

# **G-Protein $\beta\gamma$ -Regulation durch Phosducin-like Proteine**

Dissertation zur Erlangung der  
naturwissenschaftlichen Doktorwürde der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt

von

Jan Humrich

aus

Bayreuth

Würzburg 2009

Eingereicht am: ..... 30. Januar 2009

Mitglieder der Promotionskommission :

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

Gutachter : Prof. Dr. Martin J. Lohse

Gutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums: ..... 11. November 2009

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren .....	1
1.2. G-Proteine .....	3
1.3. Die physiologische Bedeutung der G-Proteine .....	6
1.4. G-Protein Regulatoren .....	9
1.5. Die Rolle der Phosducin-Familie bei der Regulation der G-Proteine .....	11
Phosducin-like Proteine .....	16
1.6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	19
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1. <b>Material</b> .....	<b>21</b>
Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	21
Biologisches Material .....	23
Medien und Puffer .....	27
2.2. <b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>31</b>
Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA .....	31
Einführung von Punktmutationen und Deletionen mittels PCR .....	32
Agarose-Gelelektrophorese von DNA .....	32
Klonierung von PCR-Produkten in Expressionsvektoren .....	33
Transformation kompetenter <i>E. coli</i> und Plasmidpräparation .....	34
Isolation von RNA und Reverse Transkription mit PCR-Analyse .....	36
2.3. <b>Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>39</b>
Herstellung und Reinigung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	39
Herstellung von Lysaten aus Kulturzellen und Gewebe .....	40
SDS-Gelelektrophorese und Western-Blotting .....	41
Präzipitation und Kopräzipitation von Proteinen .....	44
Radioaktive Phosphorylierung rekombinanter Proteine .....	46
ADP-Ribosylierung von G-Protein $\alpha$ -Untereinheiten .....	47
2.4. <b>Zellkulturmethoden</b> .....	<b>49</b>
Ziehen und Vermehren von HEK 293-Zellen .....	49

Transfektion von Kulturzellen mittels der Kalziumphosphat-Methode.	49
Transfektion von Kulturzellen mittels der Effectene®-Methode .....	50
siRNA-Transfektion von HEK 293-Zellen .....	50
<b>2.5. Methoden zur Charakterisierung der Zellphysiologie .....</b>	<b>52</b>
Messung der Inositolphosphat-Generierung in HEK 293-Zellen .....	52
Phosphorylierung von Proteinen in HEK 293-Zellen .....	53
Messung G-Protein gesteuerter Kaliumströme in HEK 293-Zellen .....	54
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1. Molekulare Klonierung und initiale Charakterisierung der Splice-</b>	
<b>    Varianten von Phosducin-like Protein (PhLP) .....</b>	<b>56</b>
<b>3.2. PhLP<sub>L</sub> wird in Zellen durch Casein Kinase 2 phosphoryliert und reguliert</b>	
.....	<b>60</b>
Phosphorylierung von PhLP <sub>L</sub> und PhLP <sub>S</sub> in intakten HEK 293-Zellen	60
Casein Kinase 2 ist die verantwortliche Kinase der PhLP <sub>L</sub> -	
Phosphorylierung in HEK 293-Zellen .....	63
PhLP <sub>L</sub> und PhLP <sub>S</sub> sind keine Substrate der PKA .....	64
Identifizierung einer kleinen regulatorischen Region im N-Terminus von	
PhLP <sub>L</sub> .....	64
Effekte der gezielten Mutation von Serin 18, Threonin 19 und Serin 20	
.....	67
<b>3.3. Im nativen Mausgewebe findet sich PhLP<sub>S</sub>, phosphoryliertes und nicht-</b>	
<b>    phosphoryliertes PhLP<sub>L</sub> .....</b>	<b>71</b>
<b>3.4. Bestimmung der Bindungsaffinität von PhLP<sub>L</sub> zu Gβγ nach</b>	
<b>    Phosphorylierung durch CK2 .....</b>	<b>74</b>
Charakterisierung eines konservierten Gβγ-Bindungsmotivs in PhLP <sub>L</sub>	77
Der PhLP <sub>L</sub> -N-Terminus und PhLP <sub>L</sub> vermitteln ähnliche Effekte in Zellen	
.....	82
<b>3.5. PhLP<sub>S</sub> führt zu Missfaltung und Down-Regulation von G-Protein βγ-</b>	
<b>    Untereinheiten – ein neuer Mechanismus der G-Protein-Regulation .....</b>	<b>83</b>
Die strukturellen Determinanten des PhLP <sub>S</sub> -Effektes und seine Bindung	
an TCP-1α .....	88
PhLP <sub>S</sub> reguliert endogene Gβγ-Signalwege .....	93

<b>4. Diskussion .....</b>	<b>96</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>102</b>
<b>6. Zusammenfassung in Englisch .....</b>	<b>104</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>8. Danksagung</b>	
<b>9. Lebenslauf</b>	

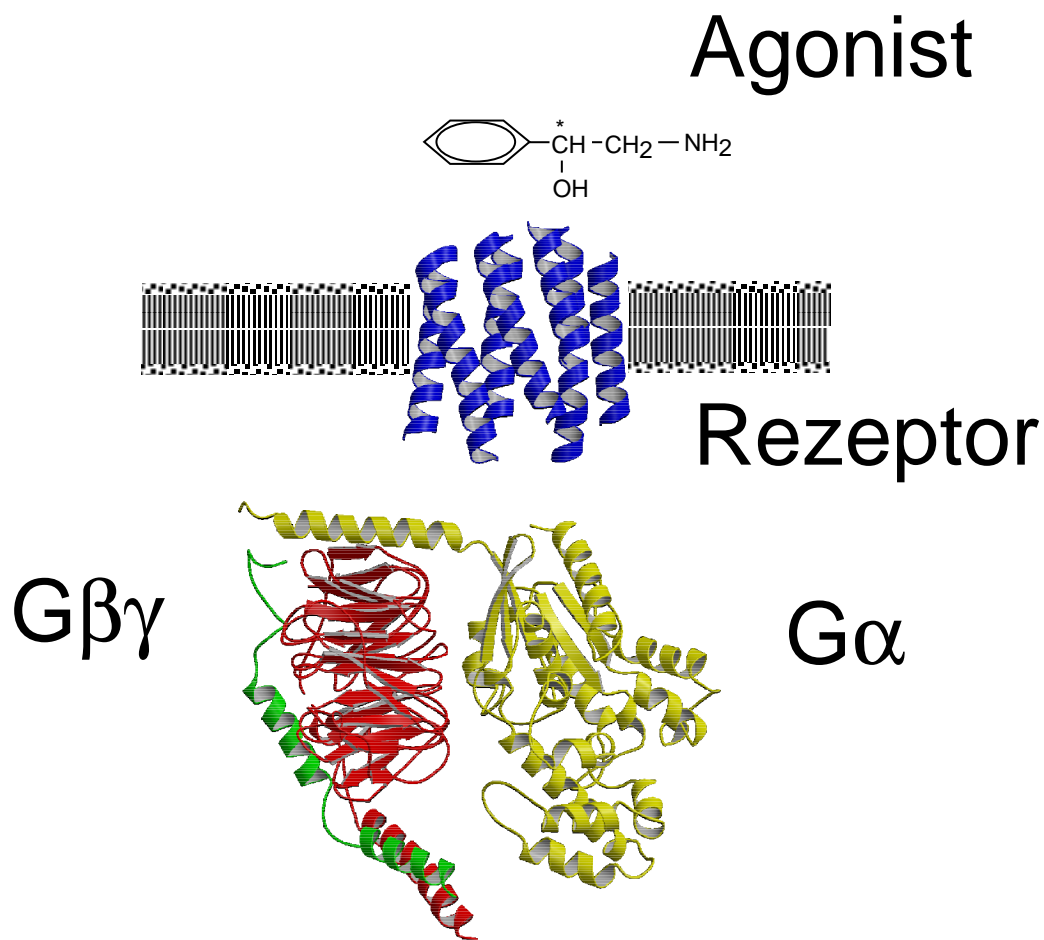
# 1. Einleitung

## 1.1. G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die Aufnahme und die Verarbeitung von extrazellulären Signalen ist für jeden Organismus essentiell. Er muss sich auf ständig wechselnde innere und äußere Bedingungen einstellen und sich anpassen. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (engl. G-protein coupled receptors oder **GPCR**) bilden die größte Gruppe unter den Rezeptoren der Zelloberfläche. Zahlreiche Hormone, Neurotransmitter oder sensorische Reize wie Licht vermitteln ihre biologische Effekte durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Dies hat dazu geführt, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bei der Suche nach neuen Zielstrukturen für Medikamente die größte Aufmerksamkeit auf sich ziehen. Schon vor Abschluss des Human-Genom Projektes konnten die meisten G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und viele ihrer Liganden identifiziert werden (Lee et al., 2003). Das liegt daran, dass die Sequenzen und die Struktur dieser Rezeptoren in vielen Fällen gleich oder ähnlich sind. Bei der prototypischen Rezeptorstruktur durchspannen sieben  $\alpha$ -helikale Domänen die Plasmamembran der Zelle (Abb. 1). Diese sind verbunden durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen (loops). Sie besitzen einen extrazellulären Aminoterminus und einen intrazellulären Carboxyterminus (Pierce et al., 2002). Diese Grundstruktur konnte vor kurzem anhand der Röntgenkristallstruktur des Rhodopsins bestätigt werden (Palczewski et al., 2000).

Mit Hilfe von Sequenzvergleichen können die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gegenwärtig in drei Unterfamilien unterteilt werden (Bockaert und Pin, 1999, Vassilatis et al., 2003). Zur größten Unterfamilie (Gruppe I-Rezeptoren) gehören unter anderem die Opsine, die Geruchsstoff-Rezeptoren und die Rezeptoren für Monoamine, Purine, Opiate, Chemokine und die Glykoprotein hormone TSH, LH und FSH. Zu den Gruppe II-Rezeptoren, die kaum Sequenzhomologien mit der Gruppe I aufweisen, gehören zum Beispiel die Peptidhormon-Rezeptoren für Parathormon (PTH) und Calcitonin. Die Gruppe III-Rezeptoren schließlich umfassen die

metabotropen Glutamatrezeptoren und den Rezeptor für extrazelluläre Kalzium-Konzentrationen.



**Abb. 1: Der heptahelikale G-Protein-gekoppelte Rezeptor mit seinem heterotrimerem G-Protein.** Ein Agonist (hier Noradrenalin) bindet an seinen Rezeptor (hier ein Modell des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors nach der Kristallstruktur des Rhodopsins nach Palczewski 2000) und aktiviert das G-Protein bestehend aus einer  $\alpha$ -Untereinheit ( $G\alpha$ ) und einer  $\beta\gamma$ -Untereinheit ( $G\beta\gamma$ ).

Modelle zur Rezeptoraktivierung postulieren einen aktiven und einen inaktiven Zustand, der sich in unterschiedlichen Positionen der Transmembrandomänen und zytoplasmatischen Domänen widerspiegelt (Seifert und Wenzel-Seifert, 2002). Die Aktivierung durch einen Agonisten führt nach diesem Modell zur Stabilisierung des aktiven Zustandes, beziehungsweise zur Veränderung in der Position der Domänen. Dieses Phänomen kann seit kurzem mittels Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET)-Technologie direkt an verschiedenen Rezeptoren (Gruppe I und II) gemessen und bestätigt werden (Vilardaga et al., 2003).

Alle G-Protein-gekoppelte Rezeptoren fungieren als sogenannte Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (englisch: guanine nucleotide exchange factor oder GEF) (Hamm, 2001). Im aktivierten (das heißt Agonist-gebundenen) Zustand katalysieren sie den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) an der  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins (Abb. 1 und 2). Dies führt dann zur Aktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit und zur Dissoziation des  $\beta\gamma$ -Dimers. Beide G-Protein-Untereinheiten sind in der Lage eine ganze Reihe an Effektoren zu regulieren, darunter Enzyme für den Second-Messenger Metabolismus wie Adenylatzyklase oder Phospholipase C- $\beta$ , ebenso wie verschiedene Ionen-Kanäle (Tab. 1 und 2).

## 1.2. G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, die durch unterschiedliche Gene kodiert werden (Neer, 1995, Dessauer et al., 1996, Hamm, 1998). Die  $\alpha$ -Untereinheit bindet Guaninnukleotide mit hoher Affinität und kann durch eine intrinsische GTPase-Funktion GTP hydrolysieren (Abb. 2). G-Proteine kann man nach funktionellen und strukturellen Gesichtspunkten der  $\alpha$ -Untereinheiten in vier Familien unterteilen:  $G_s$  (stimuliert Adenylatzyklasen),  $G_{i/o}$  (inhibiert Adenylatzyklasen und Kalziumkanäle und stimuliert Kaliumkanäle),  $G_{q/11}$  (stimuliert die  $\beta$ -Isoformen von Phospholipase C) und  $G_{12/13}$  (aktiviert das kleine G-Protein Rho). In Säugetieren gibt es mindestens 16 verschiedenen Gene für  $\alpha$ -Untereinheiten, deren Expression im Gewebe stark variiert (siehe Tabelle).



Die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Kette sind fest, aber nicht kovalent miteinander verbunden und bilden eine funktionelle Einheit. Es gibt fünf Gene für  $G\beta$  und zwölf Gene für  $G\gamma$ . Tab. 2 gibt Auskunft über einige Eigenschaften der Untereinheiten.

Alle bisher bekannten  $G\alpha$ -Proteine werden posttranslational an ihrem N-Terminus durch Palmitoylierung und/oder Myristoylierung modifiziert. Diese Modifikation erhöht die Affinität zur  $\beta\gamma$ -Untereinheit und spielt für die Membranlokalisierung und in der Folge auch die Aktivierung membranständiger Effektoren eine entscheidende Rolle (Wedegaertner, 1998). Ebenso modifiziert werden die  $G\gamma$ -Untereinheiten. Diese werden an einem C-terminalen Cystein in ihrem „CAAX-Motiv“ isoprenyliert (Farnesyl- oder Geranylgeranylrest). Diese Modifikation ist nicht für die Bindung an die  $G\beta$ -Einheit notwendig, entscheidet aber über Funktionalität und Membranlokalisierung des G-Proteins (Gehrmann et al., 2002, Michaelson et al., 2002).

Die Aufklärung der Kristallstruktur heterotrimerer G-Proteine hat viel zum heutigen Verständnis dieser Proteine beigetragen (Wall et al., 1995, Lambright et al., 1996). Die  $\beta$ -Untereinheit besteht aus einem „Propeller“ mit sieben regelmäßigen Blättern, die aus sogenannten „WD40 repeats“ bestehen (dies bezeichnet Tryptophan-Aspartat-Wiederholungen, siehe auch Abb. 1). Diese sind hochkonserviert und bilden  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Der N-Terminus von  $G\beta$  bildet zusammen mit der N-terminalen  $\alpha$ -Helix von  $G\gamma$  ein sogenanntes „coiled coil“, ein Grund für den engen strukturellen und funktionellen Zusammenhang der beider Untereinheiten. Die katalytische Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit schließlich kommt über der zentralen Region der Propellerstruktur zu liegen.  $G\alpha$  und  $G\beta\gamma$  sind so orientiert, dass die Lipidmodifikationen beider Untereinheiten an der Plasmamembran interagieren können.

<b>Familie</b>	<b>Subtyp</b>	<b>Expression</b>	<b>Effektoren</b>
$G\alpha_s$	$G\alpha_s$	ubiquitär	stimuliert AC (alle Isoformen)
	$G\alpha_{olf}$	Riechepithel, Gehirn	stimuliert AC
$G\alpha_{i/o}$	$G\alpha_{i-1}$ $G\alpha_{i-2}$ $G\alpha_{i-3}$	ubiquitär	hemmt AC (Typ I, III, V, VI, VIII und IX), aktiviert GIRK1/4 durch $G\beta\gamma$
	$G\alpha_o$	neuronal, neuroendokrin	hemmt VDCC (N-, P/Q- und R-Typen), aktiviert GIRK1/4, beides durch $G\beta\gamma$
	$G\alpha_z$	neuronal, Thrombozyten	hemmt AC
	$G\alpha_{gust}$	Geschmackszellen	aktiviert PDE für cAMP
	$G\alpha_{t-r}$	Stäbchen (Retina) Geschmackszellen	aktiviert PDE für cGMP
	$G\alpha_{t-c}$	Zapfen (Retina)	aktiviert PDE für cGMP
$G\alpha_q$	$G\alpha_q$	ubiquitär	aktiviert PLC $\beta$ ( $\beta_4$ und $\beta_3 \geq \beta_1 \gg \beta_2$ )
	$G\alpha_{11}$	fast ubiquitär	aktiviert PLC $\beta$
	$G\alpha_{14}$	Niere, Lunge, Milz	aktiviert PLC $\beta$
	$G\alpha_{15}$	hämatopoetische Zellen	aktiviert PLC $\beta$
$G\alpha_{12}$	$G\alpha_{12}$	ubiquitär	aktiviert RhoGEF, Btk, Gap1 <sup>m</sup> , Cadherin
	$G\alpha_{13}$	ubiquitär	aktiviert RhoGEF, Cadherin

**Tab. 1:** Subtypen, Expression und Effektoren der G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten nach (Wettschureck et al., 2004).

Untereinheit	Subtyp	Expression	Effektoren für G $\beta\gamma$
G $\beta$	$\beta_1, \beta_3$	fast ubiquitär, Retina	hemmen AC I, aktivieren AC II, IV und VII  aktivieren PLC $\beta$ ( $\beta_3 > \beta_2 > \beta_1$ )
	$\beta_2, \beta_4$	ubiquitär	
	$\beta_5$	Gehirn	
G $\gamma$	$\gamma_1, \gamma_{14}$	Retina, Gehirn	aktivieren GIRK 1/4 Kanäle  aktivieren GRK 2 und 3, PLA <sub>2</sub> , PI-3-Kinase $\beta$ und $\gamma$  hemmen VDCC (N-, P/Q- und R-Typen)
	$\gamma_2, \gamma_5$ bis $\gamma_{12}$	fast ubiquitär	
	$\gamma_3,$	Gehirn	
	$\gamma_4$	Gehirn, Blut	
	$\gamma_{13}$	Geschmacksknospen	

**Tab. 2:** Subtypen, Expression und Effektoren der G-Protein  $\beta\gamma$ -Untereinheiten nach (Wettschureck et al., 2004)

### 1.3. Die physiologische Bedeutung der G-Proteine

Anhand zweier wichtiger Regulationsysteme der Säugetiere soll die physiologische Bedeutung der G-Proteine dargestellt werden.

#### Kardiovaskuläres System

Die parasympathische Regulation des Herzens wird über G<sub>i/o</sub> gekoppelte muskarinische Acetylcholinrezeptoren (vom Subtyp M<sub>2</sub>) vermittelt. Einer der wichtigsten M<sub>2</sub>-G<sub>i/o</sub> aktivierten Effektoren ist der G-Protein-gekoppelte einwärts-gleichrichtende Kaliumkanal (GIRK). Dieser tetramere Kanal besteht aus zwei mal zwei Untereinheiten, Kir3.1 (GIRK1) und Kir3.4 (GIRK4), und wird durch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten stimuliert (Ito et al., 1994, Chan et al., 1996, Bünemann und Hosey, 1998). Mäuse, denen eine der beiden Kanal-Untereinheiten fehlt (Knock-Out-Mäuse), zeigen einen stark reduzierten Kaliumstrom in den Vorhöfen ihrer Herzen. Die physiologische Konsequenz ist eine Reduktion der Vagusantwort bei diesen Mäusen,

(nämlich Herzfrequenz-Modulation und -Variabilität nach Wickman et al., 1998, Bettahi et al., 2002). Mäuse, die eine defekte  $G\gamma_2$ -Untereinheit kardial überexprimieren, zeigen ebenfalls eine stark eingeschränkte Vagusempfindlichkeit (Gehrmann et al., 2002). In diesem Modell führt die defekte, das heißt nicht isoprenylierbare  $G\gamma_2$ -Untereinheit zu einem sogenannten dominant negativen Effekt, mit der Folge, dass über 50% der funktionellen  $G\beta\gamma$ -Proteine verloren gehen.

Zur muskarinischen Regulation des Herzens gehört auch die Hemmung von L-Typ Kalziumkanälen (spannungsabhängige Kanäle, VDCC). In Mäusen, denen die Gene für  $G\alpha_o$  oder  $G\alpha_{i-2}$  fehlen, kann dieser Kanal nicht mehr über Acetylcholin reguliert werden (Valenzuela et al., 1997, Nagata et al., 2000, Chen et al., 2001).

Die sympathische Aktivierung des Herzens erfolgt durch  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren (vor allem vom  $\beta_1$ -Subtyp). Die Stimulierung dieser Rezeptoren durch Katecholamine bewirkt die Aktivierung von  $G_s$  und in der Folge die Aktivierung von Adenylatzyklasen (AC). Diese produzieren dann den second messenger zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Durch cAMP nimmt die Kontraktilität und die Herzfrequenz zu, eine wichtige Anpassung an schnell wechselnde Bedingungen der Umwelt (Flucht, Jagd). Auf der anderen Seite kann die dauerhafte Stimulierung dieses Systems zur chronischen und schweren Schädigung des Herzens führen, mit der Folge, dass das Herz in seiner Pumpleistung versagt (Herzinsuffizienz) (Engelhardt et al., 1999, Lohse et al., 2003). Diese Effekte, wenn auch noch nicht vollständig verstanden, sind vor allem durch Proteinkinase A (PKA, cAMP-abhängige Kinase) und ihre Zielstrukturen verursacht und lassen sich durch Mausmodelle mit kardialer Überexpression von  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren,  $G\alpha_s$  oder PKA selbst nachahmen (Iwase et al., 1996, Engelhardt et al., 1999, Antos et al., 2001, Lohse und Engelhardt, 2001). Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Pathogenese der Herzinsuffizienz durch Katecholamine kommt durch die Beobachtung zustande, dass sogenannte  $G\beta\gamma$ -Fänger („ $G\beta\gamma$ -scavenger“) in der Lage sind, die Progression der Erkrankung zu verhindern oder zu verlangsamen. Als  $G\beta\gamma$ -Fänger in Tiermodellen wurden bisher  $\beta$ ARKct (die  $G\beta\gamma$ -bindende Region der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase 2,

GRK 2) oder eine Splice-Variante von Phosducin (siehe unten) eingesetzt (Iaccarino et al., 1998, Freeman et al., 2001, Harding et al., 2001, Li et al., 2003).

Der Blutdruck wird über drei wichtige Mechanismen reguliert: über das Herzzeitvolumen (kardialer Output), den intravasalen Volumen und den peripheren Gefäßwiderstand. In der modernen Bluthochdrucktherapie spielen alle drei Systeme eine Rolle. Die wichtigsten therapeutischen Strategien blockieren auch hier die Wirkung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren: Beispiele sind die Blockade der Angiotensin II-Wirkung am  $AT_1$ -Rezeptor oder die Blockade der Noradrenalin-Wirkung am  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptor. Diese Rezeptoren sind in der Lage, Gefäßmuskelzellen zur Kontraktion zu veranlassen (Zunahme des Gefäßwiderstandes), und vermitteln ihre Effekte durch die G-Proteine der  $G_{q/11}$ -Familie. Eine krankhafte Aktivierung dieser G-Proteine könnte in der Pathogenese der Bluthochdruckerkrankung eine zentrale Rolle spielen (Keys et al., 2002, Heximer et al., 2003).

## Zentrales Nervensystem

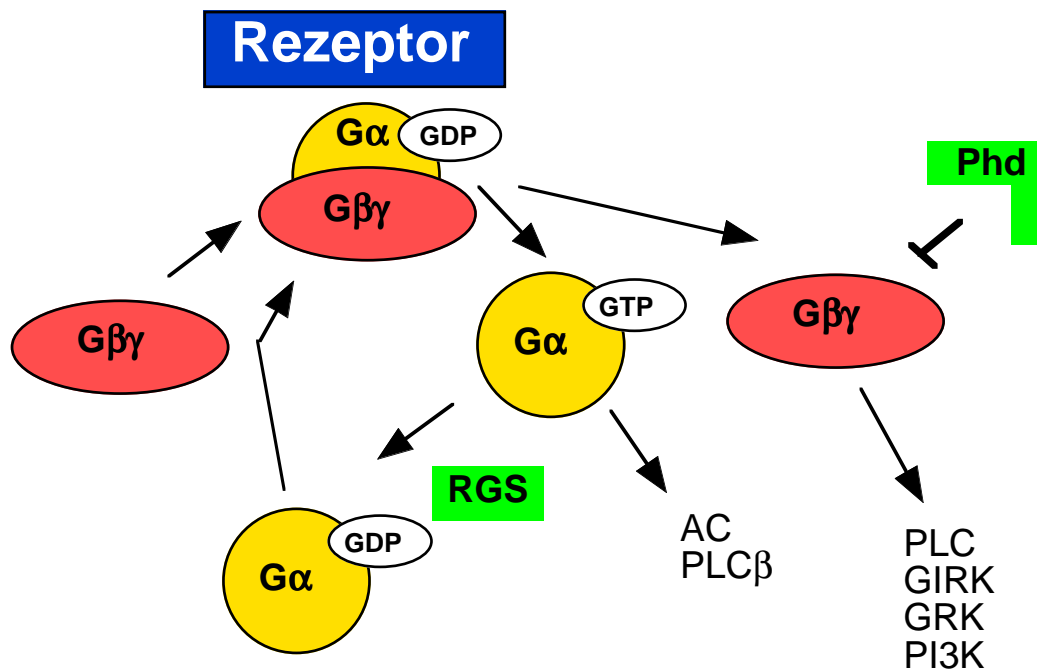
Die meisten Neurotransmitter des Zentralnervensystems (ZNS) stimulieren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, um neuronale Aktivität zu modulieren. Die Rezeptoren befinden sich sowohl präsynaptisch als auch postsynaptisch und vermitteln relativ langsame Antworten (im Vergleich zu Liganden-gesteuerten Ionenkanälen). Wie auch in anderen Organsystemen werden inhibitorische Signale über G-Proteine der  $G_{i/o}$ -Familie und stimulatorische Signale über  $G_{q/11}$  oder  $G_s$ -Proteine weitergeleitet. Das häufigste G-Protein im ZNS ist das  $G_o$ . Auf zellulärer Ebene kann  $G_o$  die Aktivität der neuronalen Kalziumkanäle (N-, P/Q und R-Typ) hemmen und neuronale Kaliumströme (durch GIRK) initiieren. Diese Effekte beruhen beide auf direkter Interaktion mit  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten (Mark et al., 2000, Mark und Herlitze, 2000). Fehlt die  $\alpha_o$ -Untereinheit, zeigen die Mäuse schwere Schädigungen auf: sie leiden unter Tremor und Krampfanfällen, sind schmerzempfindlicher und zeigen motorische Hyperaktivität (Jiang et al., 1998).

Bei der Gedächtnisbildung spielt die synaptische Plastizität im Hippocampus eine herausragende Rolle. Metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluR), die an G-Proteine der  $G_{q/11}$ -Familie koppeln, vermitteln hier Phänomene wie die Langzeit-Potenzierung (long-term potentiation) über Proteinkinase C und die Modulation von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (Miura, et al., 2002, Kotecha und MacDonald, 2003). Mäuse mit mGluR5-Knockout zum Beispiel zeigen schwere Defekte bei der Langzeit-Potentierung und Gedächtnisbildung (Lu et al., 1997).

G-Protein vermittelte Funktionen spielen also beim Säugetier eine herausragende Rolle in der Regulation wichtiger Systeme. Viele der bisher bekannten Funktionen konnten mit Hilfe genetischer Modelle an Mäusen gefunden und untersucht werden. Weitere Funktionen der G-Proteine erfordern neue Strategien für die Untersuchung am Tiermodell, da verwandte G-Proteine sich zum Teil gegenseitig kompensieren können oder Knockout-Mäuse eine frühe embryonale Letalität aufweisen, wie bei Linien mit homozygoten  $G\alpha_s$ -Knockout (Yu et al., 1998). Eine wichtige Möglichkeit, G-Protein-Funktion zu studieren, besteht in der Untersuchung der Regulation der G-Proteine durch Regulator-Proteine.

## 1.4. G-Protein Regulatoren

Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors und Aktivierung seiner G-Proteine durch GDP-GTP-Austausch an der  $\alpha$ -Untereinheit und Dissoziation der  $\beta\gamma$ -Untereinheit sind die entscheidende Schritte in der Transduktion von Signalen in das Zellinnere. Nach der Hydrolyse von GTP zu GDP durch die intrinsische Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit (GTPase-Funktion), kann die  $\beta\gamma$ -Untereinheit wieder mit dieser reassoziieren und terminiert so den G-Protein-Aktivierungszyklus (Abb. 2, Hamm, 2001). Zwei prinzipielle Möglichkeiten der G-Protein-Regulation können hier zum Tragen kommen: a) Die Bindung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten verhindert nicht nur die Aktivierung von  $G\beta\gamma$ -abhängigen Effektoren, sondern unterbricht auch den G-Protein-Zyklus nach der Hydrolyse von GTP (siehe hierzu nachfolgender Abschnitt). b) Die Hydrolysegeschwindigkeit ist entscheidend für die Dauer der G-Protein-Aktivität. Die



**Abb. 2: Der G-Protein Zyklus.** Im inaktiven Zustand liegt das G-Protein als Heterotrimer vor und GDP ist an die  $\alpha$ -Untereinheit gebunden. Nach Aktivierung des Rezeptors kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP (Aktivierung des G-Proteins). Die funktionellen Untereinheiten dissoziieren und interagieren mit unterschiedlichen Effektoren. Die GTPase-Funktion der  $\alpha$ -Untereinheit ( $G\alpha$ ) führt zur Hydrolyse von GTP (Inaktivierung). Nach erneuter Bindung der  $\beta\gamma$ -Untereinheit ( $G\beta\gamma$ ) ist das G-Protein wieder aktivierbar (neuer Zyklus). Regulation kann erfolgen durch  $G\beta\gamma$ -Bindung zum Beispiel durch Phosducin (Phd) oder durch Beschleunigung der GTP-Hydrolyse durch RGS-Proteine (RGS).

