffer:                250 mM Tris/HCl, pH 6,8  
     5% SDS  
     1% (g/v) DTT  
     40% Glycerin  
     0,005% Bromphenolblau

1 x SDS-Laufpuffer	30,3 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS Wasser ad 1000ml
1 x Transferpuffer	2,4g Tris/HCl, pH 8.3 11,24g Glycin 200 ml Methanol Wasser ad 1000ml

## 2. Methoden

### 2.1. Kultur von Bakterien und Zellen

#### 2.1.1. Kultur von E.coli

E.coli-Kulturen, die zur Vervielfältigung von Plasmidvektoren verwendet werden sollten (s.II.2.2.5.), wurden entweder als Einzelkolonie oder als Vorkultur angeimpft. Für den Ansatz einer Vorkultur wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 5 µl (100 mg/ml) Ampicillin zur Selektion angeimpft und ca. sechs Stunden in einem Thermoschüttler bei 37°C inkubiert.

Die Einzelkolonie oder Vorkultur wurde dann in 200 ml LB-Medium mit 200 µl (100 mg/ml) Ampicillin in einem 1l-Schüttelkolben bei 37°C in einem Rotationsschüttler über Nacht angezüchtet. Die auf LB-Agarplatten ausgestrichenen Kulturen wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### 2.1.2. Kultur eukaryontischer Zellen (HEK 293-Zellen)

Die Zellen wurden als Monolayer-Kulturen in DMEM-Medium mit entsprechenden Zusätzen (s.o.) bei 7% CO<sub>2</sub> und 37°C gezüchtet und je nach Dichte der Aussaat alle zwei bis drei Tage passagiert. Dabei wurden das Medium abgesaugt, die angewachsenen Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Reaktion wurde mit dem gleichen Volumen Medium gestoppt, die Zellen resuspendiert und im Verhältnis 1:2 bis 1:5 in neues Medium ausgesät.

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1. Amplifizierung von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können bestimmte DNA-Abschnitte, z.B. aus Plasmid-DNA, genomischer DNA oder viraler DNA, amplifiziert werden. Dabei verwendet man den kodierenden Sequenzen entsprechende 5'- und 3'- Oligonukleotid-Primer, wobei der erste dem Anfang der zu amplifizierenden Sequenz und der zweite dem Ende komplementär ist und auf der gegenüberliegenden Seite bindet.

Während der PCR wird ein dreiphasiger Reaktionszyklus aus

1. Denaturierung = Trennung der doppelsträngigen Matrize, um die Basen für das Anlagern der Primer freizulegen,
2. Hybridisierung oder Annealing = Anlagerung der Oligonukleotidprimer und
3. DNA-Polymerisation/Extension der Primer, die letztlich angestrebte Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts

in einem programmierbaren Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer) mehrmals durchlaufen.

In dieser Arbeit wurden Reaktionsansätze von 100 µl nach folgendem Protokoll verwendet:

- 100 µM dNTPs
- 1 µM Vorwärts-Primer (zu 100µmol/l verdünnt)
- 1 µM Rückwärts-Primer (zu 100µmol/l verdünnt)
- 0,02 - 1 µg Template-DNA
- 2,5-5 U Taq-Polymerase/ Pfu-Polymerase
- 10µl 10-fach Polymerasepuffer

Die Ansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert, auf 100 µl mit steril filtriertem Wasser aufgefüllt, kurz zentrifugiert und mit ca. 100 µl Mineralöl überschichtet. Die Pfu-Polymerase hat den Vorteil, daß sie eine 3'-5'-Endonukleaseaktivität besitzt und dadurch eine etwa zehnfach höhere Replikationsgenauigkeit aufweist.

Um eine möglichst spezifische DNA-Amplifizierung bei hoher Ausbeute und geringer Zyklenzahl zu erzielen, wurde im Laufe der Weiterentwicklung der PCR ein Temperaturoptimum für die Primerhybridisierung ermittelt. Dieses richtet sich nach der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der entsprechenden Primer, die von Primerlänge und Basenzusammensetzung (die GC-Bindung ist stärker als die AT-Bindung) abhängt. Zur Abschätzung der Schmelztemperatur dient folgende Formel:

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

Die Hybridisierungstemperatur ( $T_H$ ) sollte etwa  $7^{\circ}\text{C}$  unter der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide liegen. Wegen der Verwendung unterschiedlicher Primer in dieser Arbeit wurde daher diese Temperatur immer anders gewählt. Denaturierungs- und Polymerisierungstemperatur variieren jedoch nicht, wobei die Polymerisierungstemperatur ein Optimum für die DNA-Polymerase (hier: Taq oder Pfu) darstellt. Da die DNA zu Beginn in einer noch recht komplexen, hochmolekularen Struktur vorliegt, wählt man im ersten Zyklus eine Zeit von 5-10 min zur Denaturierung, um insbesondere GC-reiche Sequenzen zu trennen. Im Idealfall liegen in den folgenden Zyklen nur die neu entstandenen Abschnitte doppelsträngig vor, sodaß eine wesentlich kürzere Zeitspanne zur vollständigen Denaturierung ausreicht.

Im folgenden wird als Beispiel eine der in dieser Arbeit durchgeführten PCRs beschrieben:

1. Zyklus	Denaturierung	94°C	5-10 min
	Hybridisierung	$T_H$	1 min
	Polymerisierung	72°C	1 min (1 min/1 kb)
2.-34. Zyklus	Denaturierung	94°C	1 min
	Hybridisierung	$T_H$	1 min
	Polymerisierung	72°C	1 min (1 min/1 kb)
35. Zyklus	Denaturierung	94°C	1 min
	Hybridisierung	$T_H$	1 min
	Polymerisierung	72°C	10 min (1 min/1 kb)

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der Taq-Polymerase und damit verbundenen Fehlprodukten wurde ein „Hot Start“ durchgeführt: die Ansätze wurden vor dem ersten Zyklus zehn Minuten lang auf  $94^{\circ}\text{C}$  erhitzt, und die Taq-Polymerase wurde erst danach hinzugegeben.

### **2.2.2. Auftrennung und Reinigung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente wurden in einem 1%igen Flachbett-Agarosegel (in TAE) elektrophoretisch aufgetrennt, welches  $5\ \mu\text{l}$  einer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ ) zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht enthält. Als Laufmittel wurde 1x TAE

verwendet. Vor dem Auftragen wurde die DNA mit 1/10 Volumeneinheiten eines 10-fachen DNA-Ladepuffers gemischt. Zusätzlich wurden ein 100-Basenpaar-Marker bzw. ein 1-Kilobasen-Marker (New England Biolabs) als Längenstandards aufgetragen.

Die angelegte Spannung betrug 5 V/cm. Nach der Elektrophorese konnten die DNA-Banden unter UV-Licht mit Hilfe des interkalierenden Ethidiumbromids sichtbar gemacht und ihre Größe anhand der Längenstandards kontrolliert werden.

10x DNA-Ladepuffer:                    30% Glycerin  
    100 mM EDTA  
    0,5% Bromphenolblau

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

### **2.2.3. Extraktion von DNA aus Agarosegel**

Um die DNA aus der gewünschten Bande im Gel zu gewinnen, wurde der QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Dazu wurde zunächst das entsprechende Gelstück unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Zur Auflösung des Gelstücks wurde es mit dem dreifachen Volumen vom Puffer QG 10 Minuten lang bei 50°C auf dem Thermoschüttler inkubiert.

Die DNA, die im Gel enthalten war, wurde durch Zentrifugation (1 Minute, 14000 RPM, Eppendorf Centrifuge 5417) in einer QIAEX-Silicagel-Membran festgehalten, mit Waschpuffer PE gewaschen und mit dem Elutionspuffer EB in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert.

#### Puffer des QIAquick Gel Extraction Kit:

Lösungspuffer QG (3 M NaCl, 4 M NaClO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0)

Waschpuffer PE 80% Ethanol

Eluierungspuffer EB (10 mM Tris/HCl, pH 8,5)

## 2.2.4. Enzymatische Behandlung von DNA

### 2.2.4.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Bei der Spaltung mit Restriktionsenzymen wurde das vom Hersteller speziell für das verwendete Enzym empfohlene Puffersystem verwendet. Die DNA-Konzentration sollte etwa 100 ng/μl betragen, pro μg DNA wurden 2-5 Enzymeinheiten eingesetzt, sodaß eine vollständige Restriktion nach 2 Stunden bei 37°C erreicht war. Danach wurden die Enzyme, wenn nach Angabe des Herstellers möglich, 20 Minuten lang hitzeinaktiviert. War Hitzeinaktivierung nicht möglich, wurde die gespaltene DNA nach im II.2.2.3. beschriebenen Waschschrift von den Enzymen getrennt. Bei Mehrfachspaltung wurde ein Puffer verwendet, der mit allen beteiligten Restriktionsenzymen kompatibel ist. Das Ergebnis der Spaltung wurde mit Hilfe eines Agarosegels (II.2.2.2.) überprüft.

### 2.2.4.2. 5'-Dephosphorylierung des Vektors mittels SAP-Methode

Um die Religation des Vektors an gleichen Restriktionsstellen mit den zuvor herausgeschnittenen Fragmenten zu unterbinden, wurde er dephosphoryliert. Das Fehlen der Phosphatgruppe verhindert die Ligation. Für die Dephosphorylierung zuständig war die alkalische Phosphatase aus Shrimps, von der 2 U/μg DNA und ein entsprechender Puffer hinzugefügt wurden. Darauf wurde 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert, danach wurde die Phosphatase bei 65°C 30 Minuten lang inaktiviert.

### 2.2.4.3. Ligation von DNA-Fragmenten und Vektor-DNA

Die Verknüpfung von einem Vektor mit einem DNA-Fragment (Insert) mit entsprechenden Schnittstellen wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in wässriger Lösung ausgeführt. Bezüglich der Mengenverhältnisse von Vektor und Insert wurde von sechsfacher Menge Insert bis zu äquimolarer Menge variiert.

Die Ligationen erfolgten in wässriger Lösung in möglichst kleinen Volumina von 10 bis 20 μl. Das zu klonierende DNA-Fragment wurde mit dem Vektor in Gegenwart von 1/10 Volumen Ligasepuffer (10-fach) und 2-4 U T4-Ligase 20 min bei RT verknüpft.

## 2.2.5. Isolation von Plasmid-DNA in größerer Menge

Um größere Mengen an Plasmiden für die Zelltransfektion (s.u.) zur Verfügung zu haben, wurden diese in Bakterienkulturen vervielfältigt und gereinigt. Man bediente

sich der Kultur einer Einzelkolonie, wodurch eine große genetisch gleiche Menge Bakterien entstand, aus denen man dann die DNA freisetzte. Zunächst wurde die gewünschte DNA durch Transformation nach der KCM-Methode (II.2.2.7.) in E.coli gebracht, die nach Ausstreichen auf Agarplatten Einzelkolonien bilden. Eine dieser Einzelkolonien wurde in 200 ml LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin zur Selektion in einem Schüttelkolben angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Thermoschüttler inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Bakteriensuspension 7 Minuten mit 7000 RPM mit dem JA-14 Rotor von Beckman zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 10 ml Resuspensionspuffer P1 resuspendiert. Es wurden 10 ml Lysepuffer P2 hinzugefügt, der NaOH enthält, welches die genomische DNA zerstört. Daraufhin gab man 10 ml Neutralisationspuffer P3 hinzu. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 17000 RPM mit dem JA-17 Rotor von Beckman, bei der die DNA im Überstand verblieb und ein Pellet entstand, welches Proteine enthielt.

Der Überstand wurde auf eine QIAEX 500-Glassäule gegeben, die zuvor mit dem Äquilibriumspuffer QBT behandelt worden war. Zweimal wurde die in der Glassäule verbleibende DNA mit jeweils 30 ml Waschpuffer QC gewaschen. Dann wurde die DNA mit 15 ml Elutionspuffer QF in ein Zentrifugenröhrchen eluiert und mit 10,5 ml Isopropanol gefällt. Eine weitere 30-minütige Zentrifugation bei 9800 RPM mit dem JA-17 Rotor von Beckman folgte.

Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 500 µl H<sub>2</sub>O gelöst und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß von Eppendorf gegeben. Darauf wurden die Reste durch Mischung mit je 750 µl Ethanol aus dem Zentrifugenröhrchen ins Reaktionsgefäß gebracht.

Die Lösung wurde bei 14000 RPM mit einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417) 5 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit 100-300 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Puffer für die Plasmidpräparation:

Resuspensionspuffer P1:	50 mM TrisCl
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
	pH 8,0

Lysepuffer P2:	200 mM NaOH 1% SDS
Neutralisationspuffer P3:	3,0 M Kaliumazetat, pH 5,5
Äquilibrierungspuffer QBT:	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15% Isopropanol 0,15% TritonX-100 pH 7,0
Waschpuffer QC:	1,0 M NaCl 50 mM MOPS 15% Isopropanol pH 7,0
Elutionspuffer QF:	1,25 M NaCl 50 mM Tris 15% Isopropanol pH 8,5

### 2.2.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung wurde zur Feststellung der Ausbeute einer Plasmid-Maxipräparation angewandt und erfolgte photometrisch bei einem Spektrum zwischen 260 und 280 nm. Da in der Probe möglichst wenig Proteine enthalten sein sollten, wurde ein Verhältnis der Extinctionen  $E_{260}$  (DNS) /  $E_{280}$  (Proteine) von 1,6 bis 1,8 angestrebt. Dabei bezeichnen  $E_{260}$  bzw.  $E_{280}$  die Extinktionen bei 260 bzw. 280 nm in einer 1cm-Küvette.

Die DNS-Konzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$$c = E_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 100 \text{ (Verdünnung)}$$

### 2.2.7. Transformation von E.coli nach der KCM-Methode

Kompetente Zellen wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 2  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz zu 98  $\mu\text{l}$  1x KCM-Puffer hinzugefügt und mit dem gleichen Volumen Bakterien 20 Minuten auf Eis, danach 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Ansätze 50 Minuten bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert, um die Ampicillinresistenz zu exprimieren.

Daraufhin wurde nach dem Zentrifugieren (3 min, 5000 RPM in einer Tischzentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5417) der Überstand abgegossen. Die verbleibenden 50 bis 100 µl wurden zur Resuspension des Pellet verwendet und der gesamte Inhalt auf Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert.

1x KCM-Puffer:                    100 mM KCL  
    30 mM CaCl<sub>2</sub>  
    50 mM Mg Cl<sub>2</sub>

### **2.2.8. Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen nach der Calciumphosphat-Methode**

Zur transienten Transfektion von HEK 293-Zellen eignet sich die Calciumphosphatpräzipitation nach Chen und Okayama (1987). 3 bis 6 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen von einer 175 cm<sup>2</sup>-Flasche auf 4 Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm oder auf 6-Well-Platten mit einem Durchmesser von jeweils 3,6 cm ausgesät. Die Angaben für transfizierte DNA-Mengen beziehen sich in dieser Arbeit – wenn nicht gesondert erwähnt – auf 10 cm-Schalen.

Der Transfektionsansatz enthielt 10-20 µg DNA, 450 µl H<sub>2</sub>O, 125 µM CaCl<sub>2</sub> und 450 µl 2xBBS (pro Petrischale oder 6-Well-Platte), wurde gemischt, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen pipettiert, welche zu 70% konfluent waren. Bei den 6-Well-Platten wurde vom in gleicher Weise hergestellten Ansatz der Fläche ca. ein Drittel pro Well pipettiert. Die Platten wurden darauf bei 37°C und 3 % oder 5 % CO<sub>2</sub> über 48 h zur Expression inkubiert.

Dann standen die Zellen für weitere Versuche bzw. einen Western Blot zur Verfügung. Meistens wurde eine Transfektionseffizienz von 60-80% für die cDNA beider PhLP-Isoformen erreicht, was sich mit Hilfe der Transfektion von PhLP-EYFP-Konstrukten zeigen ließ (s.u.).

2X BBS:            50 mM Bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES)  
                          280 mM NaCl  
                          1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                          pH 6,95 (muß exakt eingestellt sein)

## **2.3. Proteinchemische Methode**

### **2.3.1. Herstellung eines Zellhomogenats**

Das Medium der über Nacht inkubierten Zellen wurde zunächst (unter nicht sterilen Bedingungen) abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen mit 200 µl Lysepuffer pro 10 cm-Schale (hypoton, 20 mM Tris-Base, 1% Triton X) auf einem Schüttler 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Dann wurden die lysierten Zellen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen überführt und 15 Minuten bei 14.000 RPM mit einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417) zentrifugiert. In einem anderen Reaktionsgefäß wurde der Überstand mit 5x Laemmli-Puffer im Verhältnis 5:1 verdünnt. Nach Erhitzen der Proben (10 Minuten, 95°C) konnten diese auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen werden.

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

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt in 5 %igen Sammel- und 12%igen Trenngelen (Dicke 1mm). Die aufzutrennenden Proteinmischungen wurden vor dem Auftragen mit 5x Laemmli-Puffer im Verhältnis 5:1 versetzt und 10 Minuten lang auf 95°C erhitzt.

Die Elektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 70 mA pro Gel für 1,5 h in Hoefer-Gelkammern (Gelmaße 14 x 8 cm) durchgeführt. Zur späteren Bestimmung der Proteingröße wurde in eine Tasche ein Marker aufgetragen.

4-fach Trenngelpuffer	5,0 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	8,0 ml
Wasser	7,0 ml
TEMED	10,0 µl
APS	130,0 µl

4-fach Sammelgelpuffer	2,0 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	1,0 ml
Wasser	5,0 ml
TEMED	8,0 µl
APS	80,0 µl

4-fach Trenngelpuffer:	SDS	4,0g
	3M Tris-HCl pH 8,8	500ml
	Wasser	ad 1000ml
4-fach Sammelgelpuffer:	SDS	2,0g
	1M Tris-HCl pH 6,8	250ml
	Wasser	ad 500ml

Acrylamid 30% / Bisacrylamid 0,8% als Fertiglösung von Roth

Ammoniumperoxiddisulfat (APS) 10%

Tetramethylethyldiamin (TEMED)

### 2.3.3. Western Blotting von Proteinen

Diese Methode diente dazu, Proteine, die nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, mit Hilfe immunologischer Methoden sichtbar zu machen. Im folgenden werden die einzelnen Schritte erklärt.

#### 2.3.3.1. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die Proteine wurden nach der Elektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel mit Hilfe einer Semidry-Apparatur der Firma Biorad auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese mußte zuvor mit Methanol aktiviert und daraufhin in Transferpuffer gewaschen werden. Die Reihenfolge der Lagen sieht folgendermaßen aus: Kathode – drei Lagen in Transferpuffer getränktem Blotting-Papier – SDS-Gel – PVDF-Membran – drei Lagen in Transferpuffer getränktem Blotting-Papier – Anode. Zum Proteintransfer wurde die Apparatur 90 Minuten lang auf 15 V eingestellt.

#### 2.3.3.2. Immunologische Detektion von immobilisierten Proteinen

Da die PVDF-Membran aufgrund ihrer Oberflächenstruktur potentiell antikörperbindend ist, wurden diese Bindungsstellen durch Inkubation (über Nacht) mit Blockpuffer (1xPBS, 3% Milchpulver) besetzt.

Dann wurde die Membran 1 h lang mit dem in Blockpuffer gelösten ersten Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal jeweils 10 Minuten mit Waschpuffer (1xPBS, 0,1% Tween 20) gewaschen und wiederum 1 h lang mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Nach dem oben beschriebenen Waschschrift wurden die Western Blots mittels Chemolumineszenzreaktion mit dem Supersignal West Pico

Chemoluminescent Kit (Pierce) entwickelt. Die Detektion erfolgte durch Belichtung von Biomax-ML-Filmen (Kodak).

#### **2.3.4. Zellfraktionierung**

Die Zellfraktionierung dient der Auftrennung von Zellen in ihren cytosolischen und membranären Anteil. Durch Auftrennung der beiden Anteile auf SDS-Gelen und Detektion mittels spezifischer Antikörper kann die Lokalisation bestimmter Proteine in der Zelle festgestellt werden.

Vorbereitung: Am ersten Tag wurden HEK 293-Zellen von einer 175 cm<sup>2</sup>-Flasche auf 4 Petrischalen mit einem Durchmesser von 10cm ausgesät. Nach 3-6 h erfolgte die Transfektion nach der CaPO<sub>4</sub>-Methode. Am zweiten Tag wurde das Medium gewechselt.

Am dritten Tag, also 48 h post-transfunktional, wurde die Fraktionierung durchgeführt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS pro Schale gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 2 ml Lysepuffer (1-10 mM DTT, 1 mM PMSF) pro Schale 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und mit einer 1 ml-Einmalspritze 20x durch eine 27G-Nadel gepresst, um die genomische DNA zu zerstören. Die zerstörten Zellkerne und Zelltrümmer wurden 10 Minuten bei 5100 RPM mit einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417) abzentrifugiert, es resultiert als Überstand das Zellhomogenat, von dem ein Aliquot abgenommen wird, dem man im Verhältnis 1:4 5xLaemmli-Puffer hinzufügt.

Vom restlichen Homogenat wurde 1 ml in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt. Durch die darauffolgende Zentrifugation (1 h, 68.000 RPM mit der Optima TLX120<sup>TM</sup> Ultracentrifuge von Beckman, Rotor TLA-120.2) wurden Membranen und Cytosol voneinander getrennt, wobei das Cytosol den Überstand bildete. Vom selbigen wurde wieder ein Aliquot abgenommen und wie o.g. behandelt. Der restliche Überstand wurde komplett abgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

Zur besseren Reinigung der Zellmembranen, die sich als Pellet darstellten, wurde dieses mit 1 ml Lysepuffer gewaschen und anschließend mit 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Neben den Zellmembranen enthält das Pellet auch Zellorganellen wie Mitochondrien

und Endoplasmatisches Retikulum, daher wird es in der englischen Literatur als „crude membranes“ bezeichnet. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation unter o.g. Bedingungen. Dann wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Nach der Resuspension des Pellets in Lysepuffer (0,1% TritonX) wurde ein Aliquot abgenommen und wie o.g. behandelt, der Rest bei -20°C aufbewahrt.

Die mit Laemmli-Puffer versetzten Proben konnten nun auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen werden.

Lysepuffer:           20 mM HEPES  
                          20 mM NaF  
                          1 mM Natriumorthovanadat; pH 7,4

### 2.3.5. Immunpräzipitation

Mit dieser Methode kann festgestellt werden, ob ein Protein mit einem anderen bestimmten Protein einen Komplex bildet.

Vorbereitung: Am ersten Tag wurden HEK 293-Zellen von einer 175 cm<sup>2</sup>-Flasche auf 4 Petrischalen mit einem Durchmesser von 10cm ausgesät. Nach 3-6 h erfolgte die Transfektion nach der CaPO<sub>4</sub>-Methode. Am zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Wegen der langen Inkubationszeit wurde die Sepharose bereits vorbereitet:

Zunächst wurden Waschschriffe durchgeführt. Dabei wurden 200 µl (je 50µl) Protein-G-Sepharose mit 1,5 ml 1xPBS (plus 0,01% TritonX) dreimal gewaschen. Dann wurde die gewaschene Sepharose mit dem 2,5fachen Volumen 1xPBS (plus 0,01% TritonX) verdünnt, und es wurden pro 50 µl Sepharose 5 µl Antiserum hinzugegeben. Am dritten Tag wurde die Immunpräzipitation durchgeführt. Die Sepharose wurde dreimal mit IP-Puffer gewaschen, um überflüssige Serumproteine zu entfernen.

Von nun an mußte bei einer Temperatur von 4°C gearbeitet werden. Unter unsterilen Bedingungen wurde das Medium der Zellen abgesaugt, dann inkubierte man sie 15 min lang mit 1 ml IP-Puffer (plus 1% NP-40) und 1% PMSF. Das Zelllysate wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zur effizienten Aufbrechung von Zellen und Organellen mit Ultraschall behandelt. Größere Zellbestandteile wurden 5 min bei 14.000 RPM (Eppendorf Centrifuge 5417) abzentrifugiert, der Überstand wurde der Sepharose hin-

zugefügt sowie BSA zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Es folgten 2 h Inkubation auf einem Drehrad bei 4°C.

Anschließend wurde die Sepharose mit den gebildeten Immunkomplexen 1 min bei 14.000 RPM (Eppendorf Centrifuge 5417) abzentrifugiert und fünfmal mit dem 20-fachen Volumen IP-Wasch-Puffer (plus 0,1% NP-40) gewaschen. Dazwischen wurden die Ansätze jeweils 1 min bei 14.000 RPM (Eppendorf Centrifuge 5417) zentrifugiert. Beim letzten Waschschrift wurde 1x PBS verwendet. Die gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von SDS-Laemmli-Puffer eluiert, 10 min bei 95°C erhitzt und auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen.

IP-Puffer:                    50 mM Tris, pH 8 bei 4°C  
                                  150 mM NaCl  
                                  1% NP-40  
                                  1x Proteaseinhibitormix (50 mM NaF; 5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 0,002% NaN<sub>3</sub>)

### 2.3.6. Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub>

Die Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> wurde mit aus E.coli als His<sub>6</sub>-getaggttem gereinigtem PhLP<sub>L</sub> und rekombinanter humaner CK2 (Roche) durchgeführt. Es wurden 50 µl-Proben verwendet, die 400 nM rekombinantes PhLP<sub>L</sub>, CK2-Puffer, 0,04 mU CK2 und 200 µM ATP (1 µCi [<sup>32</sup>P]ATP) enthielten und bei 30°C für 30 Minuten inkubiert wurden. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt und durch Kochen in Laemmli-Puffer beendet. Darauf folgten SDS-PAGE, Coomassie Blue-Färbung und Phosphorimaging. Phosphorimaging und Quantifizierung der Phosphorylierung wurden mit FLA-3000 von Fuji durchgeführt.

CK2-Puffer:                    20 mM Tris-Cl  
                                  50 mM KCl  
                                  10 mM MgCl<sub>2</sub>  
                                  5 mM Dithiothreitol  
                                  pH 7,5

## 2.4. Messung der G $\beta$ -Funktion mittels Inositolphosphatbildung

Die Bestimmung der Gesamtinositolphosphate wurde wie bei Quitterer et al. (1996) beschrieben durchgeführt.

### 2.4.1. Kultur und Vorbereitung der eukaryontischen Zellen

In dieser Arbeit verwendete HEK 293-Zellen wurden mit je 3  $\mu$ g cDNA für PLC $\beta_2$ , G $\beta_1$  und G $\gamma_2$  pro 10 cm-Schale transient transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen einer Schale gewaschen, abtrypsiniert und in 24 ml Kulturmedium1 (s.u.) resuspendiert. Davon wurden 4 ml auf 3 Wells einer 6-Well-Platte ausgesät für den Stimulierungsversuch. Auf ein Well einer anderen 6-Well-Platte wurden weitere 4 ml gegeben. Diese Zellen dienten dazu, mittels Western Blot die Expression der im Versuch untersuchten Proteine zu kontrollieren.

### 2.4.2. Beladung eukaryontischer Zellen mit Myo-[2-<sup>3</sup>H]-Inositol

3 bis 6 Stunden nach dem Verteilen auf 6-Well-Platten wurde das Kulturmedium1 abgesaugt, die Zellen wurden gewaschen, mit 2 ml Kulturmedium2 (inositolfreies RPMI 1640 Medium mit 0,2% FCS und 2  $\mu$ Ci/ml myo-[2-<sup>3</sup>H(N)] Inositol) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) pro Well beladen und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen für den Western Blot wurden abgesaugt, und es wurden 2 ml Kulturmedium1 mit gleicher FCS-Konzentration wie Kulturmedium2 hinzugegeben, um die Bedingungen gleich zu halten.

### 2.4.3. Stimulierung und Messung der Inositolphosphate

Die Zellen hatten das radioaktive Inositol in ihre Membran eingebaut, in der es als Phosphatidylinositol vorlag und von der Phospholipase C in Inositolphosphat gespalten werden konnte. Durch das Auffangen der freigewordenen Inositolphosphate in Dowexsäulen und die anschließende Quantifizierung konnte die Aktivität der Phospholipase C bestimmt werden.

Zunächst wurden die Zellen mit 2 ml Inkubationspuffer gewaschen. Dann wurden sie in Inkubationspuffer mit 10 mM LiCl 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert, damit die Inositolphosphate nicht abgebaut werden konnten.

Die Reaktion wurde mit 100  $\mu$ l 20%iger Perchlorsäure und 10-minütiger Inkubation auf Eis gestoppt. Der Überstand wurde in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit 450  $\mu$ l 1M KOH neutralisiert. In einer 5-minütigen Zentrifugation bei 14.000 RPM (Eppendorf Centrifuge 5417) wurde das Kaliumperchlorat abgesondert. 1 ml dieser Lösung wurde in 2 ml 50mM Tris pH 7,4 zur nochmaligen Neutralisation gegeben. Die Probe wurde auf eine Anionenaustauschersäule (DOWEX AG 1x8) aufgetragen. Die Säule wurde zweimal mit 4ml H<sub>2</sub>O gewaschen, um die freien Inositolphosphate zu entfernen. Darauf wurden die gebundenen Inositolphosphate mit 3 ml einer 1 M HCl-Lösung eluiert. Das Eluat wurde mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit der Firma Lumac LSC versetzt, und anschließend die radioaktiv markierten Inositolphosphate im Beta-Counter LS 1801 der Firma Beckman zu messen.

In den im Ergebnisteil beschriebenen Versuchen wurden die Inositolphosphate als Triplets gemessen und die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von wenigstens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die Werte werden angegeben als Prozentsatz der Kontrolle, welche die Inositolphosphatproduktion in mit PLC $\beta_2$ -, G $\beta_1$ -, und G $\gamma_2$ -cDNA transfizierten Zellen darstellt und somit als maximale Aktivierung gleich 100% gesetzt wird. Zur statistischen Auswertung wurden ANOVA und Post-Test-Comparison (Bonferroni) benutzt.

Kulturmedium 1: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium, 0,1% Glucose)  
10 % Fetales Kälberserum  
1% Penicillin (10.000 U/ml), 1% Streptomycin (10.000 U/ml)

Kulturmedium 2: RPMI 1640, inositolfrei  
0,2% FCS  
0,1% Myo-[2-<sup>3</sup>H]-Inositol (1-2  $\mu$ Ci/ml)

Inkubationspuffer: 138 mM NaCl  
5 mM KCl  
1 mM MgCl  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,1% Glucose  
20 mM HEPES pH 7,4

## III. Ergebnisse

### 1. Hemmung der $G\beta\gamma$ -Untereinheit durch $PhLP_L$ und $PhLP_S$ in Zellen

Eine  $G\beta\gamma$ -Inhibierung durch  $PhLP_L$  und  $PhLP_S$  wurde *in vitro* mehrfach nachgewiesen: Schröder und Lohse zeigten 1996 unter Verwendung von aus E.coli gereinigtem  $PhLP_S$ , daß es die Pertussistoxin-katalysierte  $G\beta\gamma$ -stimulierte ADP-Ribosylierung von  $G\alpha$  hemmt sowie die durch  $G\beta\gamma$  geförderte Aktivität der GTPase von  $G\alpha_0$ , wobei  $PhLP_S$  ein schlechterer Inhibitor war als Phosducin. Auch die  $G\beta\gamma$ -vermittelte Rhodopsin-Phosphorylierung durch GRK2 ließ sich durch  $PhLP_S$  hemmen. In einem Vergleich zwischen  $PhLP_L$ ,  $PhLP_S$  und Phosducin in ihrer Fähigkeit zur Hemmung der  $G\beta\gamma$ -abhängigen ADP-Ribosylierung von  $G\alpha_1$  erwies sich  $PhLP_L$  als dem Phosducin gleichwertiger Inhibitor, während  $PhLP_S$  weniger stark hemmte (Schröder und Lohse 2000).

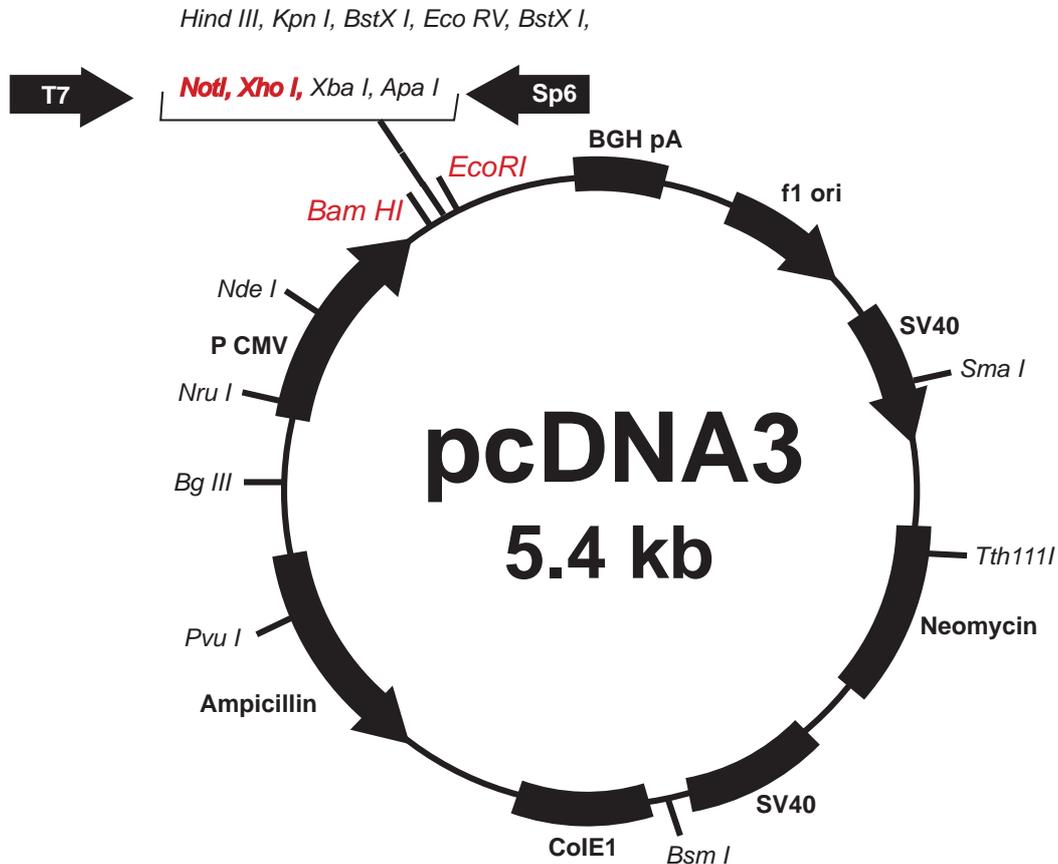
In dieser Arbeit sollten diese Mechanismen in intakten Zellen getestet werden, wobei die Fragestellung war, ob  $PhLP_L$  und  $PhLP_S$  die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit hemmen und welcher von ihnen der bessere Inhibitor ist. Hierzu wurden beide Formen aus cDNA, die ursprünglich aus Rattenhirn kloniert wurde (Schröder und Lohse 1996), in pcDNA3-Vektoren kloniert, um in HEK 293-Zellen exprimiert zu werden.

#### 1.1. Klonierung von $PhLP_L$ und $PhLP_S$

##### 1.1.1. Der pcDNA3-Vektor

Alle in dieser Arbeit verwendeten cDNAs wurden in pcDNA3 kloniert, um daraufhin in HEK 293-Zellen exprimiert zu werden. Der pcDNA3-Vektor dient der Klonierung und Expression von Genen. Er enthält zum Zwecke der Selektion eine Kopie des  $\beta$ -Lactamase-Gens, was zur Ampicillinresistenz führt. Im weiteren verfügt der Vektor über zahlreiche Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die man sich zum Einfügen von DNA-Sequenzen zu Nutze macht. Hier wurden BamHI, Eco RI, NotI und XhoI genutzt.

Zudem enthält pcDNA3 einen CMV- und einen T7-Promotor, die einer effizienten Transkription dienen.



**Abb.6: Aufbau des pcDNA3-Vektors.**

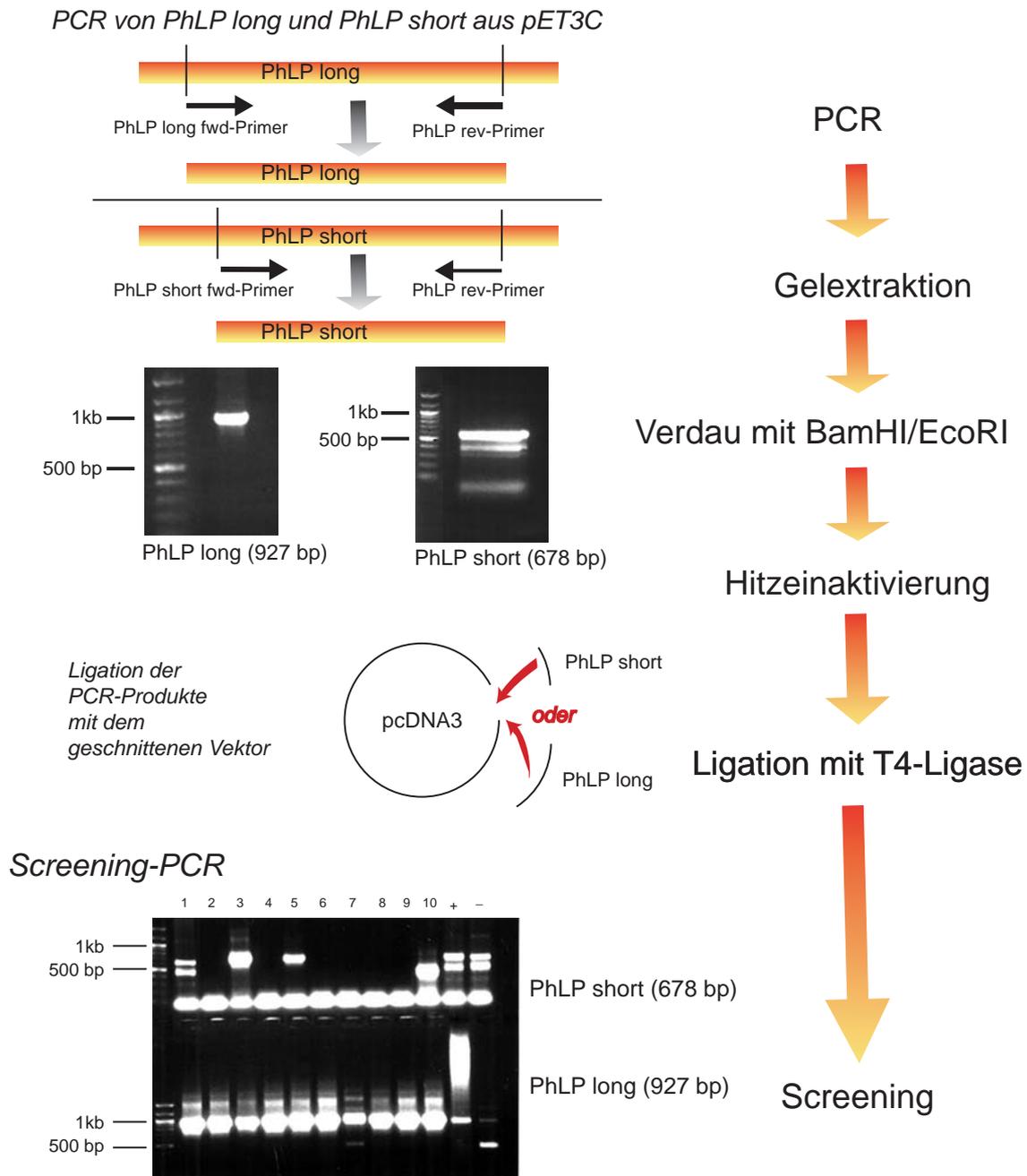
Der pcDNA3-Vektor enthält diverse Schnittstellen für Restriktionsenzyme (hier durch zum Kreis senkrechte Striche markiert), die zum Einfügen der PCR-Produkte von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> dienen. Die in dieser Arbeit verwandten sind rot markiert. Zudem enthält der Vektor eine Ampicillinresistenz zur Selektion und einen T7-Promotor zur Transkriptionskontrolle.

**1.1.2. Klonierung von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> in den pcDNA3-Vektor**

Die kodierenden Sequenzen beider Isoformen, PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub>, wurden durch Polymerasekettenreaktion aus dem Vektor pET3c-PhLP<sub>L</sub>-His amplifiziert (vgl. II.2.2.1.), wobei die ursprüngliche RNA-Vorlage aus Rattenhirn stammte (Schröder und Lohse 1996). Die Taq-Polymerase wurde zur Amplifizierung eingesetzt. Als Primer

dienten 29-34 bp lange Oligonukleotide, die mit 5'-Ende und 3'-Ende (rev.) des PhLP identisch sind. (vgl. II.1.3.4.). Zusätzlich enthielten sie zum Zwecke der Klonierung an den 5'-Enden eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease, was dazu führte, daß die PCR-Produkte vor dem Startcodon um eine *BamHI*- und hinter dem Stopcodon um eine *EcoRI*-Schnittstelle verlängert wurden. Für PhLP<sub>S</sub> mit dem Primerpaar „PhLP<sub>S</sub> fwd (BamHI)“/“PhLP rev (EcoRI)“ und PhLP<sub>L</sub> mit dem Primerpaar „PhLP<sub>L</sub> fwd (BamHI)“/“PhLP rev (EcoRI)“ ergaben sich PCR-Produkte von 678 bp bzw. 927 bp (s. Abb.7).

Nach Reinigung aus dem Agarosegel (vgl. II.2.2.3.) und dem Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (II.2.2.4.1.) wurden die DNA-Fragmente durch Ligation (vgl. II.2.2.4.3.) in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert. Die entstandenen Plasmide wurden in *E.coli* vermehrt, mit Hilfe des Quiagen DNA-Präparationskits extrahiert und durch automatische DNA-Sequenzierung von der Firma MediGene in Martinsried überprüft. Dabei zeigte die Sequenz von PhLP<sub>S</sub> einen Basenaustausch an Position 800 von Thymin zu Cystein, was zu einem Aminosäureaustausch von Phenylalanin zu Serin führte. Darauf wurde die Klonierung nach der gleichen Methode wiederholt, womit die Mutation beseitigt wurde.



**Abb.7: Klonierung von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> aus pET3C**

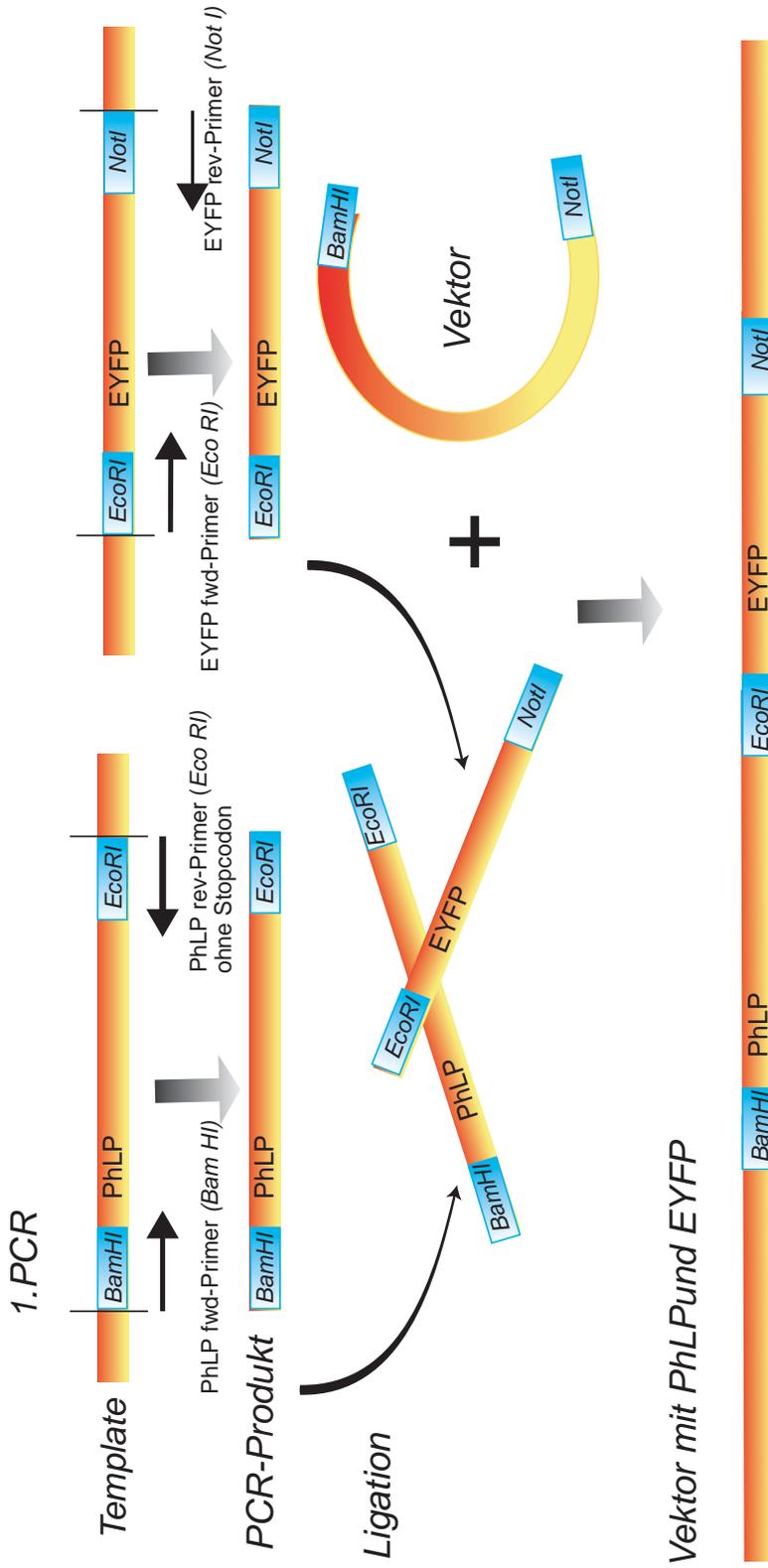
Auf der rechten Seite werden die einzelnen Schritte der Klonierung dargestellt. Auf den UV-Bildern links oben ist das Ergebnis der PCR dargestellt. Die Taq-Polymerase wurde zur Amplifizierung eingesetzt. Als Primer dienten 29-34 bp lange Oligonukleotide, die mit 5'-Ende und 3'-Ende (rev.) des PhLP identisch waren. Es ergaben sich PCR-Produkte von 927 bp (PhLP<sub>L</sub>) bzw. 678 bp (PhLP<sub>S</sub>). Nach Gelextraktion, Verdau und Hitzeinaktivierung wurden die Fragmente durch Ligation in den pcDNA3-Vektor eingefügt, der in Bakterien vermehrt wurde. Nach Animpfen von je zehn Kolonien in Vorkulturen und Screening-PCR ergaben sich für PhLP<sub>S</sub> zwei positive (3,5) Kulturen, und für PhLP<sub>L</sub> waren alle positiv.

### **1.1.3. Subklonierung von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> -EYFP-Fusionskonstrukten**

In Anhang wird der Einsatz von Fusionsproteinen aus dem zu untersuchenden Protein und einem fluoreszierenden Protein dargestellt. An dieser Stelle soll die Technik beschrieben werden, wie durch Klonierung ein Genprodukt aus der DNA zweier Proteine hergestellt wird, was zur Expression eines Fusionsproteins aus zwei einzelnen Proteinen führt. In dieser Arbeit handelt es sich um die Verbindung von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> mit EYFP.