GTPase-Funktion der  $\alpha$ -Untereinheit scheint für sich alleine unter *in vivo*-Bedingungen aber nicht ausreichend zu sein (mehrere Minuten). Die Hydrolyse von GTP wird in der Regel erheblich beschleunigt einerseits durch die Effektor-Proteine selbst (zum Beispiel  $PLC\beta_1$ ) oder andererseits durch spezifische Modulatoren, die sogenannten RGS-Proteine (regulators of G-protein signaling, Ross und Wilkie, 2000, Hollinger und Hepler, 2002). RGS-Proteine gehören zu den GAPs (GTPase-activating proteins) und sind spezifisch für die  $\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren

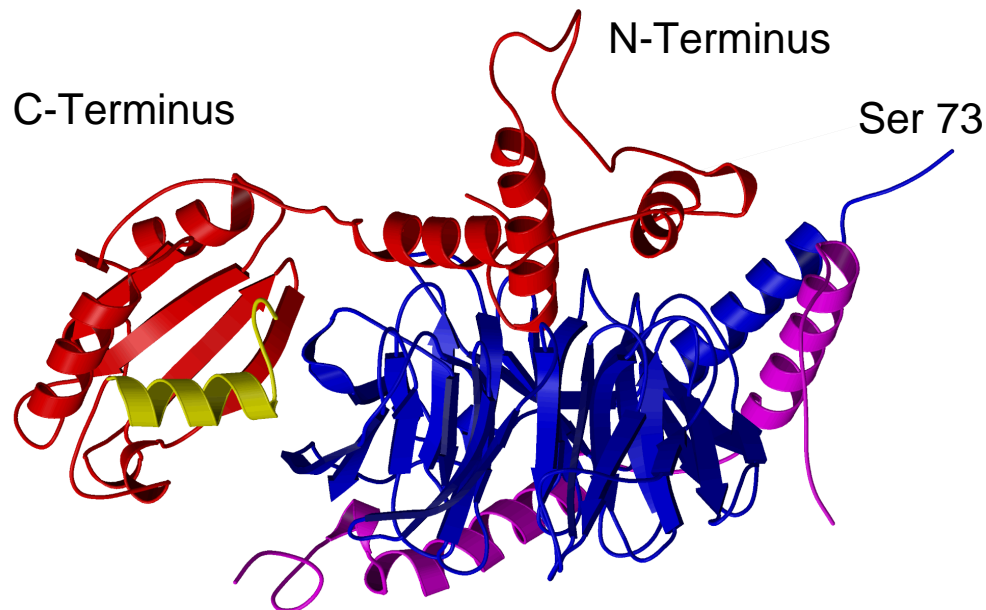
G-Proteine. Man geht heute davon aus, dass mindestens 30 verschiedene RGS-Proteine in Säugern existieren (Hepler, 2003). Die meisten regeln die Funktion von G-Proteinen der  $G_{i/o}$ - und  $G_q$ -Familien und zeigen innerhalb dieser Familien nur geringe Spezifität (*in vitro* Befunde). Als Ausnahmen gelten der Faktor p115RhoGEF, der spezifisch die GAP-Funktion für  $G\alpha_{12/13}$  ausübt (Kozasa et al., 1998), und der Faktor RGS-PX1, der als GAP für  $G\alpha_s$  fungieren könnte (Zheng et al., 2001). Neuere Arbeiten lassen den Schluss zu, dass die Spezifität der RGS-Proteine nicht nur durch die einzelnen G-Proteine, sondern auch durch die Rezeptoren selbst zustande kommt (Wang et al., 2002, Roy et al., 2003). So reguliert in glatten Gefäßmuskelzellen RGS3 den  $M_3$ -muscarinergen Acetylcholin-Rezeptor-Signalweg, während RGS5 den  $AT_1$ -Angiotensin-Rezeptor-Signalweg moduliert. Beide Rezeptoren sind gleichermaßen  $G_q$ -gekoppelt (Wang et al., 2002).

## **1.5. Die Rolle der Phosducin-Familie bei der Regulation der G-Proteine**

Phosducin wurde erstmals 1977 beschrieben als 33 kDa Phosphoprotein der Retina (Lolley et al., 1977). Im dunkeladaptierten Zustand inkorporiert die Retina nämlich  $^{32}P$ -Phosphat fast ausschließlich in einer 33 kDa-Bande, wenn man die Retinaproteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) auftrennt (Lee et al., 1984, und eigene Befunde an boviner und muriner Retina). Diese 33 kDa-Bande wurde dem Protein Phosducin zugeordnet. Nach Stimulierung durch Licht nimmt der Phosphorylierungsgrad von Phosducin ab, ein Prozess, der durch die Veränderung der Menge an zyklischen Nukleotiden maßgeblich induziert wird (Lee et al., 1984). Phosducin ist also ein retinales Protein, dessen Phosphorylierungszustand durch Rezeptoraktivierung reguliert werden kann. 1987 wurde dann Phosducin im Komplex mit der retinalen G-Protein  $\beta\gamma$ -Untereinheit (Transducin  $\beta\gamma$ , bestehend aus  $G\beta_1$  und  $G\gamma_1$ ) aus boviner Retina gereinigt (Lee et al., 1987), ein wichtiger Hinweis, dass Phosducin in nativen Gewebe eine stabile Bindung mit der Transducin  $\beta\gamma$ -Untereinheit eingeht (Abb. 3). Phosphorylierung und Transducin-Bindung waren



dann auch entscheidend für die Namensgebung dieses Proteins (Phos-phoprotein im Komplex mit Trans-ducin).



**Abb. 3: Der Phosducin-G $\beta$  $\gamma$ -Komplex.** Seitliche Ansicht eines Proteinmodells des Phosducin-G $\beta$  $\gamma$ -Komplexes nach Kristallstruktur-Daten (Gaudet et al., 1996). Die drei N-terminalen  $\alpha$ -Helices von Phosducin (rot) legen sich von oben auf den G $\beta$  $_1$ -Propeller (blau) und verdecken die Interaktionsfläche zu G $\alpha$  (nicht abgebildet). Der C-Terminus von Phosducin bildet eine kompakte Thioredoxin-Domäne (aus fünf  $\beta$ -Faltblättern flankiert von drei  $\alpha$ -Helices). Diese interkaliert mit Hilfe der C-terminalen  $\alpha$ -Helix (gelb: Aminosäure 215-232 nach Blüml et al., 1997, Loew et al., 1998) zwischen die Propellerblätter 1 und 7. In der Folge verbirgt G $\beta$  $_1$  (violett) seinen Farnesylrest (nicht abgebildet) zwischen die Propellerblätter 6 und 7 und der Komplex kann von der Membran in das Zytosol translozieren. Die Phosphorylierung von Phosducin an Serin 73 (Ser 73) durch PKA führt zur Auflösung des Komplexes (Gaudet et al., 1999).

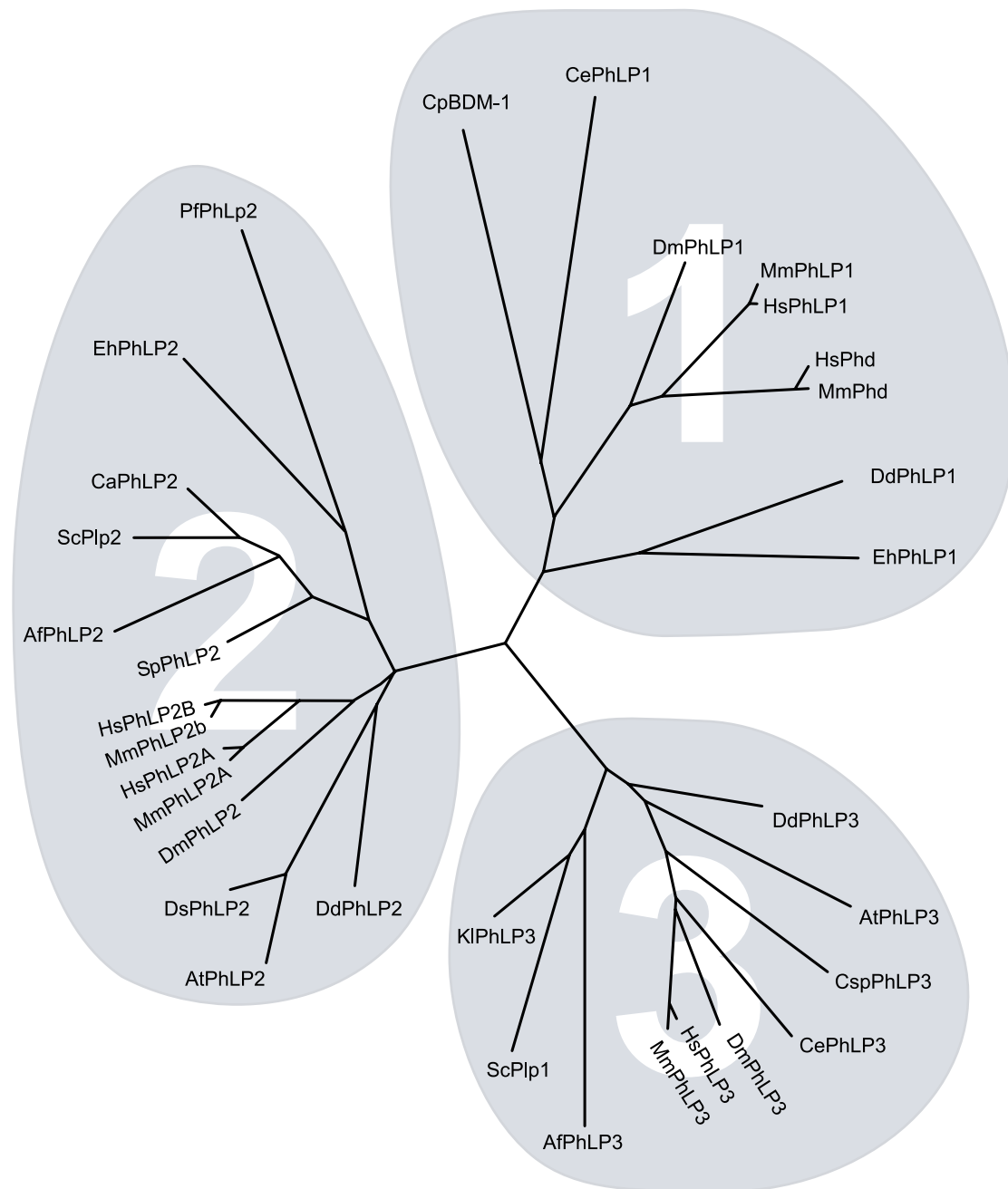
Phosducin gilt zwar heute als Protein, das dominant in Retina und Zirbeldrüse, dem entwicklungsgeschichtlich homologen Organ vorkommt (Craft et al., 1991, Lolley et al., 1992), das aber auch in vielen anderen Gewebetypen prinzipiell gefunden werden kann und bisher noch uncharakterisierte Aufgaben zu erfüllen scheint (Danner und Lohse, 1996). Beispielsweise finden sich in definierten Gehirnregionen sogenannte „pineal-like cells“, die eine starke Promotoraktivität von Phosducin aufweisen (Sunayashiki-Kusuzaki et al., 1997). Phosducin konnte deshalb auch aus bovinem Gehirn extrahiert und charakterisiert werden (Bauer et al., 1992). Ferner wurde die Bindung zur G-Protein  $\beta\gamma$ -Untereinheit ( $G\beta\gamma$ ) detailliert untersucht. Die herausragendsten Merkmale sind: a) die Bindung an  $G\beta\gamma$  führt zur vielfältigen Regulation von G-Proteinen und der Aktivität ihrer Effektoren, und b) die Bindung von Phosducin wird entscheidend moduliert durch die Phosphorylierung von Phosducin durch eine Reihe von Kinasen (siehe Tab. 3 zur Zusammenfassung).

<b>Phosducin-<math>G\beta\gamma</math>-Bindung</b>	<b>Literatur</b>
Der Phosducin <b>N-Terminus</b> (Aminosäure 1-108) besitzt hochaffine $G\beta\gamma$ -Bindungsstelle, Bindemotiv: 24 TGPKGVIINDWR 34	(Hawes et al., 1994, Xu et al., 1995, Gaudet et al., 1996, Tanaka et al., 1997, Craft et al., 1998, Savage et al., 2000)
Der Phosducin <b>C-Terminus</b> (Aminosäure 109-245) hat wichtige regulatorische Funktionen auf die G-Protein $\beta\gamma$ Untereinheit	(Blüml et al., 1997, Loew et al., 1998)
<b>G-Protein Regulation durch Phosducin</b>	
<b>Inhibition</b> von G-Proteinen durch Phosducin: <ul style="list-style-type: none"> <li>•Adenylatzyklase-Aktivierung durch <math>G_s</math></li> <li>•GDP-Freisetzung aus <math>G_o</math></li> <li>•GRK-2 und <math>PLC\beta_2</math> Aktivierung durch <math>G\beta\gamma</math></li> <li>•ADP-Ribosylierung von <math>G\alpha_o</math></li> </ul>	(Bauer et al., 1992, Lee et al., 1992, Hawes et al., 1994, Hekman et al., 1994, Danner und Lohse, 1996, Müller et al., 1996, Schulz et al., 1996, Bauer und Lohse, 1998)

<b>Unterstützung</b> von G-Protein-Funktion durch Phosducin	(Wehmeyer und Schulz, 1998, Lem et al., 1999, Kasahara et al., 2000, Obin et al., 2002, Blaauw et al., 2003)
<b>Regulation von Phosducin durch Kinasen</b>	
<b>PKA</b> Phosphorylierung (an Serine 73 im N-Terminus) inhibiert G $\beta\gamma$ -Bindung	(Lee et al., 1990, Bauer et al., 1992, Hawes et al., 1994, Hekman et al., 1994, Pagh-Roehl et al., 1995, Gaudet et al., 1999)
<b>GRK-2, -3, und -5</b> inhibieren G $\beta\gamma$ -Bindung <b>CamK II und IV</b> inhibieren G $\beta\gamma$ -Bindung	(Ruiz-Gomez et al., 2000) (Thulin et al., 2001)

**Tab. 3:** Zusammenfassung der wichtigsten Phosducin-Daten

Durch die Sequenzierung ganzer Genome einzelner Organismen konnte die Phosducin-Familie jetzt ergänzt werden durch neue Mitglieder (Blaauw et al., 2003). Die Phosducine können in drei große Unterfamilien unterteilt werden (Abb. 4). Die Gruppe der G-Protein-Regulatoren (Gruppe 1) umfasst bei den Säugetieren die Mitglieder (retinales) Phosducin und Phosducin-like Protein (PhLP) (siehe Abbildung). Die anderen beiden Gruppen (Gruppe 2 und 3) sind in ihrer Funktion weitgehend unbekannte Proteine. Für die Gruppe 2 kann aus bisherigen Befunden eine wichtige Rolle angenommen werden, da der Gen-Knockout in *Dictyostelium discoideum* zu einem letalen Phenotyp unbekannter Genese führt (Blaauw et al., 2003). Die Ausschaltung des Gens für das Gruppe 1-Phosducin (oder hier Plp1 genannt) führte in diesem Modell zur Hemmung und Misslokalisierung der G-Proteine, ein erster wichtiger Hinweis darauf, dass Phosducine nicht nur G-Proteine hemmen können, sondern auch für die G-Protein-Funktion und -Stabilität wichtig zu sein scheinen.



**Abb. 4: Der phylogenetische Baum der Phosducin-Familie** nach Blaauw et al., 2003. Die Phosducine lassen sich in drei Unterfamilien unterteilen. In der Gruppe 1 befinden sich die G-Protein-Regulatoren. Bei Säugetieren finden sich hier zwei Gene, die für homologe Proteine kodieren: das retinale Phosducin (Phd) und das ubiquitär exprimierte Phosducin-like Protein (hier PhLP1). Über die Phosducin-Homologen der Gruppe 2 und 3 ist bisher wenig bekannt. Phosducine sind innerhalb ihrer Unterfamilie hochkonserviert (von *Cryphonectria parasitica*, einem Pilz, über *Dictyostelium discoideum*, einem Einzeller, und *Caenorhabditis elegans*, einem Wurm, bis zu *Homo sapiens*, dem Menschen).

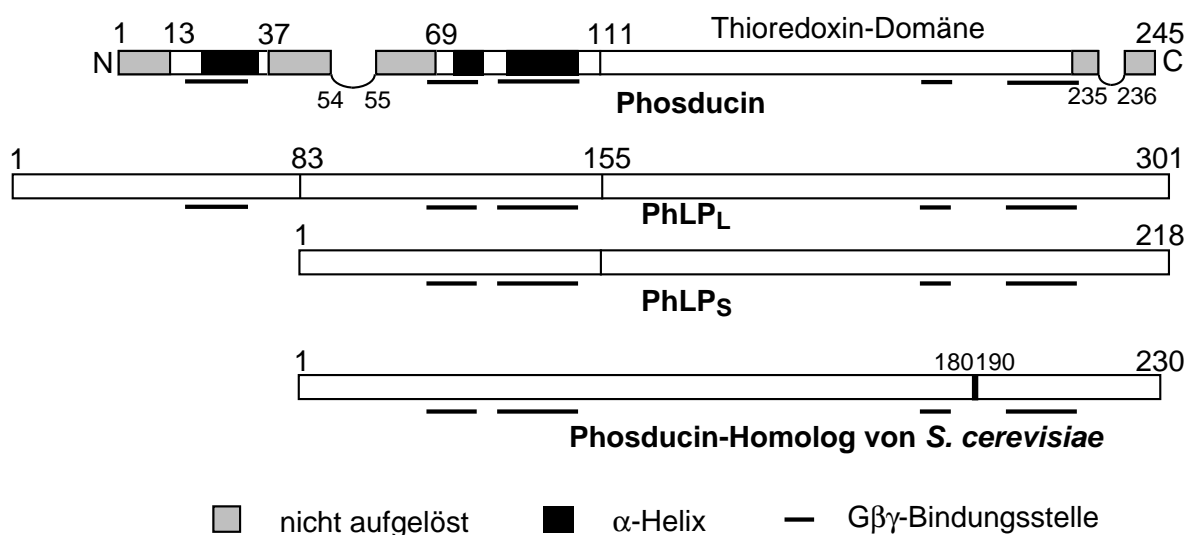
## Phosducin-like Protein

Phosducin-like Protein (PhLP) wurde erstmals kloniert als sogenanntes Ethanol-responsives Gen, dessen mRNA durch Ethanol in NG108-15 Neuroblastom x Gliom-Zellen induziert werden konnte (Miles et al., 1993). PhLP besitzt 41% Sequenzidentität und 65% Sequenzhomologie zum retinalen Phosducin. Sein struktureller Aufbau ist dem von Phosducin sehr ähnlich, legt man die Daten aus der Kristallstruktur des Phosducin-G $\beta$  $\gamma$ -Komplexes für eine computergestützte Modellierung zu Grunde (Abb. 5, Gaudet et al., 1996, SwissModelData). In seinem N-Terminus findet sich wie bei Phosducin ein hochkonserviertes G $\beta$  $\gamma$ -Bindemotiv (TGPKG $\gamma$ VINDWR). Wie auch Phosducin, kann PhLP die G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheit binden und deren Aktivität modulieren (Schröder und Lohse, 1996, Thibault et al., 1997, McLaughlin et al., 2002).

Bis vor kurzem unbekannt war allerdings, ob PhLP ähnlich wie Phosducin durch Kinasen reguliert werden kann, das heißt, ob eine Phosphorylierung des N-Terminus oder anderer Domänen zu einer Abnahme der Affinität zur G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten führen würde. Obwohl wir kürzlich zeigen konnten, dass sowohl bei Phosducin als auch bei PhLP C-terminale Fragmente durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) phosphoryliert werden und dass diese Phosphorylierung bei Phosducin zur Hemmung der G $\beta$  $\gamma$ -Bindung führte, blieb die Frage nach der genauen Rolle der PhLP-Phosphorylierung noch offen (Ruiz-Gomez, et al., 2000). Ebenso offen blieb die Frage, ob weitere Kinasen, wie zum Beispiel PKA, eine Rolle spielen könnten.

Die mRNA von PhLP existiert in zwei Splice-Varianten, die für zwei Proteine kodieren, die sich durch das Vorhandensein oder Fehlen der ersten 83 Aminosäuren unterscheiden (Abb. 5, Miles et al., 1993, Thibault et al., 1999). Die längere Form wird als PhLP<sub>Long</sub> oder PhLP<sub>L</sub> bezeichnet, die kürzere Form als PhLP<sub>Short</sub> oder PhLP<sub>S</sub>. Untersuchungen haben gezeigt, dass die lange Isoform PhLP<sub>L</sub> in vielen Säugetierorganen wie Gehirn, Herz oder Leber in hohen Proteinkonzentrationen gefunden werden kann (zwischen 50 und 200 nM) (Thibault et al., 1999, Schröder und Lohse, 2000). Diese Konzentrationen sind rechnerisch ausreichend, um G-

Proteine auch *in vivo* durch PhLP<sub>L</sub> effektiv hemmen zu können, nimmt man eine Affinität von etwa 10 nM zur Gβγ-Untereinheit an. Anders sieht es mit der kurzen Isoform PhLP<sub>S</sub> aus: Die Gewebekonzentrationen sind etwa 20-fach niedriger als die von PhLP<sub>L</sub>. Da sich im N-Terminus, der PhLP<sub>S</sub> fehlt, eine wichtige hochaffine Bindestelle für Gβγ-Untereinheiten befindet, ist zudem die Affinität von PhLP<sub>S</sub> zur Gβγ-Untereinheit um etwa das zehnfache bis zwanzigfache erniedrigt (Schröder und Lohse, 2000). Daher hatte man angenommen, dass der kurzen Splice-Variante PhLP<sub>S</sub> nur eine untergeordnete physiologische Bedeutung zukommt.



**Abb. 5: Topologie-Modell von Phosducin und Phosducin-like Protein (PhLP)** nach der Phosducin-Kristallstruktur von (Gaudet et al., 1996). Die strukturellen Domänen von Phosducin bestehen aus dem N-Terminus mit drei  $\alpha$ -Helices und drei assoziierten G $\beta$  $\gamma$ -bindenden Regionen und der Thioredoxin-Domäne mit zwei weiteren G $\beta$  $\gamma$ -Kontaktbereichen. In PhLP<sub>L</sub> finden sich alle fünf homologen G $\beta$  $\gamma$ -Kontaktregionen wieder, während die Splice-Isoform PhLP<sub>S</sub> die erste G $\beta$  $\gamma$ -Binderegion nicht besitzt. Das homologe Protein der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) erinnert vom Strukturaufbau an PhLP<sub>S</sub>, ein Hinweis darauf, dass in dieser kurzen Struktur die wesentlichen funktionellen Eigenschaften angelegt sein könnten.

Kürzlich konnte die Arbeitsgruppe um Marie-France Bader die kurze Splice-Form PhLP<sub>s</sub> aus kultivierten enterochromaffinen Zellen sowohl klonieren als auch reinigen (Gensse et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass PhLP<sub>s</sub> eine hemmende Rolle bei der Nicotin-stimulierten Exozytose von Katecholaminen aus diesen Zellen spielt. Dieser Prozess wird in enterochromaffinen Zellen unter anderem durch Gβγ-Untereinheiten vermittelt. Dies zeigt aber, dass PhLP<sub>s</sub> doch ein physiologischer G-Protein-Regulator sein kann, wenn auch in sehr spezialisierten Zellsystemen und unter sehr spezialisierten Umständen.

## 1.6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

### **Lassen sich die *in vitro* gewonnen Befunde zur PhLP-Funktion in intakten Zellen wiederfinden?**

Da sich die bisherigen Daten zum G-Protein-Regulator PhLP vor allem auf *in vitro* Befunde stützen, war die Frage offen, ob und in wieweit zelluläre Testsysteme zur G-Protein-Regulation die bisherigen Daten untermauern. Hierzu sollte die cDNA von PhLP der Ratte in eukaryotische Expressionssysteme subkloniert und die Funktion in intakten Zellen mittels Zellfunktionsassays bestimmt werden. Da G $\beta\gamma$ -Untereinheiten Effektorproteine wie PLC $\beta_2$  stimulieren können, sollte mit Hilfe der Messung von PLC $\beta$ -Metaboliten in intakten Kulturzellen der Einfluss von PhLP auf die G $\beta\gamma$ -abhängigen Signalewege untersucht werden.

### **Gibt es Mechanismen, die die Aktivität von PhLP in Zellen reguliert?**

Von dem homologen Protein Phosducin ist bekannt, dass es in der Retina phosphoryliert und auf diese Weise reguliert werden kann. Diese Phosphorylierung ist bei Phosducin abhängig von der Aktivität eines Rezeptors. Prinzipiell kann ein analoger Regulationsmechanismus für PhLP angenommen werden. Mit Hilfe metabolischer Markierung von intakten Zellen sollte die Frage geklärt werden, ob auch PhLP tatsächlich ein physiologisches Ziel von Kinasen darstellt. Weiterhin war die Frage zu beantworten, welche Kinasen hier eine Rolle spielen könnten, ob die Regulation abhängig ist von der Aktivität bestimmter Rezeptoren und welche funktionellen Konsequenzen sich daraus in Zellen ergeben. Weiterhin sollte mittels gezielter Mutagenese eine potentielle Phosphorylierungsstelle manipuliert werden, um diese näher zu charakterisieren.



## **Welche Rolle spielt die kurze Splice-Variant PhLP<sub>S</sub> in Zellen und Geweben ?**

Zur Bedeutung der kurzen Splice-Variante PhLP<sub>S</sub> gibt es widersprüchliche Befunde. Einerseits ist die Expression von PhLP<sub>S</sub> in den meisten Gewebetypen erheblich niedriger als die von PhLP<sub>L</sub>. Hinzu kommt, dass die Affinität (bestimmt durch *in vitro*-Testsysteme) deutlich schwächer ist als für eine effektive G-Protein-Regulation durch Gβγ-Bindung notwendig wäre. Andererseits konnte gezeigt werden, dass PhLP<sub>S</sub> in enterochromaffinen Zellen durchaus in der Lage ist, Gβγ-Funktionen zu regulieren. Um die hier bestehenden Widersprüche aufzuklären, sollte auch PhLP<sub>S</sub> in zellulären Testsystemen untersucht werden, und seine Fähigkeiten denen von PhLP<sub>L</sub> gegenübergestellt werden.

## **Gibt es neue Wege der G-Protein-Regulation ?**

Die bisher bekannten Wege, G-Protein-Funktion zu regulieren, bestehen in der Beschleunigung der GTPase-Funktion durch RGS-Proteine und durch direkten Bindung der Gβγ-Untereinheit durch eine ganze Reihe anderer Proteine (sogenannter „Gβγ-Scavanger“). Neuere Befunde lassen vermuten, dass G-Proteine ebenso wie viele andere Signalmediatoren durch Ubiquitinierung reguliert werden können, und dass Phosducin hier eine protektive Funktion ausüben kann (Obin et al., 2002). In dieser Arbeit sollte daher der Einfluss von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> auf die Stabilität und Expression von Gβγ-Untereinheiten näher untersucht werden. Kürzlich wurde eine Interaktion von PhLP mit dem sogenannten cytosolischen Chaperonin-Komplex CCT (chaperonin complex containing tailless polypeptide-1) beschrieben (McLaughlin et al., 2002). Dieser Komplex spielt eine Rolle bei der Faltung von WD40 repeat-Proteinen und könnte daher für Faltung von Gβγ-Untereinheiten wichtig sein (Valpuesta et al., 2002).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders aufgeführt wurden die Chemikalien von Merck, Boehringer Mannheim oder Sigma im Reinheitsgrad „pro analysi“ bezogen.

Agarose für die Elektrophorese	Gibco BRL
Affi-Gel-10	Biorad
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma
[ <sup>32</sup> P]ATP	PerkinElmer Life Sciences
BAPTA-AM	Calbiochem
BES (N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethan-sulfonsäure)	Sigma
Biomax MS- und ML-Filme	Kodak
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
6-Carboxy-X-Rhodamin	Molecular Probes
5,6-Dichloro-1-β-D-Ribofuranylbenzimidazol (DRB)	Calbiochem
DNA-Längenstandards:	
- 100bp-Ladder	New England Biolabs
- 1kb-Ladder	Gibco BRL
Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM)	PAN
Effectene®-Transfektionsreagenz	Qiagen
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma
Heparin-Na (Molekulargewicht 6000 Da)	Sigma
Lactacystin	Calbiochem
L-Glutamin; Penicillin/Streptomycin (Zellkultur)	PAN
Lipofectamine 2000 ®	Invitrogen
Lubrol WX	Serva
Myo-[2- <sup>3</sup> H]-Inositol (21 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences

[ <sup>32</sup> P]Nicotinamid-adenosin-dinukleotid (NAD)	PerkinElmer Life Sciences
[ <sup>32</sup> P]Orthophosphorsäure (10mCi/ml)	PerkinElmer Life Sciences
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen
Phosphate buffered saline (PBS, steril, Zellkultur)	PAN
Pertussistoxin	Sigma
Protein Assay-Reagenz (Bradford)	Biorad
Protein-G-Sepharose	Amersham
Proteingrößenstandard	peQLab
PVDF-Membranen (Immobilon P)	Millipore
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Rotiphorese-Gel 30 ®	Roth
RPMI 1640 Medium ohne i-Inositol	Life Technology
Säulen und Filter für die Plasmidisolierung	QIAGEN
Select Agar/Peptone/Yeast	Gibco BRL
Staurosporin	Calbiochem
Superscript III Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen
Sybr Green	Cambrex
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Tris	Merck
Trypsin/EDTA-Lösung (Zellkultur)	PAN
Western Blotting Detection Kit	Pierce
3MM-Whatman-Papier	Schleicher & Schüll
Zellkulturartikel	Nunc

### **Enzyme und Proteine**

Alkalische Phosphatase aus Garnelen (SAP)	Roche
Caseinkinase 2 (CK2)	Roche
DNase, RNase-frei	Qiagen
G-Protein $\alpha$ und $\beta\gamma$	Christian Dees
Hot-Taq-Polymerase (für Real-Time-PCR)	Eppendorf
Lambda-Phosphatase	New England Biolabs
Pfu-DNA-Polymerase	Eppendorf

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf

## Biologisches Material

### Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1-Blue	endA1, hsdR17 (rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ) supE44 lambda <sup>-</sup> recA1 gyrA1 gyrA96 relA1 (lac <sup>-</sup> ) (F <sup>-</sup> proAB lac <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10[tetR])	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21	F <sup>-</sup> ompT hsdB(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm(DE3) pLysS (Cam <sup>r</sup> )	Novagen

### Säugetierzellen

HEK 293	humane embryonale Nierenzellen	ATCC
HEK 239-GIRK 1/4	exprimiert GIRK 1/4 stabil	Moritz Bünemann

### Plasmide

pet3	Vektor für die bakterielle Expression T7-Promotor, Amp <sup>r</sup>	Novagen
pet3d-Phd-His <sub>6</sub>	exprimiert Phosducin-His <sub>6</sub>	Werner Schnepf
pet3c-PhLP <sub>L</sub> -His <sub>6</sub>	exprimiert PhLP <sub>L</sub> -His <sub>6</sub>	Stefan Schröder
pet3c-PhLP <sub>S</sub> -His <sub>6</sub>	exprimiert PhLP <sub>S</sub> -His <sub>6</sub>	Stefan Schröder
pet3d-GST-His <sub>6</sub>	Glutathion-S-Transferase-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pcDNA3	Expressionsvektor für Säugetierzellen CMV-Promotor, T7-Promotor, Amp <sup>r</sup>	Invitrogen
pcDNA3-Flag	für N-terminale Flag-Markierung	Christoph Klenk
pcDNA3-Gβ <sub>1</sub>	exprimiert G-Protein β <sub>1</sub>	Ursula Quitterer
pcDNA3-Gγ <sub>2</sub>	exprimiert G-Protein γ <sub>2</sub>	Ursula Quitterer
pcDNA3-PLCβ <sub>2</sub>	exprimiert PLCβ <sub>2</sub>	Ursula Quitterer
pcDNA3-His <sub>6</sub> Gγ <sub>2</sub>	Hexahistidin-Gγ <sub>2</sub> -Konstrukt	diese Arbeit
pcDNA3-GRK2-K220R	kinasedefiziente GRK2	Cornelius Krasel
pcDNA3-Phd	exprimiert Phosducin	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub>	exprimiert PhLP <sub>L</sub>	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>S</sub>	exprimiert PhLP <sub>S</sub>	diese Arbeit

pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> 5	exprimiert PhLP <sub>L</sub> 5-301	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> 29	exprimiert PhLP <sub>L</sub> 29-301	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> 36	exprimiert PhLP <sub>L</sub> 36-301	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> 46	exprimiert PhLP <sub>L</sub> 46-301	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> 58	exprimiert PhLP <sub>L</sub> 58-301	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> A18-20	phosphorylierungsdefizientes PhLP <sub>L</sub>	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> A25	Kontroll-Mutation in PhLP <sub>L</sub>	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> W66V	Gβγ-Bindungsdefizienz	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> AV	A18-20 und W66V-Mutation	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP 1-83	PhLP <sub>L</sub> -N-Terminus von 1-83	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP 1-118	PhLP <sub>L</sub> -N-Terminus von 1-118	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP 1-131	PhLP <sub>L</sub> -N-Terminus von 1-131	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP 1-155	PhLP <sub>L</sub> -N-Terminus von 1-155	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP 119-301	PhLP <sub>L</sub> -C-Terminus von 119-301	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP 132-301	PhLP <sub>L</sub> -C-Terminus von 132-301	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP 145-301	PhLP <sub>L</sub> -C-Terminus von 145-301	diese Arbeit
pcDNA3-AGT-Gβ <sub>1</sub>	Alkylguanintransferase-Gβ <sub>1</sub> -Konstrukt	diese Arbeit
pcDNA3-AGT-Gγ <sub>2</sub>	Alkylguanintransferase-Gγ <sub>2</sub> -Konstrukt	diese Arbeit
pcDNA3-PhLP <sub>L</sub> -EYFP	PhLP <sub>L</sub> -EYFP-Fusionsprotein	Christina Bermel
pcDNA3-PhLP <sub>S</sub> -EYFP	PhLP <sub>S</sub> -EYFP-Fusionsprotein	Christina Bermel
pcDNA3-α <sub>2A</sub> -AR	α <sub>2A</sub> -adrenerger Rezeptor	Moritz Bünemann
pGEX-1λT	exprimiert GST-Fusionsproteine	Cornelius Krasel

### Oligonukleotid-DNA-Primer zur Subklonierung und Mutagenese

Oligonukleotid-Primer wurden von Medigenomix oder MWG-Biotech bestellt. Primer für den N-Terminus von PhLP enthalten zur Subklonierung in pcDNA3 eine BamHI-Schnittstelle (fwd-Primer), Primer für dessen C-Terminus eine EcoRI-Schnittstelle (rev-Primer). Primer zur Mutagenese enthalten keine Schnittstellen. Andere Schnittstellen sind im Primernamen enthalten.

PhLP <sub>L</sub> fwd	5'-AGGAGAGGATCCATGACAACCCTGGATG-3'
PhLP <sub>S</sub> fwd	5'-AGGAGAGGATCCATGGAGCGGCTGATC-3'

PhLP rev	5'-GCAGCCGAATTCTCAATCTATTTCTAG-3'
PhLP <sub>L</sub> 5 fwd	5'-CCGGATCCATGGATGACAAGTTGCTG-3'
PhLP <sub>L</sub> 29 fwd	5'-CCGGATCCATGGACAAAGACAGAGG-3'
PhLP <sub>L</sub> 36 fwd	5'-CCGGATCCATGGCCCCAGCCAGTAG-3'
PhLP <sub>L</sub> 46 fwd	5'-CCGGATCCATGGCTGAGCTGCGAG-3'
PhLP <sub>L</sub> 58 fwd	5'-CCGGATCCATGGGTCCAAAAGGGGTG-3'
PhLP <sub>L</sub> 119 fwd	5'-TAGGATCCATGACTCTGAAGGAGTGTG-3'
PhLP <sub>L</sub> 132 fwd	5'-TAGGATCCATGGATGATGAAGAGTTTCTGCAG-3'
PhLP <sub>L</sub> 145 fwd	5'-TAGGATCCATGGACGAGATGCGGCAG-3'
PhLP <sub>L</sub> 83 rev	5'-AGAATTCTCACTCCCGGCACTGCTCC-3'
PhLP <sub>L</sub> 118 rev	5'-GGAATTCACCTCCCACTGATTTTCTTCTG-3'
PhLP <sub>L</sub> 131 rev	5'-GGAATTCACAAATTCTTGTCCATCATA-3'
PhLP <sub>L</sub> 155 rev	5'-GGAATTCACCCTTTATGAAGCTGCTGC-3'
BamHI-His <sub>6</sub> -EcoRI fwd	5'-GATCCCATCACCATCACCATCACTGAG-3'
EcoRI-His <sub>6</sub> -BamHI rev	5'-AATTCTCAGTGATGGTGATGGTGATGG-3'
HindIII-His <sub>6</sub> -BamHI fwd	5'-AGCTTATGCATCACCATCACCATCACG-3'
BamHI-His <sub>6</sub> -HindIII rev	5'-GATCCGTGATGGTGATGGTGATGCATA-3'
AGT-HindIII fwd	5'-ACACAAGCTTATGGACAAGGATTGTGAAATGAAACG-3'
AGT-BamHI rev	5'-CGGGATCCCAAGCCTGGCTTCCC
PhLP <sub>L</sub> A18-20 fwd	5'-CTACGCCGCGCTGAGGATGAGGAC-3'
PhLP <sub>L</sub> A18-20 rev	5'-CCTCAGCGGCGGCGTAGTAGTACTG-3'
PhLP <sub>L</sub> A25 fwd	5'-GATGAGGACGCTGACCATGAAGAC-3'
PhLP <sub>L</sub> A25 rev	5'-TTCATGGTCAGCGTCCTCATCCTC-3'
PhLP <sub>L</sub> W66V fwd	5'-ATCAATGACGTGCGCCGCTTCAAG-3'
PhLP <sub>L</sub> W66V rev	5'-GAAGCGGCGCACGTCATTGATCAC-3'

### **Oligonukleotid-DNA-Primer für die RT-PCR**

human Gβ <sub>1</sub> fwd	5'-CTTGCTGGGTACGACGACTT-3'
human Gβ <sub>1</sub> rev	5'-AGCTGACGCGGTTGTTTCAT-3'
rat PhLP fwd	5'-ATGGAGCGGCTGATCAAAAAG-3'
rat PhLP rev	5'-CAAATTCTTGTCCATCATAACC-3'

## siRNA für den Gen-Knock-Down

Zwei siRNAs gegen humanes TCP-1 $\alpha$  wurden mit Hilfe des MWG-Design-Werkzeugs (frei unter [www.mwg-biotech.com](http://www.mwg-biotech.com)) und unter Einbeziehung der RNA-Sequenz, wie sie in der humanen Refseq-Datenbank am NCBI unter der Zugangsnummer NM\_030752 abgelegt ist, entworfen. Die RNA wurde von MWG Biotech als Doppelstrang (preannealed) synthetisiert. Jedes 3'-Ende wurde mit dTdT versehen und mit RNase-freiem Puffer ausgeliefert. Die Kontroll-siRNA-Sequenz gegen GFP wurde übernommen von Lewis, et al. (2002).

	<u>Ziel-RNA-Sequenz</u>	<u>Position</u>
TCP-1 $\alpha$ Target 1	5'-GAAGUUGGAGAUGGAACUA-3'	(272-292)
TCP-1 $\alpha$ Target 2	5'-GAAGUGGUACAGGAGAGAA-3'	(1067-10087)
GFP-Target	5'-CGUAAACGGCCAGUUCTT-3'	(64-84)

## Antikörper

<u>Epitop</u>	<u>Spezies</u>	
PhLP <sub>S</sub>	Kaninchen, polyklonal	Stefan Schröder
PhLP-CT	Kaninchen, polyklonal	Stefan Schröder
Phosducin	Kaninchen, polyklonal	Marian Castro
G $\beta$ (common)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
G $\beta$ <sub>1</sub> (subtypspezifisch)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
G $\gamma$ <sub>2</sub> (subtypspezifisch)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
PLC $\beta$ <sub>2</sub> (subtypspezifisch)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
TCP-1 $\alpha$	Ratte, monoklonal	Calbiochem
$\beta$ -Actin	Maus, monoklonal	Sigma
Kaninchen	Ziege, polyklonal mit Peroxidase	Dianova
Maus	Ziege, polyklonal mit Peroxidase	Dianova
Ratte	Ziege, polyklonal mit Peroxidase	Calbiochem

## Medien und Puffer

Alle Medien und Puffer wurden in der Regel mit vollentsalztem und pyrogenfreiem Wasser aus einer Barnstead-Anlage hergestellt. Für die Zellkultur wurden Medien, Medienzusätze und Puffer von den entsprechenden Firmen bezogen beziehungsweise vor Gebrauch sterilfiltriert.

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

LB-Medium	1% Pepton 0,5% Yeast 1% NaCl
Agarplatte	10 ml LB-Medium mit 1,5% Select-Agar 100 µg/ml Ampicillin

### Puffer für die Molekularbiologie

10x DNA-Probenpuffer	50% (v/v) Glycerin 100 mM EDTA 0,01% (w/v) Bromphenolblau
50x TAE-Laufpuffer	2 M Tris-Base Eisessig bis pH 8,0 5 mM EDTA
10x RNA-Probenpuffer	50% (v/v) Formamid 7% (v/v) Formaldehyd 12% (v/v) Glycerin in 1x MOPS
10x FA-Laufpuffer	200 mM MOPS, pH 7,0 250 mM Formaldehyd 50 mM Natriumazetat 10 mM EDTA
RT-Reaktionspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,3 40 mM KCl 6 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT 0,5 mM dNTP 0,1 mM oligo(dT) <sub>12-18</sub> 0,1 mg/ml BSA



## **Puffer für die Proteinbiochemie**

5x Proteinprobenpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 10% (w/v) SDS 100 mM DTT 20% (v/v) Glycerin 0,01% (w/v) Bromphenolblau
4x Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
4x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
10x SDS Laufpuffer (Standard-Gele)	250 mM Tris-Base 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS
Anoden-Puffer für Tricin-Gele	100 mM Tris-Base 100 mM Tricin 1% (w/v) SDS
Kathodenpuffer für Tricin-Gele	100 mM Tris/HCl, pH 8,3
Westerntransferpuffer	20 mM Tris-Base 150 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
10x TBS (Tris-buffered saline)	200 mM Tris/HCl, pH 7,4 140 mM NaCl
Blockpuffer für Western Blots	3% (w/v) Trockenmilch 0,1% (v/v) Tween-20 in 1x TBS
Phosphorylierungspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 50 mM KCl 10 mM MgCl 5 mM DTT 200 $\mu$ M [ $^{32}$ P]ATP (20 $\mu$ Ci/ml)
ADP-Ribosylierungspuffer	20 mM Na <sub>2</sub> -HEPES, pH 8,0 20 mM NaCl 20 mM DTT 0,1 mM EDTA-Na <sub>2</sub> 1 mg/ml BSA 0,05% Lubrol 100 mM ATP 100 $\mu$ M [ $^{32}$ P]NAD (50 $\mu$ Ci/ml)

Phosphatasepuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 2 mM MnCl <sub>2</sub> 0,1 mM EDTA 5 mM DTT 0.01% Brij 35
Lysis- und Waschpuffer für die His <sub>6</sub> -Tag-Reinigung	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 500 mM NaCl 10 mM Imidazol 10 mM Mercaptoethanol
Elutionspuffer für die His <sub>6</sub> -Tag-Reinigung	20 mM Tris-Cl, pH 7,4 50 mM NaCl 200 mM Imidazol 1 mM DTT 10 % (v/v) Glycerol
Zellyse-Puffer für Immunpräzipitation phosphorylierter Proteine	50 mM Tris/HCl, pH 7,2 300 mM NaCl 50 mM NaF 10 mM Iodoacetamid 5 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 5 mM EDTA-Na <sub>2</sub> 1 mM PMSF 0,1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 0,01% NaN <sub>3</sub> 1% Triton-X100
hypotoner Zellysepuffer	50 mM Tris-base, pH 10,5 1% Triton-X100 1 mM PMSF
Puffer für Kopräzipitation	20 mM Tris-Cl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1 % Nonidet P-40 1 mM PMSF 10 mM β-Mercaptoethanol

### Medien für die Kultur von HEK-Zellen

Kulturmedium	DMEM (1g/l Glukose) 10% (v/v) FCS Penicillin/Streptomycin-Lösung 1:100
2x BBS zur Transfektion 280 mM NaCl	50 mM BES, pH 6,95 @ 21°C  1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O

Zellinkubationspuffer	20 mM Na <sub>2</sub> -HEPES, pH 7,4 138 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 g/l Glucose (10 mM LiCl)
Medium für [ <sup>3</sup> H]-Inositol-Beladung	RPMI ohne i-Inositol (1g/l Glukose) 0,2% (v/v) FCS 0,1% (v/v) Myo-[2- <sup>3</sup> H]-Inositol (2 μCi/ml)
Medium für [ <sup>32</sup> P]-Phosphor-Beladung	DMEM ohne Phosphat 20 mM Na <sup>+</sup> -HEPES, pH 7,4 200 μCi/ml [ <sup>32</sup> P]Orthophosphorsäure
Patch Clamp-Puffer, extern	10 mM HEPES-NaOH, 10, pH 7,3 120 mM NaCl 20 mM KCl 2 mM CaCl <sub>2</sub> ; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ,
Patch Clamp-Puffer intern (Pipette)	10 mM HEPES-KOH, pH 7.3 100 mM Kaliumaspartat; 40 mM KCl 5 mM MgATP 5 mM NaCl 2 mM EGTA 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,01 mM GTP

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) ist es möglich, mit strangspezifischen Oligonukleotiden (sogenannten Primern), deren Sequenzen komplementär zu den flankierenden Bereichen des gewünschten DNA-Abschnitts sind, DNA *in vitro* zu amplifizieren. In einem programmierbaren Thermocycler wird dabei ein dreiphasiger Reaktionszyklus durchlaufen (1. Denaturierung, 2. Hybridisierung und 3. Polymerisation). Primer können an ihren 5'-Enden nicht-komplementäre Abschnitte enthalten. Typischerweise werden hier Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingebaut, die eine spätere Insertion in Vektorsysteme erlauben (Subklonierungsprimer). An ihren 3'-Enden müssen Primer komplementär zur DNA sein. Zur Subklonierung von cDNA in Vektoren bedarf es in der Regel eines Vorwärts-Primers (forward oder fwd), der ein Teil des Plusstranges (also des proteinkodierenden Stranges) ist, und eines Rückwärts-Primers, der ein Teil des Minusstranges (des Gegenstranges, keine Proteinsequenz) ist. Durch die Erhitzung auf 94°C liegt die DNA nur noch als Einzelstrang vor (Denaturierung), so dass in der Hybridisierungsphase der Primer an seinem komplementären Bereich binden kann. Thermostabile Polymerasen (Taq oder Pfu) verlängern dann in der Polymerisationsphase den Primer in 3'-Richtung. Jeder Zyklus verdoppelt so den entsprechenden DNA-Abschnitt. Template-DNA (der zu amplifizierende DNA-Abschnitt) kann genomischen Ursprungs sein (enthält dann möglicherweise nicht-kodierende Regionen) oder aus umgeschriebener mRNA bestehen (sogenannte cDNA). Stammt die cDNA nicht aus einem Vektorsystem, sondern aus einer aktuellen mRNA-Präparation, so spricht man von RT-PCR (reverse transcription-PCR). Sollen quantitative Untersuchungen durchgeführt werden bedient man sich der sogenannten Real-Time-PCR (s.u.).

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und das Temperaturprofil können in Abhängigkeit von den DNA-Sequenzen leicht variieren. In der Regel wurden die Reaktionen in 40-100 µl Polymerasepuffer (vom Hersteller) und in 25 - 35 Zyklen durchgeführt.

## PCR-Reaktionsansatz

100 µM Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)  
1 µM 5'- bzw. 3'- Primer (angelöst in 100 µM Tris-Cl, pH 8,3)  
2,5 Units DNA-Polymerase (Taq oder Pfu)  
geringe Menge Template-DNA

Ein typischer Reaktionszyklus sah folgendermaßen aus:

Denaturierung	94°C	1 min
Hybridisierung	50°C	1 min
Polymerisation	72°C	1-2 min

## **Einführen von Punktmutationen und Deletionen mittels PCR**

Um Punktmutationen in eine wildtypische cDNA einzubringen, müssen Mutationsprimer so entworfen werden, dass sie einerseits den gewünschten Basenaustausch enthalten, und andererseits dieser von mindestens 9 Basen in 3'- und 5'-Richtung flankiert wird. Ein Primer muss als Vorwärts-Primer (fwd), ein zweiter als Rückwärts-Primer (rev) vorliegen. Beide sind überwiegend komplementär zu einander. In einem ersten Schritt wurden zwei parallele PCR-Reaktionen an der Ausgangs-DNA durchgeführt: a) Subklonierungsprimer fwd und Mutationsprimer rev und b) Mutationsprimer fwd und Subklonierungsprimer rev. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt, gereinigt und dienten zusammen als Template für eine weitere PCR-Reaktion. Da die beiden Produkte im Bereich der Mutationsprimer überlappten, konnte an beiden Strängen eine Elongation durch die Polymerase stattfinden. Die weitere Amplifikation erfolgte durch die Subklonierungsprimer (fwd und rev).

## **Agarose-Gelelektrophorese von DNA**

Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Stränge nach ihrer Größe aufzutrennen und um dann ihre Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe zu bestimmen. Lange Fäden aus Agarosepolymeren werden zu einem Gel vernetzt. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner

sind die Poren, die sich in dem Gel befinden. Die Gelelektrophorese funktioniert wie ein Sieb für Moleküle; ein elektrisches Feld wird verwendet, um die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die Gelmatrix zu ziehen, wobei die kleineren DNA-Moleküle sich schneller durch das Gel bewegen können. Somit wird eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente (aus PCR oder Restriktionsenzymverdau) erfolgte in dieser Arbeit in 1-1,5 %igen Agarosegelen. Dabei wurde Agarose in TAE-Laufpuffer erhitzt, geschmolzen und mit Ethidiumbromid-Lösung (Endkonzentration 1 µg/ml) in eine Flachbettkammer aus Plexiglas gegossen und ausgehärtet. Probenaschen wurden mit einem Teflonkamm erzeugt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit der entsprechenden Menge 10x DNA-Probenpuffer versetzt, und das Gel in TAE-Puffer in die Elektrophorese-Kammer gelegt. In einer Laufzeit von 30 bis 45 Minuten bei 5 Volt / cm Elektrodenabstand wurde dann die DNA aufgetrennt. Die Verbindung Ethidiumbromid zeigt im Gel kaum Fluoreszenz (weil sie in Lösung ihre Konformation frei ändern kann). Durch Bindung an DNA wird die Fluoreszenz jedoch stark erhöht und so können DNA-Banden im UV-Licht leicht identifiziert werden. DNA, die weiterverwertet wurde, konnte am UV-Tisch ausgeschnitten und mittels Qiagen Gel Extraktion-Kit entsprechend der Angaben des Herstellers gereinigt werden.

## **Klonierung von PCR-Produkten in Expressionsvektoren**

### **Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen**

Um DNA-Produkte zielgerichtet in Vektorsysteme einbringen zu können, sollten sowohl das entsprechende Expressionsplasmid, als auch die Insertions-DNA (zum Beispiel ein PCR-Produkt) mit Restriktionsenzymen behandelt werden. Restriktionsenzyme zerschneiden Doppelstrang-DNA an sehr spezifischen Sequenzabschnitten (sites). In kommerziellen Vektoren (wie pcDNA3) befindet sich eine Multiple Cloning Site, in der mehrere Restriktionsschnittstellen hintereinander zur Verfügung stehen. Die meisten PCR-Produkte in dieser Arbeit wurden über

BamH I und EcoR I in pcDNA3 inseriert. Der Enzymverdau erfolgte in dem vom Hersteller gelieferten Puffersystem und nach dessen Vorgaben. Eine Auftrennung im Agarosegel entfernt die abgeschnittenen Basenpaare.

### **Ligation von DNA-Insert und Vektor-DNA**

Sind zwei DNA-Enden mit demselben Enzym verdaut worden, passen sie zueinander wie ein Schlüssel zu einem Schloss ("sticky ends"). Um sie wieder dauerhaft zu verbinden, müssen sie durch einen energieverbrauchenden Prozess ligiert werden. Zur Ligation mittels T4-Ligase wurden DNA-Fragmente mit Vektor-DNA im Verhältnis 1-5:1 in einem Endvolumen von 10 µl zusammengeführt (Gesamt-DNA-Menge 20-50 ng). In diesem Ansatz befand sich 0,1 Volumen des vom Hersteller mitgelieferten 10x-Ligasepuffers und eine Enzymeinheit T4-DNA-Ligase. Die Ligation wurde entweder bei 21°C für 3h oder bei 16°C über Nacht durchgeführt.

### **Transformation kompetenter Bakterien und Plasmidpräparation**

#### **Transformation von *E. coli*-Bakterien**

Um die neu ligierten Vektoren überprüfen und vermehren zu können, müssen diese in spezielle Bakterienstämme eingebracht werden (Transformation). In der sich anschließenden Selektion mit einem Antibiotikum überleben nur Bakterien, die ein intaktes Plasmid aufgenommen haben (Produktion des Resistenzfaktors, zum Beispiel Penicillinase [Amp<sup>r</sup>]). Die Stammhaltung kompetenter (aufnahmebereiter) *E. coli*-Bakterien (XL1-Blue) erfolgte in LB-Medium mit 10 % (w/v) PEG 3000, 5 % DMSO und 20 mM MgSO<sub>4</sub> bei -80°C. Ein Aliquot wurden vor der Transformation auf Eis aufgetaut. 100 µl dieser Bakterien wurden zu einem Transformationsansatz bestehend aus 100 µl KCM-Puffer und 10 µl Ligationsansatz gegeben. Die Ansätze wurden 20 Minuten auf Eis und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1ml LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz bei 37°C für 50 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (3000g für

3 Minuten) und in 50-100 µl LB-Medium resuspendiert, bevor diese auf einer LB-Agarplatte (in der Regel mit Ampicillin 1 µg/ml zur Selektion) ausplattiert und im Brutschrank über Nacht inkubiert wurden. Die erzielte Transformationseffizienz betrug etwa  $1-5 \times 10^8$ / µg pcDNA3.

5x KCM-Puffer:     100mM KCl  
                          30mM CaCl<sub>2</sub>  
                          50mM MgCl<sub>2</sub>

### **Plasmidpräparation mit dem Qiagen-MaxiKit**

*E. coli*-Kulturen wurden von je einer Einzelkolonie der Agarplatte angeimpft und in 5 ml (Vorkultur) bzw. 200-500 ml (Hauptkultur) LB-Medium (mit Ampicillin 1 µg/ml) bei 37°C auf einem Rotationsschüttler bei 180 rpm in 8 bis 16 Stunden hochgezogen. Zur Gewinnung von größeren Mengen Plasmid-DNA (sogenannte Maxi-Präparation) wurden in der Regel 200ml LB/Ampicillin vermehrt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt im JA 14 Rotor bei 7000 rpm für 5 Minuten. Das Bakterienpellet wurde nach Herstellervorgaben in Puffer P1 (10 ml) aus dem Qiagen Maxi-Kit resuspendiert. Die Bakterienlyse und Denaturierung der DNA erfolgte durch Zugabe von Puffer P2 (10 ml) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von Puffer P3 und 20-minütiger Inkubation auf Eis fielen Proteine, Membranbestandteile und genomische Bakterien-DNA aus. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt im JA-17-Rotor bei 17.000 rpm für 30 Minuten erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA aus dem Überstand mittels Bindung an die Qiagen Maxi-Kit Anionenaustauschersäule, anschließendem Waschen (2x 30 ml Puffer QC) und Eluieren (15 ml Puffer QF). Das Eluat wurde nacheinander mit Isopropanol und Ethanol gefällt und schließlich in sterilem, destilliertem Wasser (200-500 µl) aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm Wellenlänge bestimmt (Optische Dichte von 1,0 entspricht 50 µg DNA). Der Reinheitsgrad einer Präparation wurde durch die Extinktion bei 280 nm definiert (Proteinmaximum). Hierbei sollte der Quotient aus beiden Messungen um die 1,8 betragen.



Puffer P 1:	100µg/ml RNase A 10mM EDTA 50mM Tris/HCl; pH 8.0	Puffer P 2:	200mM NaOH 1% SDS
Puffer P 3:	3,0M KAc, pH 5,5	Puffer QC:	1M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% (v/v) Isopropanol
Puffer QF:	1,25 M NaCl 50 mM MOPS, pH 8,5 15% (v/v) Isopropanol		

## Isolation von RNA und Reverse Transkription mit PCR-Analyse

### RNA-Präparation aus Zellen

Veränderungen in der Proteinausstattung einer Zelle können auf unterschiedlichen Ebenen stattfinden. Ein wichtiger Regulationsmechanismus für Zellen und Organismen sind hierbei Veränderungen in der Transkription von mRNA. Erhöhung oder Drosselung der Transkription korreliert häufig mit der entsprechenden Veränderung in den betroffenen Proteinen. Daher wurden HEK 293-Zellen in dieser Arbeit im Hinblick auf quantitative Veränderung der mRNA untersucht. Hierfür wurden konfluente Zellen eines Wells einer 6-Wellplatte mit 350 µl Puffer RLT aus dem RNeasy-Kit von Qiagen lysiert. Das Lysat wurde mit einer Pipette in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zur Homogenisierung für eine Minute gevortext. Anschließend erfolgte die Zugabe von 350 µl Ethanol (70%) mit vorsichtiger Durchmischung. Der gesamte Ansatz wurde dann auf eine RNeasy-Kit Minisäule pipettiert und bei 8000 x g durch die Minisäule zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die Minisäulen einmal mit Puffer RW1 (350 µl) gewaschen. Um auch geringste Mengen an möglicher genomischer DNA zu eliminieren, wurde ein DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt. Hierfür wurden nun 10 µl RNase-freie DNase (3 Kunitz-Einheiten / µl) mit 80 µl Puffer RDD vorsichtig vermischt (nicht gevortext) und auf die Säule pipettiert. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Minisäule nochmals mit 350 µl RW1 und zweimal mit Puffer RPE (je 500 µl) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 µl RNase-freiem Wasser. Die RNA-Konzentration wurde

photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm Wellenlänge bestimmt (Optische Dichte von 1,0 entspricht 40 µg RNA). Die genannten Puffer waren Bestandteil des RNeasy-Kits von Qiagen.