Zur Durchführung der Klonierung wurden zunächst einzelne PCRs von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> und EYFP nach in II.2.2.1. beschriebener Methode mit in II.1.3.4. aufgeführten Primern durchgeführt. Der PhLP-Rückwärts-Primer enthielt kein Stopcodon, damit bei der späteren Transkription nicht nur PhLP, sondern auch das nachfolgende EYFP abgelesen wurden. So folgen auf das letzte Codon des PhLP die Schnittstelle EcoRI als Zwischensequenz und darauf das Startcodon ATG des EYFP. Das Leseraster wurde eingehalten.

In einer darauffolgenden Tripelligation wurden die PCR-Produkte von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> und von EYFP mit dem pcDNA3-Vektor zusammengebracht. Aufgrund der drei verschiedenen Restriktionsschnittstellen (s.Abb.8) ist die Reihenfolge bei der Zusammensetzung festgelegt, wodurch PhLP und EYFP im Vektor hintereinander liegen.



**Abb.8: Klonierung von PhLPL/EYFP und PhLPS /EYFP-Produkten.** Zunaechst werden einzelne PCRs von PhLPL / PhLPS und EYFP durchgefuehrt (1. PCR). In einer Tripelligation werden die beiden PCR-Produkte mit dem Vektor verbunden. Aufgrund der 3 verschiedenen Restriktionsschnittstellen kommen PhLP und EYFP "hintereinander" zu liegen.

## 1.2. Inhibierung der G $\beta\gamma$ -gekoppelten Inositolphosphatbildung in HEK 293-Zellen – Vergleich von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub>

Schröder und Lohse zeigten 2000 in *in vitro*-Systemen u.a. anhand der G $\beta\gamma$ -getriggerten ADP-Ribosylierung von G $\alpha$ , daß PhLP<sub>L</sub> in der G $\beta\gamma$ -Bindung und damit verbundenen Inhibierung genauso effektiv war wie Phosducin, während PhLP<sub>S</sub> etwa 15 mal schwächer war. Aus diesem Grunde wurde PhLP<sub>S</sub> eine weniger große Rolle in der G-Protein-Regulation zugeschrieben, zumal es in den meisten Geweben weniger stark exprimiert wird als PhLP<sub>L</sub> (Schröder und Lohse 2000). Neuere Erkenntnisse ergaben, daß PhLP<sub>S</sub> aus bovinen chromaffinen Zellen gereinigt werden konnte und dort die nikotin-stimulierte calciumabhängige Exozytose von Katecholaminen zu hemmen scheint über einen Signalweg, der einen G $\beta\gamma$ -Komplex beinhaltet (Gensse et al. 2000), womit ihm – im Gegensatz zu vorhergehenden Erkenntnissen – eine physiologische Rolle zugeschrieben wurde. In dieser Arbeit sollte die Rolle von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> in ihrer Funktion als G $\beta\gamma$ -Inhibitoren in lebenden Zellen untersucht werden sowie ein Vergleich gezogen werden zwischen den beiden Formen, insbesondere unter der Fragestellung, ob PhLP<sub>S</sub> als kurze Spleißvariante in lebenden Zellen eine Rolle spielt.

Als Testsysteme wurde eine Assayreaktion verwendet, welche von der Anwesenheit von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten abhängig ist: die Inositolphosphatbildung aufgrund von G $\beta\gamma$ -getriggelter Aktivierung der Phospholipase C $\beta_2$  in HEK 293-Zellen (s. Einleitung).

### 1.2.1. Hemmung der G $\beta\gamma$ -gekoppelten Inositolphosphatbildung durch PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> im Vergleich mit der GRK2

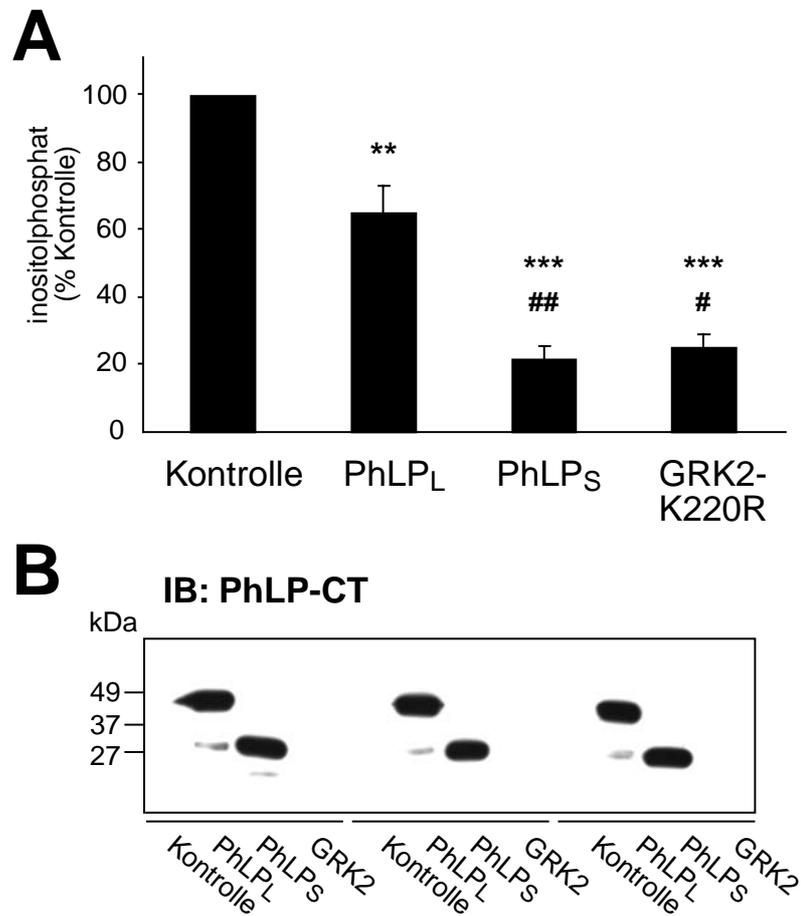
G $\beta\gamma$  stimuliert in Zellen die Phospholipase C $\beta_2$ , welche den Membranbestandteil PIP<sub>2</sub> in DAG und IP<sub>3</sub> spaltet, woraus eine Erhöhung des vorhandenen IP<sub>3</sub> resultiert. Um Unterschiede der IP<sub>3</sub>-Menge unter den getesteten Bedingungen deutlicher zu machen, wurde durch transiente Transfektion der cDNA von PLC $\beta_2$  und von den G-Protein-Untereinheiten G $\beta_1$  und G $\gamma_2$  cDNA (jeweils 3  $\mu$ g) die basale IP<sub>3</sub>-Produktion auf das Fünffache erhöht im Vergleich zu allein mit cDNA von PLC $\beta_2$  transfizierten Zellen ohne G $\beta_1$  und G $\gamma_2$  (Daten nicht gezeigt). Zur Untersuchung der Einflüsse von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> wurden die entsprechenden cDNAs in den pcDNA3-Expressionsvektor

kloniert und zusätzlich zu den oben genannten cDNAs (jeweils 3 µg PLCβ<sub>2</sub>, Gβ<sub>1</sub> und Gγ<sub>2</sub>) transient transfiziert, was die IP<sub>3</sub>-Produktion signifikant senkte. Überraschenderweise erwies sich die kurze Spleißvariante PhLP<sub>S</sub> als der effektivere Gβγ-Inhibitor, obwohl sie eine schwächere Interaktion mit Gβγ zeigte als PhLP<sub>L</sub> (Schröder, Lohse 2000).

Die Transfektion von 8 µg cDNA für PhLP<sub>S</sub> bzw. PhLP<sub>L</sub> senkte die IP<sub>3</sub>-Produktion um  $78.3 \pm 3.8\%$  (n=7) im Falle von PhLP<sub>S</sub>, um  $32.2 \pm 8.4\%$  im Falle von PhLP<sub>L</sub> und  $75.0 \pm 4.0\%$  im Falle von der GRK2-K220R (s.Abb.9A), die als Positivkontrolle diente, da für sie eine Inhibierung Gβγ-getriggelter Effekte, u.a. der Inositolphosphatbildung, in HEK 293-Zellen bekannt ist (Koch et al. 1994). Die Unterschiede zwischen Kontrolle und PhLP<sub>L</sub> und zwischen PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> waren hoch signifikant ( $p < 0.01$ ).

### **1.2.2. Expressionskontrolle mittels Western-Analyse**

Um auszuschließen, daß die in 1.2.1. dargestellten Hemmeffekte nicht aus unterschiedlicher Expression der Proteine PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> resultieren, z.B. eine höhere PhLP<sub>S</sub>-Expression seine höhere Effektivität erklärt, wurden die im Versuch verwendeten Zellen lysiert und mittels Westernblotting auf ihre Proteinexpression untersucht. Abb.9B zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Transfektionen.



**Abb.9: Inhibierung der G $\beta$  $\gamma$ -stimulierten Inositolphosphatbildung in HEK 293-Zellen**

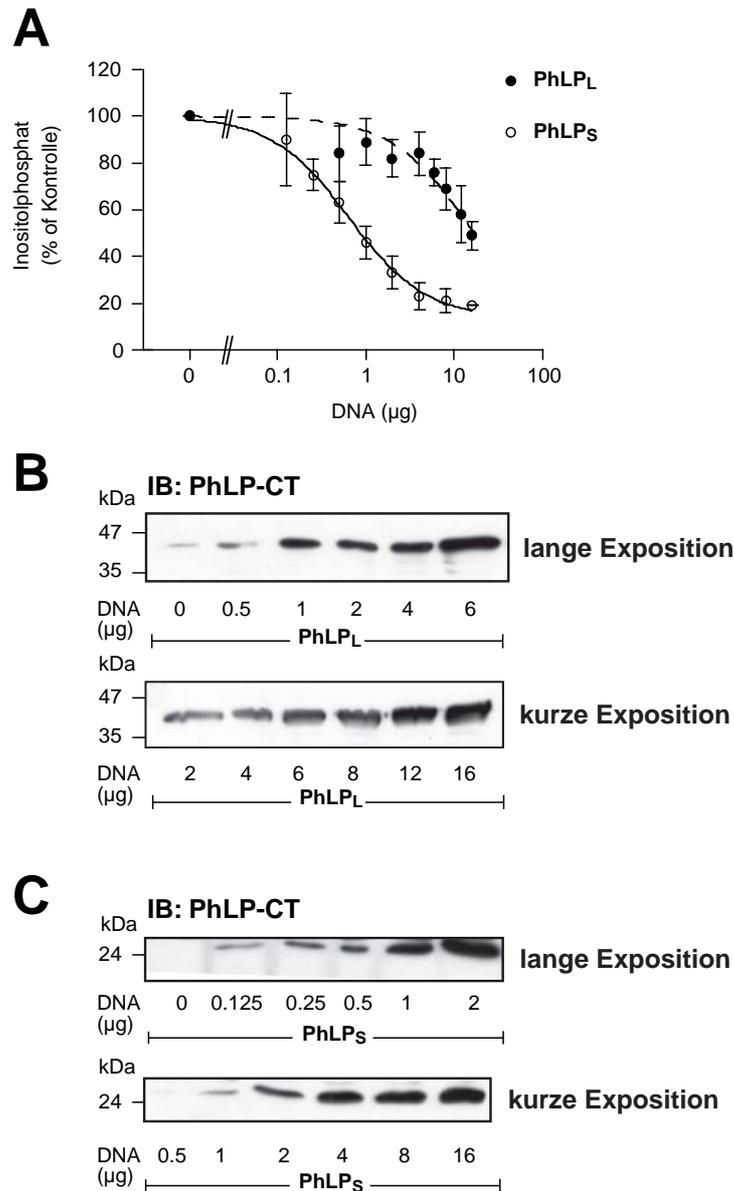
A. HEK 293-Zellen wurden transient transfiziert mit 8  $\mu$ g cDNA PhLP<sub>L</sub>, PhLP<sub>S</sub>, GRK2-K220R oder leerem Vektor (Kontrolle) und jeweils mit 3  $\mu$ g cDNA G $\beta$ <sub>1</sub>, G $\gamma$ <sub>2</sub> und PLC  $\beta$ <sub>2</sub> pro Schale (10 cm Durchmesser). Die Inositolphosphatproduktion wurde 42h nach Transfektion gemessen gemäß II.2.4. (\*\*p<0.01, und \*\*\*p<0.001, vgl. mit Kontrolle ##p<0.01 und #p<0.05 vgl. mit PhLP<sub>L</sub>).

B. Western Blot dreier voneinander unabhängiger Experimente zum Vergleich von Proteinexpressionsniveaus von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> nach Transfektion. SDS-Gele wurden mit 20% des Zelllysats eines 6-Well beladen und detektiert mit dem polyklonalen CTPP Antikörper (s. II.1.3.5.).

### **1.3. Dosis-Wirkungs-Kurven der Hemmung der G $\beta\gamma$ -gekoppelten Inositolphosphatbildung durch PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> in HEK 293-Zellen**

Nachdem ein hemmender Effekt von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> auf die G $\beta\gamma$ -Funktion in HEK 293-Zellen festgestellt worden war und PhLP<sub>L</sub> sich dabei als stärkerer Inhibitor erwiesen hatte, wurden zur weiteren Untersuchung Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Hierzu wurden ausgehend von einer Mindestmenge cDNA PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> von 0.5  $\mu\text{g}$ / 0.125  $\mu\text{g}$  immer größere Mengen cDNA transfiziert bis zu einer Höchstmenge von 16  $\mu\text{g}$ , so daß die maximal mögliche Inhibierung der IP<sub>3</sub>-Bildung sicher erreicht war. Um die Gesamtmenge an transfizierter cDNA gleich zu halten, wurde mit dem leeren pcDNA3-Vektor jeweils aufgefüllt. Wie aus Abb.10A hervorgeht, betrug der IC<sub>50</sub>-Wert, bei dem das maximale IP<sub>3</sub>-Signal auf die Hälfte reduziert ist, für PhLP<sub>L</sub> 13.2  $\mu\text{g}$ , war also 20 mal so hoch wie der IC<sub>50</sub>-Wert für PhLP<sub>S</sub> (0.64  $\mu\text{g}$ ).

Die Westernanalysen in Abb.10B und 10C zeigen, daß den steigenden Mengen transfizierter cDNA die Expression von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> entspricht.



**Abb.10: Konzentrationsabhängige Effekte von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> auf die Inositolphosphatbildung**

A. HEK 293-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen cDNA für PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> transient transfiziert. Es wurde jeweils die Inositolproduktion gemessen. Der IC<sub>50</sub> von PhLP<sub>L</sub> war 20mal höher als der von PhLP<sub>S</sub> (13.2 µg bzw. 0.64 µg cDNA pro 10cm-Schale).

B, C. Western Blots zeigen die ansteigenden Proteinniveaus von PhLP<sub>L</sub> (B) und PhLP<sub>S</sub> (C) unter den gleichen Bedingungen wie in (A). Es wurden verschiedene Belichtungszeiten genutzt, um die volle Bandbreite der Proteinexpression abzudecken. Als Antikörper wurde der polyklonale Anti-CTPP (s. II.1.3.5.) benutzt.

## 2. Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub>

Bisherige Erkenntnisse über die G $\beta\gamma$ -Inhibierung durch PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> gaben keine suffiziente Erklärung für die unterschiedliche Effektivität der beiden Spleißvarianten in Zellen (Schröder et al. 1997, Thibault et al. 1997, Schröder und Lohse 2000). Im Gegenteil, sie widersprachen sogar den hier gewonnenen Ergebnissen: in *in vitro*-Versuchen (Hemmung von G $\beta\gamma$ -stimulierter ADP-Ribosylierung von G $\alpha$ , G $\beta\gamma$ -geförderter Aktivität der GTPase von G $\alpha_0$  und G $\beta\gamma$ -vermittelter Rhodopsin-Phosphorylierung durch GRK2) erwies sich PhLP<sub>S</sub> stets als schwächerer Inhibitor im Vergleich zu PhLP<sub>L</sub> und Phosducin, welche gleich stark waren (Schröder und Lohse 1996, Schröder und Lohse 2000).

Zudem wurde eine direkte Bindung von G $\beta$ , was als Voraussetzung für die Hemmung postuliert wird, in Zellen nur für PhLP<sub>L</sub> nachgewiesen (Thibault et al. 1997). Hinzu kommt, daß für PhLP<sub>L</sub> mehr G $\beta\gamma$ -Bindungsstellen bekannt sind als für PhLP<sub>S</sub>, da sie sich hauptsächlich im N-Terminus befinden, welcher PhLP<sub>S</sub> fehlt (Koch et al. 1993, Touhara et al. 1994, Xu et al. 1995, Pitcher et al. 1995). Dies wurde bis zu gewissem Grade dadurch relativiert, daß ein C-terminales Fragment in PhLP<sub>S</sub> identifiziert wurde, welches zur G $\beta\gamma$ -Hemmung fähig ist (Schröder et al. 1997).

Da all diese Befunde keinen Hinweis für die Überlegenheit von PhLP<sub>S</sub> in Zellen lieferten, zogen wir einen Mechanismus in Erwägung, der in *in vitro*-Assays, die die o.g. genannten Experimente alle waren, nicht vorkommen kann, in Zellen, in denen die Versuche dieser Arbeit durchgeführt wurden und sämtliche Proteine der Zelle eine Rolle spielen können, aber sehr gut möglich ist: die Beeinflussung der Aktivität von Proteinen durch Phosphorylierung. Ein Hinweis darauf ist auch, daß PhLP<sub>L</sub> einen zusätzlichen N-Terminus besitzt, der PhLP<sub>S</sub> fehlt, also eine Region, in der so eine Modifizierung stattfinden könnte, von der PhLP<sub>S</sub> aber verschont bleiben und daher in seiner Aktivität nicht beeinflusst würde.

Phosphorylierung durch sogenannte Kinasen ist eine Möglichkeit der Regulierung von Proteinen. Beispielsweise wird Phosducin in Zellen durch die PKA phosphoryliert (Lee et al. 1990a), was seine Fähigkeit, mit G $\beta\gamma$  zu interagieren, reduziert (Bauer et al. 1992). Den gleichen Effekt hat die Phosphorylierung durch GRK2 (Ruiz-Gómez et al. 2000).

Thulin et al. zeigten 2001, daß auch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaM-KinaseII) Phosducin phosphoryliert und seine  $\text{G}\beta\gamma$ -Bindung stärker hemmt als die PKA.

Im Falle von PhLP wurde zwar eine Phosphorylierung durch die GRK2 *in vitro* gezeigt und als Regulationsmechanismus in Erwägung gezogen, aber der Einfluß auf die Funktion von PhLP wurde nicht getestet (Ruiz-Gómez et al. 2000).

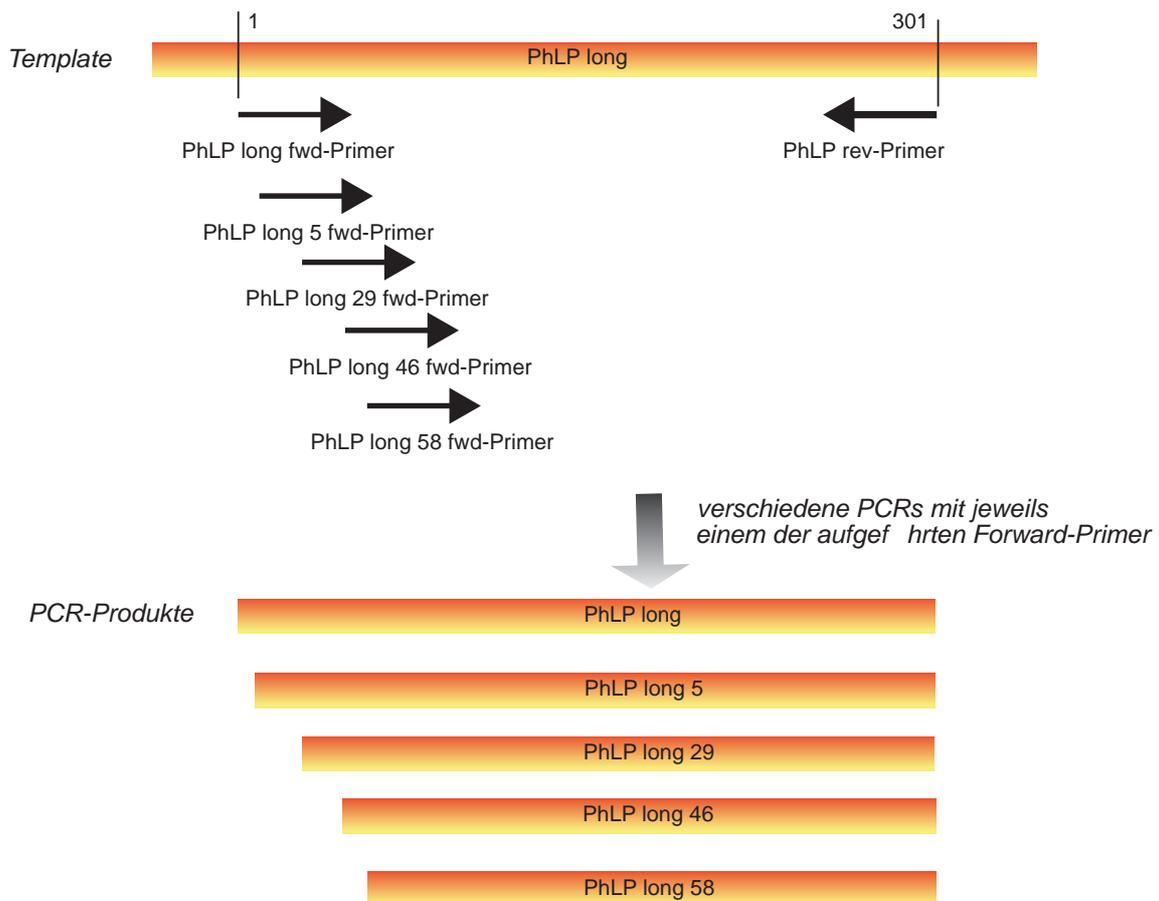
## 2.1. Trunkierung von PhLP<sub>L</sub>

Wir richteten das Augenmerk auf den 83 Aminosäuren langen zusätzlichen N-Terminus von PhLP<sub>L</sub>, da er den einzigen Unterschied zu PhLP<sub>S</sub> ausmacht, mit der Fragestellung, ob es dort eine bestimmte Region gibt, in der Phosphorylierung stattfinden könnte. Um mögliche verantwortliche Kinasen zu identifizieren, wendeten wir auf die Sequenz eine Computeranalyse (ScanProsite) an, in der sieben mögliche Phosphorylierungsstellen mit dem Phosphorylierungsmotiv ([S/T]-X-X-[S/T]) gefunden wurden (s.Abb.12), welches für die CK 2 typisch ist. Diese Phosphorylierungsstellen liegen in Form von Clustern der Aminosäuren Serin (S) und Threonin (T) vor. Wie im folgenden (III.2.1.1.) beschrieben, wurde durch Klonierung der N-Terminus von PhLP<sub>L</sub> schrittweise verkürzt, woraus folgende Varianten resultierten (vgl.Abb.12): L5 (Aminosäuren 5-301 unter dem Verlust von T2, T3), L29 (Aminosäuren 29-301 unter zusätzlichem Verlust von S18, T19, S20, S25), L46 (Aminosäuren 46-301 unter zusätzlichem Verlust von S39, S40, S41, T42) und L58 (Aminosäuren 58-301 unter dem zusätzlichen Verlust von S54 und T57). Diesen PhLP<sub>L</sub>-Varianten fehlt jeweils eine mögliche Phosphorylierungsstelle, also ein o.g. Serin/Threonin-Cluster, in der Annahme, daß PhLP<sub>L</sub> an einer oder mehrerer dieser Stellen in der Zelle phosphoryliert wird.

### 2.1.1. Klonierung trunkierter Formen von PhLP<sub>L</sub>

Für die Subklonierung von PhLP<sub>L</sub>-Trunkierungen wurde nach demselben Prinzip wie für PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> verfahren. Die Primerpaare wurden mit denselben Angriffssequenzen für die Restriktionsenzyme versehen wie die PhLP<sub>L</sub>/PhLP<sub>S</sub>-Primer (s.II.1.3.4.) und unterschieden sich allein in den Vorwärts-Primern, deren Anfangsequenzen an verschiedenen Stellen des 249 Basenpaaren längeren 3'-Endes von PhLP<sub>L</sub>

ansetzten, sodaß PhLP<sub>L</sub> bildlich gesprochen schrittweise „abgeschnitten“ wurde (vgl.II.1.3.4.). Auf diese Weise wurden insgesamt fünf Trunkierungen vorgenommen und entsprechend fünf verschiedene Vorwärts-Primer eingesetzt, die - vom 3'-Ende von PhLP<sub>L</sub> aus gezählt- hinter den ersten 12, 84, 105, 135 und 171 Basenpaaren ansetzten. Übertragen auf die Aminosäuresequenz bedeutet dies eine Verkürzung von PhLP<sub>L</sub> um 4, 28, 45 und 57 Aminosäuren, vom N-Terminus aus gesehen (s.Abb.11, 12).



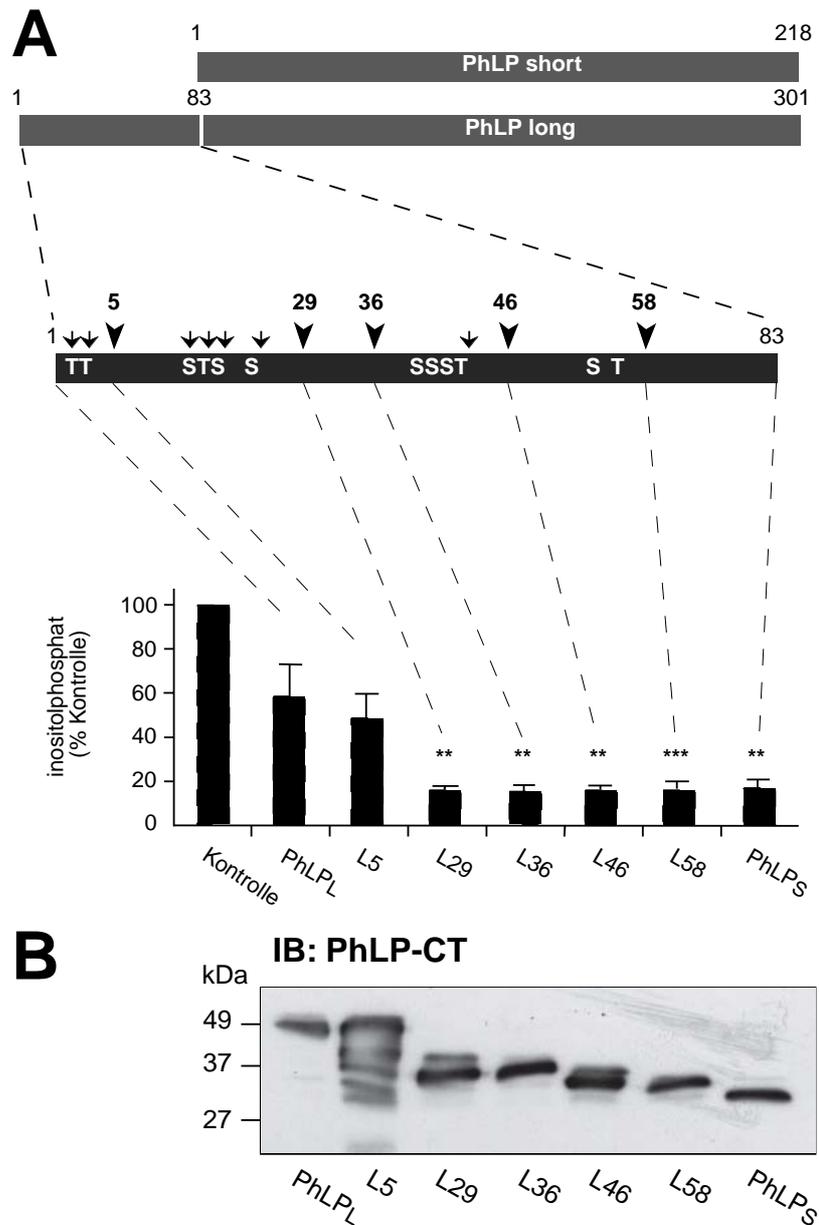
### Abb.11: Klonierung von PhLP<sub>L</sub>-Trunkierungen

Für die Klonierung von PhLP<sub>L</sub>-Trunkierungen wurden verschiedene Vorwärts-Primer benutzt. Die Primerpaare wurden mit denselben Angriffssequenzen für die Restriktionsenzyme wie die PhLP<sub>L</sub>/PhLP<sub>S</sub>-Primer (s.II.1.3.4.) versehen und unterschieden sich allein in den Vorwärts-Primern, deren Anfangssequenzen an verschiedenen Stellen des 249 Basenpaaren längeren 3'-Endes von PhLP<sub>L</sub> ansetzten. So entstanden 4 neue Konstrukte, jeweils um 12, 84, 135 und 171 Basenpaaren kürzer, übertragen auf die Aminosäuresequenz um 4, 28, 45 und 57 Aminosäuren, vom N-Terminus aus gesehen.

### **2.1.2. Hemmung der G $\beta\gamma$ -vermittelten Inositolphosphatbildung durch trunkierte Formen von PhLP<sub>L</sub>**

Als Parameter für eine mögliche Verbesserung der Funktion von PhLP<sub>L</sub> durch Eliminierung der Phosphorylierungsstellen diene die unter III.1.2. beschriebene Hemmung der G $\beta\gamma$ -abhängigen Inositolphosphatbildung. Die G $\beta\gamma$ -inhibitorische Potenz der neu konstruierten PhLP<sub>L</sub>-Varianten wurde getestet und mit PhLP<sub>S</sub> als starkem Inhibitor verglichen. Dazu wurden HEK 293-Zellen wie unter III.1.2. beschrieben mit je 3  $\mu$ g cDNA für PLC $\beta_2$ , G $\beta_1$  und G $\gamma_2$  transient transfiziert und 8  $\mu$ g cDNA des entsprechenden Konstrukts (L5, L29, L46, L58) bzw. PhLP<sub>L</sub> als schwachem Inhibitor oder PhLP<sub>S</sub> als maximalem Inhibitor. Es zeigte sich, daß die Verkürzung um den Abschnitt zwischen Aminosäure 5 bis 28 der entscheidende Schritt war, die inhibitorische Effektivität von PhLP<sub>L</sub> zu PhLP<sub>S</sub> zu erlangen. Die Entfernung der ersten 28 Aminosäuren von PhLP<sub>L</sub> (wie in L29, L46 und L58 der Fall) genügte, um die volle Aktivität von PhLP<sub>S</sub> zu erreichen. Dies und der Aspekt, daß PhLP<sub>L</sub> in Zellen im Gegensatz zu PhLP<sub>S</sub> phosphoryliert vorliegt (Humrich et al. 2003) macht es wahrscheinlich, daß am Cluster AS 18-20 und/ oder AS 25 Phosphorylierung stattfindet, die zu einer Verschlechterung der Funktion führt.

Gleichmäßige Expression der neuen Konstrukte wurde durch Westernanalyse überprüft (s. Abb. 12B).



**Abb.12: Definierung einer regulatorischen Sequenz zwischen Aminosäure 5 und 28 durch schrittweise Trunkierung des N-Terminus von PhLP<sub>L</sub>.**

A. Der zusätzliche N-Terminus von PhLP<sub>L</sub> enthält mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen (Serin (S) und Threonin (T)), die in der oberen Abbildung dargestellt sind. Die Pfeile zeigen auf die für CK 2 typischen Phosphorylierungsstellen, während die mit Nummern versehenen Pfeilspitzen die Stellen kennzeichnen, an denen zur Konstruktion der trunkierten Formen von PhLP<sub>L</sub> geschnitten wurde. Die Entfernung der ersten 28 Aminosäuren von PhLP<sub>L</sub> (L29) reichte aus zur Erlangung der G $\beta$  $\gamma$ -inhibitorischen Aktivität von PhLP<sub>S</sub>, während die Entfernung der ersten 4 Aminosäuren die inhibitorische Aktivität nicht verbesserte. Weitere Trunkierungen (L46, L58) führten zu keiner weiteren Änderung. Das Inositolphosphat signal wurde durch PhLP<sub>L</sub> um 42 +/-

11% (n=5) reduziert, 52 +/- 9% (n=5) durch L5, 84 +/-1% (n=3) durch L29, 85 +/-2% (n=5) durch L36, 84 +/-1% (n=3) durch L46, 85 +/-2% (n=5) durch L58, und 84 +/- 3% (n=5) durch PhLP<sub>S</sub> (\*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 versus PhLP<sub>L</sub>).

B. Expressionskontrolle der fünf N-terminal trunkierten Konstrukte verglichen mit PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub>. Es wurden die gleichen Transfektionen durchgeführt wie in der Inositolphosphatmessung (A, Text) und 20% des Lysats eines 6-Well pro Bahn eingesetzt. Hier gezeigt wird einer von zwei Western blots mit gleichen Ergebnissen. Konstrukt L5 verläuft aufgrund von Proteindegradation in mehreren Banden. Zur Detektion der Konstrukte wurde der polyklonale Antikörper Anti-CTPP (s.II.1.3.5) benutzt.

## **2.2. Einfluß vom Austausch der Aminosäuren Serin 18, Threonin 19 und Serin 20 bzw. Serin 25 auf die Funktion von PhLP<sub>L</sub> als Gβγ-Inhibitor**

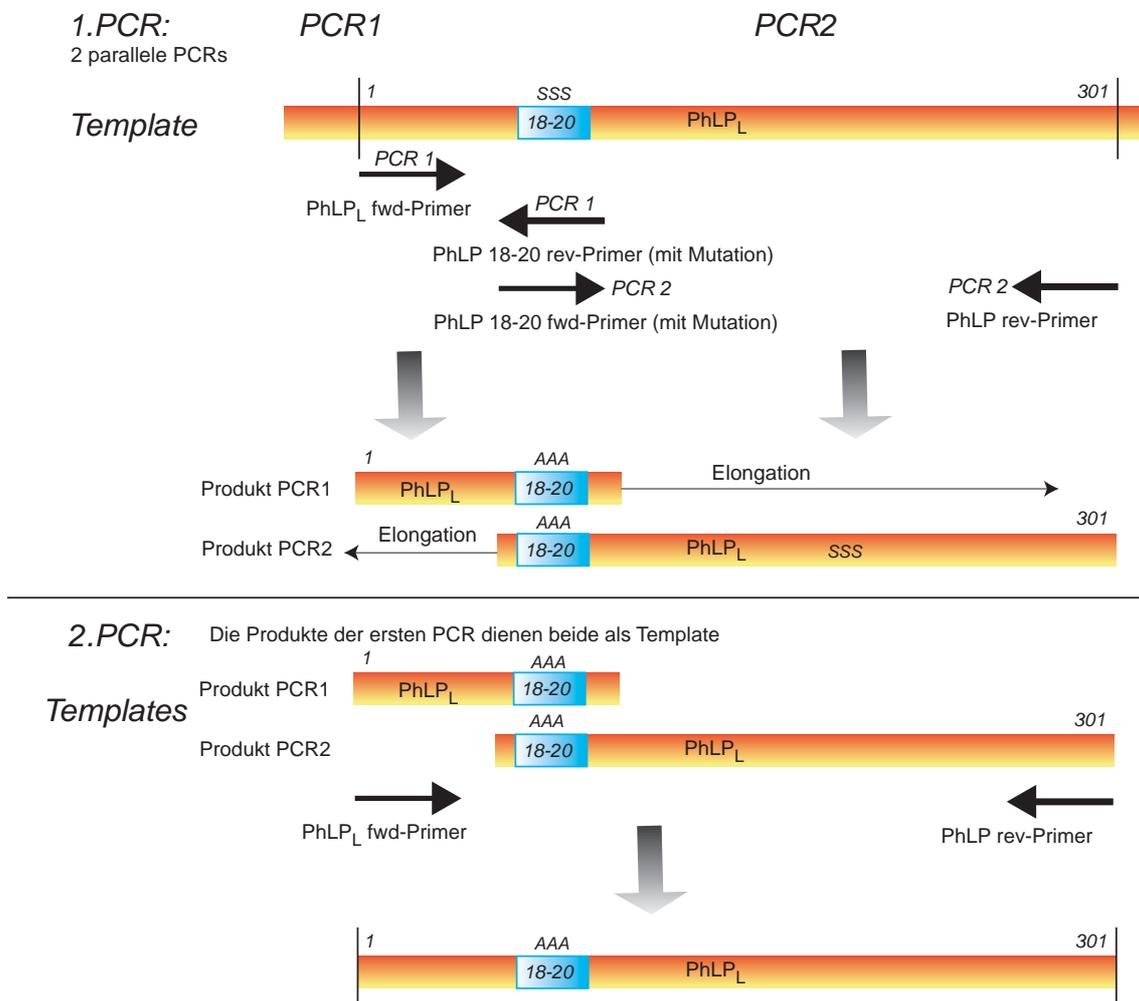
Als nächster Schritt stellte sich die Frage, ob es genau die Phosphorylierungsstelle innerhalb der ersten 28 Aminosäuren ist, die eine Rolle in der PhLP<sub>L</sub>-Regulation spielt und, wenn dies der Fall ist, welche Aminosäure des Clusters (S18, T19, S20 und S25) phosphoryliert wird. Zwei Mutanten wurden konstruiert, wobei in PhLP<sub>L</sub>A18-20 S18, T19 und S20 durch Alanin ersetzt wurden, während in PhLP<sub>L</sub>A25 S25 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde. Wie im Falle von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> wurden sie in den pcDNA3-Vektor kloniert (s.o.).

### **2.2.1. Konstruktion von Ser/Thr zu Ala-Mutanten**

Ziel dieser Klonierung war es, PhLP-Konstrukte mit Punktmutationen zu erstellen, und zwar erstens mit dem Austausch der Aminosäuren 18-20 (S18, T19, S20) gegen 3 Alanine (PhLP<sub>L</sub>A18-20) und zweitens mit dem Austausch der Aminosäure Serin 25 gegen Alanin (PhLP<sub>L</sub>A25). Dazu wurden 2 aufeinanderfolgende PCR-Schritte durchgeführt, während im ersten Schritt zwei parallele PCRs erfolgten (PCR 1 und PCR 2, s.Abb.13). In PCR 1 wurden der zur Klonierung des Wildtyp-PhLPs verwandte PhLP-Vorwärts-Primer eingesetzt und ein zusätzlicher Rückwärts-Primer, der den zu verändernden Abschnitt um einige Basenpaare überragt. In PCR 2 hingegen wurden der zur Klonierung des Wildtyp-PhLPs verwandte PhLP-Rückwärts-Primer verwendet und ein zusätzlicher Vorwärts-Primer, der einige Basenpaare früher beginnt als der zu verändernde Abschnitt. Die zusätzlichen Primer enthielten statt der zu S18-20/ S25 komplementären Sequenz Basen, die für Alanin kodieren. Daher enthielten die beiden PCR-Produkte anstelle der für Serin kodierenden Basen die für Alanin kodierenden. Als Produkte ergaben sich ein Teil PhLP, der bei Basenpaar 1 beginnt und einige Basenpaare länger ist als 18-20/ 25 und ein Teil PhLP, der kurz vor Abschnitt 18-20/ 25 beginnt und bis zum Ende von PhLP reicht.

In der 2.PCR wurden als Templates die Produkte aus der ersten eingesetzt und die normalen PhLP<sub>L</sub>/PhLP<sub>S</sub> Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Die Temperatur wurde so

gewählt, daß die beiden Templates annealen konnten. Als Produkt erhielt man ein Konstrukt der Länge von PhLP mit ausgetauschten Basenpaaren.



**Abb.13: Klonierung von Ser/ Ala-Mutanten von PhLP<sub>L</sub>.**

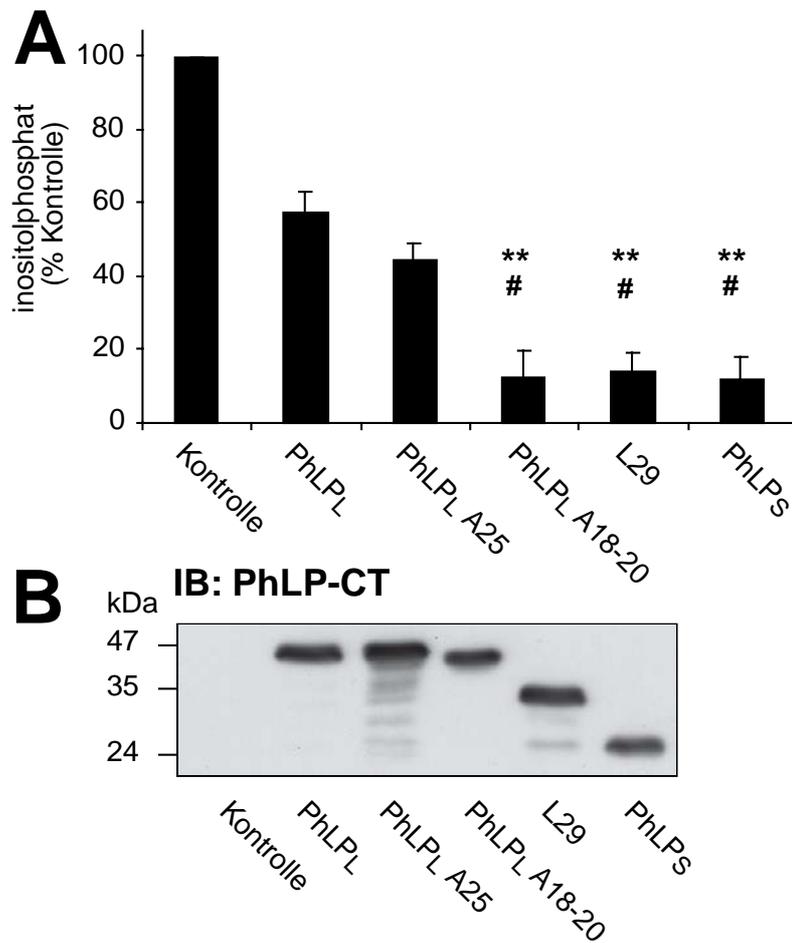
Zur Klonierung von Ser/ Ala-Mutanten wurden 2 aufeinanderfolgende PCR-Schritte durchgeführt, wobei im ersten Schritt zwei parallele PCRs erfolgten. In PCR 1 wurden der zur Klonierung des Wildtyp-PhLPs verwandte PhLP-Vorwärts-Primer eingesetzt und ein zusätzlicher Rückwärts-Primer, der den zu verändernden Abschnitt um einige Basenpaare überragt. In PCR 2 hingegen wurden der zur Klonierung des Wildtyp-PhLPs verwandte PhLP-Rückwärts-Primer verwendet und ein zusätzlicher Vorwärts-Primer, der einige Basenpaare früher beginnt als der zu verändernde Abschnitt. Die zusätzlichen Primer enthielten statt der zu S18-20/ S25 komplementären Sequenz Basen, die für Alanin kodierten. In der 2. PCR wurden als Templates die Produkte aus der ersten eingesetzt und die normalen PhLP Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Die Temperatur wurde so gewählt, daß die beiden Templates annealen konnten und so jeweils auf die volle Länge des PhLP<sub>L</sub> elongiert werden konnten. Als Produkt erhielt man ein Konstrukt der Länge von PhLP mit ausgetauschten Basenpaaren.

### 2.2.2. Einfluß der Ser→Ala-Mutationen auf die Hemmung der Inositolphosphate

Wie die trunkierten PhLP<sub>L</sub>-Varianten, wurden die Ser → Ala-Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung der Gβγ-gekoppelten Inositolphosphatbildung getestet. Dazu wurden HEK 293-Zellen wie in den Versuchen aus III.1.2, 1.3. und 2.1. mit je 3 µg cDNA für PLCβ<sub>2</sub>, Gβ<sub>1</sub> und Gγ<sub>2</sub> transient transfiziert und 8 µg cDNA des entsprechenden Konstrukts (PhLP<sub>L</sub>A18-20, PhLP<sub>L</sub>A25), bzw. PhLP<sub>L</sub> als schwachem Inhibitor oder PhLP<sub>S</sub> als maximalem Inhibitor.

Es zeigte sich, daß sich PhLP<sub>L</sub>A18-20 als ebenso starker Inhibitor erwies wie PhLP<sub>S</sub> und L29. PhLP<sub>L</sub>A25 hingegen zeigte eine ebenso schwache inhibitorische Aktivität wie PhLP<sub>L</sub>. Die Unterschiede in den Wirkungen von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>L</sub>A25 auf der einen Seite und PhLP<sub>S</sub>, L29 und PhLP<sub>L</sub>A18-20 auf der anderen Seite waren hoch signifikant. Die Expression dieser Konstrukte wurde wiederum in der Westernblot-Analyse kontrolliert (s.Abb.14B).

Aufgrund dieser Daten lässt sich annehmen, daß PhLP<sub>L</sub> am Cluster S18, T19 und S20 phosphoryliert wird, was zu einer schwächeren Gβγ-Hemmung führt, während S25 höchstwahrscheinlich keine Rolle spielt. Geht man von der Hypothese aus, daß zur Gβγ-Hemmung direkte Bindung notwendig ist, könnte man die Beobachtung so erklären, daß durch die Phosphorylierung an den AS 18-20 PhLP<sub>L</sub> daran gehindert wird, mit Gβγ zu interagieren und sie zu hemmen, während PhLP<sub>S</sub> ungehindert Gβγ binden kann. Es zeigte sich jedoch bereits in dieser Arbeit (s.III.3), daß der stärkere βγ-Inhibitor PhLP<sub>S</sub> im Vergleich zu PhLP<sub>L</sub> Gβγ nur sehr schwach bindet. Zudem wurde in weiterführenden Arbeiten dargelegt, daß den Beobachtungen völlig andere Mechanismen zugrunde liegen: in unserer Gruppe konnte gezeigt werden, daß unphosphoryliertes und gespleißtes PhLP (=PhLP<sub>S</sub>) die korrekte Faltung von Gβγ hemmt (s.Diskussion, Humrich et al. 2005), während phosphoryliertes PhLP eine protektive Wirkung hat, was in den Arbeiten von Obin et al. (2002), Blaauw et al. (2003) und Lukov et al. (2005) dargelegt wird (s.Diskussion).



**Abb.14: Inhibierung der G $\beta\gamma$ -stimulierten Inositolphosphatbildung in HEK 293-Zellen durch mutierte Formen von PhLP<sub>L</sub> mit Alaninmutationen von Ser 18, Thr 19 und Ser 20 (PhLP<sub>L</sub> A18-20) bzw. von Ser 25 (PhLP<sub>L</sub> A25)**

A. HEK 293-Zellen wurden wie im Text beschrieben transient transfiziert und die Inositolphosphatproduktion gemessen wie in III.1.2., 1.3., 2.1. (\*\*p<0.01 versus PhLP<sub>L</sub>, #p<0.05 versus PhLP<sub>L</sub>A25, und p>0.05 für versus PhLP<sub>L</sub>A25). Eine Alaninmutation von Ser 18, Thr 19 und Ser 20 (PhLP<sub>L</sub>A18-20), jedoch nicht von Ser 25 (PhLP<sub>L</sub>A25) führte zum Erreichen der vollen inhibitorischen Aktivität.

B. Expressionskontrollen zeigten gleiche Proteinmengen aller Konstrukte in einem von drei Western Blots mit gleichen Ergebnissen. Zur Detektion der Konstrukte wurde der polyklonale Antikörper Anti-CTPP (II.1.3.5.) benutzt.