## **RNA-Gelelektrophorese mit Formhaldehyd-Agarosegel (FA)**

Die routinemäßige Überprüfung der RNA-Qualität und Quantität erfolgte mit Formaldehydagarose-Gelelektrophorese (siehe auch unter DNA-Gelelektrophorese). Formaldehyd denaturiert hierbei potentiell kontaminierende RNasen. Es wurde ein 1,2 %iges Agarose-Gel in FA-Laufpuffer in eine Plexiglasflachbettkammer gegossen (mit Zugabe von Ethidiumbromid 1 µg/ml Gel). Nach der Aushärtung des Gels und anschließender Befüllung der Kammer mit FA-Laufpuffer wurden die RNA-Proben in RNA-Probenpuffer aufgenommen und in die durch einen Kamm geformten Taschen pipettiert. Nach zirka 30 Minuten bei 5 Volt / cm Gelstrecke konnten die typischen RNA-Banden auf dem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht werden. Qualitativ hochwertige RNA-Präparationen enthielten hierbei deutlich erkennbar die 18 S- und die 28 S-ribosomale RNA-Bande in gleicher Fluoreszenzstärke. Verschmierte Banden und Größenunterschiede zwischen den Banden wären Zeichen einer RNA-Degradation mit Qualitätsverlusten für die nachfolgende Untersuchung. Bei der Pufferbereitung wurde ausschließlich RNase-freies, destilliertes Wasser verwendet.

## **Reverse Transkription der RNA-Präparation mit folgender PCR**

Der Vorgang der Reversen Transkription (RT) dient eigentlich einigen RNA-Viren, ihr RNA-Genom in DNA umzuschreiben, um entweder den Proteinbiosynthese-Apparat der Wirtszelle zu missbrauchen oder ihr Genom in die wirtseigene DNA zu integrieren. In der Molekularbiologie macht man sich diesen Mechanismus zu Nutze, um mRNA in sogenannte komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Diese cDNA enthält ausschließlich die proteinkodierenden Sequenzen (im Gegensatz zur genomischen DNA) und ist zudem wesentlich stabiler als die mRNA. In dieser Arbeit wurden die RNA-Präparationen mit Hilfe des Superscript III Reverse Transkriptase®-

Kits von Invitrogen umgeschrieben. Hierfür wurden 1 µg RNA in 50 µl RT-Reaktionspuffer mit 200 Einheiten Reverser Transkriptase für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die folgende PCR-Analyse wurde nun 1 µl dieses Ansatzes in einem 100 µl-PCR-Standard-Ansatz weiterverwendet. Die DNA-Oligonukleotid-Primer für die Detektion von humanem Gβ<sub>1</sub> wurden so gewählt, dass die Produkte der cDNA von denen potentiell kontaminierender genomischer DNA unterschieden werden konnten (Produktgröße bei cDNA: 95 bp, bei genomischer DNA 324 bp).

## **Quantitative PCR-Analyse**

Die quantitative PCR-Untersuchung wurde als sogenannte Real Time PCR durchgeführt (verwendet wurde das ABI Prism Sequenz Detektion System von Applied Biosystems). Die Quantifizierung erfolgt hierbei mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus (daher der Name "Real Time") und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden (qPCR), die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden (z.B. kompetitive PCR). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Jede RNA-Probe (1 µl) wurde dreifach mit einem Primer-Paar in jeweils 25 µl-Ansätzen in einer 96-Wellplatte untersucht. Als Polymerase fand das Enzym Hot-Taq von Eppendorf Verwendung. Als Fluoreszenzfarbstoff diente Sybr Green, als Referenzfarbstoff 6-Carboxy-X-Rhodamin. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde die cDNA aus Kontrollzellen in mehreren Schritten verdünnt. Die relativen cDNA-Mengen von Gβ<sub>1</sub> und PhLP wurden dann berechnet unter Annahme einer 100 %igen PCR-Effizienz. Als Positivkontrolle und Referenzgröße für die Gesamt-cDNA-Menge wurden von jeder Präparation PCR-Ansätze mit Standard-Primern für β-Actin und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (beides sind sogenannte "housekeeping" Gene) auf derselben Versuchsplatte mitgemessen. Die Mengen dieser Standards waren zwischen den Kontrollen und der Versuchsgruppe nicht unterschiedlich.

## 2.3. Proteinchemische Methoden

### Herstellung und Reinigung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Expression von PhLP<sub>L</sub>, PhLP<sub>S</sub> und Phosducin erfolgte in *E. coli* Kulturen des Stammes BL21(DE3)pLysS. Es wurden die IPTG-induzierbaren Vektorsysteme pET3c und 3d verwendet, in die die rekombinanten Proteine als PCR-Produkt mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag (His<sub>6</sub>) subkloniert worden waren. Nach Transformation der Bakterienkultur wurde zunächst eine 5 ml-Vorkultur aus einer Kolonie angeimpft und über Nacht gezogen. Anschließend wurde die Vorkultur in 500 ml LB-Medium überimpft und bei 37°C im Rotationsschüttler bis zu einer optischen Dichte von 0,8 bei 600 nm Wellenlänge herangezogen. Dann wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert, und die Kultur für weitere vier Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 7000 x g im JA-14-Rotor (Beckmann) pelletiert und in 10 ml Ni-NTA-Agarose-Lysis- und Waschpuffer unter der Zugabe von 0,1 mM PMSF resuspendiert. Um die intrazellulären Proteine aus den Bakterien freizusetzen und die genomische DNA, die bei der Weiterverarbeitung stört, zu destruieren, wurde die Bakteriensuspension einer Ultraschallbehandlung unterzogen (mit Soniplus HD 200, Brandlin, für 2 x 1 Minute in kurzen Pulsen auf Eis). Da die überexprimierten Proteine in Lösung vorlagen, wurde das Bakterienlysat durch Ultrazentrifugation bei 100 000 xg (70Ti-Rotor, Beckmann) für 40 Minuten bei 4°C von festen Bestandteilen befreit. Hexahistidin-markierte Proteine lassen sich unter Komplexbildung mit Ni<sup>2+</sup> über NTA-tragendes Agarosematerial von anderen Proteinen reinigen. Daher wurde nun der Überstand aus der Ultrazentrifugation in eine 15 ml-Säule (Bio-Rad) überführt, die vorher mit 1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen) beladen und mit Lyse- und Waschpuffer äquilibriert worden war. Nach Durchlaufen des Überstandes wurde die Säule mit 3 x 10 ml Waschpuffer beschickt und der jeweilige Durchlauf verworfen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden 2 x 0,5 ml Elutionspuffer verwendet. Anschließend erfolgte die Umpufferung (2 x imidazolfreier Puffer ad 2,0 ml) und Konzentrierung in zentrifugierbaren Konzentratoren (Amicon) mit einer Cut-Off Porengröße von 10 000 Da. Nach Proteinbestimmung und Aliquotierung erfolgte die Lagerung bei -80°C.

## **Herstellung von Lysaten aus Kulturzellen und Gewebe**

Für die Herstellung von Proteinlysaten für die Western-Analyse wurden Kulturzellen in der Regel aus einem Well einer 6-Wellplatte (im Monolayer gewachsen) verwendet. Das Kulturmedium wurde zunächst abgesaugt, anschließend wurden die Zellen mit hypotonem Lysepuffer (200 µl/Well) für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und bei 20 000 x g in der Tischzentrifuge bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Durch diesen Schritt wurden Triton X-unlösliche Bestandteile (Zellkerne, DNA, Zytoskelettproteine) entfernt. Der Überstand wurde nun in SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C für 10 Minuten denaturiert und reduziert. Im Fall der Aufarbeitung von Gewebe (zum Beispiel Herz der Maus), wurde das gefrorene Gewebestück zunächst gewogen und anschließend mit dem 10-fachen Volumen an hypotonem Lysepuffer in einem Glaspotter homogenisiert. Das Homogenat wurde nun wie oben zentrifugiert und der Überstand nach einer Proteinbestimmung nach (Bradford, 1976) zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt.

## **Phosphatasebehandlung von Lysaten**

In einigen Experimenten wurden die Lysatproteine durch Phosphatase dephosphoryliert. Hierfür wurden 50 µg Gesamtprotein von Lysat aus HEK 293-Zellen oder 100 µg von Lysat aus Maushirn in 50 µl Phosphatasepuffer mit 1000 Einheiten Lambdaproteinphosphatase ( $\lambda$ PPase) bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Kontrollproben wurden analog behandelt (ohne  $\lambda$ PPase). Die Reaktion wurde gestoppt durch SDS-Probenpuffer und Denaturierung bei 95°C (siehe unten).

## **SDS-Gelelektrophorese und Western-Blotting**

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

Als Trennmedium bei dieser Art der Elektrophorese dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Zusätzlich kommt SDS (*engl. sodium dodecylsulfate*, deutsch: Natriumdodecylsulfat) zum Einsatz. Dieses anionische Detergens überdeckt weitestgehend die Eigenladungen von Proteinen, so dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Zur Auftrennung werden die denaturierten Proben auf ein Gel aus Polyacrylamid geladen, welches in einer geeigneten Elektrolytlösung eingelegt ist. Danach wird eine elektrische Spannung angelegt, die eine Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel bewirkt. Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die Maschen des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel wandern. Am Ende des Vorganges sind alle Proteine in den einzelnen Proben nach Größe sortiert und können einer weiteren Analyse zugeführt werden (Färbung mit Coomassie, Immunologische Nachweise mit Western Blot).

Als Elektrolytlösungen wurde in dieser Arbeit einerseits das Tris-Glycin-Puffersystem (ursprünglich von Laemmli entwickelt) für die Analyse von Proteinen zwischen 15 und etwa 150 kDa verwendet, andererseits wurde das Tris-Tricin-Puffersystem (von Schägger und von Jagow entwickelt) für Proteine zwischen 1 und 50 kDa Größe eingesetzt. In dieser Arbeit wurde das Elektrophoresesystem der Firma Hoefer mit dem Gelmaßen 14 cm x 8 cm bei 1,5 mm Dicke und in der Regel 15 Taschen verwendet. Der Gebrauch eines Sammelgels über der eigentlichen Trennstrecke dient der Konzentration der Proteine. Dies führt in der Regel zur Auftrennung mit scharfen Proteinbanden. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 10 Minuten denaturiert auf das vertikale Gelsystem aufgetragen. Bei konstanter Stromstärke (70 mA/Gel) wurden die Proteine in etwa 60 bis 90 Minuten aufgetrennt.

Sammelgel (4%): 125 mM Tris-Cl, pH 6,8  
0,1 % SDS  
3,75 % Acrylamid / 0,1 % Bisacrylamid (Rotiphorese®-Gel 30)  
1 µl/ ml TEMED, 10 µl/ ml Ammoniumperoxodisulfat (10 % w/v)

Trenngel (12%): 375 mM Tris-Cl, pH 8,8  
0,1 % SDS  
12 % Acrylamid / 0,32 % Bisacrylamid (Rotiphorese®-Gel 30)  
0,5 µl/ ml TEMED, 6,5 µl/ ml Ammoniumperoxodisulfat (10% w/v)

Bei dem Tris-Glycin Puffersystem wurden für die Anode und die Kathode derselbe Puffer verwendet (SDS-Laufpuffer für Standard-Gele). Für die Tris-Tricin-Gele mußten jeweils ein Anoden- und ein Kathoden-Puffer verwendet werden. Nach dem Lauf des Gels wird das Sammelgel abgetrennt und verworfen und das Trenngel entweder einem Western Transfer zugeführt (siehe unten) oder fixiert und gefärbt. Standard-Verfahren war hier die Färbung mit Coomassie R (0,375 % w/v in Methanol 45 % v/v, 10 % v/v Eisessig).

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

In der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine werden bei diesem Verfahren durch elektrischen Strom aus dem Gel auf eine Trägermembran (Polyvinylidendifluorid (PVDF) als Immobilon P von Millipore) transferiert. Verwendet wurde die Semidry-Blotting-Apparatur von Bio-Rad. Folgende Lagen wurden hierfür von unten nach oben auf der Flachbett-Anode aufgeschichtet: 6 Lagen 3MM-Whatman-Papier, getränkt in Transfer-Puffer; eine PVDF-Membran, mit Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert; das SDS-Trenngel; nochmals 6 Lagen getränktes 3MM-Whatman-Papier. Mit der Kathode wurde das Sandwich von oben abgedeckt und leicht komprimiert. Bei einer Spannung von 15 V erfolgte der Proteintransfer in 90 Minuten.

## **Immundetektion der immobilisierten Proteine**

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden die Membranen zunächst entweder 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in Blockpuffer inkubiert. Dies diente der Absättigung von hydrophoben Bindungsstellen auf der Membran. Dann wurde ein primärer Antikörper in geeigneter Verdünnung (in der Regel zwischen 1:1000 und 1:20 000) in 10 ml Blockpuffer oder in 10 ml TBS/ BSA (2 % w/v) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten 5 Waschschriffe (je etwa 30 ml TBS/ 0,1 % Tween 20) über 30 Minuten verteilt, bevor der sekundäre Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:5000 bis 1:20 000 in 10 ml Blockpuffer oder TBS/ BSA) für eine weitere Stunde zugegeben wurde. Zum Abschluß wurde die Membran nochmals wie beschrieben gewaschen. Der Nachweis des gebundenen ersten Antikörpers - und damit auch des entsprechenden Antigens - erfolgte mit Hilfe der Meerrettichperoxidase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt vorlag. Verschiedene Fertiglösungen, die in dieser Arbeit benutzt wurden (Supersignal von Pierce, Uptilight von Interchim, ECL von Amersham), basieren auf dem Prinzip, dass ein Chemolumineszenzfarbstoff durch Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Peroxidase oxidiert wird und dadurch Licht emittiert. Die Detektion des Lichtes erfolgte hier bei der Western Blot-Immunanalyse in der Regel durch Belichtung von Biomax-ML-Filmen (Kodak). Die spezifischen Proteine stellten sich als geschwärzte Banden dar.

## **Quantitative Analyse von Western Blot-Banden**

Es wurden von jedem Blot mehrere Belichtungen durchgeführt (zum Beispiel für 10 Sekunden, 1 Minute, 3 Minuten), denn nicht alle Einflüsse auf die Bandenintensivität lassen sich immer exakt im Vorfeld steuern. Eine quantitative Auswertung eines Western Blots bedurfte deshalb einer relativen Bezugsgröße (Kontrollbande), die sich auch zwischen einzelnen Experimenten als relativ gleichförmig in Schwärzung und Bandendicke darstellen ließ (das heißt, sie war normal verteilt). Für die quantitative Analyse wurde der Blot dann zunächst hochauflösend (600 x 600 dpi) gescannt, die einzelnen Banden im Programm Photoshop (Adobe) markiert, und die



relativen Schwärzungsanteile der Banden bestimmt. Die relativen Werte von mehreren unabhängigen Experimenten wurden anschließend statistisch ausgewertet (Mittelwert, Standardfehler, ANOVA mit post-hoc Analyse bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ ).

## **Präzipitation und Kopräzipitation von Proteinen**

### **Präzipitation von Proteinen**

Um überexprimierte Proteine aus Zelllysaten isoliert untersuchen zu können, wurden einzelne Proteine mittels spezifischer Antikörper gebunden und von den übrigen zellulären Proteinen getrennt. Hierfür wurden pro Probe 20  $\mu$ l Protein G-Sepharose (Amersham) mit 1  $\mu$ g primärem Antikörper (zum Beispiel anti-PhLP-CT) in PBS (0,01 % Triton X-100) über Nacht bei 4°C in einem Rotator (mit 10 rpm) beladen. Anschließend wurden die Sepharose-Beads zentrifugiert (20 000 x g, 1 Minute, Raumtemperatur), gewaschen (2 x 1 ml PBS) und mit BSA (1 mg/ Probe) versetzt. Dann wurde die Sepharose in gut resuspendiertem Zustand mit abgeschnittener Pipettenspitze aliquotiert und mit dem zu untersuchenden Lysat inkubiert (in der Regel für 2 Stunden bei 4°C auf einem Rotator mit 10 rpm). Schließlich wurde der Überstand nach Zentrifugation (Tischzentrifuge bei 20 000 x g/ 1 Minute/ 4°C) abgesaugt und die Sepharose mehrfach gewaschen (4 x 1 ml Lysepuffer und 1 x 1 ml PBS). Die Elution erfolgte in den meisten Fällen mit SDS-Probenpuffer bei 95°C für 10 Minuten und die weitere Analyse mit SDS-PAGE.

### **Kopräzipitation von Proteinen**

Um Proteininteraktionen beziehungsweise -bindungen zielgerichtet zu untersuchen, wurden verschiedene Techniken verwendet, den allen gemein ist, dass ein Bindungspartner im Laufe der Prozedur an Säulenmatrix (Agarose) gebunden wird. Durch Waschschriffe werden alle unspezifischen Proteine anschließend entfernt.

Durch gezielte Elution und Analyse (zum Beispiel Western Blot gegen den zweiten Bindungspartner) lässt sich eine Aussage über die Protein-Proteinwechselwirkung generieren.

### **Kopräzipitation mit His<sub>6</sub>-markierten Proteinen**

Es wurden His<sub>6</sub>-markierte Proteine verwendet, die entweder rekombinant in *E. coli* hergestellt und über Ni-NTA-Agarose gereinigt worden waren (wie PhLP-His<sub>6</sub>; siehe oben) oder aber in eukaryoten Kulturzellen überexprimiert wurden (wie der Gβ<sub>1</sub>/ His<sub>6</sub>-Gγ<sub>2</sub>-Komplex). Für die Proteinbindungsstudie wurde 1 ml Kopräzipitationspuffer (KP, mit zusätzlichen 20 mM Imidazol) zur Zellyse über die Zellen eines Wells einer 6-Wellplatte gegeben und wie oben beschrieben vorbereitet (Überstand wurde in 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäße überführt). In dieses Lysat wurde dann in einigen Experimenten 400 nM rekombinantes His<sub>6</sub>-markiertes Protein zugegeben (bait) und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Bei anderen Experimenten waren die Bindungspartner in derselben Transfektion vorhanden, bei wieder anderen wurden zwei unterschiedlich transfizierte Lysate zu gleichen Teilen gemischt und inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl aufgeschlämmter Ni-NTA-Agarose und eine weitere Inkubation für 20 Minuten bei 4°C in einem Rotator (10 rpm). Dann wurden die Proben in der Tischzentrifuge (bei 20 000 x g/ 1 Minute/ 4°C) pelletiert und der Überstand abgesaugt. Die Agarose wurde gewaschen (3 x 1 ml KP, 1 x 1 ml PBS) und in SDS-Probenpuffer bei 95°C in 10 Minuten eluiert. Die weitere Analyse erfolgte mit SDS-PAGE und Western Blot.

### **Kopräzipitation mit Antikörpern**

Bei der Kopräzipitation von Proteinen mittels Antikörpern können in der nachfolgenden Immundetektion im Western Blot häufig stark störende Artefakte durch die Ko-Elution der Antikörper selbst auftreten. Daher gibt es die Möglichkeit der kovalenten Kopplung eines Antikörpers an die Gelmatrix. Hierfür wurde das Affi-Gel 10-System (Bio-Rad) verwendet. Eine N-Hydroxysuccimid-Estergruppe

gebunden an Agarose bildet mit primären Aminogruppen stabile Amidbindungen. Nach dreimaligem Waschen von 1 ml Affi-Gel in einer 15 ml-Säule (Bio-Rad) mittels einfachem Durchfließen mit je 10 ml H<sub>2</sub>O, wurden 100 µl anti-Gβ-Antikörper (Santa Cruz) in 20 mM Hepes (pH 7,5), 50 mM NaCl zugegeben und die Säule dicht verschlossen für 4 Stunden bei 4°C in einem Rotator inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit Hepes/NaCl wurde die Gelmatrix mit 50 mM Tris-Cl (pH 7,5) über Nacht inkubiert. Dies diente der Absättigung von noch verbliebenen reaktiven Bindungsstellen im Affi-Gel. Verwendet wurden im Anschluss 50 µl-Aliquots einer 50%igen Gel-Suspension. Proteinbindung an den Antikörper, Wasch- und Zentrifugationsschritte erfolgten in Analogie zur obigen Beschreibung. Die Elution wurde grundsätzlich mit 100 mM Na-Citrat (pH 3,0) durchgeführt. Die Beads wurden zentrifugiert und der Überstand abgenommen und neutralisiert (1M NaOH). Dieses Verfahren löste keine Immunglobuline von der Gelmatrix, die Western Analyse bleibt frei von Antikörper-Artefakten.

## **Radioaktive Phosphorylierung rekombinanter Proteine**

Phosphorylierungen sind posttranslationale Modifizierungen an Proteinen, die durch die eingebrachte zusätzliche Ladung vielfach ihre chemischen und biologischen Eigenschaften verändern (zum Beispiel Laufverhalten in SDS-PAGE, Funktionshemmung oder -aktivierung). Phosphorylierungen finden an bestimmten Aminosäuren statt (in der Regel Serin, Threonin und Tyrosin) und werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme, sogenannter Kinasen, ausgeführt. Diese Kinasen erkennen meistens spezifische Sequenzabschnitte (sites) in einem Protein als Zielsequenz (target). Um Phosphorylierungen leichter detektierbar und quantifizierbar zu machen, bedient man sich des Einbaus radioaktiver Phosphatreste. In dieser Arbeit wurde das Nuklid <sup>32</sup>P, ein hochenergetischer β-Strahler, verwendet. Als Donor in *in vitro*-Experimenten diente ATP.

Die rekombinanten Proteine (PhLP<sub>L</sub>-His<sub>6</sub>, PhLP<sub>S</sub>-His<sub>6</sub> und Phosducin-His<sub>6</sub>) wurden in einer Konzentration von 400 nM in 50 µl Phosphorylierungspuffer bei 30°C oder 37°C

mit 0,04 bis 0,3 Millieinheiten an Casein Kinase 2 (CK2, human, rekombinant, Roche) oder mit 5 Einheiten Protein Kinase A (PKA, katalytische Untereinheit gereinigt aus Schweineherz, Cornelius Krasel) inkubiert. Nach unterschiedlichen Reaktionszeiten (meistens nach 30 Minuten) wurde der Prozess auf Eis gestoppt, mit SDS-Probenpuffer versetzt und die Proteine für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proben in der SDS-PAGE entfernte die unverbrauchte Radioaktivität ( $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$  in der Lauffront). Die Trenngele wurden anschließend fixiert / gefärbt und bei 80°C für 90 Minuten auf 3MM-Whatman-Papier getrocknet (da Feuchtigkeit die  $\beta$ -Strahlung absorbiert und streut). Die Gele wurden dann auf PhosphorImager-Speicherplatten gelegt, und diese für 1 bis 3 Tage exponiert. Die Visualisierung und Quantifizierung der radioaktiven Banden erfolgte dann am FLA-3000-PhosphorImager (Fuji). Die hohe dynamische Breite der Speicherfolien macht eine lineare Beziehung zwischen der eingebauten Menge an Radioaktivität und den ermittelten freien Einheiten (arbitrary units) möglich. Alternativ wurde statt der Speichermedien ein sensitiver Film exponiert (Biomax-MS, Kodak) und entwickelt.

In einigen Experimenten musste die Phosphorylierung mit Zellysaten durchgeführt werden. Dies machte es nötig, die rekombinanten Proteine nach der Phosphorylierung zu präzipitieren (Ni-NTA-Agarose) und zu reinigen (analog zur Beschreibung Kopräzipitation mit His<sub>6</sub>-markierten Proteinen). SDS-PAGE und Signaldetektion erfolgten wie beschrieben.

## **ADP-Ribosylierung von G-Protein $\alpha$ -Untereinheiten**

ADP-Ribosylierung ist der enzymatische Transfer einer ADP-Ribose von einem Donor ( $\text{NAD}^+$ ) auf ein Protein. Ähnlich wie die Phosphorylierung werden Proteine so in ihren biologischen Funktionen modifiziert. Die G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten vom G<sub>i/o</sub>-Typ werden zum Beispiel durch Pertussistoxin (PTX) irreversibel durch ADP-Ribosylierung gehemmt. Eine Voraussetzung für diese Reaktion ist die Anwesenheit von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Dies macht man sich zu Nutze, um eine funktionelle Hemmung der G $\beta\gamma$ -Untereinheiten durch andere Proteine quantitativ darzustellen,

indem man die Menge des in die  $\alpha$ -Untereinheit eingebauten radioaktiven [ $^{32}\text{P}$ ]ADP bestimmt .

$G_o$ -Protein  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten wurden nach den Beschreibungen von (Neer et al., 1984, Sternweis und Robishaw, 1984) von Christian Dees, Würzburg, aus Rinderhirnmembranen gereinigt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Für die ADP-Ribosylierung wurden 4 nM  $G\alpha_o$ , 6 nM  $G\beta\gamma$  und 100 ng PTX in 50  $\mu\text{l}$  ADP-Ribosylierungspuffer für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Radioaktives [ $^{32}\text{P}$ ]NAD überträgt hierbei [ $^{32}\text{P}$ ]ADP auf  $G\alpha_o$ . Zur Hemmung dieser Reaktion wurden  $\text{PhLP}_L$  und Phospho- $\text{PhLP}_L$  (nach CK2-Phosphorylierung, siehe oben) in aufsteigenden Konzentrationen von 10 - 1000 nM und  $\text{PhLP}_S$  in Konzentrationen von 300 - 1000 nM zugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion auf Eis gestoppt und die Probe mit SDS-Probenpuffer bei 95°C für 10 Minuten denaturiert und reduziert. Es folgten SDS-PAGE, Färbung und Detektion plus Quantifizierung wie bei der Phosphorylierung rekombinanter Proteine beschrieben.

## 2.4. Zellkulturmethoden

### Ziehen und Vermehren von HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen wurden als Monolayer in DMEM-Kulturmedium bei 5 bis 7% CO<sub>2</sub> und 37°C gezogen und alle zwei bis drei Tage (je nach Dichte und Wachstum) passagiert. Hierfür wurden die Zellen gewaschen (PBS), mit Trypsin/EDTA abgelöst, in Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 bis 1:10 auf neue Kulturplatten ausgesät. Kulturplatten mit zirka 10 cm Durchmesser (Bodenfläche 60 cm<sup>2</sup>) wurden mit 10 ml Kulturmedium und die Wells einer 6-Wellplatte (10 cm<sup>2</sup>) mit 2 ml Kulturmedium beschickt. Bei der Passagierung der stabilen Zelllinie HEK 293-GIRK-1/4 wurde das Kulturmedium zusätzlich mit dem Selektionsantibiotikum G418 (200 mg/ l) supplementiert.

### Transfektion von HEK 293-Zellen mit der Kalziumphosphatmethode

Die transiente Transfektion von HEK 293-Zellen erfolgte in der Regel mit der Kalziumphosphat-Methode nach Chen und Okayama (1987). Die Zellen wurden 6 Stunden vor der Transfektion so ausgesät, dass sie mit etwa 70 %iger Konfluenz adhärten. Folgende sterile Lösungen wurden für die Transfektion benötigt:

0,25 M CaCl<sub>2</sub>

2x BBS

Folgende Transfektionsansätze wurden verwendet:

	<b>pro Well</b> <b>einer 6-Wellplatte</b> (10 cm <sup>2</sup> )	<b>pro</b> <b>10 cm-Kulturschale</b> (60 cm <sup>2</sup> )
Plasmid-DNA	1 - 5 µg	10 - 20 µg
CaCl <sub>2</sub>	100 µl	500 µl
2x BBS	100 µl	500 µl

Die Ansätze wurden gut durchmischt, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gleichmäßig auf die Zellen pipettiert. Diese wurden dann über Nacht bei 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Der gebildete Kalziumphosphatniederschlag wird mit der absorbierten DNA von den Zellen phagozytiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach Mediumwechsel entweder weiter gezogen oder auf andere Platten gesplittet. Versuche und Expressionskontrollen erfolgten 40 bis 42 Stunden nach Transfektion.

## **Transfektion von HEK 293-Zellen mit der Effectene<sup>®</sup>-Methode**

Die transiente Transfektion von HEK 293-GIRK-1/4-Zellen, die der Messung von Kaliumströmen zugeführt werden sollten, wurden mit Effectene<sup>®</sup> von Qiagen im Wesentlichen nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Kulturschalen (10 cm<sup>2</sup>) mit Zellen in etwa 50 %iger Konfluenz und 2 ml Kulturmedium wurden folgendermaßen transfiziert:

- 1 µg cDNA ad 150 µl Puffer EC (DNA-Kondensationspuffer)
- Zugabe von 16 µl Enhancer, vortexen und für 5 Minuten inkubieren,
- Zugabe von 20 µl Effectene<sup>®</sup>, vortexen und 10 Minuten inkubieren,
- Zugabe von 500 µl Medium, mischen und über die Zellen pipettieren.

Die weitere Inkubation der Zellen erfolgte wie üblich, die Versuchsdurchführung fand nach 48 Stunden statt.

## **siRNA-Transfektion von HEK-293-Zellen**

Ursprünglich stellen sogenannte small interfering RNAs (siRNAs) kurze RNA-Doppelstränge (21-28 Nukleotide) dar, die von einer RNase III (auch Dicer genannt) aus langen endogenen RNAs herausgeschnitten werden. Diese kleinen RNAs werden anschließend in den Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) eingebaut. Mithilfe der inkorporierten RNA-Fragmente bindet RISC komplementär an mRNA. Dies dient einerseits dem Abbau von Fremd-RNA - zum Beispiel der von

Viren - andererseits der zellinternen Proteinegulation. Die Molekularbiologie setzt synthetisch hergestellte siRNAs ein, um durch RNA Interferenz (RNAi) die Expression von spezifischen Zielgenen zu verringern. Die siRNA wird in eukaryotische Zellen eingebracht (transfiziert), um die mRNA des Zielgens zu verringern oder abzuschalten (Gen-Knockdown). 2001 wurde diese Technik im Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen in der Arbeitsgruppe um Thomas Tuschl erstmals an Säugerzellen erfolgreich durchgeführt (Elbashir et al., 2001).

In dieser Arbeit wurden HEK 293-Zellen in 1 ml Kulturmedium (ohne Penicillin/Streptomycin-Lösung) mit einer Konfluenz von 30 bis 50% in die Wells einer 12-Wellplatte ausgesät. Nach 4 bis 6 Stunden Adhärenzzeit wurde die Transfektion mit Lipofectamin® (Invitrogen) nach den Vorgaben des Herstellers ausgeführt: zunächst Vermischen von 2 µl Lipofectamin und 40 bis 80 pmol siRNA (dies entspricht 0,5 bis 1,0 µg / 4 cm<sup>2</sup>-Loch) in 100 µl Kulturmedium, nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur überschichten der Zellen und Inkubation bei 7% CO<sub>2</sub> und 37°C. Die Analyse der Expression des Zielproteins und weiterer Kontrollproteine erfolgte nach 42 Stunden mit Hilfe von Western-Immunoblots. Die Transfektionseffizienz, kontrolliert anhand der Transfektion von GFP-cDNA in pcDNA3, lag mit dieser Methode bei über 90%.



## 2.5. Methoden zur Charakterisierung der Zellphysiologie

### Messung der Inositolphosphat-Generierung in HEK 293-Zellen

Inositolphosphate entstehen als ein sogenannter Second-Messenger bei der Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (siehe Einleitung). Neben der direkten Aktivierung von endogenen oder transfizierten Rezeptoren kann man sich eine direkte Überexpression von PLC $\beta_2$  und G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten für die Generierung eines robusten Inositolphosphat-Signals zu Nutze machen (Xu, et al., 1995). Eine Hemmung von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten in Zellen führt dann zu einer Hemmung der Inositolphosphat-Bildung.

HEK 293-Zellen wurden transient mit jeweils 3  $\mu\text{g}$  cDNA für PLC $\beta_2$ , G $\beta_1$  und G $\gamma_2$  sowie jeweils bis zu 8  $\mu\text{g}$  cDNA für die in dieser Arbeit untersuchten PhLP-Isoformen oder die der entsprechenden Kontrollen transfiziert (bei konstanter Gesamt-DNA-Menge auf 60  $\text{cm}^2$ -Kulturschalen nach der Kalziumphosphat-Methode). Nach Inkubation über Nacht (5%  $\text{CO}_2$ , 37°C) wurden die transfizierten Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät (nach Ablösung der Zellen mit 0,5 ml Trypsin/EDTA erfolgte die Resuspension in 10 ml Kulturmedium; dann wurden jede Transfektion in je 3 Wells für die Inositolphosphat-Messung und in 1 Well für die Western Blot-Expressionsanalyse in je 2 ml Medium ausgesät, der Rest verworfen). Nach 6 Stunden Inkubation (5%  $\text{CO}_2$ , 37°C) wurden die Zellen mit 2ml PBS pro Well gewaschen und anschließend in 2ml inositolfreiem RPMI 1640-Medium mit 0,2% (v/v) FCS und 0,1% (v/v) Myo-[2- $^3\text{H}$ ]-Inositol (2  $\mu\text{Ci/ml}$ ) bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre inkubiert. Nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellen dann mit Zellinkubationspuffer gewaschen und bei 37°C in 1 ml von diesem Puffer inklusive 10 mM Lithiumchlorid für weitere 30 Minuten inkubiert. Lithiumchlorid hemmt den Abbau der Inositolphosphate. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  20%iger Perchlorsäure ( $\text{HClO}_4$ ) auf Eis gestoppt (Denaturierung der Zellen). Der Überstand wurde in Eppendorfgefäße überführt und mit 400  $\mu\text{l}$  1M KOH neutralisiert. 1 ml dieser Lösung wurde nach Zentrifugation in 2 ml 50mM Tris-Cl, pH 7,4, gepuffert. Die

gesamte Probe wurde zur Bindung der negativ geladenen Inositolphosphate auf eine Anionenaustauschersäule (von Dowex, Mesh 100-200, Cl<sup>-</sup>-Form, 0,5 ml einer 50%igen Suspension) aufgetragen. Zur Entfernung der freien Inositole wurde zweimal mit 4 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Inositolphosphate wurden mit 3 ml 1M HCl eluiert. Nach Zugabe von 12 ml Szintillator (Lumac LSC) wurden die radioaktiv markierten Inositolphosphate im  $\beta$ -Counter LS 1801 (Beckman) gemessen. Von den drei Messwerten einer Dreifachbestimmung wurde der Median für die weitere statistische Auswertung herangezogen. Aus mehreren unabhängigen Experimenten wurden Mittelwerte und Standardfehler ermittelt und als Säulendiagramme dargestellt. Eine ANOVA der zu vergleichenden Werte mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wurde durchgeführt. In einer post-hoc-Analyse nach Bonferroni wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Mittelwerten als signifikant ( $p < 0,05$ ), als hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) oder nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) eingestuft und entsprechend gekennzeichnet.

## **Phosphorylierung von Proteinen in HEK 293-Zellen**

Die Phosphorylierung von Proteinen in intakten Zellen setzt voraus, dass radioaktives <sup>32</sup>Phosphor die Zellmembran permeiert. Dies muss mit [<sup>32</sup>P]Phosphat im Zellkulturmedium durch entsprechende Vorinkubation geschehen. In den Zellen wird [<sup>32</sup>P]Phosphat in [<sup>32</sup>P]ATP umgewandelt, welches dann unter anderem als Substrat endogener Kinasen in der Proteinphosphorylierung genutzt wird.

Die *in vivo*-Phosphorylierung von PhLP und Phosducin erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll von Malecz, et al. (1998). 42 Stunden nach der transienten Transfektion und 26 Stunden nach der Aussaat auf 6-Wellplatten wurden die HEK 293-Zellen mit serum- und phosphatfreiem Medium (supplementiert mit 20 mM HEPES, pH 7,4) gewaschen und darin für 30 Minuten inkubiert. Die Markierung des intrazellulären ATP-Pools erfolgte dann in diesem Medium mit einer [<sup>32</sup>P]Phosphat-supplementierung (200  $\mu$ Ci/ ml Aktivität) bei 30°C für weitere 2 Stunden. Wie gekennzeichnet wurde in einigen Experimenten eine Stimulation des kotransfizierten muscarinergen M<sub>3</sub>-Rezeptors mit 1 mM Carbachol für 5 Minuten durchgeführt. Um

die endogenen Reaktionen zu stoppen, wurden die 6-Wellplatten auf Eis plziert, das radioaktive Medium abgesaugt, und die Zellen mit eiskaltem PBS (1 x 1 ml pro Well) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 1 ml Lysepuffer für die Immunpräzipitation phosphorylierter Proteine lysiert. Dieser Puffer enthält neben Detergenzien und Proteaseinhibitoren auch Phosphatase-Hemmstoffe. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit Drehverschluß überführt und durch Zentrifugation (20 000 x g für 15 Minuten bei 4°C) von der Triton X-100-unlöslichen Fraktion getrennt. Es folgte die Immunpräzipitation mit Hilfe der entsprechenden Antikörper, gekoppelt an Protein G-Sepharose, wie unter „Präzipitation von Proteinen“ beschrieben. Die weitere Analyse (SDS-PAGE, Färben / Fixieren, Detektion / Quantifizierung) erfolgte wie unter „Radioaktive Phosphorylierung rekombinanter Proteine“ beschrieben.

## **Messung von G-Protein gesteuerten Kaliumströmen in Zellen**

Die Messung der zellulären Kaliumströme wurde mit Hilfe der Patch Clamp Technik durchgeführt, die 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann als eine Verfeinerung der Spannungsklemme (Voltage Clamp) entwickelt worden war, um Strom in einzelnen Ionenkanälen zu messen. Für diese Entwicklung wurde ihnen 1991 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen.

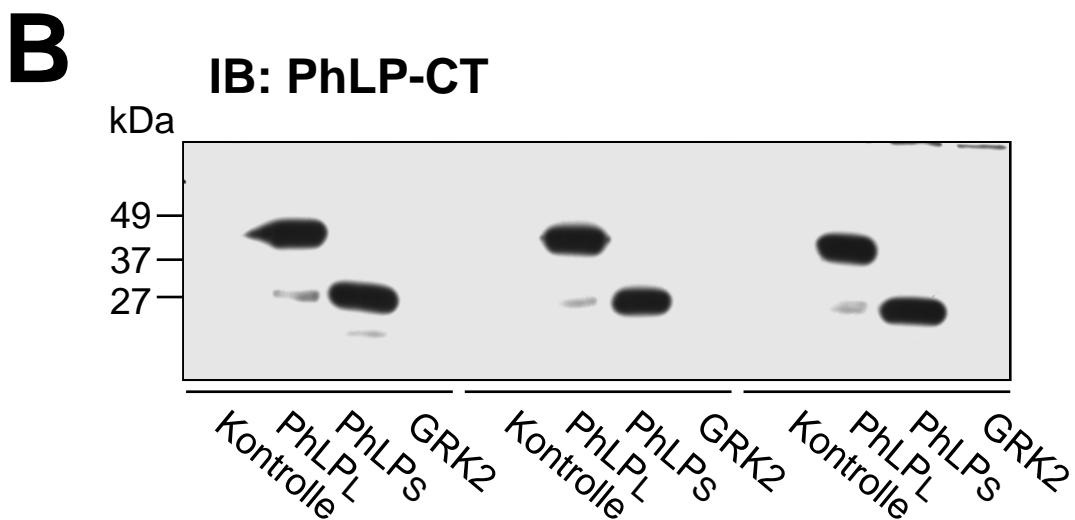
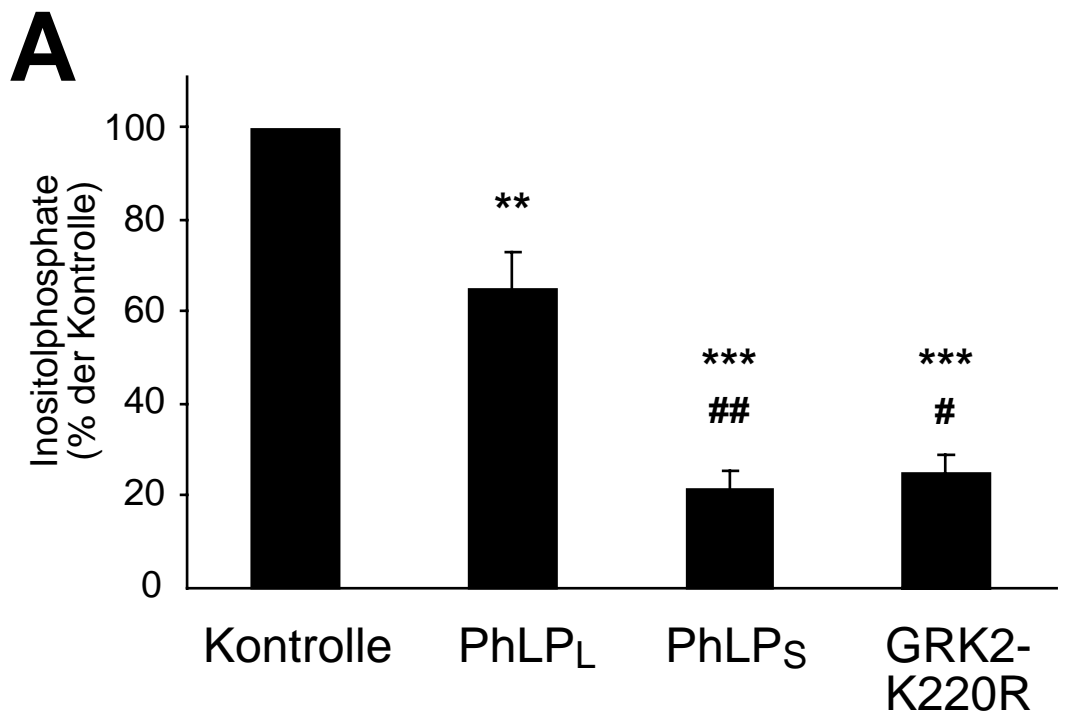
Die Messung der Membranströme wurde hier an HEK 293-Zellen durchgeführt, die den Kaliumkanal GIRK mit seinen Untereinheiten 1 und 4 stabil überexprimierten (HEK 293-GIRK1/4). Dieser Kanal wird über G-Protein  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert (siehe Einleitung). Die Zellen wurden zunächst zusätzlich transient mit cDNA für den adrenergen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor (0,2  $\mu\text{g}$ ) und für PhLP<sub>s</sub> (0,6  $\mu\text{g}$ ), beziehungsweise Kontroll-Plasmid, nach der Effectene®-Methode transfiziert. Kotransfektion von 0,2  $\mu\text{g}$  CD8-cDNA diente als Transfektionsreporter-System (Jurman, et al., 1994). Hierbei exprimieren transfizierte Zellen das lymphozytäre Oberflächenantigen CD8. Nach Zugabe von Antikörper-beschichteten Polystyren-Mikrosphären (Dynabeads, Dynal; 4,5  $\mu\text{m}$  Durchmesser) bleiben diese an transfizierten Zellen kleben und machen sie unter dem Mikroskop leicht detektierbar. Die Messung der Kaliumströme wurde als

konventionelle Whole-Cell Patch Clamp-Konfiguration durchgeführt und orientierte sich an den Beschreibungen von Hamill et al. (1981) und Hommers et al. (2003): Zunächst wurden Borosilikat-Glaskapillaren (GF-150-10, Warner Instrument Corp.), die an einem horizontalen Glas-Puller (P-95, Fleming & Poulsen) an einer Seite ausgezogen worden waren, mit internem Patch Clamp-Puffer befüllt und mit der Spitze auf eine transfizierte Zelle (in externem Patch Clamp-Puffer) gesetzt (On-Cell Konfiguration). Durch kurzen Unterdruck in der Kapillare kam es unter der Kapillarenspitze zu einem Loch in der Plasmamembran und es entstand die Whole-Cell Konfiguration. Der Abdichtungswiderstand der Kapillare rangierte hierbei zwischen 3-6 M $\Omega$ . Der Kaliumstrom  $I_K$  wurde als Einwärtsstrom bei einem Haltepotential von -90 mV im Basalzustand und nach Stimulation mit 1  $\mu$ M Noradrenalin gemessen. Die abschließende Bariumblockade macht die GIRK-Ströme unterscheidbar von anderen Strömen im Hintergrund. Die Ströme wurden verstärkt (Axopatch 200, Axon Instruments) und digital aufgezeichnet. Die Steuerung erfolgte mit dem Hardware/Software-Paket ISO2 (MFK). Um das Strom-Spannungsverhältnis zu determinieren, wurden sogenannte Spannungsrampen von -120 bis +60 mV innerhalb von 500 ms durchgeführt und alle 10 Sekunden wiederholt. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, die zusammengefassten Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt, und Unterschiede mittels Student's t-Test auf Signifikanz getestet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Molekulare Klonierung und initiale Charakterisierung der Splice-Varianten von Phosducin-like Protein (PhLP)

Um die Funktion der beiden Splice-Varianten von PhLP in intakten Zellen untersuchen zu können, wurde die cDNA mit Hilfe der Primer BamHIPhLP<sub>L</sub>fwd, BamHIPhLP<sub>S</sub>fwd und EcoRIPhLP<sub>Prev</sub> vermehrt (PCR) und in pcDNA3 (Invitrogene) in die entsprechende Klonierungsstelle eingebracht. Die cDNA wurde ursprünglich aus dem reversen Transkriptat von Rattehirn-RNA gewonnen (beschrieben von Schröder und Lohse, 1996, SwissProt-Zugangsnummer: Q63737). Mit Hilfe des eukaryotischen Expressionssystems konnten nun Kulturzellen transfiziert und untersucht werden. Folgendes Assay-System wurde hierzu etabliert: Gleichzeitig mit der cDNA für PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> oder entsprechenden Kontrollproteinen wurde cDNA von humanem Gβ<sub>1</sub>, von bovinem Gγ<sub>2</sub> und von humaner PLCβ<sub>2</sub> (jeweils auch in pcDNA3) in Humane Embryonale Kidney 293 (HEK 293)-Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Nach Beladung der Zellen mit <sup>3</sup>H-markiertem Inositol, konnte die Bildung von Inositolphosphaten durch die aktivierte PLCβ<sub>2</sub> bestimmt werden (die Methode folgt der Beschreibung nach Xu, et al., 1995, und Qwitterer und Lohse, 1999). Hierbei zeigte sich, dass ohne die Kotransfektion eines Gβγ-regulierenden Proteins, (nur leeres Plasmid, um die Gesamtmenge transfizierter DNA konstant zu halten), die basale Inositolphosphat-Produktion um etwa das fünffache stimuliert werden konnte (im Vergleich zu vollständig scheintransfizierten Zellen, siehe hierzu auch Abb. 18B). Transfizierte man allerdings die cDNA von PhLP<sub>L</sub> hinzu, konnte die Generierung von Inositolphosphaten signifikant gehemmt werden (Abb. 6A). Unerwarteter Weise hemmte die kurze Splice-Variante PhLP<sub>S</sub> die Inositolphosphat-Produktion in den Zellen effektiver als die lange Isoform PhLP<sub>L</sub>. Dies steht im Widerspruch mit den bisher veröffentlichten Daten aus *in vitro*-Systemen (Schröder und Lohse, 2000): Untersuchungen an gereinigten Komponenten hatten gezeigt, dass PhLP<sub>S</sub> eine etwa 15-fach geringere Affinität zur Gβγ-Untereinheit im Vergleich zu PhLP<sub>L</sub> aufweist. Unter den hier durchgeführten



**Abb. 6: Hemmung der G $\beta$  $\gamma$ -stimulierten Inositolphosphatproduktion in HEK 293-Zellen.** A: HEK 293-Zellen wurden mit je 8  $\mu$ g cDNA von PhLP<sub>L</sub>, PhLP<sub>S</sub>, GRK2-K220R oder leerer Plasmid-DNA (Kontrolle) zusammen mit jeweils 3  $\mu$ g cDNA von G $\beta$ <sub>1</sub>, G $\gamma$ <sub>2</sub> und PLC $\beta$ <sub>2</sub> transient in einer 10 cm-Schale transfiziert. Inositolphosphat-Spiegel wurden 42 h später analysiert (\*\*\*,  $p < 0,001$  und \*\*,  $p < 0,01$  versus Kontrolle; ##,  $p < 0,01$  und #,  $p < 0,05$  versus PhLP<sub>L</sub>). B: Western Blot dreier unabhängiger Inositolphosphat-Experimente, die die Proteinexpression von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> nach der Transfektion vergleicht.

Bedingungen war die Hemmung durch PhLP<sub>S</sub> nahezu vollständig, berücksichtigt man die Tatsache, dass etwa 20% des Signals bereits als Hintergrund vorhanden war. Als Positiv-Kontrolle wurde die Kinase-defiziente Mutante der GRK2 (GRK2-K220R) eingesetzt, ein Protein mit bekannten starken Gβγ-bindenden Eigenschaften (Dicker et al., 1999). Während die Messung keine Unterschiede zwischen PhLP<sub>S</sub> und GRK2-K220R aufzeigte, war die Differenz zwischen PhLP<sub>L</sub> einerseits und PhLP<sub>S</sub> bzw. GRK2-K220R andererseits signifikant (Abb. 6A).

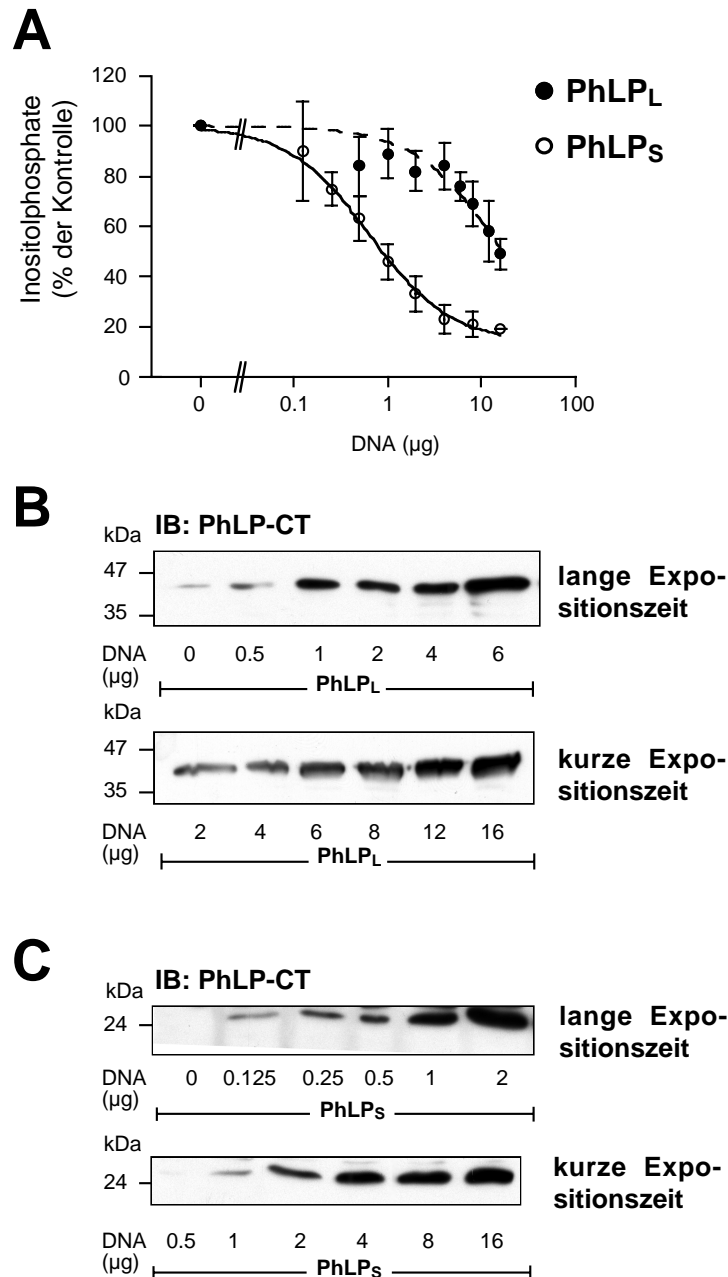
Um auszuschließen, dass die funktionellen Unterschiede zwischen PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> auf Unterschiede in der Protein-Expression zurückzuführen sind, wurde die PhLP-Expression jeder Transfektion in parallel zur funktionellen Messung ausgesäten Zellen mittels Western Blot bestimmt. Hierzu machte man sich zu Nutze, dass der Antikörper PhLP-CT gegen die C-terminalen 11 Aminosäuren von PhLP gerichtet ist. Anders als bei einer Proteinfärbung spielt daher die unterschiedliche Größe der Proteine (nämlich 34 kDa bzw. 25 kDa) bei der Signalstärke keine Rolle. Abb. 6B zeigt einen Blot mit drei unabhängigen Experimenten (Transfektionen). Innerhalb eines Experiments und ebenso innerhalb der Versuchsserie war die Expression von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> stets vergleichbar (die Intra-Assay- und Inter-Assay-Variation war gering). Die funktionellen Unterschiede lassen sich nicht durch eine höhere Expression von PhLP<sub>S</sub> erklären. Tab. 4 fasst die Ergebnisse zusammen.

<b>Inositolphosphat-Produktion</b>	<b>PhLP<sub>L</sub></b>	<b>PhLP<sub>S</sub></b>	<b>GRK2-K220R</b>
Hemmung um	32,2 %	78,3 %	75,0 %
Standardfehler	± 8,4 %	± 3,8 %	± 4,0 %
n	13	7	3
IC <sub>50</sub>	13,3 µg	0,64 µg	n.b.

**Tab. 4:** Hemmung der Inositolphosphat-Produktion

Um die Hemmung der Inositolphosphate durch PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> genauer zu charakterisieren, wurden Dosis-Wirkungs-Experimente durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA der beiden Proteine schrittweise mit leerer Plasmid-DNA verdünnt (konstante Gesamt-DNA-Menge). Wie in Abb. 7A und Tab. 4 zu sehen, liegt der

IC<sub>50</sub>-Wert für PhLP<sub>L</sub> etwa 20-fach höher als der für PhLP<sub>S</sub>. Abb. 7B und C zeigen, dass die Protein-Expression bei beiden Proteinen direkt mit der Menge an transient transfizierter DNA korreliert.



**Abb. 7: Dosis-Wirkungskurve der Inositolphosphat-Hemmung von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub>.** A: HEK 293-Zellen wurden mit den angegebenen Dosen an PhLP<sub>L</sub>- bzw. PhLP<sub>S</sub>-cDNA transfiziert. Der IC<sub>50</sub>-Wert von PhLP<sub>L</sub> liegt hierbei etwa 20-fach über dem Wert von PhLP<sub>S</sub> (siehe Tabelle 4). B und C: Western Blot-Analyse der Proteinexpression von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> bei aufsteigenden Konzentrationen an cDNA. Um die ganze Breite der Expression auf Film darzustellen, wurden unterschiedliche Expositionszeiten herangezogen (lang: 5 Minuten; kurz: 1 Minute).