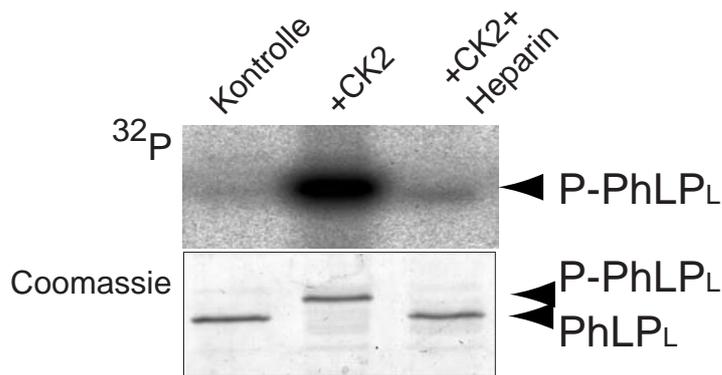
## 2.3. Phosphorylierung von gereinigtem PhLP<sub>L</sub> und Nachweis von CK2 in HEK 293-Zellen

### 2.3.1. Phosphorylierung von gereinigtem PhLP<sub>L</sub> durch die Caseinkinase 2

Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, daß PhLP<sub>L</sub> in HEK 293-Zellen im Gegensatz zu PhLP<sub>S</sub> konstitutiv phosphoryliert vorliegt (Humrich et al. 2003). Als möglicherweise verantwortliche Kinase wurde die CK2 mittels Computeranalyse (ScanProsite) identifiziert, in der sieben mögliche Phosphorylierungsstellen mit dem typischen CK2-Phosphorylierungsmotiv ([S/T]-X-X-[S/T]) gefunden wurden (s.III.2.1.). In *in vitro*-Versuchen mit rekombinanter CK2 stellte sich heraus, daß PhLP<sub>L</sub> tatsächlich ein Substrat der CK2-Phosphorylierung ist (Humrich et al. 2003). Um die Phosphorylierung zu unterbinden, wurde Heparin, ein bekannter CK2-Inhibitor (Allende 1995), eingesetzt, wobei Konzentrationen von 3 µM ausreichten, um *in vitro* die CK2 zu hemmen (Humrich et al. 2003).

In Proben von embryonalen Geweben, in denen die CK2, die bei der Entwicklung und Differenzierung von Zellen eine große Rolle spielt (Pinna und Meggio 1997), hochaktiv ist, wurde beobachtet, daß in Western Blots auf der Höhe von PhLP<sub>L</sub> eine Doppelbande auftritt (s.Abb.16, Humrich et al. 2003). Dabei läuft phosphoryliertes PhLP<sub>L</sub> in der Bande mit dem höheren Molekulargewicht, da durch Phosphorylierung die Beweglichkeit im Gel eingeschränkt wird, weshalb P-PhLP<sub>L</sub> langsamer und somit auf der Höhe einer höheren kDa-Zahl läuft (Verschiebung). Dieser Effekt soll in dieser Arbeit anhand von *in vitro*-Versuchen mit rekombinantem PhLP und rekombinanter CK2 demonstriert werden (s.Abb.15).

Im hier gezeigten Versuch wurde gereinigtes rekombinantes PhLP<sub>L</sub> (400 nM) durch rekombinante CK2 (0,04 mU) phosphoryliert mit und ohne Zusatz von 30 µM Heparin bei 30°C für 30 Minuten. Die SDS-PAGE wurde mit einem 16%igen Gel durchgeführt und einem Phosphoimaging unterzogen. Die Phosphorylierung durch CK2 (P-PhLP<sub>L</sub>) bewirkt eine Einschränkung der Mobilität im Gel und damit eine Verschiebung.



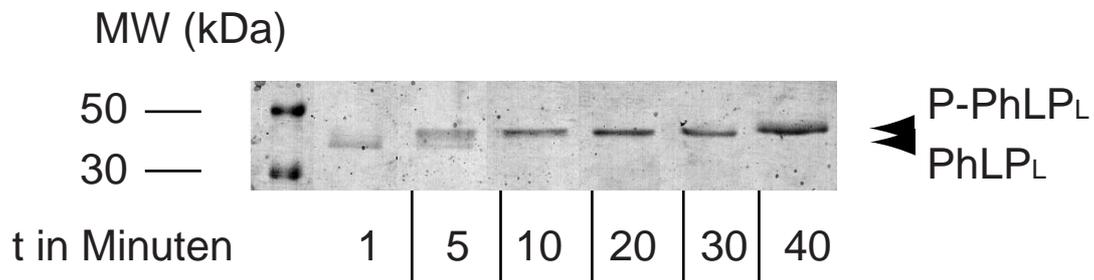
**Abb.15: Phosphorylierung von rekombinantem PhLP<sub>L</sub> durch rekombinante Caseinkinase 2.**

Gereinigtes rekombinantes PhLP<sub>L</sub> (400 nM) wurde durch CK 2 (0.04 mU) phosphoryliert ohne und mit Zusatz von 30 µM Heparin bei 30°C für 30 Minuten. Die SDS-PAGE wurde mit einem 16%igen Gel durchgeführt und einem Phosphoimaging unterzogen. Die Phosphorylierung durch CK2 (P-PhLP<sub>L</sub>) bewirkt eine Einschränkung der Mobilität im Gel.

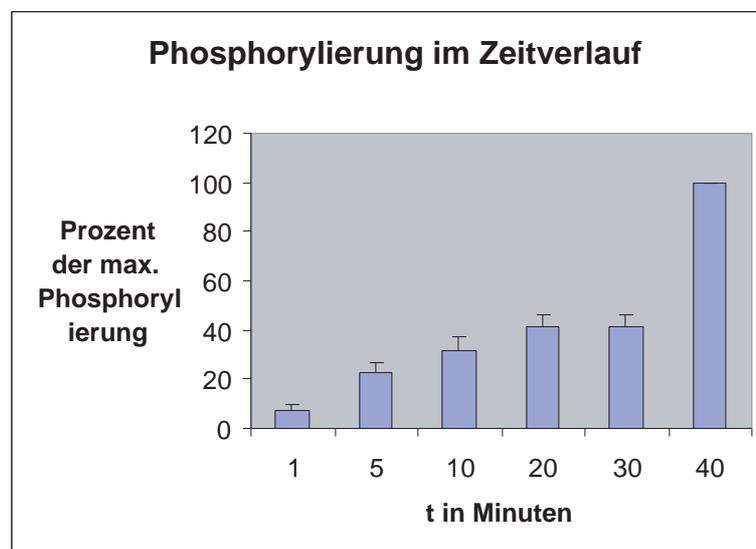
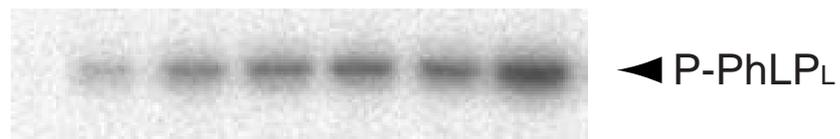
### 2.3.2. Phosphorylierung von gereinigtem PhLP<sub>L</sub> durch die Caseinkinase 2 im Zeitverlauf

Als nächstes sollte die Kinetik der in 2.3.1. demonstrierten Phosphorylierung *in vitro* gezeigt werden. Hierzu wurde gereinigtes rekombinantes PhLP<sub>L</sub> (400 nM) durch CK 2 (0.04 mU) bei 30°C phosphoryliert und jeweils nach 1, 5, 10, 20, 30 und 40 Minuten eine Probe aus dem Versuchsansatz entnommen, die Reaktion auf Eis gestoppt und bei 95°C inaktiviert. Die SDS-PAGE wurde mit einem 16%igen Gel durchgeführt und einem Phosphoimaging unterzogen. Es ließ sich zeigen, wie mit der Zeit immer mehr PhLP<sub>L</sub>-Proteine von der Phosphorylierung betroffen waren, was sowohl am mit der Zeit steigenden Signal im Phosphoimager als auch an der fortschreitenden Verschiebung im Gel deutlich wird (s.Abb.16).

## Coomassie: Beladung durch Protein



## Phosphorylierung mit <sup>32</sup>P



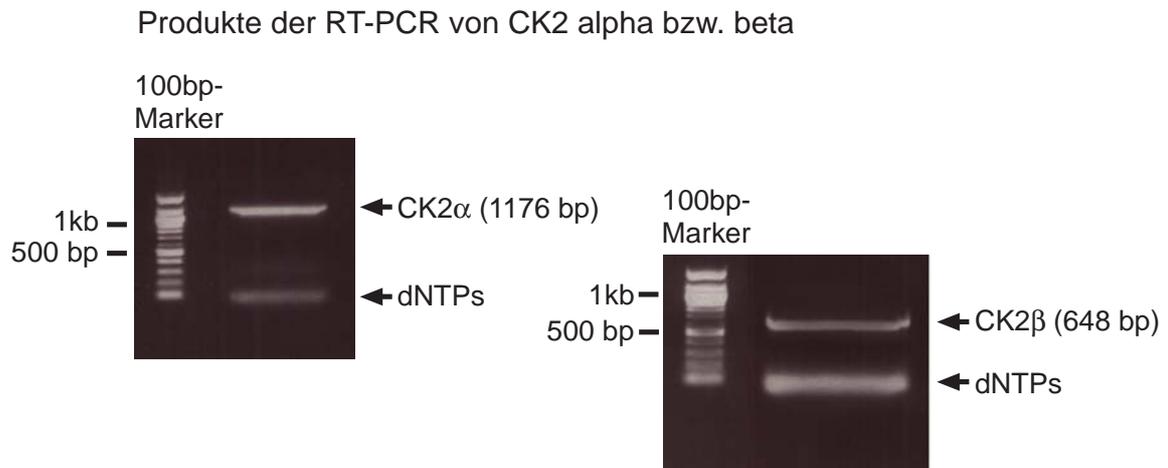
### Abb.16: Phosphorylierung von rekombinantem PhLP<sub>L</sub> durch rekombinante Caseinkinase 2 im Zeitverlauf

Gereinigtes rekombinantes PhLP<sub>L</sub> (400 nM) wurde durch CK 2 (0,04 mU) phosphoryliert bei 30°C für 1, 5, 10, 20, 30 und 40 Minuten. Die SDS-PAGE wurde mit einem 16%igen Gel durchgeführt und einem Phosphoimaging unterzogen. Die mit der Zeit zunehmende Phosphorylierung durch CK2 (P- PhLP<sub>L</sub>) bewirkte eine Einschränkung der Mobilität im Gel, die von der ersten bis zur 40. Minute immer stärker ausgeprägt war.

### 2.3.3. Nachweis von mRNA der Caseinkinase 2 in HEK 293-Zellen durch RT-PCR

Nachdem in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe von *in vitro*-Assays gezeigt werden konnte, daß das für die PhLP-Phosphorylierung verantwortliche Enzym die CK2 ist, sollte hier nun bewiesen werden, daß die CK2 tatsächlich in HEK 293-Zellen vorhanden ist, also auch eine physiologische Bedeutung hat. Hierzu bedienten wir uns eines Verfahrens, bei dem die mRNA der Zellen mit Reverser Transkriptase (RT) zunächst in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben wird. Da mRNA das Transkriptionsprodukt der DNA ist, die gerade abgelesen, also in Proteine umgesetzt, also wirklich „gebraucht“ wird, erfährt man über die mRNA, welche Proteine in der Zelle „hergestellt“ werden. Im Vergleich zur Kenntnis des Genoms erfährt man also, welche Proteine in den untersuchten Zellen tatsächlich eine Rolle spielen. Die so entstandene cDNA diente als Template für die PCR mit Primern jeweils für die beiden Untereinheiten der CK2.

Für beide Untereinheiten der CK2 ließ sich ein RT-PCR-Produkt nachweisen (Abb.17), womit davon ausgegangen werden kann, daß sie in HEK 293-Zellen als Repräsentant für menschliche Zellen vorhanden und damit aktiv ist (sie gilt als konstitutiv aktiv). Dies ist ein zusätzlicher Hinweis auf die Relevanz der CK2-Aktivität im Hinblick auf die PhLP<sub>L</sub>-Phosphorylierung, denn in den bisher durchgeführten Experimenten wurde sie entweder von außen hinzugegeben oder nur indirekt durch Einsatz von Inhibitoren nachgewiesen (Humrich et al. 2003).



**Abb.17: Nachweis von mRNA der Caseinkinase 2 in HEK 293-Zellen durch RT-PCR – PCR-Produkte für CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$**

Die Taq-Polymerase wurde zur Amplifizierung eingesetzt, als Template diente eine mRNA-Präparation aus HEK 293-Zellen, die mit reverser Transkriptase in cDNA umgewandelt worden war. Als Primer dienten 29-34 bp lange Oligonukleotide, die mit ihrem 3'- und 5'-Ende der cDNA von CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$  identisch waren. Es ergaben sich PCR-Produkte von 1176 bp (CK2 $\alpha$ ) bzw. 648 bp (CK2 $\beta$ ), was ein Hinweis auf das Vorhandensein und Aktivität der CK2 in HEK 293-Zellen ist.

### 3. Nachweis der Bindung von $G\beta\gamma$ und $PhLP_L$ bzw. $PhLP_S$ durch Co-Immunpräzipitation

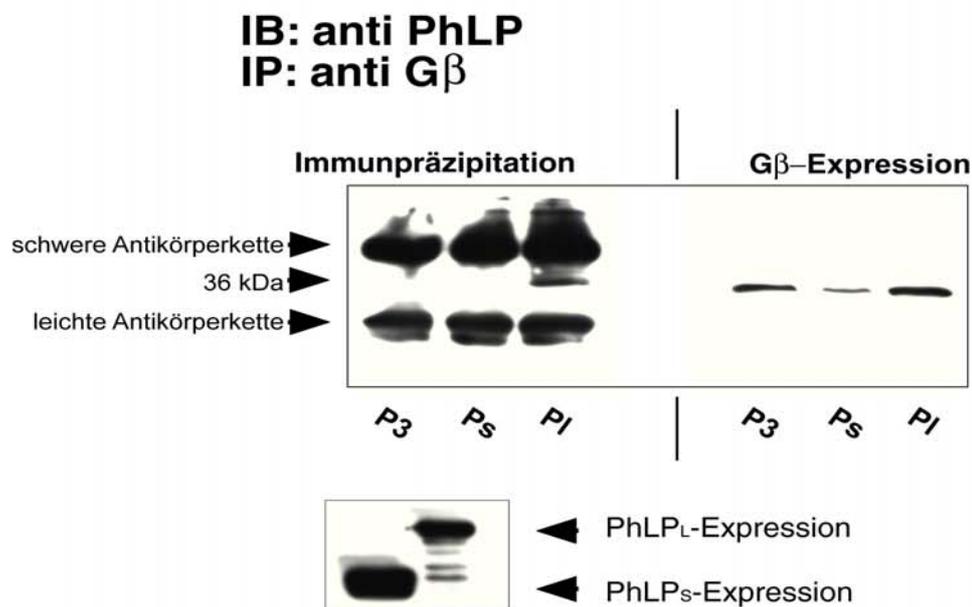
Nachdem die Hemmung der  $G\beta\gamma$ -gekoppelten Inositolphosphatbildung durch  $PhLP_L$  und  $PhLP_S$  in HEK 293-Zellen nachgewiesen worden war (vgl.III.1) und die schwächere Hemmung durch  $PhLP_L$  vermutlich durch seine Phosphorylierung bedingt ist (vgl.III.2), bestand zunächst die Hypothese, daß beide  $PhLP$ -Formen  $G\beta\gamma$  durch Bindung hemmen. Es wäre nämlich plausibel, daß die Interaktion zwischen  $PhLP_L$  und  $G\beta\gamma$  durch seine Phosphorylierung eingeschränkt ist und es daher weniger gut hemmen kann. So sollte in dieser Arbeit durch Immunpräzipitation (vgl. II.2.3.5.) eine direkte Interaktion zwischen  $PhLP_L$  bzw.  $PhLP_S$  und  $G\beta\gamma$  in Zellen nachgewiesen werden. Es wurde bereits für beide Isoformen *in vitro* gezeigt, daß eine direkte Bindung vorliegt, dieser Befund wurde in Zellen jedoch nur für  $PhLP_L$  nachgewiesen (Thibault et al. 1997).

Der Versuch wurde in dieser Arbeit in HEK 293-Zellen durchgeführt, die pro 10 cm-Petrischale mit je 3  $\mu\text{g}$  cDNA für  $G\beta_1$  und  $G\gamma_2$  und 8  $\mu\text{g}$  cDNA für  $PhLP_S$  bzw.  $PhLP_L$  transient transfiziert wurden (vgl. II.2.2.8.).  $PhLP$  wurde mit dem Kaninchen-anti- $PhLP$ -Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunfällung wurde mittels SDS-PAGE (vgl. II.2.3.2.) aufgetrennt und durch Western-Transfer auf PVDF-Membranen immobilisiert. Die Bindung zwischen  $PhLP_L/PhLP_S$  und  $G\beta_1$  wurde während der SDS-PAGE gelöst, sodaß die zu betrachtenden Proteine bei der Bande ihrer eigenen Größe zu finden waren, das heißt, man erstrebte eine  $G\beta_1$ -Bande bei 36 kDa. Die Markierung von hypothetisch gebundenem  $G\beta_1$  erfolgte durch Kaninchen-anti- $\beta_1$ -Antikörper, die Detektion durch Chemilumineszenz unter Verwendung eines Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Kaninchen POD) (s.II.1.3.5.).

Unerwarteterweise ließ sich für  $PhLP_L$  eine Bindung von  $G\beta_1$  deutlich nachweisen, während  $PhLP_S$  keine Bindung zeigte, obwohl es in der  $G\beta\gamma$ -Inhibierung  $PhLP_L$  überlegen war (vgl. III.1.2. und Humrich et al. 2005). Im weiteren fiel auf, daß die Zellen, die mit  $PhLP_S$  transfiziert waren, eine geringere  $G\beta_1$ -Expression aufwiesen als die Zellen mit  $PhLP_L$ , was in drei voneinander unabhängigen Experimenten nachgewiesen wurde (s.Abb.18, Humrich et al. 2005). Bei den mit  $PhLP_L$  transfizierten Zellen zeigte sich eine geringe Steigerung der  $G\beta_1$ -Expression im Vergleich zu mit p3-transfizierten

Zellen, was mit den Ergebnissen von Lukov et al (2005) übereinstimmt. Dort wurde herausgefunden, daß PhLP<sub>L</sub> bei der Dimerbildung der G $\beta$ -Untereinheit benötigt wird, bei seiner Abwesenheit kommt es folglich zur Störung und zu vorzeitigem Abbau.

All diese Erkenntnisse deuten darauf hin, daß die Bindung von G $\beta$  $\gamma$  zwar für die Inhibierung erforderlich ist, da sie bei PhLP<sub>L</sub> beobachtet wurde, daß es im Falle von PhLP<sub>S</sub> jedoch einen anderen Mechanismus geben könnte, durch den das Vorhandensein von G $\beta$ -Untereinheiten reduziert würde, was ebenfalls zu einem verminderten G $\beta$  $\gamma$ -geförderten Effekt (in dieser Arbeit die IP<sub>3</sub>-Bildung) führen würde. Auf diese Fragestellung wird im Diskussionsteil näher eingegangen.



**Abb.18: Nachweis der Bindung von G $\beta$  und PhLP durch Immunpräzipitation**

Dargestellt sind Westernblotanalysen von Immunpräzipitaten (links oben) und Zellhomogenaten (rechts, links unten) aus transient transfizierten HEK 293-Zellen, welche pro 10 cm-Petrischale mit 8  $\mu$ g cDNA für PhLP<sub>L</sub> oder PhLP<sub>S</sub> und jeweils 3  $\mu$ g cDNA für G $\beta$ <sub>1</sub> und G $\gamma$ <sub>2</sub> transfiziert wurden. Die Zellhomogenate dienen dem Größenvergleich und der Expressionskontrolle des zu präzipitierenden Proteins (G $\beta$ <sub>1</sub>, rechtes Bild) und PhLP (links unten). Die Bindung zwischen PhLP und G $\beta$  wurde während der Immunpräzipitation gelöst, sodaß die zu betrachtenden Proteine bei der Bande ihrer eigenen Größe zu finden waren, das heißt, man erstrebte eine G $\beta$ <sub>1</sub>-Bande bei 36 kDa. Als breite Banden stellten sich die verwendeten Antikörper dar. Eine Bindung war nur für PhLP<sub>L</sub> nachzuweisen (linkes Bild). In der Expressionskontrolle des zu präzipitierenden Proteins G $\beta$ <sub>1</sub> fiel auf, daß die Expression von G $\beta$ <sub>1</sub> in Anwesenheit von PhLP<sub>S</sub> reduziert war (Humrich et al. 2005) und in Anwesenheit von PhLP<sub>L</sub> leicht erhöht (Lukov et al. 2005). Abkürzungen: P<sub>3</sub> pcDNA3, P<sub>S</sub> PhLP<sub>S</sub>, P<sub>I</sub> PhLP<sub>L</sub>

## IV. Diskussion

G-Proteine werden durch verschiedene Klassen von Proteinen reguliert, hauptsächlich durch die RGS-Proteine und die Phosducinfamilie. Die Proteine der Phosducinfamilie binden G-Protein  $\beta\gamma$ -Untereinheiten und hemmen auf diese Weise die G-Protein-funktion (Bauer et al. 1992; Gaudet et al. 1996), wodurch G-Protein-gekoppelte Effekte gehemmt werden, z.B. die Aktivierung von PLC $\beta$ -Formen und der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase (Yoshida et al. 1994; Hekman et al. 1994, Xu et al. 1995).

In dieser Arbeit sollte der Effekt von zwei Proteinen der Phosducinfamilie, PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub>, welche *in vitro* G $\beta\gamma$ -Untereinheiten hemmen, in Zellen getestet werden. Dabei diente die Aktivierung der G $\beta\gamma$ -abhängigen Phospholipase C $\beta_2$  in HEK 293-Zellen als funktionelles Readout der G $\beta\gamma$ -Inhibierung.

### 1. G $\beta\gamma$ -inhibitorische Effekte von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> in Zellen

PhLP<sub>L</sub> (Phosducin like protein long) und PhLP<sub>S</sub> (Phosducin like protein short) sind die bislang bekannten Vertreter aus der Gruppe der Phosducin-ähnlichen Proteine, wobei sie sich allein durch den zusätzlichen 83 Aminosäuren langen N-Terminus von PhLP<sub>L</sub> unterscheiden (Miles et al. 1993). In *in vitro*-Versuchen zeigte Schröder (Schröder und Lohse 2000), daß PhLP<sub>L</sub> ein in seiner Affinität gleichwertiger G $\beta\gamma$ -Inhibitor zu Phosducin ist, während die Inhibierung durch PhLP<sub>S</sub> deutlich schwächer ist. Dies stimmt mit der Tatsache überein, daß PhLP<sub>S</sub> eine N-terminale G $\beta\gamma$ -Bindung fehlt (Gaudet et al. 1996). Außerdem lag es aufgrund der Verteilung in verschiedenen Geweben eher nahe, PhLP<sub>L</sub> eine physiologische Rolle zuzuschreiben, da PhLP<sub>S</sub> in den getesteten Geweben Gehirn, Leber, Niere, Lung, Herz und Skelettmuskel in wesentlich kleineren Mengen gefunden wurde (Thibault et al. 1999, Schröder und Lohse 2000). Daher nahm man an, daß von den beiden Isoformen die lange Form PhLP<sub>L</sub> der physiologische G-Proteinregulator ist.

In dieser Arbeit stellte sich im Gegensatz zu dieser Annahme heraus, daß PhLP<sub>S</sub> ein effektiver Regulator der G $\beta\gamma$ -Funktion in HEK 293-Zellen ist, da die G $\beta\gamma$ -abhängige

Aktivität der Phospholipase  $C\beta_2$  gehemmt wird. Dies lässt vermuten, daß der C-terminale Teil der Phosducinfamilie eine größere Rolle spielt als bisher angenommen, auch unter dem Aspekt, daß das dem Phosducin homologe Protein der Hefe bzgl. Größe und Struktur der Domänen  $PhLP_S$  ähnelt (s. Abb. 5).

Die Hemmung durch  $PhLP_S$  war in Zellen stärker als durch  $PhLP_L$ , was den *in vitro*-Ergebnissen von Schröder et al. 1996 widerspricht. Im Laufe der Arbeit wurde diesem Unterschied nachgegangen, wobei man sich auf den Mechanismus der Proteinregulation durch Phosphorylierung konzentrierte, der im nächsten Kapitel behandelt wird.