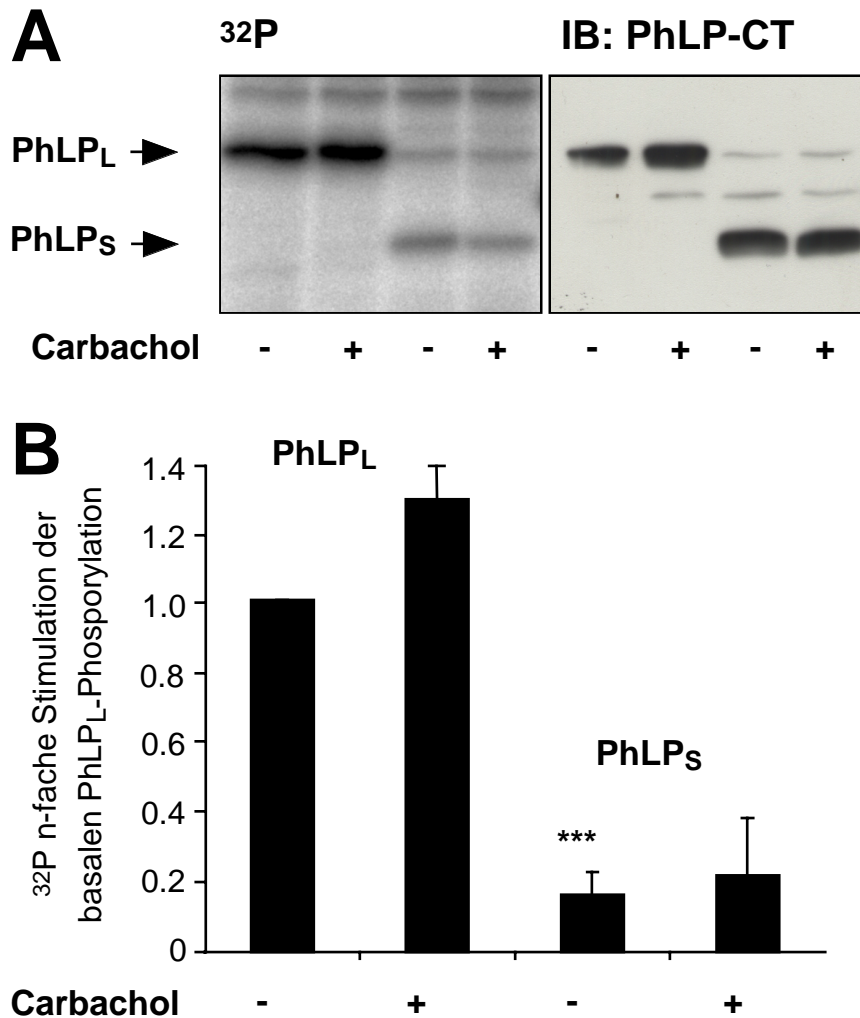


## 3.2. PhLP<sub>L</sub> wird in Zellen durch Casein Kinase 2 phosphoryliert und reguliert

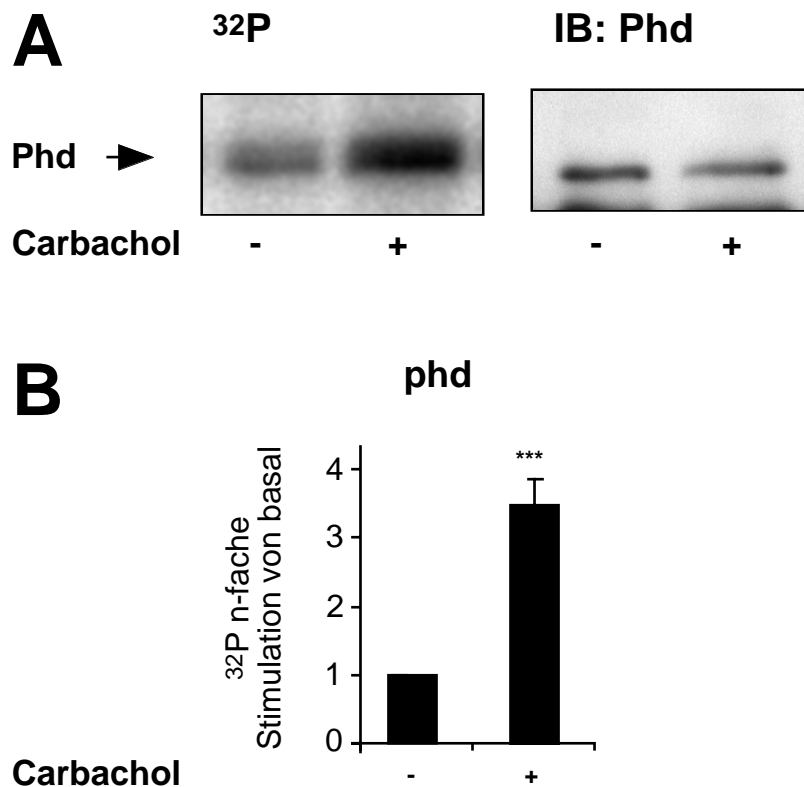
### Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> in intakten HEK 293-Zellen

Wie eingangs erwähnt, wird die Affinität des homologen Proteins Phosducin zu Gβγ durch Phosphorylierung signifikant vermindert. Es wurde daher angenommen, dass möglicherweise die in intakten Zellen deutlich reduzierte Gβγ-Hemmung bei PhLP<sub>L</sub> ebenso durch Phosphorylierung beeinflusst sein könnte. HEK 293 Zellen wurden daher nach der transienten Transfektion mit [<sup>32</sup>P]Orthophosphat beladen. Um den Einfluss eines Rezeptor-Signals auf den Phosphoryierungsgrad der Proteine zu untersuchen wurde cDNA des M<sub>3</sub>-muskarinergen Acetylcholin-Rezeptors (M<sub>3</sub>-Rz) kotransfiziert. Dieser Rezeptor vermittelt nach Stimulierung mit Carbachol (ein Muskarin-Rezeptor-Agonist) ein prominentes Inositolphosphat-Signal in HEK 293 Zellen (siehe Abb. 16B). Achtundvierzig Stunden nach Transfektion und zwei Stunden nach radioaktiver Beladung wurden die Zellen für fünf Minuten mit Carbachol stimuliert, dann auf Eis lysiert. PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> bzw. in Kontroll-experimenten Phosducin wurden mit Hilfe der entsprechenden Antikörper präzipitiert und gewaschen. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE konnte die spezifisch eingebaute Radioaktivität durch die Phosphor-Imager-Einheit visualisiert und quantifiziert werden (Abb. 8 und 9). Das Ergebnis dieses Versuchs war: PhLP<sub>L</sub> zeigt einen signifikant höheren Einbau (8-fach) an <sup>32</sup>P-Phosphat als PhLP<sub>S</sub> im nicht stimulierten Zustand. Dabei zeigte sich auch, dass sich der Grad der Phosphorylierung beider Proteine durch die Stimulierung des M<sub>3</sub>-Rezeptors nicht signifikant steigern ließ (Abb. 8A und B). Bei dem homologen Protein Phosducin hingegen ist der Einbau an <sup>32</sup>P-Phosphat deutlich abhängig von der Aktivität des M<sub>3</sub>-Rezeptors (Abb. 9A und B). Diese Befunde sind im Einklang mit der Beobachtung, dass die Phosducin-Phosphorylierung von Kalzium-abhängigen Signalwegen stimuliert werden kann (Thulin et al., 2001). Die Unterschiede in der Phosphorylierbarkeit von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub>, ebenso wie von Phosducin selbst zeigt, dass die drei Proteine dieser Subfamilie (G-Protein-Regulatoren) durchaus unterschiedliche funktionelle Aufgaben erfüllen. PhLP<sub>L</sub> wird also in intakten HEK 293-

Zellen konstitutiv phosphoryliert. Dies könnte erklären, warum bei der Inhibition der G $\beta$  $\gamma$ -abhängigen Inositolphosphat-Produktion PhLP<sub>L</sub> deutlich schlechter war als PhLP<sub>S</sub>, welches in Zellen nicht bzw. kaum phosphoryliert zu sein scheint.



**Abb. 8: PhLP<sub>L</sub> wird in intakten HEK 293-Zellen konstitutiv phosphoryliert.** Transient transfizierte HEK 293-Zellen (2  $\mu$ g M<sub>3</sub>-muskarinischer Acetylcholinrezeptor und 8  $\mu$ g PhLP<sub>L</sub> bzw. PhLP<sub>S</sub>) wurden mit [<sup>32</sup>P]Orthophosphat beladen. Ein Teil der Zellen wurde mit dem M-Rezeptoragonisten Carbachol (1mM) für 5 Min. stimuliert. Anschließend wurden die PhLP-Isoformen mit einem Antikörper präzipitiert und im Gel aufgetrennt. A, linker Teil, zeigt die Visualisierung des <sup>32</sup>P-Einbaus in die präzipitierten PhLP-Isoformen vor und nach Stimulierung mit Carbachol (1mM), und A, rechter Teil, zeigt die Expression der Isoformen in den korrespondierenden Zelllysaten. B: quantitative Auswertung des <sup>32</sup>P-Einbaus in PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> (mit und ohne Carbachol-Stimulierung) von drei bis fünf unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Während Rezeptorstimulation keine signifikante Änderung der Phosphorylierung bewirkte, fiel die 8-fach höhere Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> gegenüber der von PhLP<sub>S</sub> auf (\*\*\*, p < 0,001 versus PhLP<sub>L</sub>, nicht stimuliert).



**Abb. 9: Die Phosducin-Phosphorylierung wird durch den M<sub>3</sub>-muskarinischen Rezeptor stimuliert.** Das homologe Protein Phosducin wurde zum Vergleich wie PhLP in Abb. 8 in HEK 293-Zellen transfiziert, und diese mit [<sup>32</sup>P]Orthophosphat beladen und mit Carbachol stimuliert. A, linker Teil, zeigt die Visualisierung des <sup>32</sup>P-Einbaus in das präzipitierte Phosducin (Phd) und A, rechter Teil, zeigt die präzipitierte Menge an Phosducin im Immunoblot. B: Quantifizierung des <sup>32</sup>P-Einbaus in Phosducin vor und nach Stimulation mit Carbachol (100 µM). Phosducin liegt zum Teil basal phosphoryliert vor, die Stimulation führt zur 3,5-fachen Zunahme des <sup>32</sup>P-Einbaus in Phosducin (\*\*\*, p < 0,001 versus nicht-stimuliert).

## Casein Kinase 2 (CK2) ist die verantwortliche Kinase der PhLP<sub>L</sub>-Phosphorylierung in HEK 293-Zellen

Um die verantwortliche Kinase für die PhLP<sub>L</sub>-Phosphorylierung zu identifizieren, wurde eine Computer-gestützte Analyse (über ScanProsite) der N-terminalen 83 Aminosäuren von PhLP<sub>L</sub> durchgeführt. Hierbei wurden sieben potentielle CK2-Phosphorylierungsstellen vorgeschlagen. Diese lagen jeweils innerhalb eines klassischen CK2-Phosphorylierungsmotivs [S/T]-X-X-[D/E] (siehe auch Abb. 11A). CK2 ist eine konstitutiv aktive Serin/Threonin-Kinase, die ubiquitär in Säugern exprimiert wird (Allende und Allende, 1995, Pinna und Meggio, 1997). Zunächst wurde nun getestet, ob PhLP<sub>L</sub> tatsächlich Substrat von CK2 sein konnte. Hierzu wurden rekombinante, aus *E. coli* gereinigte Proteine durch humane rekombinante CK2 (Roche) phosphoryliert (Abb. 10A). Hierbei zeigte sich, dass PhLP<sub>L</sub> tatsächlich ein Substrat von CK2 war, dass aber PhLP<sub>S</sub> deutlich schwächer und Phosducin gar nicht durch CK2 phosphoryliert werden konnte. Weiterhin wurde der Einfluss des potenten, aber unspezifischen Kinaseinhibitors Staurosporin<sup>1</sup> (Ruegg und Burgess, 1989), und des intrazellulären Kalzium-Chelators BAPTA-AM (Billman, 1993, Jiang et al., 1994) auf die Funktion der rekombinanten CK2 untersucht. Hier zeigten sich keine Effekte auf die PhLP<sub>L</sub>-Phosphorylierung (Abb. 10A). Weiterhin wurden zwei Substanzen getestet, von denen bekannt war, dass sie CK2 inhibieren konnten: a) das Gycosaminoglycan Heparin (IC<sub>50</sub> ~ 3 nM nach Allende und Allende, 1995, Block et al., 2001), und b) das Nukleosid-Derivat 5,6-Dichloro-1-β-D-Ribofuranyl-Benzimidazol (DRB, IC<sub>50</sub> ~ 7 μM nach Zandomeni, 1989, Kim und Kahn, 1997). Im *in vitro*-Assay konnten 3 μM Heparin die Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> durch CK2 vollständig, und 100 μM DRB die Phosphorylierung deutlich (ca. um 50 %) inhibieren (Abb. 10A). Um zu demonstrieren, dass CK2 auch in HEK 293 Zellen die verantwortliche Kinase war, wurde die Phosphorylierung von rekombinanten PhLP<sub>L</sub> nun mit Lysaten aus untransfizierten HEK 293-Zellen durchgeführt (Abb. 10B). Aus der Literatur ist bekannt, dass sich in Zelllysaten von Säugerzellen große Mengen an CK2-Aktivität finden lassen (Lin et al., 1992, Allende und Allende, 1995). Da sowohl Heparin, als auch DRB nicht in ausreichenden Maße in intakte Zellen gelangt,

---

<sup>1</sup> Der Calbiochem Katalog 2002/2003 nennt folgende IC<sub>50</sub>-Werte: CaM-Kinase (20 nM), Myosin Light Chain Kinase (1,3 nM), PKA (7 nM), PKC (0,7 nM) und PKG (8,5 nM).

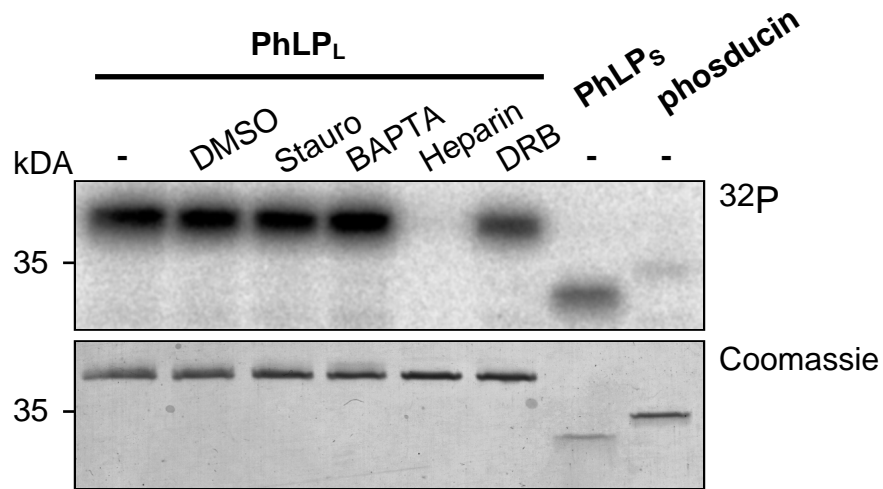
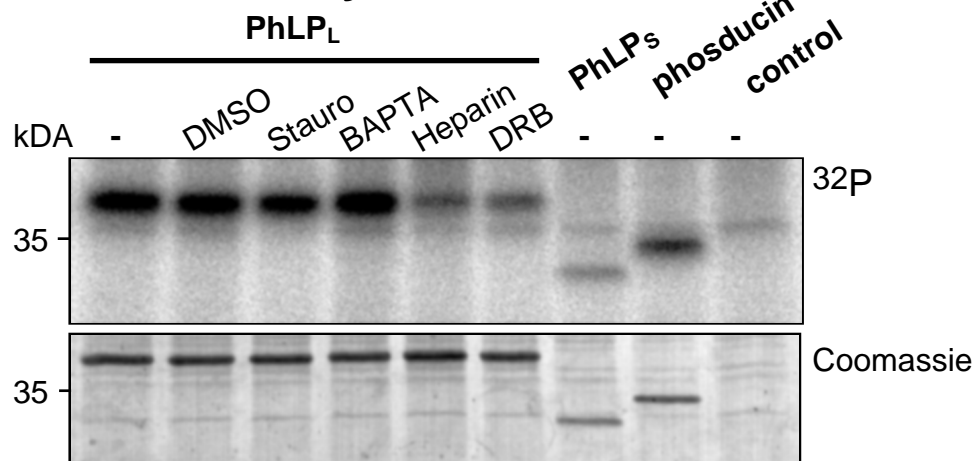
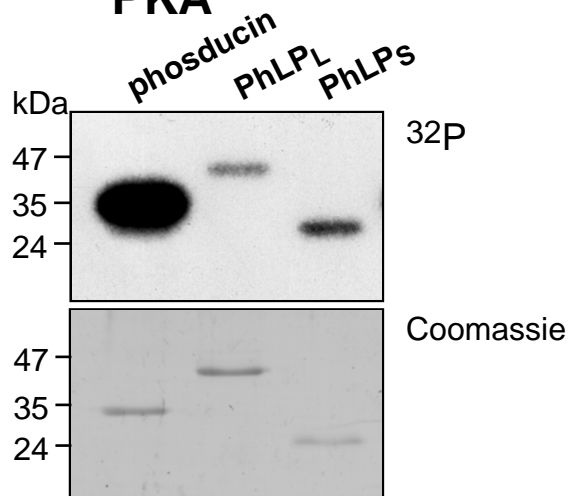
musste der Versuch an lysierten Zellen durchgeführt werden. Unter diesen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass vor allem PhLP<sub>L</sub>, nicht aber PhLP<sub>S</sub> oder Phosducin durch die Kinasen des Zelllysates phosphoryliert wurden. Diese „Lysat-Kinasen“ ließen sich in derselben Weise inhibieren wie auch rekombinante CK2: Staurosporin und BAPTA-AM hatten keinen Einfluss, Heparin (3 µM) und DRB (100 µM) inhibierten deutlich die PhLP<sub>L</sub>-Phosphorylierung (Abb. 10B). Diese Daten sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass tatsächlich CK2 die dominante Kinase war, die in HEK 293-Zellen für die konstitutive Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> verantwortlich gemacht werden kann.

### **PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> sind kein Substrat von PKA**

Das homologe Protein Phosducin wird an Serin 73 durch Protein Kinase A (PKA) phosphoryliert und reguliert (siehe hierzu Lee et al., 1990, Bauer et al., 1992, Gaudet et al., 1999). Es stellte sich die Frage, ob auch die PhLP-Isoformen tatsächlich ein Substrat der PKA sein könnten, da eine PKA-Konsensus-Stelle in beiden Isoformen prinzipiell vorhanden ist (Aminosäure 117 bis 121 in PhLP<sub>L</sub>: GKMT\*L). Hierzu wurden PKA Kinase-Assays sowohl mit rekombinantem PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub>, als auch mit dem bekannten Substrat Phosducin durchgeführt, jeweils in der gleichen Konzentration von 400 nM (Abb. 10C). Wie erwartet, war Phosducin ein exzellentes Substrat für PKA, während sowohl PhLP<sub>L</sub>, als auch PhLP<sub>S</sub> nur sehr geringe Mengen an radioaktivem Phosphat inkorporierten (ungefähr 10 bis 20-fach geringer). Es wurde daher der Schluss gezogen, dass beide PhLP-Isoformen keine physiologischen Substrate für die cAMP-regulierte PKA darstellen.

### **Identifizierung einer kleinen regulatorischen Region im N-Terminus von PhLP<sub>L</sub>**

In einem nächsten Schritt sollte die Frage beantwortet werden, ob sich eine bestimmte Region, die sowohl für die konstitutive Phosphorylierung, als auch für die

**A****Casein Kinase 2****B****HEK-Zellysat****C****PKA**

**Abb. 10: Phosphorylierung von Phosducin und PhLP durch rekombinante Casein Kinase 2, durch HEK-Zelllysate und durch PKA.** Äquimolare Konzentrationen (400 nM) an rekombinatem C-terminal His<sub>6</sub>-getagtem PhLP<sub>L</sub> (14,04 µg/ml), PhLP<sub>S</sub> (10,3 µg/mg) und Phosducin (11,62 µg/ml) wurden entweder mit Casein Kinase 2, HEK Zelllysaten oder der katalytischen Untereinheit von PKA inkubiert. A: Mit rekombinanter humaner CK2 (0,04 Units/Reaktionansatz) wurden PhLP<sub>L</sub>, PhLP<sub>S</sub> und Phosducin bei 30°C für 30 Min. phosphoryliert. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Coomassie Blaufärbung (*Coomassie*), wurde das Gel durch die Phosphorimaging-Einheit visualisiert (<sup>32</sup>P). Während PhLP<sub>L</sub> durch CK2 effizient phosphoryliert werden konnte, wurde PhLP<sub>S</sub> nur schwach (21% von PhLP<sub>L</sub>) und Phosducin gar nicht (2% von PhLP<sub>L</sub>) phosphoryliert. Folgende Konzentrationen für die Kinaseinhibitoren wurden verwendet: 1 µM Staurosporin (*Stauro*), 100 µM BAPTA-AM (*BAPTA*), 3 µM Heparin und 100 µM DRB. DMSO (1% V/V) diente als Lösungsmittelkontrolle. B: HEK-Zelllysate (hergestellt wie unter Material und Methoden beschrieben) wurden zum Phosphorylieren von rekombinanten PhLP<sub>L</sub>, PhLP<sub>S</sub> und Phosducin herangezogen. Bei der Phosphorylierung durch PhLP<sub>L</sub> wurden dieselben Inhibitoren benutzt wie unter A. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine mittels Ni-NTA-Agarose präzipitiert, gewaschen und im SDS-PAGE aufgetrennt. Gefärbtes Gel (*Coomassie*) und <sup>32</sup>P-Einbau (<sup>32</sup>P) sind gegenübergestellt. In der Kontrolle ist kein rekombinantes Protein zugesetzt und stellt die Hintergrundphosphorylierung dar. PhLP<sub>L</sub> wurde durch HEK-Zelllysate deutlich phosphoryliert. Diese Phosphorylierung konnte durch die CK 2-Inhibitoren Heparin und DRB gehemmt werden, aber nicht durch den Breitspektrum-inhibitor Staurosporin oder den Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA. C: Rekombinantes Phosducin, PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> wurden durch die katalytische Untereinheit von PKA (100 Einheiten) bei 30°C für 15 Min phosphoryliert. Die Reaktionen wurden mit Laemmli-Puffer gestoppt und im Gel aufgetrennt (*Coomassie*). Die radioaktive Phosphorylierung wurde auf einem Film visualisiert (<sup>32</sup>P). PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> sind im Gegensatz zu Phosducin keine suffizienten Substrate von PKA .

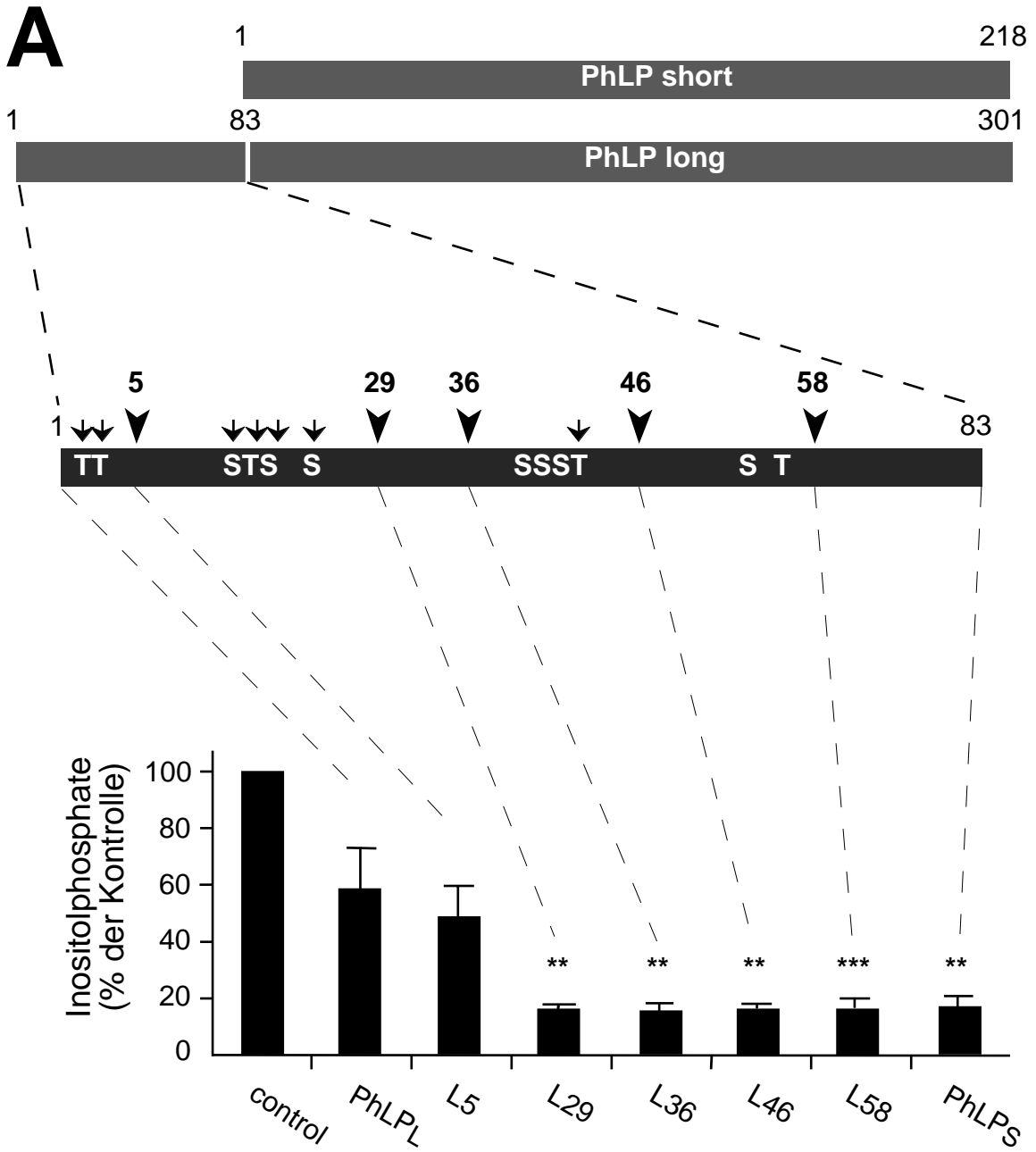
verminderte Hemmfunktion von PhLP<sub>L</sub> verantwortlich ist, näher eingrenzen lässt. Wie in Abb. 11 A (oberer Teil) dargestellt, befinden sich in den 83 N-terminalen Aminosäuren von PhLP<sub>L</sub> mehrere Cluster von Serinen und Threoninen. Darunter sind sieben CK2-Konsensus-Stellen, die potentiell alle wichtig sein könnten. Der N-Terminus von PhLP<sub>L</sub> wurde deshalb schrittweise verkürzt, so dass Konstrukte entstanden, die jeweils ein Serin/Threonin-Cluster weniger beinhalten. Diese

Konstrukte wurden folgendermaßen bezeichnet: L5 (Aminosäuren 5-301 in PhLP<sub>L</sub>), L29 (Aminosäuren 29-301), L36 (Aminosäuren 36-301), L46 (Aminosäuren 46-301) und L58 (Aminosäuren 58-301). Die Ergebnisse der Inositolphosphat-Bestimmung in HEK 293-Zellen zeigten, dass der entscheidende Schritt in der Zunahme der Gβγ-hemmenden Funktion durch den Verlust der Region zwischen Aminosäure 5 und 28 verursacht wurde (Abb 11A, unterer Teil). Die Western-Analyse demonstrierte, dass alle Konstrukte (mit Ausnahme von L5) stabil und die Expressionsstärken vergleichbar waren (Abb. 11B).

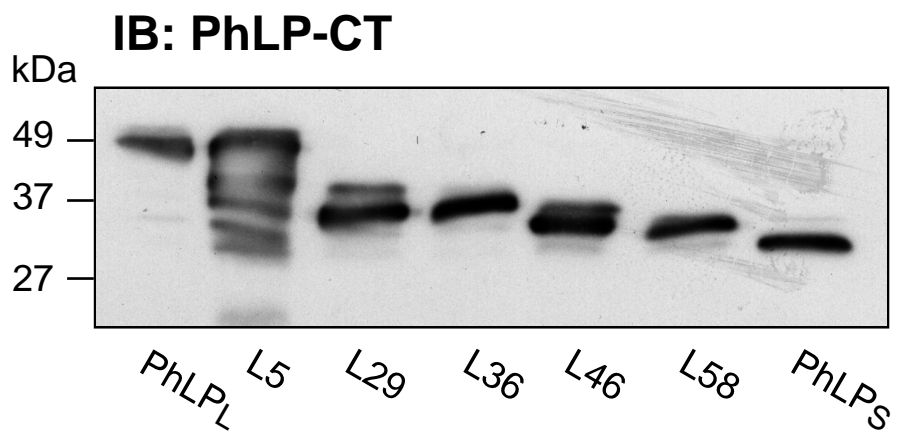
### **Effekt der gezielten Mutation von Serin 18, Threonin 19 und Serin 20**

Als nächster Schritt sollte untersucht werden, ob die vier putativen CK2-Phosphorylierungsstellen in der Region von Aminosäure 5 bis 28 (S18, T19, S20, S25) die entscheidende funktionelle Rolle spielten, und welche der Kandidaten hierfür verantwortlich sein könnten. Es wurden daher zwei Mutanten mit Hilfe PCR-basierter Mutagenese konstruiert: PhLP<sub>L</sub>A25, bei der Serin 25 durch Alanin ausgetauscht wurde, und PhLP<sub>L</sub>A18-20, in der Serin 18, Threonin 19 und Serin 20 jeweils durch Alanine ersetzt wurden (siehe auch Abb.11A). Diese Mutanten wurden dann wiederum daraufhin getestet, ob sie die zelluläre Gβγ-abhängige Inositolphosphat-Generierung inhibieren konnten. Hier zeigte sich, dass PhLP<sub>L</sub>A18-20 die gleiche inhibitorische Fähigkeit wie PhLP<sub>S</sub> oder das Konstrukt L29 besaß (Abb. 12A). Die Mutante PhLP<sub>L</sub>A25 allerdings konnte nur eine eingeschränkte Hemmung vermitteln, vergleichbar mit der von wildtypischem PhLP<sub>L</sub>. Die Unterschiede zwischen PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>L</sub>A25 auf der einen Seite und PhLP<sub>S</sub>, PhLP<sub>L</sub>A18-20 und L29 auf der anderen Seite waren in dieser Versuchsserie signifikant. Die Expression aller Konstrukte war wiederum vergleichbar (Abb. 12B). Diese Daten ließen vermuten, dass das Cluster S18, T19, S20 die entscheidenden Phosphorylierungsstellen beinhaltete, die für die verminderte Funktion von PhLP<sub>L</sub> in HEK 293 Zellen verantwortlich waren.