## 2. Regulation von $PhLP_L$ durch Phosphorylierung

Bei der Frage nach dem Grund für diesen Widerspruch wurde der Vergleich zu Phosducin gezogen, was in Zellen einer Regulation durch Kinasen (Enzyme, die Proteine durch Phosphorylierung regulieren) unterliegt. Phosducin ist einer phosphorylierungsabhängigen Regulation unterworfen (Lee et al. 1987, 1990a, Reig et al. 1990). Die Phosphorylierung durch die PKA am Serinrest 73 (Lee et al. 1990a) führt zu einem Verlust der  $G\beta\gamma$ -inhibitorischen Funktion (Bauer et al. 1992, Lee et al. 1992, Yoshida et al. 1994). Als weiteres an der Phosducin-Phosphorylierung beteiligtes Enzym ist die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II zu nennen (Thulin et al. 2001).

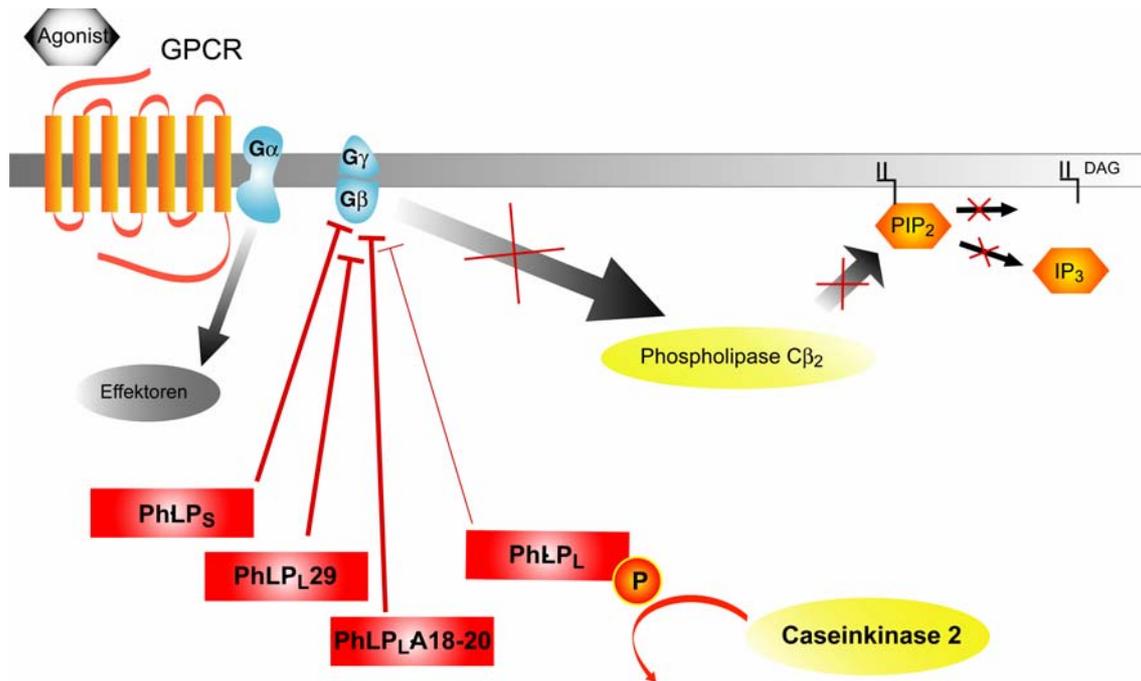
Es stellte sich tatsächlich heraus, daß in HEK 293-Zellen  $PhLP_L$  im Gegensatz zu  $PhLP_S$  phosphoryliert vorliegt (Humrich et al. 2003), womit Parallelen zum Phosducin gezogen werden können. In den *in vitro*-Versuchen, in denen  $PhLP_L$  der überlegene Inhibitor war, war ein solcher Einfluß nicht möglich, weil dort keine Kinasen anwesend waren. Daher könnte es durchaus sein, daß in Zellen Kinasen seine Aktivität beeinflussen und zum schlechteren Inhibitor machen. Ein PKA-Consensusmotiv ist wie im Phosducin auch in  $PhLP_L$  und  $PhLP_S$  vorhanden (Aminosäuren 117 bis 121), scheint aber *in vivo* und *in vitro* nicht als Phosphorylierungsstelle zu fungieren (Humrich et al. 2003). Dies wäre auch keine suffiziente Erklärung, da dieses Motiv sowohl in  $PhLP_L$  als auch in  $PhLP_S$  vorhanden ist und somit beide phosphoryliert werden müssten, was nicht der Fall ist.

Daher richtete man bei der Suche nach weiteren möglichen Kinasen, die  $PhLP_L$  in seiner Funktion als  $G\beta\gamma$ -Inhibitor hemmen, die Aufmerksamkeit insbesondere auf den

zusätzlichen N-Terminus, der den einzigen Unterschied zwischen PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> ausmacht. Unter der Fragestellung einer möglichen Phosphorylierung des N-Terminus der langen Form PhLP<sub>L</sub> wurde nach Zielsequenzen für verschiedene Kinasen gesucht. Es fanden sich vier Phosphorylierungsstellen für die Caseinkinase 2 (CK2), die Serin und Threonin phosphoryliert und als verantwortliches Enzym durchaus möglich ist, da sie ubiquitär vorkommt und konstitutiv aktiv ist (Allende et al. 1995, Pinna und Meggio 1997). So wird beispielsweise Arrestin-3, ein anderes Protein des G-Protein-gekoppelten Signalwegs, von der CK2 reguliert (Kim et al. 2002).

Im *in vitro*-Versuch gelang es, die CK2 als das verantwortliche Enzym zu identifizieren (Humrich et al. 2003). In dieser Arbeit wird durch RT-PCR gezeigt, daß die cDNA der CK2 in HEK 293-Zellen, die als Modell für *in vivo*-Versuche genutzt wurden, transkribiert wird, was bedeutet, daß sie in Zellen vorhanden und damit aktiv ist, weil sie als konstitutiv aktiv gilt. Um die verantwortliche Phosphorylierungsstelle von den vier möglichen zu identifizieren, wurden durch Trunkierung und alternatives Spleißen mögliche Serin/Threonin-Cluster im zusätzlichen N-Terminus von PhLP<sub>L</sub> schrittweise entfernt bis zur Erlangung der Effektivität des PhLP<sub>S</sub>. Mit Hilfe von Entfernung des Clusters AS 18-20 durch Trunkierung bzw. der Ser/Ala-Mutation AS 18-20 ließ sich die Effektivität des PhLP<sub>L</sub> wiederherstellen.

Zusammengenommen sprechen diese Befunde dafür, daß PhLP<sub>L</sub> in seiner Funktion als G $\beta\gamma$ -Inhibitor in HEK 293-Zellen und damit *in vivo* dauerhaft geschwächt wird, da es basal phosphoryliert vorliegt (Humrich et al. 2003) durch eine Kinase, deren Aktivität konstitutiv und damit nicht reguliert ist.



**Abb.19: Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit**

PhLP<sub>S</sub>, PhLP<sub>L</sub>29 (trunkierte Form von PhLP<sub>L</sub>) und PhLP<sub>L</sub>A18-20 (Ser→Ala-Mutante) sind starke Inhibitoren der  $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins, was den  $\beta\gamma$ -getriggerten Effekt der PIP<sub>2</sub>-Spaltung reduziert, wodurch weniger IP<sub>3</sub> und DAG entstehen. PhLP<sub>L</sub> wird durch die Caseinkinase 2 phosphoryliert, weswegen es den Effekt weniger stark hemmen kann.

### 3. G $\beta\gamma$ -Bindung von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> in Zellen – der Mechanismus der Inhibition?

Nachdem sich in dieser Arbeit PhLP<sub>S</sub> als seiner langen Splicevariante PhLP<sub>L</sub> überlegener G-Proteinregulator erwiesen hatte, sollte diese Eigenschaft von PhLP<sub>S</sub> dadurch untermauert werden, daß eine stärkere G $\beta$ -Bindung im Vergleich zu PhLP<sub>L</sub> dargestellt werden sollte. Wir nahmen eine Regulation durch Bindung an, da eine N-terminale Bindungsstelle für Phosducin identifiziert wurde (Hawes et al. 1994, Xu et al. 1995), eine Region, in der PhLP<sub>L</sub> dem Phosducin homolog (Gaudet et al. 1996) und somit dort auch vorhanden ist. Zudem wurde Bindung *in vitro* sowie in Zellen für PhLP<sub>L</sub> direkt nachgewiesen (Thibault et al. 1997).

Für PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> ist auch eine C-terminale Bindungsstelle bekannt, die die Regulation durch PhLP<sub>S</sub>, dem der N-Terminus fehlt, erklären könnte (Schröder et al. 1997). In Zusammenschau legen diese Befunde die Vermutung nahe, daß die beobachtete Gβγ-Inhibition durch Bindung der Gβγ-Untereinheit geschieht.

Die Ergebnisse fielen überraschenderweise in umgekehrter Weise aus: im Gegensatz zur Erwartung, daß PhLP<sub>S</sub> eine größere Affinität zu Gβ zeigt, wurde durch Immunpräzipitation eine Gβ-Bindung für PhLP<sub>L</sub> nachgewiesen, während für PhLP<sub>S</sub> überhaupt keine Bindung gezeigt werden konnte (s.III.3). Dies widersprach auf den ersten Blick den Daten aus den funktionellen Assays. Jedoch ergab sich als Nebenbefund des Bindungsassays, daß die mit PhLP<sub>S</sub> transfizierten HEK 293-Zellen eine geringere Gβ-Expression zeigten als mit PhLP<sub>L</sub> transfizierte (s.III.3). Dies könnte eine Erklärung dafür liefern, warum PhLP<sub>S</sub> im Bindungsassay keine direkte Bindung zeigt: Es bindet nicht an Gβγ, sondern bewirkt durch einen bisher unbekanntem Mechanismus eine Reduktion ihrer Menge. Man könnte sogar so weit gehen zu vermuten, daß PhLP<sub>L</sub> zwei Mechanismen zur Verfügung stehen, um Gβγ zu hemmen: zum einen der bekannte über die N-terminale Bindungsstelle (Hawes et al. 1994, Xu et al. 1995), dessen sich die phosphorylierte lange Spleißvariante bedient, zum anderen ein noch unbekanntes, der im nichtphosphorylierten und/ oder N-terminal kürzeren Zustand greift.

Diese Fragestellung wurde in unserer Arbeitsgruppe weiterverfolgt, wobei sich zeigte, daß unphosphoryliertes und gespleißtes PhLP (=PhLP<sub>S</sub>) mit dem Tailless Complex Polypeptide-1α (TCP-1α) des cytosolischen Chaperonkomplexes (CCT) interferiert und auf diese Weise die Faltung der Gβγ-Untereinheiten hemmt (Humrich et al. 2005). Da bei Beendigung dieser Arbeit diese Befunde noch nicht vorlagen, sollen im folgenden Kapitel, ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit, verschiedene Möglichkeiten der Gβγ-Inhibition durch das nicht direkt bindende PhLP<sub>S</sub> aufgezeigt werden. In diesem Rahmen wird auf die Ergebnisse der Arbeit zum Einfluß von PhLP<sub>S</sub> auf das TCP-1α (Humrich et al. 2005) genauer eingegangen.

## 4. Erklärungsmodelle für die G $\beta$ $\gamma$ -Inhibition durch PhLP<sub>S</sub>

### 4.1. Downregulation

Ein möglicher indirekter Mechanismus der G-Proteinregulation wäre die Down-Regulation der G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheit durch PhLP<sub>S</sub>, welche gemäß dem Nebenbefund der Immunpräzipitation von G $\beta$  durch PhLP<sub>S</sub> denkbar wäre. Dort zeigte sich eine verringerte Expression von G $\beta$  bei Transfektion von PhLP<sub>S</sub> (s.III.3). Es stellt sich die Frage, ob diese Regulation auf der Stufe der mRNA-Transkription und -Translation, der Proteinsynthese oder nach Bildung des fertigen Proteins, sprich durch gesteigerten Abbau, stattfindet.

Die Hemmung auf Ebene der Transkription kann durch Präparation von mRNA aus Zellen, folgender reverser Transkription und anschließender quantitativer PCR der G $\beta$ -cDNA festgestellt werden. Dies wurde an HEK 293-Zellen mit bzw. ohne Überexpression von PhLP<sub>S</sub> durchgeführt, wobei sich kein Unterschied in der mRNA-Menge von G $\beta_1$  ergab (Humrich et al. 2005). Daraus lässt sich schließen, daß auf Transkriptionsebene PhLP<sub>S</sub> keinen Einfluß hat.

Um einen hemmenden Einfluß auf die G $\beta$ -Untereinheit nach Beendigung ihrer Proteinsynthese zu testen, könnte anhand von Pulse-Chase-Assays untersucht werden, ob in mit PhLP<sub>S</sub> transient transfizierten HEK 293-Zellen die Proteinsynthese von G $\beta$  erhalten ist. Wenn das der Fall ist, würde es bedeuten, daß auf Transkriptions- und Translations-ebene keine Störung vorliegt, sondern die Stabilität der G $\beta$ -Untereinheit beeinträchtigt ist. Es gibt Hinweise für das Vorhandensein eines solchen Mechanismus für Phosducin und PhLP: sie beide scheinen mit SUG1, einer ATPase, zu interagieren, die Bestandteil des 26S Proteasoms ist, welches am Abbau von Proteinen beteiligt ist (Zhu et al. 1998, Barhite et al. 1998). Zusätzlich macht diese Hypothese wahrscheinlich, daß die beste dieser Interaktionen für PhLOP1 beschrieben wurde, eine Splicevariante von Phosducin, die homolog zur kurzen Splicevariante PhLP<sub>S</sub> ist (Zhu et al. 1998). Diese Interaktion mit SUG1 könnte auch für PhLP<sub>S</sub> überprüft werden.

Ein weiterer Hinweis für den Einfluß von PhLP<sub>S</sub> auf den proteasomalen Abbau ist der Befund, daß bei PhLP<sub>S</sub>-transfizierten HEK 293-Zellen die Proteinmenge von G $\gamma_2$  im

Vergleich zur Kontrolle reduziert ist, durch den Proteasominhibitor Lactacystin jedoch teilweise erhöht wird (Humrich et al. 2005).

## 4.2. Störung der Faltung von G $\beta$ $\gamma$

Ein weiterer Aspekt der G $\beta$  $\gamma$ -Inhibierung könnte der Einfluß von PhLP auf die Faltung von Proteinen sein: PhLP stellt einen Inhibitor des Cytosolischen Chaperon Komplexes (CCT, s.o.) dar, der bei der Faltung von Aktin, Tubulin, G $\alpha$ -Untereinheiten und von G $\beta$  ähnlichen Proteinen eine Rolle spielt (McLaughlin et al. 2002b, Humrich et al. 2005). PhLP<sub>S</sub> ist in transient transfizierten Zellen in der G $\beta$  $\gamma$ -Inhibition sehr effektiv, also in Zellen, in denen Proteinexpression vermehrt stattfindet und somit Proteinfaltung eine große Rolle spielt, was dafür spräche, daß die Regulation auf dieser Ebene stattfinden könnte.

Wie vorausgehend erwähnt, wurde die Fragestellung der G $\beta$  $\gamma$ -Inhibierung durch PhLP in unserer Arbeitsgruppe weiterverfolgt, da für gespleißtes PhLP (=PhLP<sub>S</sub>) keine direkte G $\beta$  $\gamma$ -Bindung gezeigt werden konnte. Es wurde – repräsentativ für unphosphoryliertes PhLP<sub>L</sub> – eine PhLP<sub>L</sub>-Variante ohne die in dieser Arbeit identifizierte Phosphorylierungsstelle der CK2 und ohne die N-terminale G $\beta$  $\gamma$ -Bindungsstelle von PhLP<sub>L</sub> konstruiert (PhLP<sub>L</sub>AV). Dabei stellte sich heraus, daß PhLP<sub>S</sub> und PhLP<sub>L</sub>AV G $\beta$  $\gamma$  nicht binden, aber zur Downregulation ihrer Proteinmenge führen. Es wurde auch deutlich, daß die Hemmung des Tailless Complex Polypeptide-1 $\alpha$  (TCP-1 $\alpha$ ) des cytosolischen Chaperonkomplexes (CCT) durch siRNA zu einer Reduktion von G $\gamma$ <sub>2</sub> in transfizierten HEK 293-Zellen führt.

Daraufhin wurde für PhLP<sub>S</sub> eine Interaktion mit dem TCP-1 $\alpha$  anhand von Immunpräzipitation gezeigt (Humrich et al. 2005). Durch schrittweise Trunkierung des N-terminalen Teils von PhLP<sub>S</sub> wurde als für die TCP-1 $\alpha$ -Bindung verantwortliche Region der Abschnitt zwischen PhLP 132 und 145, der die  $\alpha$ -Helix 3 enthält, identifiziert. Somit legt die weiterführende Arbeit unserer Gruppe nahe, daß die G $\beta$  $\gamma$ -Inhibierung durch PhLP<sub>S</sub> über einen bisher nicht bekannten Mechanismus der G $\beta$  $\gamma$ -Regulation, nämlich der Hemmung der Faltung durch Interaktion mit dem TCP-1 $\alpha$ , erfolgt.

### 4.3. Stabilisierung der G $\beta$ $\gamma$ -Untereinheiten durch PhLP<sub>L</sub>

Eine andere Erklärung der unterschiedlichen G $\beta$ -Expressionen wäre eine protektive Wirkung von phosphoryliertem PhLP<sub>L</sub> auf die Stabilität der G $\beta$ -Untereinheiten, was mit folgenden Daten übereinstimmt: Fehlen des PhLP1-Gens im Pilz *Cryphonectria parasitica* (Kasahara et al. 2000) führte zu einem Phänotypen ohne funktionierendes G $\beta$ , Deletion eines homologen Phosducin-Familiengens in *Dictyostelium discoideum* machte die G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten funktionsunfähig (Blaauw et al. 2003). Also war die intakte Funktion des G-Proteins abhängig von der Anwesenheit des Phosducinproteins. Auch retinales Phosducin zeigte schützende Wirkung auf G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten. Darüberhinaus wurde eine Verhinderung des Abbaus von G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten über den Ubiquitinsignalweg mit Hilfe von Phosducin nachgewiesen (Obin et al. 2002).

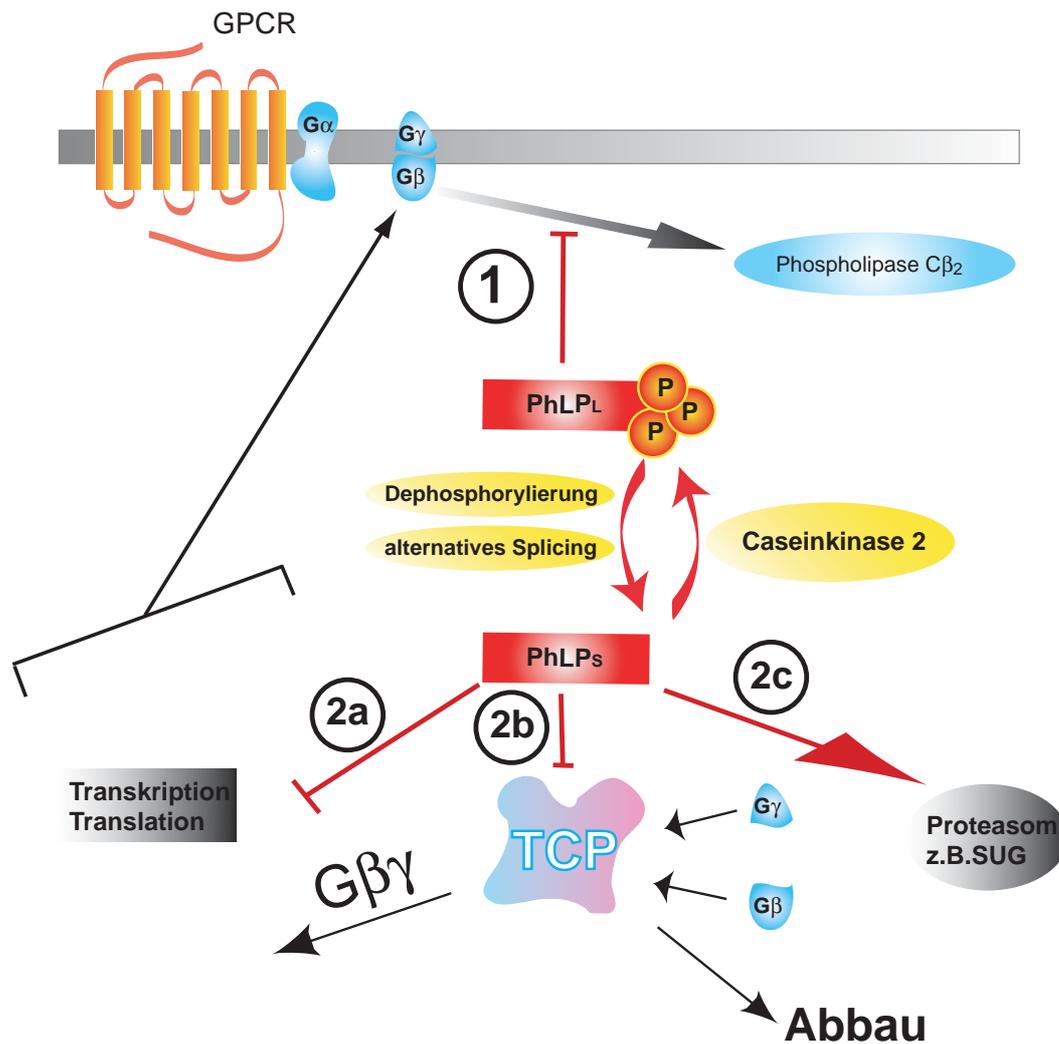
Kürzlich wurde in HeLa-Zellen gezeigt, daß die Inhibierung von PhLP durch siRNA zu einer Reduktion der G $\beta$ -Expression, zu einem geschwächten G $\beta$ -gekoppelten Signal und zu reduzierter G $\beta$  $\gamma$ -Dimerbildung führt (Lukov et al. 2005). Es wurde eine G $\beta$ -Bindung durch phosphoryliertes wie nicht phosphoryliertes PhLP nachgewiesen. Die Assoziation des PhLP-G $\beta$ -Komplexes mit G $\gamma$  war jedoch nur unter Phosphorylierung von PhLP möglich. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, daß PhLP an der G $\beta$  $\gamma$ -Dimerbildung beteiligt ist, indem es G $\beta$  zunächst bindet, worauf sich G $\gamma$  an G $\beta$  binden kann, was beide Komponenten vor dem vorzeitigen Abbau schützt.

Die beiden Erklärungsmodelle der Störung der G $\beta$  $\gamma$ -Faltung durch PhLP (Humrich et al. 2005) und der Stabilisierung des G $\beta$  $\gamma$ -Dimers (Lukov et al. 2005) widersprechen sich auf den ersten Blick, da ersteres besagt, daß durch PhLP G $\beta$  $\gamma$  inhibiert und letzteres, daß es vor Abbau geschützt wird. Die beiden Modelle lassen sich jedoch dadurch in Einklang bringen, daß die TCP-1 $\alpha$ -Bindung, welche zur Störung der Faltung führt, für die kurze Spleißvariante PhLP<sub>S</sub> beobachtet wurde (Humrich et al. 2005). Die Hemmung der G $\beta$  $\gamma$ -gekoppelten Inositolphosphatbildung in Zellen wurde in PhLP<sub>S</sub> überexprimierenden HEK 293-Zellen gesehen (Humrich et al. 2003). Die Beobachtung, daß PhLP bei der G $\beta$  $\gamma$ -Dimerbildung unterstützend wirkt, wurde jedoch für ungespleißtes, phosphoryliertes PhLP<sub>L</sub> gemacht (Lukov et al. 2005).

Es spricht nichts dagegen, daß physiologisch die beiden Spleißvarianten ihre unterschiedlichen Effekte ausüben und je nachdem, welche Variante überwiegend exprimiert

wird, entweder die Störung der G $\beta\gamma$ -Faltung oder die Stabilisierung dominant ist. In unserer Arbeitsgruppe wurden Unterschiede der PhLP<sub>S</sub>/ PhLP<sub>L</sub>-Expression in Abhängigkeit vom Gewebe gezeigt (Humrich et al. 2003). So überwiegt in Herz und Embryo der Maus hauptsächlich phosphoryliertes PhLP<sub>L</sub>, während in Nebenniere und Gehirn phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes PhLP<sub>L</sub> gleichermaßen vorhanden ist. In der Nebenniere wird – im Gegensatz zu den meisten anderen Geweben – auch PhLP<sub>S</sub> exprimiert.

In der gleichen Arbeit wurde der G $\beta\gamma$ -hemmende Effekt von PhLP<sub>S</sub> auf die Inositolphosphatbildung in PhLP<sub>S</sub> überexprimierenden HEK 293-Zellen gezeigt (Humrich et al. 2003), der, wie sich später herausstellte, auf der Downregulation von G $\beta\gamma$  durch Störung der Faltung beruht. In diesem Fall ist die überwiegende G $\beta\gamma$ -Hemmung als dominant-negativer Effekt des PhLP<sub>S</sub> zu werten, da es in unphysiologisch hoher Menge vorhanden ist.



**Abb.20: Mögliches Prinzip der Gβγ-Inhibition durch PhLP (s.auch Humrich et al. 2005):**

Es stehen zwei verschiedene Mechanismen der Gβγ-Inhibition zur Verfügung, abhängig vom Zustand von PhLP (phosphoryliert/ unphosphoryliert):

1. Die ständig phosphorylierte Isoform PhLP<sub>L</sub> hemmt Gβγ und seine Effektoren (PLC β<sub>2</sub>) durch direkte Bindung von Gβγ.
2. Im unphosphorylierten Zustand (PhLP<sub>S</sub> (Spleißvariante *in vivo*), PhLP<sub>L</sub>A18-20 (Ser/Ala-Mutante, in dieser Arbeit kloniert)) reduziert PhLP die Menge Gβγ in der Zelle durch einen Mechanismus, der noch zu erforschen ist, denn es stellte sich heraus, daß es Gβγ nicht bindet, sondern seine Menge reduziert. Dabei kann die Gβγ-Bildung auf Ebene der Proteinsynthese (2a), der Proteinfaltung (2b) unterbunden werden, oder es werden proteinabbauende Wege gefördert (2c).

## 5. Physiologische Relevanz von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> als Gβγ-Inhibitoren

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> sind Proteine, die die Gβγ-Untereinheit von G-Proteinen regulieren, während sie auf die Gα-Untereinheit keinen Einfluß haben. Da mit der Zeit immer mehr Effektoren für die Gβγ-Untereinheiten (Cabrera-Vera et al. 2003) entdeckt wurden, denen im Gegensatz zur α-Untereinheit zunächst nur eine passive Rolle zugesprochen wurde (Neer 1995), ergibt sich daraus eine größere Bedeutung für die βγ-Untereinheit des G-Proteins und damit auch für Regulatoren wie PhLP.

Während der Untersuchung der beiden Spleißvarianten PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> wurde zunächst nur PhLP<sub>L</sub> eine physiologische Relevanz zugesprochen (s.o.), da es ein stärkerer Gβγ-Inhibitor war und in mehr Geweben gefunden wurde als seine kurze Spleißvariante (Schröder und Lohse 2000). Erst später ergaben sich Hinweise auf eine eigene Rolle von PhLP<sub>S</sub> (Gensse et al. 2000).

PhLP<sub>S</sub> wurde in der Nebenniere der Maus in Mengen nachgewiesen, die der Menge an PhLP<sub>L</sub> in Gehirn und Herz der Maus vergleichbar sind (Humrich et al. 2003). Diese gilt als ausreichend für eine *in vivo*-Regulation von G-Proteinen (Schröder und Lohse 2000). Die Detektion von PhLP<sub>S</sub> in der Nebenniere passt zu dem Befund, daß es aus bovinen chromaffinen Zellen isoliert werden konnte (Gensse et al. 2000). Diese Befunde stützen die These, daß nicht nur PhLP<sub>L</sub>, sondern auch PhLP<sub>S</sub> ein physiologisch relevanter Regulator von G-Proteinen ist.

Die Befunde dieser Arbeit, daß einerseits PhLP<sub>S</sub> in Zellen ein stärkerer βγ-Inhibitor ist und andererseits Einfluß auf die Menge von verfügbarem βγ ausübt, eröffnet neue Möglichkeiten der Regulation, die in IV.4 beschrieben und noch zu erforschen sind.

Um die *in vivo*-Relevanz zu stützen, müssten weitere Gβγ-abhängige Effektoren, die erwiesene physiologische Bedeutung haben, auf ihre Hemmbarkeit durch PhLP untersucht werden. Eine Möglichkeit sind die GIRK-Kanäle, die höchstwahrscheinlich an vagaler negativen Inotropie beteiligt sind, um ein Beispiel zu nennen (Ito et al. 1994, Chan et al. 1996, Bünemann et al. 1998).

## V. Zusammenfassung

Phosducin-like protein (PhLP) gehört zur Phosducinfamilie der G-Protein- $\beta\gamma$ -Regulatoren und kommt in zwei Spleißvarianten vor. Die lange Isoform PhLP<sub>L</sub> und die kurze Isoform PhLP<sub>S</sub> unterscheiden sich allein durch das Vorhandensein des 81 Aminosäuren langen N-Terminus von PhLP<sub>L</sub>. In Versuchen mit gereinigten Proteinen erwies sich PhLP<sub>L</sub> als der stärkere G $\beta\gamma$ -Inhibitor, während die Bedeutung von PhLP<sub>S</sub> nicht bekannt war.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß in transfizierten HEK 293-Zellen PhLP<sub>S</sub> die G $\beta\gamma$ -vermittelte Signalbildung 20mal stärker hemmt als PhLP<sub>L</sub>. Da der zusätzliche N-Terminus von PhLP<sub>L</sub> mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für die konstitutiv aktive Caseinkinase 2 besitzt, wurde angenommen, daß die lange Spleißvariante in Zellen einer solchen Regulation unterliegt, was sich auf seine Funktion als G $\beta\gamma$ -Inhibitor auswirkt. Durch schrittweise Trunkierungen bzw. Serin-/Threonin  $\rightarrow$  Alaninmutationen wurden die potentiellen Phosphorylierungsstellen entfernt, was zur Verbesserung der G $\beta\gamma$ -Hemmfähigkeit führte. Der N-terminale Aminosäurenabschnitt Ser-18/Thr-19/Ser-20 wurde dabei als die verantwortliche Stelle identifiziert.

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, daß PhLP<sub>L</sub> in HEK 293-Zellen im Gegensatz zu PhLP<sub>S</sub> einer konstitutiven Phosphorylierung unterliegt und durch die CK2 katalysiert wird. In dieser Arbeit werden die Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> durch die CK2 anhand von rekombinanten Proteinen sowie ihre Kinetik dargestellt. Das Vorhandensein von mRNA der CK2 in HEK 293-Zellen zeigt, daß sie in der Zelle exprimiert und somit aktiv ist, was ihre physiologische Bedeutung herausstellt.

Eine direkte G $\beta\gamma$ -Bindung konnte durch Immunpräzipitation nur für PhLP<sub>L</sub> nachgewiesen werden, weswegen für PhLP<sub>S</sub> ein alternativer Mechanismus der G $\beta\gamma$ -Hemmung angenommen wurde, was in folgenden Arbeiten näher untersucht wurde.

## VI. Literaturverzeichnis

**Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, begründet von Forth W, Henschler D, Rummel W (2004):**

*Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* Urban und Fischer

**Allende JE, Allende CC (1995):**

Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* **9**: 313-323

**Barhite S, Thibault C, Miles MF (1998):**

Phosducin-like protein (PhLP), a regulator of G $\beta$  $\gamma$  function, interacts with the proteasomal protein SUG1. *Biochim Biophys Acta* **1402**: 95-101

**Bauer PH, Lohse MJ (1998):**

Effects of phosducin on the GTPase cycle of Go. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **357**: 371-377

**Bauer PH, Müller S, Puzicha M, Pippig S, Obermaier B, Helmreich EJ, Lohse MJ (1992):**

Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator. *Nature* **358**: 73-76

**Bell B, Xing H, Yan K, Gautam N, Muslin AJ (1999):**

KSR-1 binds to G-protein  $\beta\gamma$  subunits and inhibits  $\beta\gamma$ -induced mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **274**: 7982-7986

**Biel M, Schneider A, Wahl C (2002):**

Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med.* **12**: 206-212

**Blaauw M, Knol JC, Kortholt A, Roelofs J, Ruchira, Postma M, Visser AJ, van Haastert PJ (2003)**

Phosducin-like proteins in *Dictyostelium discoideum*: implications for the phosducin family of proteins. *EMBO J* **22**, 5047-5057

**Blüml K, Schnepf W, Schröder S, Beyermann M, Macias M, Oschkinat H, Lohse MJ (1997):**

A small region in phosducin inhibits G-protein  $\beta\gamma$ -subunit function. *EMBO J* **16**: 4908-4915

**Boyer JL, Waldo GL, Harden TK (1992):**

Beta  $\gamma$ -subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. *J Biol Chem* **267**: 25451-25456

**Bünemann M, Hosey MM (1998):**

Regulators of G protein signaling (RGS) proteins constitutively activate G $\beta\gamma$ -gated potassium channels. *J Biol Chem* **273**: 31186-31190

**Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas ZO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm H (2003):**

Insights into G protein structure, function and regulation. *Endocrine reviews* **24**: 765-781 Review

**Calvi LM, Schipani E (2000):**

The PTH/PTHrP receptor in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *J Endocrinol Invest.* **23**(8): 545-54

**Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P (1992):**

Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- $\beta$ 2 by G protein  $\beta\gamma$ -subunits. *Nature* **360**: 684-6

**Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL, Kozasa T (1999):** Selective regulation of  $G\alpha_{q/11}$  by an RGS domain in the G-protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* 274: 34483-92

**Chaillot D, Declerck N, Niefind K, Schomburg D, Chardot T, Meunier JC (2000):** Mutation of recombinant catalytic subunit  $\alpha$  of the protein kinase CK2 that affects catalytic efficiency and specificity. *Protein En.* **13**: 291-298

**Chan KW, Langan MN, Sui JL, Kozak JA, Pabon A, Ldias JA, Logothetis DE (1996):**  
A recombinant inwardly rectifying potassium channel coupled to GTP-binding proteins. *J.Gen.Physiol.* **107**, 381-397

**Chasserot-Golaz S, Hubert P, Thierse D, Dirrig S, Vlahos CJ, Aunis D, Bader MF (1998):**  
Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in regulated exocytosis: studies in chromaffin cells with inhibitor LY294002. *J Neurochem* 70: 2347-56

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

**Clapham DE (1998):**  
Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron.* **21**: 5-7

**Craft CM, Lolley RN, Seldin MF, Lee RH (1991):**  
Rat pineal gland phosducin: cDNA isolation, nucleotide sequence, and chromosomal assignment in the mouse. *Genomics* **10**: 400-409

**Danner S, Lohse MJ (1996):**  
Phosducin is a ubiquitous G-protein regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10145-50

**Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R (2005):**

Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J Clin Invest.* **115(8)**:1972-83.

**Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T,**

**Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, et al. (1986):**

Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**: 75-79

**Downes GB, Gautam N (1999) :**

The G-Protein subunit gene families. *Genomics* **62**: 544-552

**Faust M., Montenarh M (2000):**

Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res* **301**: 329-340

**Galas MC, Helms JB, Vitale N, Thierse D, Aunis D, Bader MF (1996):**

Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J Biol Chem* **272**: 2788-93

**Garzon J, Rodriguez-Diaz M, Lopez-Fando A, Garcia-Espana A, Sanchez-Blazquez P (2002):**

Glycosylated phosducin-like protein long regulates opioid receptor function in mouse brain. *Neuropharmacology* **42**: 813-828

**Gaudet R, Bohm A, Sigler PB (1996):**

Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin  $\beta\gamma$  and its regulator, phosducin. *Cell* **87**: 577-588

**Gauss R, Seifert R (2000):**

Pacemaker oscillations in heart and brain: a key role for hyperpolarization-activated cation channels. *Chronobiol Int.* **17**: 453-469

**Gensse M, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bader MF (2000):**

Regulation of exocytosis in chromaffin cells by phosducin-like protein, a protein interacting with G protein betagamma subunits. *FEBS Lett.* **480**: 184-188

**Golenhofen K (1997):**

*Physiologie: Lehrbuch, Kompendium, Fragen und Antworten*, Urban und Schwarzenberg

**Hamm HE (1998):**

The many faces of G protein signalling. *J Biol Chem* **273**: 669-672

**Hawes BE, Touhara K, Kurose H, Lefkowitz RJ, Inglese J (1994):**

Determination of the G  $\beta\gamma$ -binding domain of phosducin. A regulatable modulator of G  $\beta\gamma$  signaling. *J Biol Chem* **269**: 29825-29830

**He L, Fong J, v.Zastrow M, Whistler JL (2002)**

Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. *Cell* **108**, 271-282

**Hekman M, Bauer PH, Söhlemann P, Lohse MJ (1994):**

Phosducin inhibits receptor phosphorylation by the beta-adrenergic receptor kinase in a PKA-regulated manner. *FEBS Lett* **343**: 120-124

**Humrich J, Bermel C, Grübel T, Quitterer U, Lohse MJ (2003):**

Regulation of phosducin-like protein by casein kinase 2 and N-terminal splicing. *J Biol Chem* **278**: 4474-4481

**Humrich J, Bermel C, Bünemann M, Härmark L, Frost R, Quitterer U, Lohse MJ (2005):**

Phosducin-like protein regulates G protein  $\beta\gamma$  folding by interaction with tailless complex polypeptide-1 $\alpha$ : dephosphorylation or splicing of PhLP turns the switch toward regulation of Gbetagamma folding. *J Biol Chem* **280**: 20042-20050

**Ito H, Ono K, Noma A (1994):**

Background conductance attributable to spontaneous opening of muscarinic K<sup>+</sup> channels in rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol. (Lond.)* **476**, 55-68

**Kasahara S, Wang P, Nuss DL (2000):**

Identification of bdm-1, a gene involved in G protein  $\beta$ -subunit function and  $\alpha$ -subunit accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 412-417

**Kim YM, Barak LS, Caron MG, Benovic JL (2002):**

Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem* **277**: 16837-16846

**Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ (1993):**

The binding site for the  $\beta\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **268**, 8256-8260

**Koch WJ, Hawes BE, Inglese J, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1994):**

Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling. *J Biol Chem* **269**: 6193-6197

**Kuo CH, Taniura H, Watanabe Y, Fukada Y, Yoshizawa T, Miki N (1989):**

Identification of a retina-specific MEKA protein as a 33 K protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **162**: 1063-1068

**Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB (1994):**

Structural determinants for activation of the  $\alpha$ -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* **369**: 621-628

**Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB (1996):**

The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**: 311-319

**McLaughlin JN, Thulin CD, Bray SM, Martin MM, Elton TS, Willardson BM (2002):**

Regulation of angiotensin II-induced G protein signaling by phosphatidylinositol-3-OH kinase-like protein. *J Biol Chem* **277**: 34885-34895

**McLaughlin JN, Thulin CD, Hart SJ, Resing KA, Ahn NG, Willardson BM (2002):**

Regulatory interaction of phosphatidylinositol-3-OH kinase-like protein with the cytosolic chaperonin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7962-7967

**Lee RH, Brown BM, Lolley RN (1990a):**

Protein kinase A phosphorylates retinal phosphatidylinositol-3-OH kinase on serine 73 in situ. *J Biol Chem* **265**: 15860-15866

**Lee RH, Fowler A, McGinnis JF, Lolley RN, Craft CM (1990b):**

Amino acid and cDNA sequence of bovine phosphatidylinositol-3-OH kinase, a soluble phosphoprotein from photoreceptor cells. *J Biol Chem* **265**: 15867-15873

**Lee RH, Lieberman BS, Lolley RN (1987):**

A novel complex from bovine visual cells of a 33000-Dalton phosphoprotein with  $\beta$ - and  $\gamma$ -transducin: Purification and subunit structure. *Biochemistry* **26**: 3983-3990

**Lee RH, Ting TD, Lieberman BS, Tobias DE, Lolley RN, Ho YK (1992):**

Regulation of retinal cGMP cascade by phosphatidylinositol-3-OH kinase in bovine rod photoreceptor cells. Interaction of phosphatidylinositol-3-OH kinase and transducin. *J Biol Chem* **267**: 25104-25112

**Löffler G (1999):** *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 3. Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg

**Logothetis DE, Kurachie Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987):**

The subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic  $K^+$  Channel in heart. *Nature* **325**: 321-326

**Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990):** beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248: 1547-50

**Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Raure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992):** Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem*: 267: 8558-64

**Lolley RN, Craft CM, Lee RH (1992):**

Photoreceptors of the retina and pinealocytes of the pineal gland share common components of signal transduction. *Neurochem Res* 17: 81-89

**Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M (1999):**

Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem.* 9: 179-186

**Lüllmann H, Mohr K (1999):**

*Pharmakologie und Toxikologie*, 14. Auflage Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York

**Lukov GL, Myung CS, McIntire WE, Shao J, Zimmerman SS, Garrison JC, Willardson BM (2004):**

Role of the isoprenyl pocket of the G protein betagamma subunit complex in the binding of phosducin and phosducin-like protein. *Biochemistry* 43: 5651-5660

**Lukov GL, Ting H, McLaughlin JN, Hamm HE, Willardson BM (2005):**

Phosducin-like protein acts as a molecular chaperone for G protein  $\beta\gamma$  dimer assembly. *EMBO J* 24: 1965-1975

**Martin-Benito J, Bertrand S, Hu T, Ludtke PJ, McLaughlin JN, Willardson BM, Carrascosa JL, Valpuesta JM (2004):**

Structure of the complex between the cytosolic chaperonin CCT and phosducin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 17410-17415

**Martin-Benito J, Boskovic J, Gomez-Puertas P, Carrascosa JL, Simons CT, Lewis SA, Bartolini F, Cowan NJ, Valpuesta JM (2002):**

Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *EMBO J.* **21**: 6377-6386

**Meggio F, Boldyreff B, Marin O, Pinna LA, Issinger OG (1992):**

Role of the beta subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme. *Eur J Biochem* **204**: 293-297

**Miles MF, Barhite S, Sganga M, Elliott M (1993):**

Phosducin-like protein: an ethanol-responsive potential modulator of guanine nucleotide-binding protein function. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10831-10835

**Montanelli L, Delbaere A, Di Carlo C, Nappi C, Smits G, Vassart G, Costagliola S (2004):**

A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(3): 1255-8

**Müller S, Straub A, Schroder S, Bauer PH, Lohse MJ (1996):**

Interactions of phosducin with defined G protein  $\beta\gamma$ -subunits. *J Biol Chem* **271**: 11781-11786

**Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants (2004):**

The state of GPCR research in 2004. *Nature reviews drug discovery* **3**: 575, 577-626

**Neer EJ (1995):**

Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**: 249-257

**Niefind K, Guerra B, Pinna LA, Issinger OG, Schomburg D (1998):**

Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *EMBO J* **17**: 2451-2462

**Niefind K, Guerra B, Ermakowa I, Issinger OG (2001):**

Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J* **20**: 5320-5331

**Obin M, Lee BY, Meinke G, Bohm A, Lee RH, Gaudet R, Hopp JA, Arshavsky VY, Willardson BM, Taylor A (2002):**

Ubiquitylation of the transducin  $\beta\gamma$  subunit complex. Regulation by phosphatase. *J Biol Chem* **277**: 44566-44575

**Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000):**

Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**:739-45

**Pinna LA, Meggio F (1997):**

Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res* **3**:77-97

**Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ (1995):**

Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G $\beta\gamma$  subunits and lipid. *J Biol Chem* **270**: 11707-11710

**Pumiglia KM, LeVine H, Haske T, Habib T, Jove R, Decker SJ (1995):**

A direct interaction between G-protein  $\beta\gamma$  subunits and the Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* **270**: 14251-14254

**Quitterer U, AbdAlla S, Jarnagin K, Müller-Esterl W (1996):**

Na<sup>+</sup> ions binding to the bradykinin B2 receptor suppress agonist-independent receptor activation. *Biochemistry* **35**: 13368-13377

**Quitterer U, Lohse MJ (1999):**

Crosstalk between G $\alpha$ (i)- and G $\alpha$ (q)-coupled receptors is mediated by G $\beta\gamma$  exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10626-10631

**Reig JA, Yu L, Klein DC (1990):**

Pineal transduction. Adrenergic  $\rightarrow$  cyclic AMP-dependent phosphorylation of cytoplasmic 33-kDa protein (MEKA) which binds  $\beta\gamma$ -complex of transducin. *J Biol Chem* **265**: 5816-5824

**Ruiz-Gomez A, Humrich J, Murga C, Quitterer U, Lohse MJ, Mayor F Jr. (2000):**

Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* **275**: 29724-29730

**Santoro B, Tibbs GR (1999):**

The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann NY Acad Sci.* **868**: 741-764

**Sarno S, Ghisellini P, Pinna LA (2002a):**

Unique activation mechanism of protein kinase CK2. The N-terminal segment is essential for constitutive activity of the catalytic subunit but not of the holoenzyme. *J Biol Chem* **277**: 22509-22514

**Sarno S, Moro S, Meggio F, Zagotto G, Dal Ben D, Ghisellini P, Battistutta R, Zanotti G, Pinna LA (2002b):**

Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol Ther* **93**: 159-168

**Sarno S, Marin O, Boschetti M, Pagano MA, Meggio F, Pinna LA (2000):**

Cooperative modulation of protein kinase CK2 by separate domains of its regulatory  $\beta$ -subunit. *Biochemistry* **39**: 12324-12329

**Sarrouilhe D, Filhol O, Leroy D, Bonello G, Baudry M, Chambaz EM, Cochet C (1998):**

The tight association of protein kinase CK2 with plasma membranes is mediated by a specific domain of its regulatory  $\beta$ -subunit. *Biochim Biophys Acta* **1403**: 199-210

**Schröder S., Lohse MJ (1996):**

Inhibition of G-protein  $\beta\gamma$ -subunit functions by phosducin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2100-2104

**Schröder S, Blüml K, Dees C, Lohse MJ (1997):**

Identification of a C-terminal binding site for G-protein  $\beta\gamma$ -subunits in phosducin-like protein. *FEBS Lett* **401**: 243-246

**Schröder S, Lohse MJ (2000):**

Quantification of the tissue levels and function of the G-protein regulator phosducin-like protein (PhIP). *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **362**: 435-439

**Siderovski DP, Hessel A, Chung S, Mak TW, Tyers M (1996):**

A new family of regulators of G-protein-coupled receptors? *Curr Biol* **6**: 211-2

**Slupsky JR, Quitterer U, Weber CK, Gierschik P, Lohse MJ, Rapp UR (1999):**

Binding of G $\beta\gamma$  subunits to cRaf1 downregulates G-protein-coupled receptor signalling. *Curr Biol* **9**: 971-974

**Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990):**

Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*: 185: 60-89

**Tae HJ, Grossmann M, Inhae J (1998):**

G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **273**:17299-17302 Review

**Thibault C, Feng Wang J, Charnas R, Mirel D, Barhite S, Miles MF (1999):**

Cloning and characterization of the rat and human phosducin-like protein genes: structure, expression and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta* **1444**: 346-354

**Thibault C, Sganga MW, Miles MF (1997):**

Interaction of phosducin-like protein with G protein  $\beta\gamma$  subunits. *J Biol Chem* **272**: 12253-12256

**Thulin CD, Savage JR, McLaughlin JN, Truscott SM, Old WM, Ahn NG, Resing KA, Hamm HE, Bitensky MW, Willardson BM (2001):**

Modulation of the G protein regulator phosducin by  $\text{Ca}^n$ /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *J Biol Chem* **276**: 23805-23815