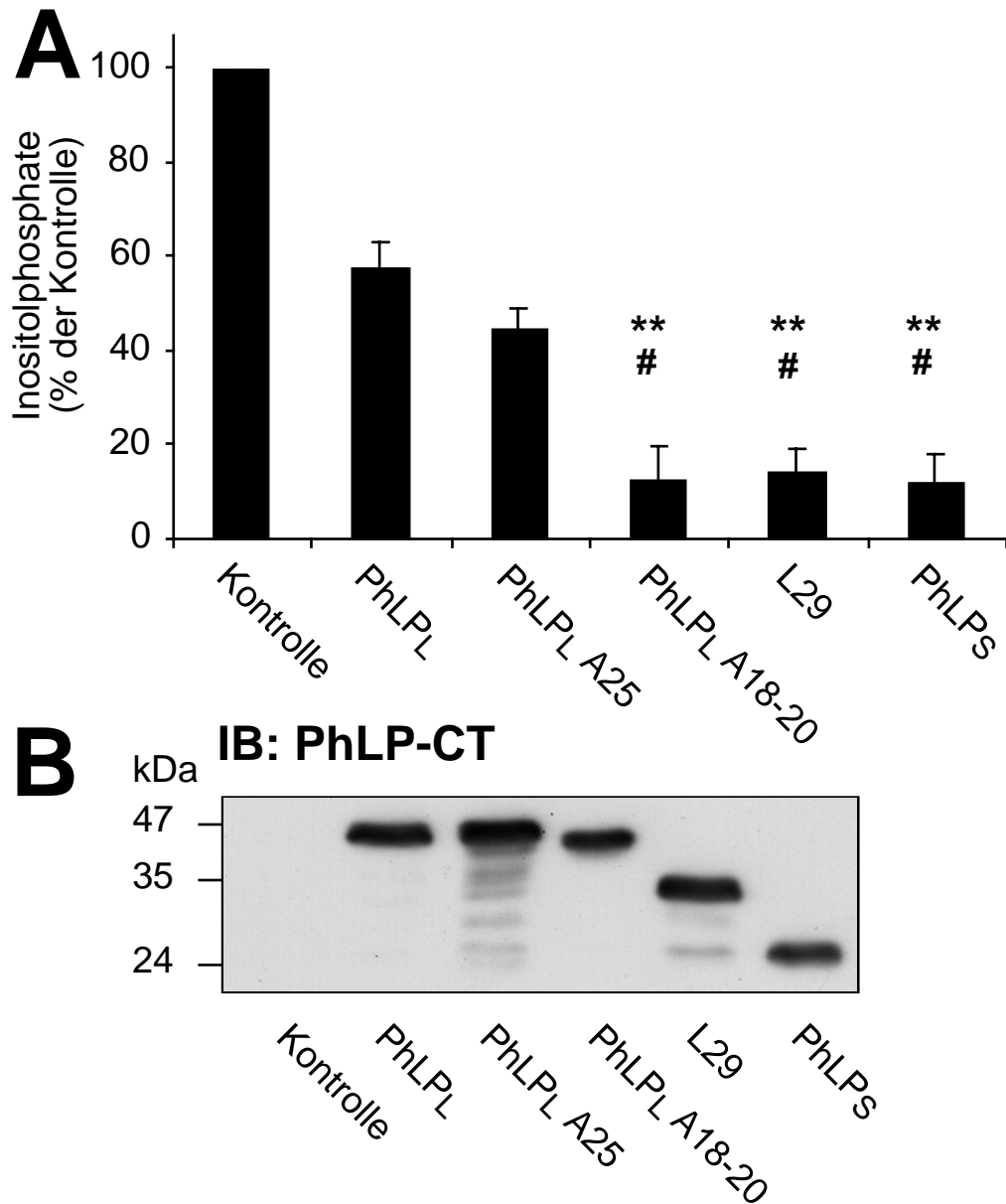


**B**



**Abb. 11: Schrittweise Trunkierung des PhLP<sub>L</sub>-N-Terminus zur Eingrenzung der regulatorischen Region.** A: Der verlängerte N-Terminus in PhLP<sub>L</sub> besitzt mehrere Cluster möglicher Phosphorylierungsstellen (oberer Teil der Abbildung; S, Serine, und T, Threonine). Pfeile markieren die möglichen CK2-spezifischen Angriffspunkte, Pfeilköpfe und Zahlen diejenigen Aminosäuren, die sich C-terminal der Schnittstellen in PhLP<sub>L</sub> befinden. Die Deletion der ersten 28 Aminosäuren war ausreichend, um in der Inositolphosphat-Messung für PhLP<sub>L</sub> den vollen G $\beta$  $\gamma$ -inhibierenden Effekt wie bei PhLP<sub>S</sub> zu erzielen (Konstrukte L29, L36, L46, L58 im unteren Teil der Abbildung). Hingegen war die Entfernung der ersten vier Aminosäuren mit ihrer potentiellen CK2-Phosphorylierungsstelle (Konstrukt L5) nicht ausreichend, um die Aktivität von PhLP<sub>L</sub> zu modifizieren (\*\*,  $p < 0,01$  und \*\*\*,  $p < 0,0001$  versus PhLP<sub>L</sub>). B: Expressionkontrolle der fünf N-terminal trunkierten PhLP<sub>L</sub>-Konstrukte im Vergleich zur Expression von wildtypischem PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub>. Gezeigt ist einer von zwei Western Blots mit identischen Ergebnissen unter Verwendung des PhLP-CT Antikörpers.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PhLP<sub>L</sub> in Zellen konstitutiv phosphoryliert wird, diese Phosphorylierung für die funktionelle Einschränkung von PhLP<sub>L</sub> in Zellen verantwortlich ist, und dass die Phosphorylierung mit hoher Wahrscheinlichkeit durch CK2 ausgeführt wird. Die Evidenz hierfür war: a) alle drei Aminosäuren des Clusters S18, T19, S20 liegen in einer CK2-Konsensus-Sequenz, b) PhLP<sub>L</sub> liegt in Zellen konstitutiv phosphoryliert vor, und CK2 ist eine konstitutiv aktive Kinase, c) rekombinante CK2 konnte PhLP<sub>L</sub> signifikant phosphorylieren (im Gegensatz zu PhLP<sub>S</sub> oder Phosducin), und d) die Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> durch Zelllysate konnte durch spezifische CK2-Inhibitoren blockiert werden, während andere Kinaseinhibitoren keine Effekte zeigten.

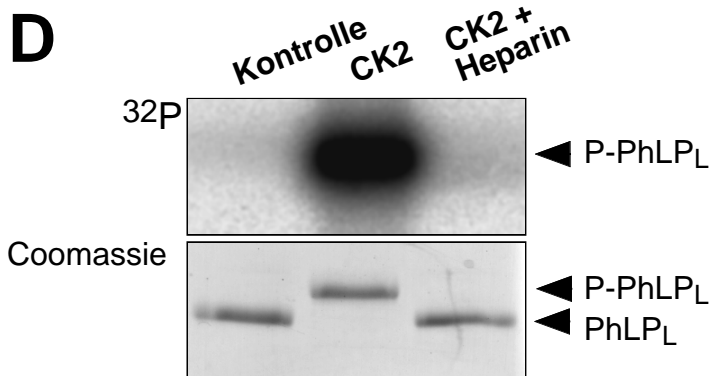
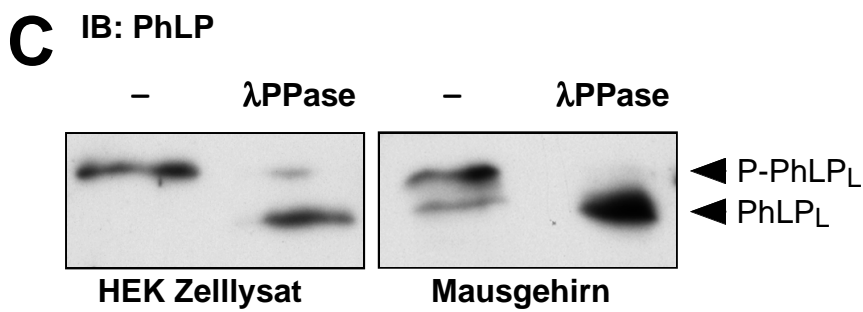
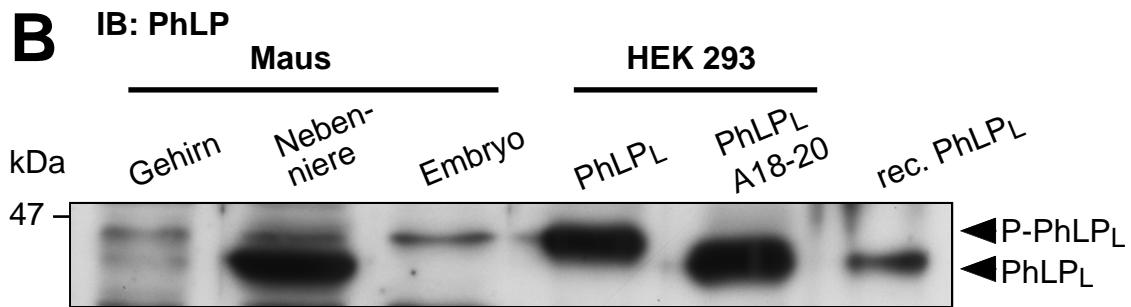
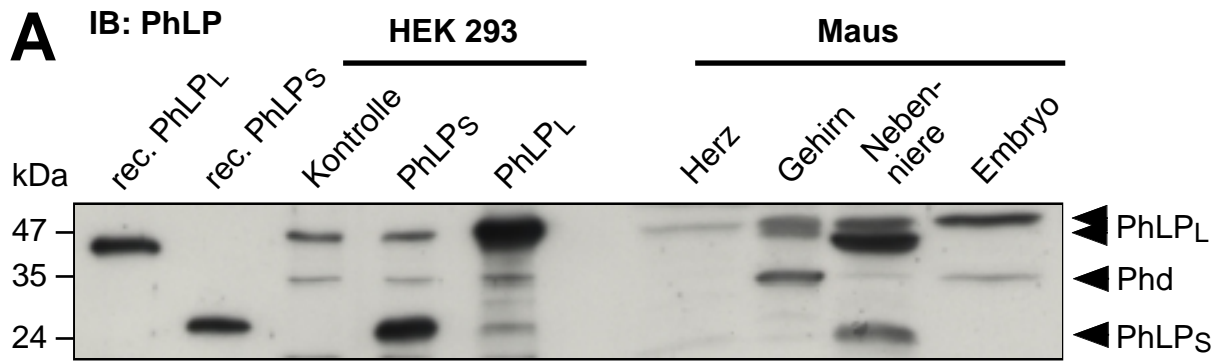


**Abb. 12: Effekt der gezielte Mutation von Ser-18, Thr-19 und Ser-20 in PhLP<sub>L</sub> auf die Gβγ-abhängige Inositolphosphat-Produktion.** A: HEK 293-Zellen wurden wie bisher transient transfiziert, anschließend die Inositolphosphate analysiert. Austausch der Aminosäuren Ser-18, Thr-19 und Ser-20 gegen Alanine (PhLP<sub>L</sub>A18-20) führte zur vollständigen Hemmung der Gβγ-abhängigen Inositolphosphat-Generierung, nicht jedoch die Mutation von Ser-25 nach Alanin (PhLP<sub>L</sub>A25) (\*\*,  $p < 0,01$  versus PhLPL; #,  $p < 0,05$  versus PhLP<sub>L</sub>A25; Vergleich PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>L</sub>A25 ist  $p > 0,05$ ). B: Expressionskontrolle der verschiedenen Mutanten zeigt vergleichbare Proteinexpression für alle Konstrukte im Western Blot (IB: PhLP-CT).

### **3.3. In nativen Mausgeweben finden sich PhLP<sub>S</sub>, phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes PhLP<sub>L</sub>**

Nun sollte die Frage geklärt werden, ob das beobachtete Phänomen der N-terminalen Regulation von PhLP auch in natürlichen Geweben gefunden werden kann. Hierzu wurde Gewebe verglichen, von dem bekannt war, dass es PhLP<sub>L</sub> in ausreichender Menge enthielt (wie zum Beispiel Herz oder Gehirn, nach Thibault et al., 1999, Schröder und Lohse, 2000) oder von dem man annehmen konnte, dass es PhLP<sub>S</sub> enthielt. Gewebe, das ontogenetisch den enterochromaffinen Zellen (die PhLP<sub>S</sub> enthalten (Gensse et al., 2000) nahe steht, ist das Mark der Nebenniere (Adrenalin-produzierende Zellen). Gewebe, das den embryonalen Nierenzellen (HEK 293) vom Entwicklungsstand her vergleichbar ist, kam von Mäuseembryonen. Weiterhin war bekannt, dass die CK2 in der Embryonalentwicklung, bei Zellteilung und Zellzyklus eine herausragende Rolle spielt (Pinna und Meggio, 1997). Hier sollten deshalb auch hohe Mengen an Phospho-PhLP<sub>L</sub> gefunden werden können.

PhLP<sub>L</sub> wurde in allen drei Mäuseorganen und in Mäuseembryonen (Entwicklungstag 10,5) mit Western Blot nachgewiesen (Abb. 13A). Weiterhin fand sich PhLP<sub>L</sub> in untransfizierten (bzw. mit Kontrollvektor transfizierten) HEK 293 Zellen. PhLP<sub>S</sub> dagegen konnte nur in der Nebenniere und in HEK 293 Zellen nach Transfektion mit PhLP<sub>S</sub> cDNA in ausreichender Signalstärke detektiert werden. Nach verlängerter Exposition des Films schienen geringe Mengen an PhLP<sub>S</sub> auch in Herz und Gehirn vorhanden zu sein, aber nicht in HEK 293 Zellen oder embryonalem Gewebe (Daten nicht gezeigt). In den meisten Fällen verlief die Auftrennung von PhLP<sub>L</sub> in einer Doppelbande. Dabei hatte die kleinere Bande die Laufhöhe von rekombinanten, aus *E. coli* gereinigte PhLP<sub>L</sub> (Abb. 13A, links, und 13B, untere Pfeilspitze) und die größere Bande die Laufhöhe von PhLP<sub>L</sub> aus HEK 293 Zellen (Abb. 13A, und B, obere Pfeilspitze). Da das Vorhandensein von Phosphatgruppen in einem Protein die Wandereigenschaften in der SDS-Gelelektrophorese auf diese Weise verändern kann, liegt die Vermutung nahe, dass die konstitutive Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> in Gewebe und Zellen hierfür verantwortlich war. Die Frage war nun, ob die Mutante



**Abb. 13: Differentielle Expression von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> und von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem PhLP<sub>L</sub> im Gewebe der Maus.** A: Western Blot mit Antikörper gegen PhLP<sub>S</sub> (IB: PhLP) mit folgenden Spuren: rekombinantes PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> (jeweils 0,1 pmol aus *E. coli*), neben Laufspuren von transient transfizierten HEK 293-Zellen (jeweils 20 µg Gesamtprotein in Kontrolle, PhLP<sub>S</sub> und PhLP<sub>L</sub>) und Spuren von Organen und Geweben der Maus (jeweils 200 µg Gesamtprotein aus Herz, Gehirn, Nebenniere und Embryo). Die Nebenniere zeigt eine deutliche Bande auf der Höhe von PhLP<sub>S</sub>. Gehirn und Nebenniere zeigen weiterhin eine Doppelbande: die obere Bande korrespondiert mit der Laufhöhe von PhLP<sub>L</sub> aus HEK 293 Zellen (endogen und nach Transfektion), die untere mit der Laufhöhe von PhLP<sub>L</sub> aus *E. coli*. Der PhLP<sub>S</sub>-Antikörper zeigt Kreuzreaktivität mit dem Protein Phosducin (bei einer apparenten Größe im SDS-PAGE von 33 kDa). B: Western Blot-Analyse von jeweils 100 µg Gesamtprotein aus murinem Gehirn, Nebenniere und Embryo und 10 µg Gesamtprotein aus HEK 293 Zellen nach der Transfektion mit Wildtyp-PhLP<sub>L</sub> und der phosphorylierungsdefizienten Mutante PhLP<sub>L</sub>A18-20. Zum Vergleich wiederum 0,1 pmol rekombinantes PhLP<sub>L</sub> aus *E. coli*. Die Mutation in Ser-18, Thr-19 und Ser-20 führt zur Veränderung des Laufverhaltens von PhLP<sub>L</sub> in der Gelelektrophorese. Die Laufhöhe von PhLP<sub>L</sub>A18-20 korrespondiert mit der Höhe von rekombinanten nicht-phosphoryliertem PhLP<sub>L</sub> und der unteren Doppelbande von PhLP<sub>L</sub> aus Mausgehirn und Nebenniere. C: Jeweils 50 µg Protein aus HEK 293 Zellen und 100 µg Protein aus Mausgehirn wurden einer Dephosphorylierung mittel λ-Phosphatase (λPPase, 1000 Einheiten für 20 Min. bei 37°C) unterzogen und anschließend im Western Blot analysiert. Durch Dephosphorylierung veränderte sich das Laufverhalten des endogenen PhLP<sub>L</sub> in HEK 293-Zellen und Mausgehirn. D: Gereinigtes, rekombinantes PhLP<sub>L</sub> (400nM) wurde durch CK2 (0,3 Millieinheiten) bei 37°C für 120 Min. phosphoryliert. Als Kontrolle wurde zum einen CK2 weggelassen oder zum anderen durch Heparin (30 µM) blockiert. Nach Auftrennung in einem 15% SDS-Gel wurde PhLP<sub>L</sub> angefärbt (Coomassie). Spuren von [<sup>32</sup>P]ATP dienten zur Kontrolle der Phosphorylierungsreaktion (<sup>32</sup>P). CK2-Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> führte zu Veränderung in der Gel-Mobilität des rekombinanten PhLP<sub>L</sub>.

PhLP<sub>L</sub>A18-20, von der ja bereits gezeigt wurde, dass sie funktionell aktiver war als der Wildtyp, ebenso eine Veränderung im SDS-PAGE Laufverhalten zeigte. Wie in Abb.13B zu erkennen, lief die Mutante PhLP<sub>L</sub>A18-20 tatsächlich auf Höhe von rekombinanten, nicht-phosphoryliertem PhLP<sub>L</sub>. Dies kann als weiterer Hinweis darauf gesehen werden, dass mit dem Austausch der Phosphorylierungsstellen an dieser

Position die entscheidende Veränderung in das Protein eingeführt wurde. Das bedeutet, dass nach Mutation dieser CK2-Phosphorylierungsstellen keine weitere signifikante Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> in Zellen in Erscheinung trat. Weiterhin korrepondierte die Laufhöhe von PhLP<sub>L</sub>A18-20 mit der Höhe der unteren Doppelbande insbesondere in Hirngewebe und Nebenniere (Abb 13B). Um nun endgültig den Phosphorylierungszustand für die Doppelung der PhLP<sub>L</sub>-Bande verantwortlich machen zu können, wurden HEK 293 Zellysate (mit endogenen PhLP<sub>L</sub>) ebenso wie Gehirnllysate mit Lambda Protein Phosphatase ( $\lambda$ PPase) behandelt. Diese Phosphatase entfernt effizient Phosphatreste von Serinen, Threoninen und Tyrosinen (Zhuo, et al., 1993). Die Behandlung der Lysate mit  $\lambda$ PPase hatte zur Folge, dass die höher laufende Bande in HEK 293 Zellen verschwand, während die kleinere Bande auftauchte. Bei Gehirn löste sich die Doppelbande auf zu Gunsten einer einzigen kleiner laufenden Bande (Abb. 13C). Weiterhin konnte die Annahme, die größere Bande repräsentiere Phospho-PhLP<sub>L</sub>, dadurch gestützt werden, dass nach stöchiometrischer Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> durch die CK2 *in vitro* ein Gelshift des gleichen Ausmaßes induziert werden konnte (Abb. 13D). PhLP<sub>L</sub> liegt also in verschiedenen nativen Geweben der Maus sowohl phosphoryliert, als auch nicht-phosphoryliert vor. Die kurze Isoform PhLP<sub>S</sub> konnte außerdem in der Nebenniere mit Western Blot deutlich nachgewiesen werden.

### **3.4. Bestimmung der Bindungsaffinität von PhLP<sub>L</sub> zu G $\beta$ $\gamma$ nach Phosphorylierung durch CK2**

In der Vergangenheit konnte durch mehrer Gruppen gezeigt werden, dass die N-terminale Phosphorylierung des homologen Proteins Phosducin durch unterschiedliche Kinasen (zum Beispiel PKA oder CamK II) zu einem Verlust an G $\beta$  $\gamma$ -Bindungsaffinität führte (Lee et al., 1990, Bauer et al., 1992, Yoshida et al., 1994, Ruiz-Gomez et al., 2000, Savage et al., 2000, Thulin et al., 2001). Was nun PhLP<sub>L</sub> betrifft, wurden bis heute keine analogen Untersuchungen durchgeführt. Diese könnten allerdings klären, warum das PhLP<sub>L</sub> in Zellen ein gegenüber PhLP<sub>S</sub> und der phosphorylierungsdefizienten Mutante PhLP<sub>L</sub>A18-20 reduzierte G $\beta$  $\gamma$ -hemmende

Aktivität aufweist. Um die Affinität von Phospho-PhLP<sub>L</sub> nun zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Versuche herangezogen. Zunächst wurde rekombinantes C-terminal His<sub>6</sub>-getaggttes PhLP<sub>L</sub> (gereinigt aus E. coli) mit rekombinanter CK2 bis zur Sättigung der Reaktion phosphoryliert (Sättigungskurve nicht gezeigt). Eine komplette, gesättigte Phosphorylierung führte zu einem vollständigem Shift der PhLP<sub>L</sub>-Bande in der SDS-Gelelektrophorese (siehe auch Abb.13D und 14A). Anschließend wurden äquimolare Konzentrationen (400 nM) an unbehandeltem und phosphoryliertem PhLP<sub>L</sub>, an PhLP<sub>S</sub> und als Kontrollprotein an Glutathion-S-Transferase-His<sub>6</sub> (GST-His<sub>6</sub>) mit Zelllysaten aus HEK 293-Zellen inkubiert, die zuvor durch transiente Transfektion Gβγ überexprimierten. Die His<sub>6</sub>-getaggtten Proteine wurden dann mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose präzipitiert. Die Menge an kopräzipitierten Gβγ-Untereinheiten wurden dann mit Hilfe eines Gβ-spezifischen Antikörpers im Western Blot detektiert (Abb. 14A). Dieses Experiment konnte keine Unterschiede in der Bindung von Gβγ an PhLP<sub>L</sub> aufdecken, ob nun phosphoryliert oder kontrollbehandelt. Andererseits war die Menge an gebundenen Gβγ an PhLP<sub>S</sub> nur äußerst gering. An GST-His<sub>6</sub> wurden keine Gβγ-Untereinheiten gebunden. Diese Beobachtung konnte durch einen funktionellen Gβγ-Assay untermauert werden: Hemmung der Pertussis-Toxin-vermittelten ADP-Ribosylierung von Gα<sub>o</sub>-Untereinheiten. Die ADP-Ribosylierung wird hierbei stimuliert durch die Anwesenheit von Gβγ-Untereinheiten (Schröder und Lohse, 2000). Wie in Abb 14B zu erkennen, wurde die Gβγ-stimulierte ADP-Ribosylierung in gleichen Maße von PhLP<sub>L</sub> und Phospho-PhLP<sub>L</sub> gehemmt. Wiederum ist die Hemmung durch PhLP<sub>S</sub> deutlich schwächer (Tab. 5). Die IC<sub>50</sub>-Werte für PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> lagen innerhalb des bereits publizierten Bereichs (Schröder und Lohse, 2000).

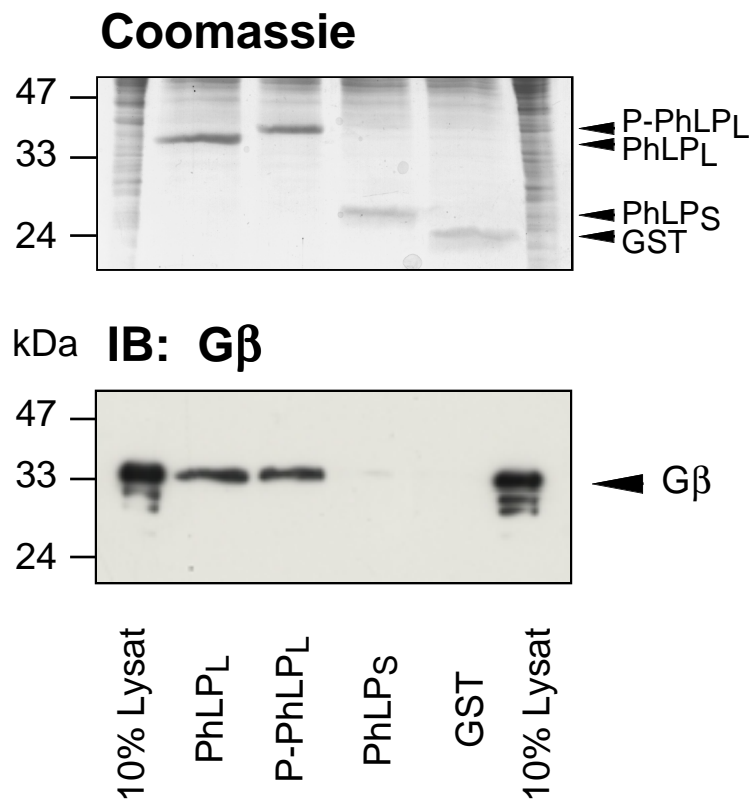
<b>ADP-Ribosylierung</b>	<b>PhLP<sub>L</sub></b>	<b>Phospho-PhLP<sub>L</sub></b>	<b>PhLP<sub>S</sub></b>
Hemmung um	90,2 %	98,6 %	22,6 %
Standardfehler	± 1,8 %	± 0,3 %	± 5,2 %
n	7	6	4
IC <sub>50</sub> ± Standardfehler	18,7 ± 4,5 nM	16,5 ± 5,2 nM	160 ± 44,6 nM

**Tab. 5:** Hemmung der Gβγ-stimulierten ADP-Ribosylierung durch PhLP *in vitro*.

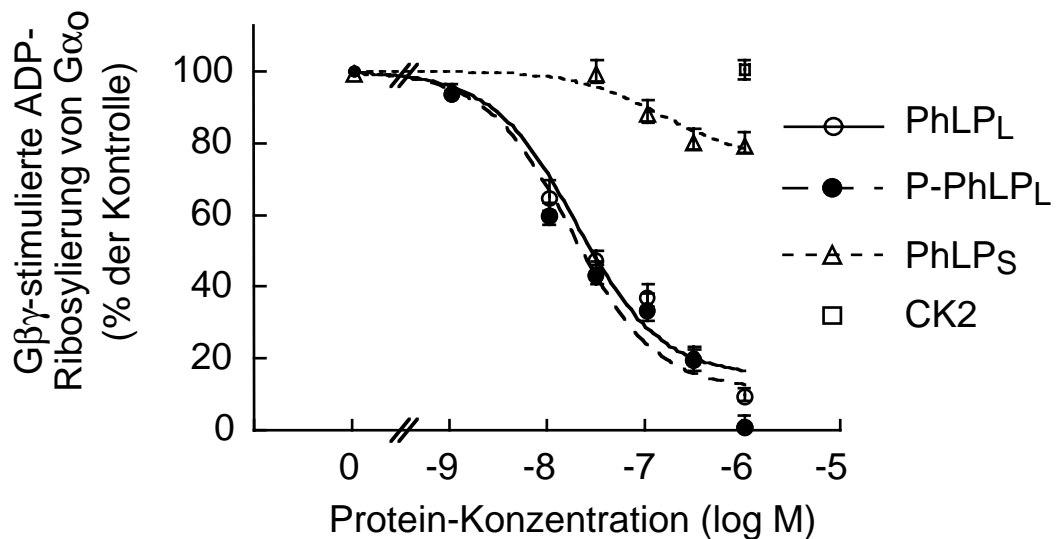


Die Schlussfolgerung aus diesen beiden Experimenten lautet: Die N-terminale Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> verändert nicht die Bindungsaffinität zur Gβγ-Untereinheit (im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Phosducin). Die direkte Interaktion von PhLP<sub>L</sub> und Gβγ oder von PhLP<sub>S</sub> und Gβγ kann nicht als Erklärung für das Phänomen der besseren Gβγ-Hemmung durch PhLP<sub>S</sub> in intakten HEK 293 Zellen herangezogen werden.

**A**



**B**



#### **Abb. 14: Die Affinität der PhLP-Isoformen zu G $\beta$ $\gamma$ .**

A: Bindung an G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten. Äquimolare Konzentrationen (400 nM) an rekombinanten C-terminal His<sub>6</sub>-getagtem PhLP<sub>L</sub> (14,04  $\mu$ g/ml), phosphoryliertem PhLP<sub>L</sub> (14,04  $\mu$ g/ml), PhLP<sub>S</sub> (10,3  $\mu$ g/ml) und Glutathion-S-Transferase (GST, 9,59  $\mu$ g/ml) wurden mit Zelllysaten aus HEK 293 Zellen inkubiert, die G $\beta$ <sub>1</sub> und G $\gamma$ <sub>2</sub> überexprimierten. Nach 30 Min. bei 37°C wurden die rekombinanten Proteine mit Ni-NTA-Agarose präzipitiert, gewaschen und im SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf PVDF-Membran wurde die Detektion mit einem G $\beta$ -spezifischen Antikörper durchgeführt (IB: G $\beta$ ). Die vollständige Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> wurde durch dessen Veränderung in der Gel-Mobilität kontrolliert (Coomassie). B: Hemmung der G $\beta$  $\gamma$ -stimulierten ADP-Ribosylierung von G $\alpha$ <sub>o</sub> durch PhLP. Nach Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> (wie unter A), wurde der Effekt aufsteigender Konzentrationen an PhLP<sub>L</sub>, Phospho-PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> auf den Pertussistoxin- (100 ng) and G $\beta$  $\gamma$ - (6 nM) stimulierten ADP-Ribose-Transfer auf G $\alpha$ <sub>o</sub> untersucht. Als Kontrolle diente CK2. Gezeigt ist das Ergebnis aus drei bis sieben unabhängigen Experimenten.