**Touhara K, Inglese J, Pitcher JA, Shaw G, Lefkowitz RJ (1994):**

Binding of G protein  $\beta\gamma$ -subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* **269**: 10217-10220

**Vitale N, Gensse M, Chasserot-Golaz S, Aunis D, Bader MF (1996):**

Trimeric G proteins control regulated exocytosis in bovine chromaffin cells: sequential involvement of  $G_o$  associated with secretory granules and  $G_{i3}$  bound to the plasma membrane. *Eur J Neurosci* **8**, 1275-1285

**Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bailly Y, Morinaga N, Frohman MA, Bader MF (2002):**

Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF) 6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *J Cell Biol* **159**: 79-89

**De Vries and Farquhar MG (1999):**

RGS proteins: more than just GAPs for heterotrimeric G proteins. *Trends in Cell Biology* **9**: 138-43

**Willardson BM, Wilkins JF, Yoshida T, Bitensky MW (1996):**

Regulation of phosducin phosphorylation in retinal rods by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 1475-1479

**Xu, J., Wu, D., Slepak, V.Z. and Simon, M.I. (1995):**

The N terminus of phosducin is involved in binding of  $\beta\gamma$  subunits of G protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 2086-2090

**Yoshida T, Willardson BM, Wilkins JF, Jensen GJ, Thornton BD, Bitensky MW (1994):**

The phosphorylation state of phosducin determines its ability to block transducin subunit interactions and inhibit transducin binding to activated rhodopsin. *J Biol Chem* **269**: 24050-24057

**Zhu X, Craft CM (1998):**

Interaction of phosducin and phosducin isoforms with a 26S proteasomal subunit, SUG1. *Molecular Vision* **4**: 13

## VII. Abbildungsverzeichnis

**Abb.1:** Prinzip eines G-Protein-gekoppelten Signalweges

**Abb.2:** Modell eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR)

**Abb.3:** Der GTPase-Zyklus heterotrimerer G-Proteine

**Abb.4:** Wirkung von  $G\beta\gamma$  auf die Phospholipase C  $\beta_2$  (PLC  $\beta_2$ )

**Abb.5:** Topologiemodell von Phosducin, PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> und Hefe- Phosducin Homolog, entsprechend der Kristallstruktur des Phosducin- $G\beta\gamma$ -Komplexes (Gaudet 1996)

**Abb.6:** Aufbau des pcDNA3-Vektors

**Abb.7:** Klonierung von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> aus pET3C

**Abb.8:** Klonierung von PhLP<sub>L</sub>/EYFP und PhLP<sub>S</sub>/EYFP-Produkten

**Abb.9:** Inhibierung der  $G\beta\gamma$ -stimulierten Inositolphosphatbildung in HEK 293-Zellen

**Abb.10:** Konzentrationsabhängige Effekte von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> auf die Inositolphosphatbildung

**Abb.11:** Klonierung von PhLP<sub>L</sub>-Trunkierungen

**Abb.12:** Definierung einer regulatorischen Sequenz zwischen Aminosäure 5 und 28 durch schrittweise Trunkierung des N-Terminus von PhLP<sub>L</sub>

**Abb.13:** Klonierung von Ser/ Ala-Mutanten von PhLP<sub>L</sub>

**Abb.14:** Inhibierung der G $\beta\gamma$ -stimulierten Inositolphosphatbildung in HEK 293-Zellen durch mutierte Formen von PhLP<sub>L</sub> mit Alaninmutationen von Ser 18, Thr 19 und Ser 20 (PhLP<sub>L</sub> A18-20) bzw. von Ser 25 (PhLP<sub>L</sub> A25)

**Abb.15:** Phosphorylierung von rekombinatem PhLP<sub>L</sub> durch rekombinante Caseinkinase 2

**Abb.16:** Phosphorylierung von rekombinatem PhLP<sub>L</sub> durch rekombinante Caseinkinase 2 im Zeitverlauf

**Abb.17:** Nachweis von mRNA der Caseinkinase 2 in HEK 293-Zellen durch RT-PCR-PCR-Produkte für CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$

**Abb.18:** Nachweis der Bindung von G $\beta$  und PhLP durch Immunpräzipitation

**Abb.19:** Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit

**Abb.20:** Mögliches Prinzip der G $\beta\gamma$ -Inhibition durch PhLP

**Abb.21:** Lokalisation von PhLP<sub>L</sub> / PhLP<sub>S</sub> in Abhängigkeit von der Überexpression der G $\beta\gamma$ -Untereinheit

**Abb.22:** Visualisierung der räumlichen Verteilung von PhLP<sub>L</sub> / PhLP<sub>S</sub> in HEK 293-Zellen

## VIII. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	(1) Ampere; (2) Adenin
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ADP/ATP	Adenosindiphosphat/- triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Amp	Ampicillin
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
β-ARK	β-adrenerge Rezeptorkinase
bp	<i>basepair(s)</i> , Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cytosin
Ca	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCT	Chaperonin containing TCP 1
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Ci	Curie
CK2	Caseinkinase 2
Cl	Chlor
CMV	Cytomegalovirus
COS-7	mit SV40 transfizierte Affennierenzelllinie (CV1 Origin SV40)
C-Terminus	Carboxyterminus eines Peptids/ Proteins

CTPP	<u>C</u> -terminal <u>PhLP</u> -peptide
d	Durchmesser
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY 13
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EYFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
fwd	<i>forward</i> , vorwärts
g	(1) Gramm; (2) relative Erdbeschleunigung
G	Guanin
G $\alpha$ / G $\beta$ / G $\gamma$	G-Protein $\alpha$ -/ $\beta$ -/ $\gamma$ - Untereinheit
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GIRK	<i>G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel</i> G-Protein-gesteuerter einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Proteine	Guaninnukleotid-bindende Proteine
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
G <sub>s</sub> , G <sub>i</sub> , G <sub>o</sub> , G <sub>s</sub>	stimulatorisches, inhibitorisches, „other“ G-Protein, Transducin
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK 293-Zellen	humane embryonale Nierenzellen

Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His <sub>6</sub> -Tag	Histidinhexamer am C-Terminus rekombinanter Proteine
IC <sub>50</sub>	Konzentration des Inhibitors bei halbmaximaler Hemmung
IP <sub>3</sub>	Inositol-(1,4,5,)-triphosphat
K	kilo
K	Kalium
kb	<i>kilo base(s)</i> , Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KLH	keyhole limpet hemocyanine
Li	Litiumchlorid
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	molar (mol/l)
MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinase
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
μg	mikrogramm
μl	mikroliter
MOPS	P-(Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
min	Minute
mM	milli Mol
mU	milli Unit
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
Na	Natrium
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
<i>Not I</i>	<i>Nocardia oitidiscaviarum</i>
N-Terminus	Aminoterminus eines Peptids/ Proteins
NTP	Nucleosidtriphosphat
PBS	phosphate buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDE	cGMP-Phosphodiesterase

PDGF	platelet derived growth factor
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	potentiam hydrogenii
Phd	Phosducin
PhLOP	Phosducin like orphan proteins
PhLP <sub>L</sub>	<i>phosducin-like protein, long</i> Phosducin-ähnliches Protein, lange Isoform
PhLP <sub>S</sub>	<i>phosducin-like protein, short</i> Phosducin-ähnliches Protein, kurze Isoform
PI <sub>3</sub> -Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4,5)biphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLCβ	Phospholipase Cβ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Meerrettich-Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Ras	Raf-activated factor
rev	<i>reverse</i> , rückwärts
RGS	regulators of G-protein signalling
rpm	rounds per minutes
RGS	Regulatoren der G-Protein-Signalweiterleitung
RNA	<i>ribo nucleid acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	(1) Reverse Transkription; (2) Raumtemperatur
S; Ser	Serin
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumaurylsulfat
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat- <u>P</u> olyacryl <u>a</u> mid- <u>G</u> eleelektrophorese
SUG	ATPase, Teil des 26S-Proteasoms
T	(1) Thymin (Nukleotid); (2) Threonin (Aminosäure)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat EDTA
<i>Taq</i>	<i>Termophilus aquaticus</i>

TCP	tailless complex polypeptide
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur von Oligonukleotiden
TNF $\alpha$	tumor nekrosis factor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
U	<i>units</i> , Einheiten
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

## IX. Anhang

In diesem Kapitel sind Versuche aufgeführt, die im Laufe der Arbeit methodisch erarbeitet und durchgeführt wurden, jedoch zur Erklärung der wesentlichen Beobachtungen, wie sich im Verlauf herausstellte, nicht beitragen. Daher sind sie gesondert aufgeführt, um die Schlüssigkeit des Ergebnisteils dieser Arbeit nicht zu stören.

### 1. Lokalisation von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub>

Im Gegensatz zu *in vitro*-Versuchen, auf denen die Ideen dieser Arbeit basieren, finden die G $\beta$  $\gamma$ -Interaktionen, wie wir sie hier in lebenden Zellen untersuchen, in einer Umgebung statt, die wir nicht in der Weise kontrollieren können wie einen *in vitro*-Versuch, wo die Komponenten des Versuchs von außen gegeben sind. In einem Zellsystem sind viele andere Komponenten und Störeinflüsse zu berücksichtigen, die Einfluß nehmen können auf die Versuchsergebnisse, so daß sie kritisch hinterfragt werden müssen. In diesem Abschnitt soll die Lokalisation der Proteine PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> innerhalb der Zelle untersucht werden, denn auch räumliche Verhältnisse können Interaktionen beeinflussen. Beispielsweise könnte die höhere Effektivität von PhLP<sub>S</sub> als G $\beta$  $\gamma$ -Regulator dadurch zustande kommen, daß es durch eine Translokation an die Zellmembran der membranständigen G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheit näher steht und sie daher besser hemmen kann.

Für die G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheit ist eine Membranbindung durch eine Isoprenylgruppe der G $\gamma$ -Untereinheit bekannt (Lukov et al. 2004), während PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> als cytosolische Proteine angesehen werden. So gibt es verschiedene denkbare Möglichkeiten, wie die Interaktion zwischen den beiden Komponenten zustande kommen könnte. Zum Beispiel wäre es denkbar, daß PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> vom Cytosol zur Membran transloziert, wo dann die Interaktion stattfinden würde. Vielleicht wird PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> aber auch dazu angeregt, bei einer erhöhten Aktivität der G-Proteine, also bei einer großen Menge von freiem G $\beta$  $\gamma$ , von vornherein eine Membranlokalisierung einzunehmen.

Eine Änderung der intrazellulären Lokalisation wurde beispielsweise im Falle von PhLP<sub>S</sub> beobachtet im Sinne einer Redistribution ins Cytoplasma nach Zellstimulierung. (Gensse et al. 2000). Daher wäre es denkbar, daß die höhere Effektivität in der

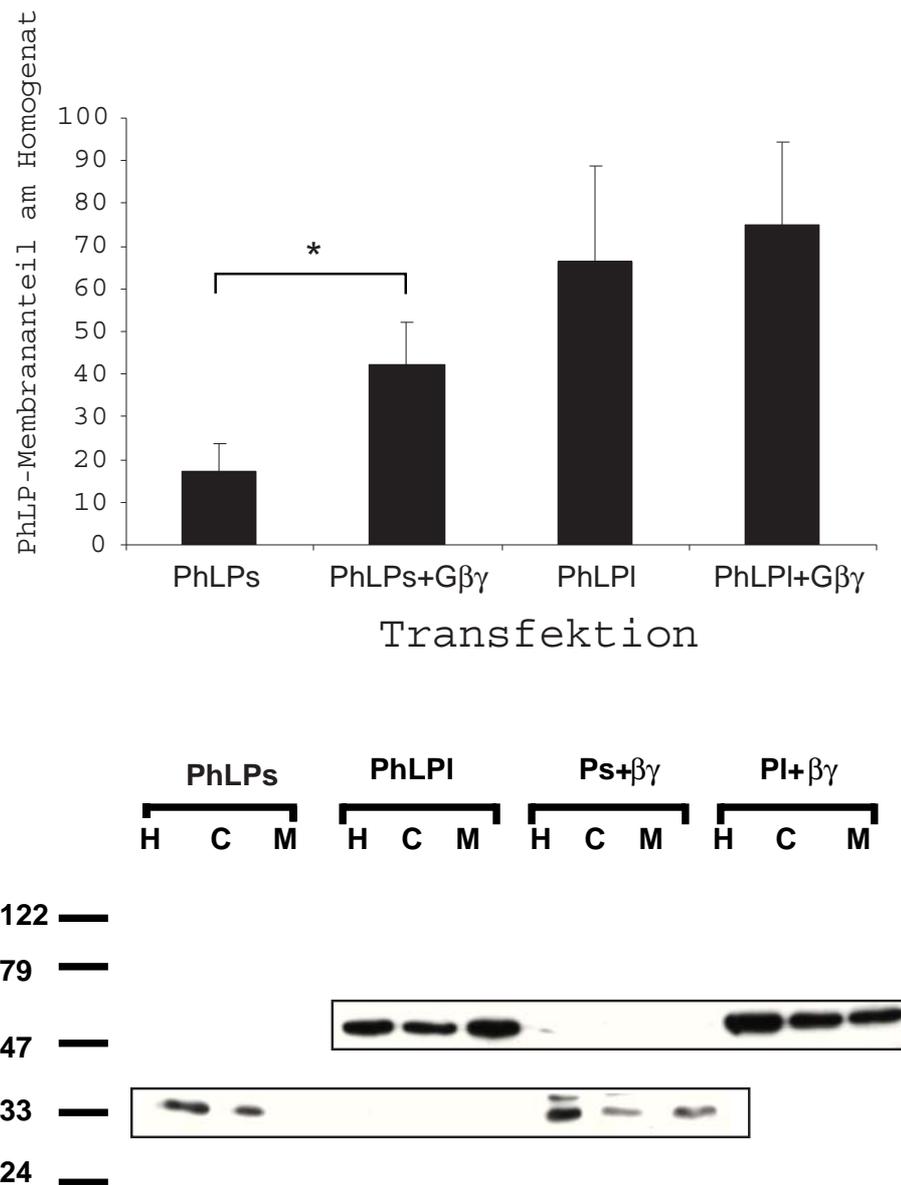
G $\beta\gamma$ -Inhibition von PhLP<sub>S</sub> durch einen Ortswechsel an die Membran zu erklären ist, welcher bei PhLP<sub>L</sub> nicht vorhanden wäre.

### **1.1. Auftrennung in Cytosol- und Membranfraktion PhLP-transfizierter Zellen durch Zellfraktionierung**

Um das räumliche Verhalten von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> genauer zu ergründen, wurden HEK 293-Zellen mit 2  $\mu\text{g}$  cDNA PhLP<sub>L</sub> bzw. PhLP<sub>S</sub> pro 10 cm-Petrischale transient transfiziert, und es wurde entweder 8  $\mu\text{g}$  leerer Vektor pcDNA3 oder 8  $\mu\text{g}$  cDNA für jeweils G $\beta_1$  und G $\gamma_2$  dazu transfiziert, um eine Überexpression von G $\beta\gamma$  zu erzielen. Nach Expression wurden die Zellen mittels Fraktionierung (s.II.2.3.4.) in eine Membran- und eine Cytosolfraction aufgetrennt, sodaß mittels Westernblotting der einzelnen Fraktionen die Lokalisation von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> festgestellt werden konnte in Abhängigkeit von G $\beta\gamma$ -Überexpression.

Es zeigte sich, daß die Überexpression von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten nicht, wie als Möglichkeit oben aufgezeigt, eine Translokation von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> an die Membran bewirkt. Es ließen sich jedoch Unterschiede zwischen den beiden Spleißvarianten feststellen. Während PhLP<sub>L</sub> zu etwa gleichen Teilen unabhängig von einer G $\beta\gamma$ -Überexpression an der Membran wie im Cytosol lokalisiert zu sein scheint, liegt der Großteil von PhLP<sub>S</sub> im Cytosol vor und weniger an der Membran, wobei der Unterschied signifikant war. Die statistische Analyse wurde mittels T-Test durchgeführt.

Somit trägt die Erkenntnis der verschiedenen Lokalisationen nicht zur Erklärung der höheren Effektivität von PhLP<sub>S</sub> als G $\beta\gamma$ -Inhibitor bei, wenn man von einer Inhibierung durch direkte Bindung ausgeht, da sich das schwächere PhLP<sub>L</sub> in Nähe der zu inhibierenden Proteine befindet.



**Abb.21: Lokalisation von PhLP<sub>L</sub> / PhLP<sub>S</sub> in Abhängigkeit von der Überexpression der Gβγ -Untereinheit**

A. HEK 293-Zellen wurden pro 10 cm-Petrischale mit 2 µg cDNA PhLP<sub>L</sub> oder PhLP<sub>S</sub> transient transfiziert. Zusätzlich wurde entweder 8 µg des leeren Vektors pcDNA3 oder 8 µg cDNA Gβ<sub>1</sub>-Untereinheit plus 8 µg cDNA Gγ<sub>2</sub>-Untereinheit dazutransfiziert. Der Membrananteil von PhLP<sub>L</sub> liegt gemessen am Homogenat bei 70%, unter Gβγ -Überexpression bei 70%. Der Membrananteil von PhLP<sub>S</sub> liegt bei 22%, unter Gβγ -Überexpression bei 40%. \*p<0.05

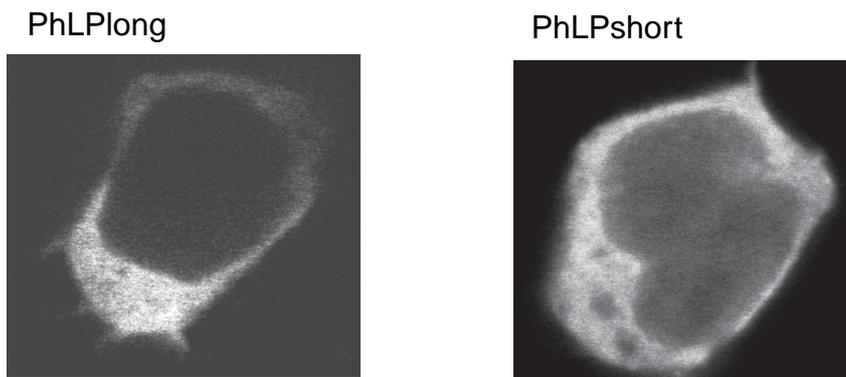
B. Western Blots zeigen die Auftrennung des Homogenats (H) der wie in A. beschrieben transfizierten HEK 293-Zellen in Cytosol (C) und Membran (M). In Abhängigkeit von der Überexpression von Gβγ wurde die Lokalisation von PhLP<sub>L</sub> bzw. PhLP<sub>S</sub> unter Nutzung des polyklonalen Anti-CTPP-Antikörpers (s.II.1.3.5.) dargestellt.

## **1.2. Visualisierung von PhLP in HEK 293-Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie und konfokale Mikroskopie nach Fusion mit EYFP**

Als weitere Methode zur Darstellung der Lokalisation von Proteinen diente die Verknüpfung dieser Proteine mit einem fluoreszierenden Protein und die direkte Darstellung im konfokalen Mikroskop. Dort kann durch Fluoreszenz die Lokalisation des fluoreszierenden Proteins und damit des zu untersuchenden Proteins festgestellt werden, da die beiden Proteine durch ihre Bindung zusammenhängen und sich somit an der gleichen Stelle befinden. Zu diesem Zweck wurde ein Fusionsgen aus PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> und EYFP kloniert, was zur Expression eines Fusionsproteins aus EYFP und PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> führte (vgl. III.1.1.3.).

Zur Durchführung der Klonierung wurden zunächst einzelne PCRs von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> und EYFP nach in II.2.2.1. beschriebener Methode durchgeführt. In der folgenden PCR dienten als Templates die Produkte der ersten PCR, also die cDNA von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> und EYFP. Der erste Primer ist der 3'-terminalen Sequenz von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> komplementär, der zweite Primer der 5'-terminalen Sequenz von EYFP, sodaß die beiden Sequenzen im PCR-Produkt hintereinander lagen. Dieses Produkt wurde wie in II.2.2.2. bis 2.2.4. dargestellt in den pcDNA3-Vektor kloniert.

HEK 293-Zellen wurden wie in II.2.2.8. beschrieben transient transfiziert mit 100 ng cDNA für PhLP<sub>L</sub>-EYFP oder PhLP<sub>S</sub>-EYFP pro Well einer 6-Well-Platte. Es zeigte sich eine vorwiegend zytosolische Verteilung der beiden Proteine. Im weiteren konnte anhand dieser Methode eine Transfektionseffizienz von 80% sowohl für PhLP<sub>L</sub> als auch für PhLP<sub>S</sub> gezeigt werden.



**Abb.22: Visualisierung der räumlichen Verteilung von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> in HEK 293-Zellen**

HEK 293-Zellen wurden mit 100 ng pro Well einer 6-Well Platte cDNA des PhLP<sub>L</sub>- oder PhLP<sub>S</sub>-EYFP Fusionsproteins transient transfiziert. Durch schichtweise Betrachtung der Zellen mit dem konfokalen Mikroskop wurde mit Hilfe der Fluoreszenz von EYFP die Lokalisation von PhLP<sub>L</sub>/ PhLP<sub>S</sub> sichtbar.

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. M. Lohse durchgeführt.

- An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Lohse für die Ermöglichung und Förderung dieser Arbeit bedanken sowie den großzügigen Freiraum, Ideen zu verwirklichen und in seiner Arbeitsgruppe mitarbeiten zu dürfen.
- Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jan Humrich, der meine Arbeit betreut und die wesentlichen Ideen gegeben hat. Dank seiner habe ich gelernt, was wissenschaftliches Arbeiten bedeutet und nur klare Präzision und logisches Denken zum Erfolg führen, was er mir in zahlreichen Diskussionen immer wieder vermittelt hat. Auch für seine große Geduld und Mühe möchte ich danken, mir die nötigen wissenschaftlichen Methoden zu vermitteln, die eine Grundvoraussetzung darstellen. Darüberhinaus danke ich ihm, daß er mir geholfen hat, über die wesentlichen Aspekte der Arbeit hinaus eigene Ideen zu entwickeln und mir die Möglichkeit gab, diese in seiner Arbeitsgruppe zu verwirklichen. Natürlich danke ich ihm auch für den angenehmen freundschaftlichen Umgang.
- Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Laboratmosphäre und das bereitwillige Beantworten meiner Fragen und Aushelfen, wenn etwas fehlte. Zudem kam das Privatleben nie zu kurz, was sich in zahlreichen gemeinsamen Unternehmungen in der Freizeit widerspiegelt. Es haben sich Freundschaften entwickelt, die immer noch bestehen und auf die man sich in schwierigen Situationen immer verlassen konnte und kann.
- Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern für die uneingeschränkte Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Ebenso bedanke ich mich bei meiner „Zweitfamilie“ und meiner „Schwester“ für ihre unglaubliche Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

## LEBENS LAUF

Christina Maria Bermel

### PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 05.Juni 1979  
Geburtsort: Bonn  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### SCHULISCHE AUSBILDUNG

1985 – 1989 Gemeinschaftsgrundschule Süd, Jülich  
1990 – 1998 Gymnasium Haus Overbach, Jülich-Barmen  
06/1998 Allgemeine Hochschulreife

### UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

10/1998 – 06/2005 Studium der Humanmedizin, Bayerische  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
08/2000 Ärztliche Vorprüfung  
03/2002 1. Teil der Ärztlichen Prüfung  
03/2004 2. Teil der Ärztlichen Prüfung  
05/2005 3. Teil der Ärztlichen Prüfung

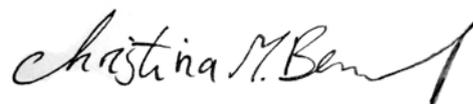
### DISSERTATION

seit Januar 2001 am Institut für Pharmakologie der Julius-  
Maximilians-Universität Würzburg

Thema: Regulation von G $\beta$ -Untereinheiten durch Phosducin-  
ähnliche Proteine (PhLP)

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

Göttingen, im Dezember 2005,



Christina Maria Bermel