#### **Charakterisierung eines konservierten G $\beta$ $\gamma$ -Bindungsmotivs in PhLP<sub>L</sub>**

Um die Frage nach den zellulären Mechanismen der PhLP<sub>S</sub>-vermittelten G $\beta$  $\gamma$ -Signalhemmung weiter aufzuklären, wurde zunächst der N-Terminus von PhLP<sub>L</sub> genauer untersucht. Der Bereich, in dem sich die lange und die kurze Form von PhLP unterscheiden, sollte Informationen über den Mechanismus der G $\beta$  $\gamma$ -Regulation beinhalten. Von dem homologen Protein Phosducin wusste man, dass der Austausch einer Aminosäure (nämlich Tryptophan 29 gegen Valin) in einem konservierten Sequenzabschnitt die direkte G $\beta$  $\gamma$ -Bindung drastisch reduzieren konnte (Tab. 3 und Abb. 15A, Xu et al., 1995). Die Lösung der Röntgenkristallstruktur des Phosducin-G $\beta$  $\gamma$ -Komplexes hatte gezeigt, dass dieser Sequenzabschnitt die erste  $\alpha$ -Helix des Phosducin-N-Terminus bildete (Abb. 15A, Gaudet et al., 1996). Nun sollte die Rolle dieser homologen Region in PhLP<sub>L</sub> untersucht werden. Hierzu wurden zwei Mutanten generiert: a) die erste mit einem Austausch von Tryptophan gegen Valin in der Position 66 in der wildtypischen Form von PhLP<sub>L</sub> (PhLP<sub>L</sub>W66V) und b) die zweite mit der gleichen Mutation in der phosphorylierungsdefizienten Form PhLP<sub>L</sub>A18-20 (PhLP<sub>L</sub>AV). Um nun zu zeigen, dass auch bei PhLP<sub>L</sub> die Bindung an G $\beta$  $\gamma$  von diesem



**Abb. 15: Direkte Gβγ-Bindung von PhLP<sub>L</sub> ist abhängig von Tryptophan-66 im N-Terminus.**

A: Sequenzvergleich des konservierten Gβγ-Bindungsmotivs aus PhLP<sub>L</sub> der Ratte (ratPhLP<sub>L</sub>), Phosducin der Ratte (ratPhd) und aus PhLP der Fruchtfliege (droPhLP). Diese Region formt die α-Helix 1 dieser Proteine (Gaudet et al., 1996). Die für die Gβγ-Bindung essentielle Aminosäure Tryptophan steht in PhLP<sub>L</sub> der Ratte an Position 66 (W, in Fettdruck). B: Representativer Western Blot einer Versuchsserie, bei der verschiedene PhLP-Mutanten zunächst in HEK 293-Zellen exprimiert und anschließend mittels Gβ<sub>1</sub>•His<sub>6</sub>-Gγ<sub>2</sub>-Komplexen präzipitiert wurden. Die Gβ<sub>1</sub>•His<sub>6</sub>-Gγ<sub>2</sub>-Komplexe wurden mit Ni-NTA-Agarose gefällt, gewaschen und eluiert (Elate). Im anschließenden Western Blot wurde die Menge an komplexierten PhLP (IB: PhLP-CT) und zur Kontrolle an His<sub>6</sub>-Gγ<sub>2</sub> (IB: Gγ<sub>2</sub>) detektiert. Zum Vergleich der Expressionsstärke der einzelnen PhLP-Mutanten wurden fünf Prozent des jeweiligen Lysates ebenfalls untersucht (Beladung). Dass die PhLP-Isoformen unter den gewählten Bedingungen nicht ohne Gβγ präzipitiert werden können, zeigen die Kontrollbedingungen rechts (Ktr). C: HEK 293 Zellen wurden transient mit cDNA für PhLP<sub>L</sub>, PhLP<sub>L</sub>W66V und Kontroll-Vektor (jeweils 8 μg / 10 cm-Schale) zusammen mit cDNA für Gβ<sub>1</sub>, Gγ<sub>2</sub> und PLCβ<sub>2</sub> transfiziert. Inositolphosphat-Spiegel wurden 42 h später analysiert (Mittelwerte ± Standardfehler von fünf unabhängigen Experimenten; \*\*\*, p < 0,001 versus Kontrolle; ◇◇, p < 0,01 versus PhLP<sub>L</sub>W66V). Direkte Gβγ-Bindung und Gβγ-Funktionsassay unterstreichen die essentielle Bedeutung von Tryptophan 66 in PhLP<sub>L</sub>.

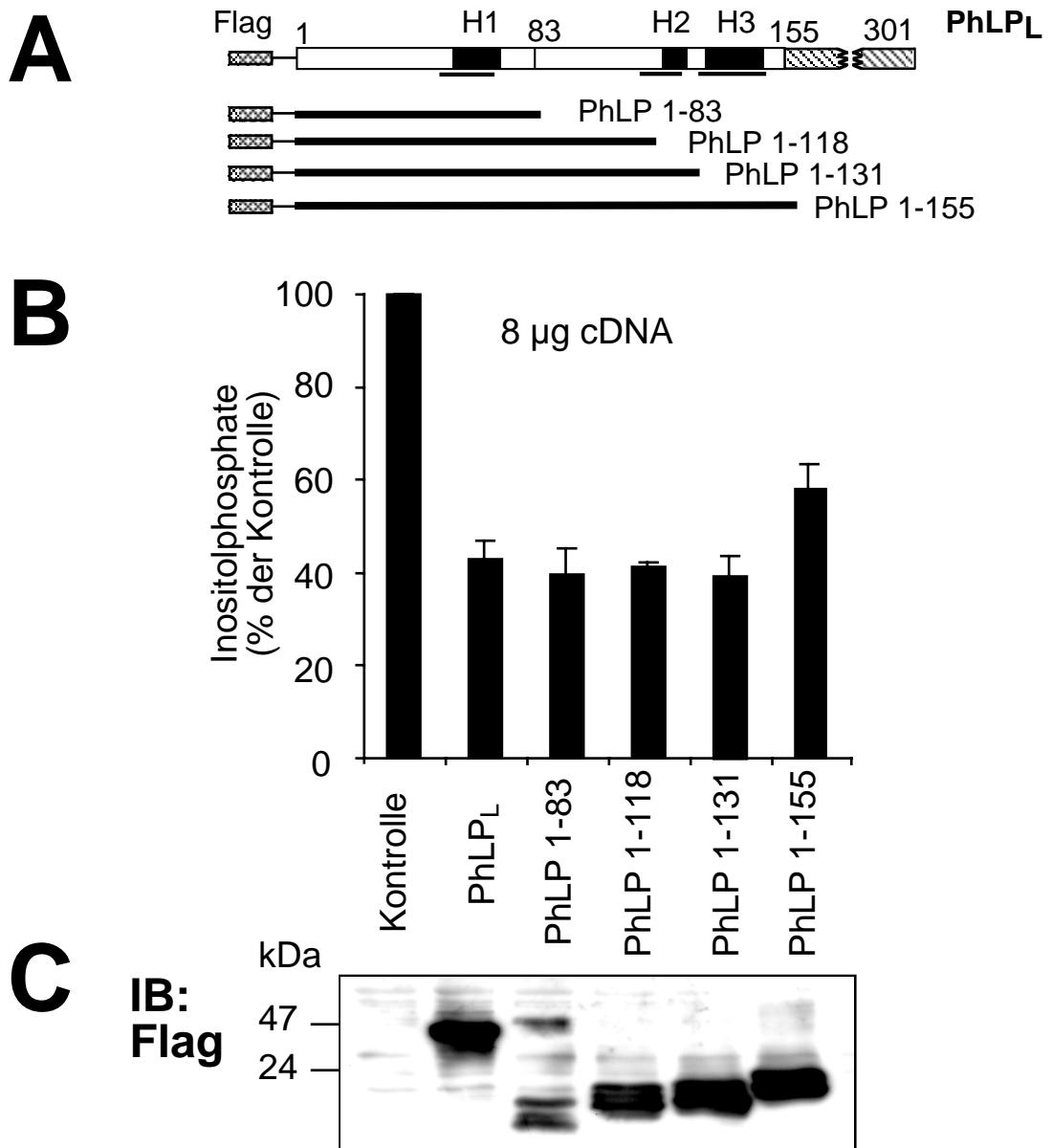
konservierten Motiv abhängig ist, wurden nun die zellulär exprimierten PhLP-Isoformen mit Gβγ-Untereinheiten kopräzipitiert. Hierfür wurde zunächst eine His<sub>6</sub>-Markierung N-terminal an die Gγ<sub>2</sub>-Untereinheit in pcDNA 3 kloniert (His<sub>6</sub>-Gγ<sub>2</sub>), um Gβγ-Komplexe mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose aus Zelllysaten präzipitieren zu können. Diese Gβ<sub>1</sub>•His<sub>6</sub>-Gγ<sub>2</sub>-Komplexe waren in der Lage, die Inositol-Phosphat-Produktion durch PLCβ<sub>2</sub> genauso zu stimulieren wie wildtypische Gβγ-Komplexe und ließen sich durch die Kotransfektion von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> auf identische Weise funktionell inhibieren (Daten nicht gezeigt). Nun wurden einmal Zellen mit cDNA von Gβ<sub>1</sub> und His<sub>6</sub>-Gγ<sub>2</sub>, und einmal Zellen mit den verschiedenen PhLP-Konstrukten transfiziert. Jede Transfektion wurde in Detergenzien-haltigen Puffer lysiert. Dann wurden gleiche Mengen von PhLP-exprimierenden Lysaten mit Gβ<sub>1</sub>•His<sub>6</sub>-Gγ<sub>2</sub>-haltigen Lysaten inkubiert. Anschließend wurde Ni-NTA-Agarose zugegeben, präzipitiert und

gewaschen. Dann wurde die Menge der kopräzipitierten PhLP-Konstrukte mittels Western Blot im Eluat determiniert (Abb. 15B, oben). Zur Kontrolle wurde die Menge des gebundenen  $G\beta_1\bullet His_6\text{-}G\gamma_2$ -Komplexes mit Hilfe eines  $G\gamma_2$ -spezifischen Antikörpers kontrolliert (Abb. 15B, Mitte). Die gleichmäßige Beladung der Versuchsansätze mit den PhLP-Konstrukten wurde ebenso kontrolliert (Abb. 15C, unten) sowie die Bindung von  $PhLP_L$  und  $PhLP_S$  an Ni-NTA-Agarose in Abwesenheit des  $G\beta_1\bullet His_6\text{-}G\gamma_2$ -Komplexes (Abb. 16A, rechts). Das Ergebnis war: Zellulär exprimiertes  $PhLP_L$  mit intakter Bindedomäne konnte an zellulär exprimierten  $G\beta\gamma$ -Komplexen binden.  $PhLP_S$  (das vollständig ohne die N-terminale  $G\beta\gamma$ -Bindungsregion ist) wurde unter diesen Bedingungen gar nicht an  $G\beta\gamma$ -Komplexe gebunden, während  $PhLP_{LW66V}$  und  $PhLP_{LAV}$  (diejenigen, die defiziente  $G\beta\gamma$ -Bindungsregion besaßen) nur deutlich abgeschwächt binden konnten.

Anschließend wurde die Fähigkeit der  $PhLP_{LW66V}$ -Mutante getestet, die  $G\beta\gamma$ -vermittelte Inositolphosphat-Produktion in HEK 293 Zellen zu inhibieren. Wie erwartet, wurde diese von wildtypischem  $PhLP_L$  signifikant gehemmt (mit einer Transfektionsdosis von 8  $\mu\text{g}/10$  cm-Schale). Die Mutante  $PhLP_{LW66V}$  allerdings konnte keine Inhibition vermitteln (Abb. 15C und Tab. 6). Daher konnte gefolgert werden, dass die Fähigkeit von  $PhLP_L$  sowohl für die  $G\beta\gamma$ -Bindung als auch für die funktionelle  $G\beta\gamma$ -Hemmung in Zellen von der intakten Funktion des konservierten  $G\beta\gamma$ -BindungsMotivs abhängig war.

<b>Inositolphosphat-Hemmung</b>	<b><math>PhLP_L</math> (8 <math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b><math>PhLP_{LW66V}</math> (8 <math>\mu\text{g}</math>)</b>
Hemmung um	57,2 %	10,3 %
Standardfehler	$\pm 4,0$ %	$\pm 13,1$ %
n	5	7

**Tab. 6:** Hemmung der  $G\beta\gamma$ -vermittelten Inositolphosphat-Produktion bei hoher cDNA-Dosis.



**Abb. 16: Die ersten 83 Aminosäuren von PhLP<sub>L</sub> vermitteln dessen G $\beta$  $\gamma$ -hemmenden Effekt in Zellen.** A: Darstellung der N-terminalen Konstrukte von PhLP<sub>L</sub>. Die Konstrukte sind benannt nach der Position der Aminosäuren im nativen PhLP<sub>L</sub>. Im N-Terminus befinden sich drei  $\alpha$ -Helices (H1, H2 und H3), die in Analogie zur Kristallstruktur des Phosducin• G $\beta$  $\gamma$ -Komplexes dargestellt sind und mit G $\beta$  $\gamma$  in Kontakt treten (schwarze Linie). B: HEK 293-Zellen wurden wie unter Abb. 15 beschrieben transfiziert und analysiert (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von drei bis sechs unabhängigen Experimenten, ANOVA:  $p < 0,0001$ ; Bonferroni:  $p < 0,001$  für alle versus Kontrolle). C: Repräsentativer Western Blot zur Kontrolle der Expression der N-terminalen Mutanten von PhLP<sub>L</sub> mittels M2 FLAG-Antikörper (IB: Flag). PhLP<sub>L</sub> und sein N-Terminus zeigen gleiche funktionellen G $\beta$  $\gamma$ -Hemmung in HEK 293-Zellen.

## **Der PhLP<sub>L</sub> N-Terminus und PhLP<sub>L</sub> vermitteln ähnliche Effekte in Zellen.**

Aufgrund des deutlichen Effektes der W66V-Mutation auf die Funktion von PhLP<sub>L</sub> stellten wir die Hypothese auf, dass der N-Terminus von PhLP<sub>L</sub> (also die ersten 83 Aminosäuren) ebenso wie das vollständige Protein ausreichend sein sollte, eine gleichartige Hemmung der Inositolphosphatproduktion auszuüben. Wir konstruierten daher einige C-terminal deletierte Mutanten aus PhLP<sub>L</sub> (Abb. 16A) und testeten deren Fähigkeit die Gβγ-stimulierte Inositolphosphat-Generierung zu hemmen (Abb. 16B). Die Expression der Konstrukte wurde mittels einer Flag-Markierung im Western Blot untersucht und war unter diesen Bedingungen vergleichbar (Abb. 16C). Wir konnten zeigen, dass alle N-terminalen Konstrukte, die mindestens die ersten 83 Aminosäuren von PhLP<sub>L</sub> enthielten, eine dem PhLP<sub>L</sub> vergleichbare Hemmung in diesem Zellassay vermitteln konnten.

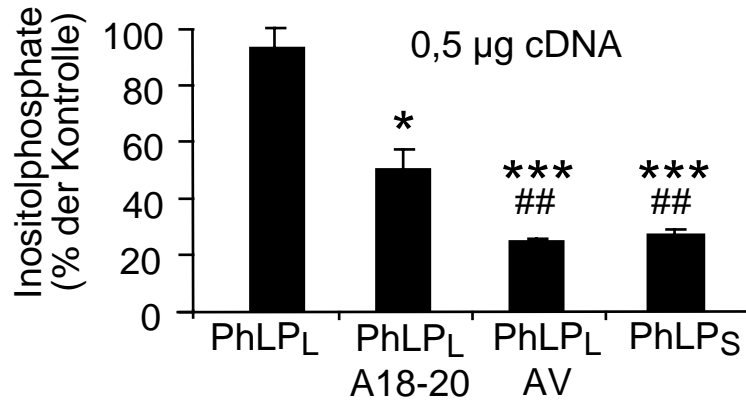
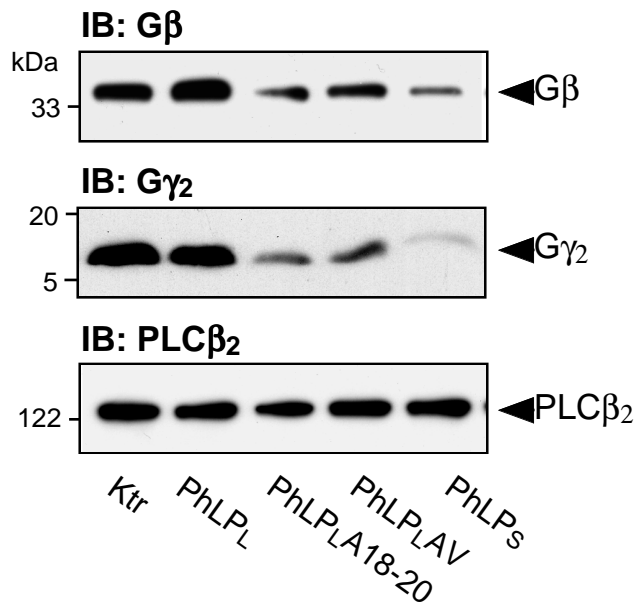
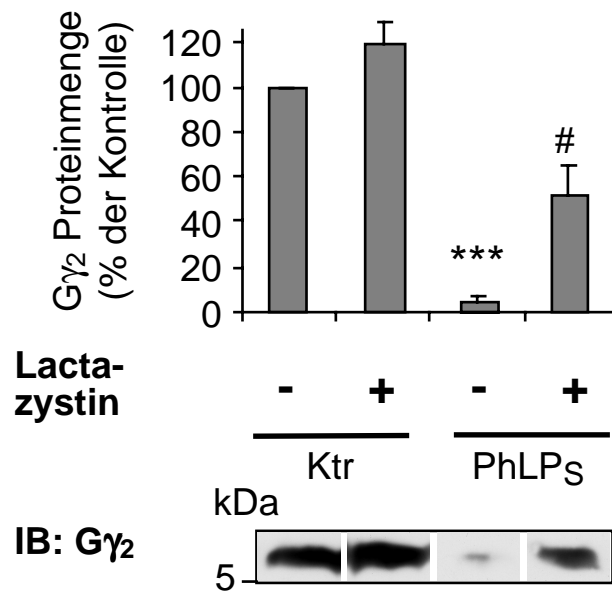
### 3.5. PhLP<sub>S</sub> führt zu Missfaltung und Down-Regulation von G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten – ein neuer Mechanismus der G-Protein-Regulation

Da die IC<sub>50</sub>-Werte von PhLP<sub>S</sub> in der zellulären Inositolphosphat-Hemmung gegenüber PhLP<sub>L</sub> um den Faktor 20 nach links verschoben sind (Abb. 7A und Tab. 4), stellte sich die Frage, ob, wie nach bisherigen Befunden vermutet, die phosphorylierungsdefizienten Mutanten PhLP<sub>L</sub>A18-20 und PhLP<sub>L</sub>AV ebenso potenter als PhLP<sub>L</sub> die zelluläre G $\beta\gamma$ -Funktion hemmen konnten. Zur Überprüfung wurden deshalb niedrige Konzentrationen an spezifischer cDNA verwendet (0,5  $\mu$ g/ 10 cm-Schale, bei konstanter Gesamt-DNA). Es ergab sich folgendes Bild (Abb. 17A): Während wildtypisches PhLP<sub>L</sub> (welches in Zellen konstitutiv phosphoryliert vorliegt) bei diesem Expressionsniveau keine funktionelle Inhibition mehr vermitteln konnte, waren die beiden phosphorylierungsdefizienten Mutanten PhLP<sub>L</sub>A18-20 und PhLP<sub>L</sub>AV in der Lage, wie PhLP<sub>S</sub>, eine maximale Hemmung der Inositolphosphate herbeizuführen und zwar mit höherer Potenz als PhLP<sub>L</sub> (Tab. 7). Die Expression aller Konstrukte war vergleichbar, wenn dieselbe Dosis an cDNA pro Transfektion verwendet wurde (0,5  $\mu$ g/10 cm Schale). Die Schlussfolgerung aus diesem Versuch war daher, dass es zwei unterschiedliche Formen der G $\beta\gamma$ -Regulation durch PhLP geben sollte: eine Regulation durch direkte Bindung von (konstitutiv phosphoryliertem) PhLP<sub>L</sub> an G $\beta\gamma$ , vermittelt durch das konservierte Bindemotiv der ersten  $\alpha$ -Helix (Abb. 15A), und eine zweite indirekte Form der Regulation durch PhLP<sub>S</sub> und durch nicht-phosphoryliertes PhLP<sub>L</sub>. Die indirekte Form der Regulation sollte von der hochaffinen G $\beta\gamma$ -Bindungsstelle unabhängig sein.

<b>Inositolphosphat-Hemmung</b>	<b>PhLP<sub>L</sub></b> (0,5 $\mu$ g)	<b>PhLP<sub>L</sub>A18-20</b>	<b>PhLP<sub>L</sub>AV</b>	<b>PhLP<sub>S</sub></b> (0,5 $\mu$ g)
Hemmung um	6,7 %	49,7 %	75,3 %	72,8 %
Standardfehler	$\pm$ 7,4 %	$\pm$ 7,2 %	$\pm$ 1,0 %	$\pm$ 1,9 %
n	3	3	3	3

**Tab. 7:** Hemmung der G $\beta\gamma$ -vermittelten Inositolphosphat-Produktion bei niedriger cDNA-Dosis.

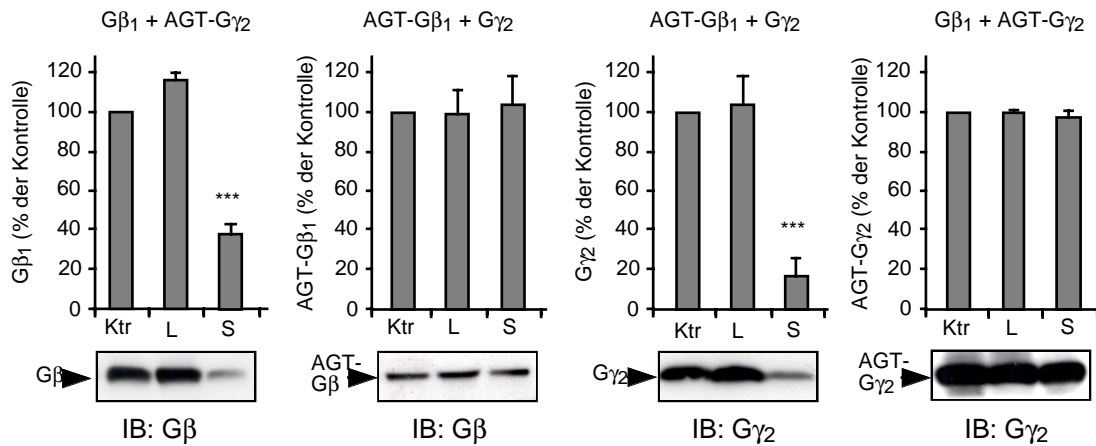
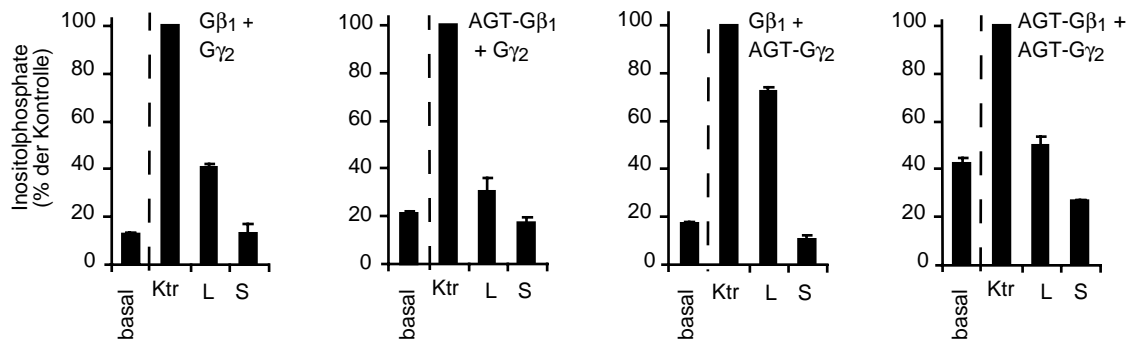
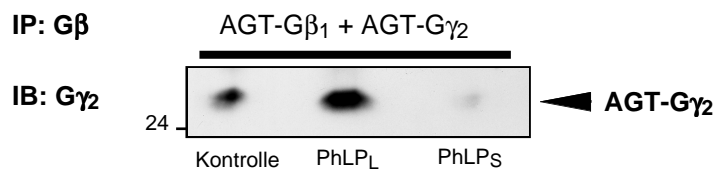


**A****B****C**

**Abb. 17: PhLP<sub>S</sub>, PhLP<sub>L</sub>A18-20 und PhLP<sub>L</sub>AV vermitteln eine Down-Regulation von Gβ und Gγ.** A: Hemmung der Inositolphosphat-Generierung. Während der Gehalt an cDNA für die PhLP-Mutanten auf 0,5 µg / 10 cm-Schale erniedrigt wurde, blieb die cDNA-Menge für Gβ<sub>1</sub>, Gγ<sub>2</sub> und PLCβ<sub>2</sub> konstant. Unter diesen Bedingungen ist natives PhLP<sub>L</sub> nicht mehr in der Lage Gβγ-Funktion in Zellen zu hemmen. Dies unterstreicht die hohe Potenz der Gβγ-Hemmung von PhLP<sub>L</sub>A18-20, PhLP<sub>L</sub>AV und PhLP<sub>S</sub> (\*\*\*, p < 0,001 und \*, p < 0,05 versus Kontrolle; ##, p < 0,01 versus PhLP<sub>L</sub>). B: Western Blot, repräsentativ für fünf bis sieben unabhängige Experimente, der zeigt, dass Gβ (IB: Gβ) und Gγ (IB: Gγ<sub>2</sub>) in Anwesenheit der genannten PhLP-Konstrukte signifikant herabreguliert sind. Die Menge anderer Proteine blieb hingegen unbeeinträchtigt (hier zur Kontrolle PLCβ<sub>2</sub>). C: Effekt des Proteasom-Inhibitors Lactazystin (in einer Konzentration von 4 µM für 4 Stunden bei 37°C) auf die Proteinmenge von Gγ<sub>2</sub> bei Kontrollen (Ktr) und PhLP<sub>S</sub>-transfizierten Zellen (PhLP<sub>S</sub>). Die Analyse wurde an drei unabhängigen Experimenten durchgeführt (\*\*\*, p < 0,001 versus unbehandelter Kontrolle (-); #, p < 0,05 versus PhLP<sub>S</sub>, unbehandelt (-)). Ein repräsentativer Western Blot ist abgebildet.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese fanden wir, dass der Proteingehalt an Gβ<sub>1</sub> und Gγ<sub>2</sub> in HEK 293-Zellen bei Kotransfektion von PhLP<sub>S</sub>, PhLP<sub>L</sub>A18-20 und PhLP<sub>L</sub>AV drastisch reduziert war, nicht aber bei Kotransfektion von PhLP<sub>L</sub> (Abb. 17B). Dieser Effekt war spezifisch für Gβγ-Untereinheiten, da der Gehalt an PLCβ<sub>2</sub> sich hierbei nicht veränderte (Abb. 17B, unten). Der Verlust an Gγ<sub>2</sub> konnte teilweise durch eine 4-stündige Inkubation mit dem spezifischen Proteasom-Inhibitor Lactacystin aufgehoben werden (Abb. 17C). Dies spricht für eine Beteiligung proteasomaler Abbauege an der Down-Regulation der Gβγ-Untereinheiten.

Um nun zu untersuchen, ob der PhLP<sub>S</sub>-medierte Gβγ-Abbau auch ursächlich für die hochpotente Hemmung des Gβγ-stimulierten Inositolphosphatweges war, versuchten wir den Abbau der Gβγ-Untereinheiten durch Stabilisierung zu verhindern. Kürzlich wurde in einer Arbeit gezeigt, dass die Gγ<sub>2</sub>-Untereinheit in bovinem Gehirn einer Ubiquitylierung nach der sogenannten „N-end rule“ unterworfen ist (Hamilton et al., 2003). Dies bedeutet, dass eine posttranslationale Modifikation des N-Terminus das entsprechende Protein empfindlich für den proteasomalen Abbau macht. In dieser Arbeit konnte ebenso gezeigt werden, dass durch Mutationen im N-Terminus die Gγ<sub>2</sub>-

**A****G $\beta$  $\gamma$ -Proteinexpression****B****G $\beta$  $\gamma$ -Funktion****C****G $\beta$ /G $\gamma$ -Assoziation**

**Abb. 18: Die N-terminale Modifikation von G $\beta$ - und G $\gamma$ -Untereinheiten stabilisiert deren Expression, bewahrt aber nicht ihre Funktion.** A: Quantitative Analyse der Effekte von PhLP<sub>L</sub> (hier: L) und PhLP<sub>S</sub> (S) auf den Proteingehalt von G $\beta$ 1, AGT-G $\beta$ 1, G $\gamma$ 2 und AGT-G $\gamma$ 2. Vier bis fünf Immunoblots (IB des angeführten Proteins) wurden nach densitometrischer Auswertung quantifiziert und normalisiert auf die entsprechende Kontrollbande (Ktr). Während PhLP<sub>S</sub> den Gehalt an wildtypischen G $\beta$ 1 und G $\gamma$ 2 signifikant reduzierte (\*\*\*,  $p < 0,001$  versus Ktr), verhinderte die N-terminale Modifikation mit AGT die Herabregulation der modifizierten Untereinheit vollständig (konnte aber die Herabregulation des unmodifizierten Partners in denselben Zellen nicht verhindern). B: Inositolphosphat-Assays, die mit unterschiedlichen Kombinationen aus wildtypischen und N-terminal modifizierten G-Proteinuntereinheiten durchgeführt wurden.

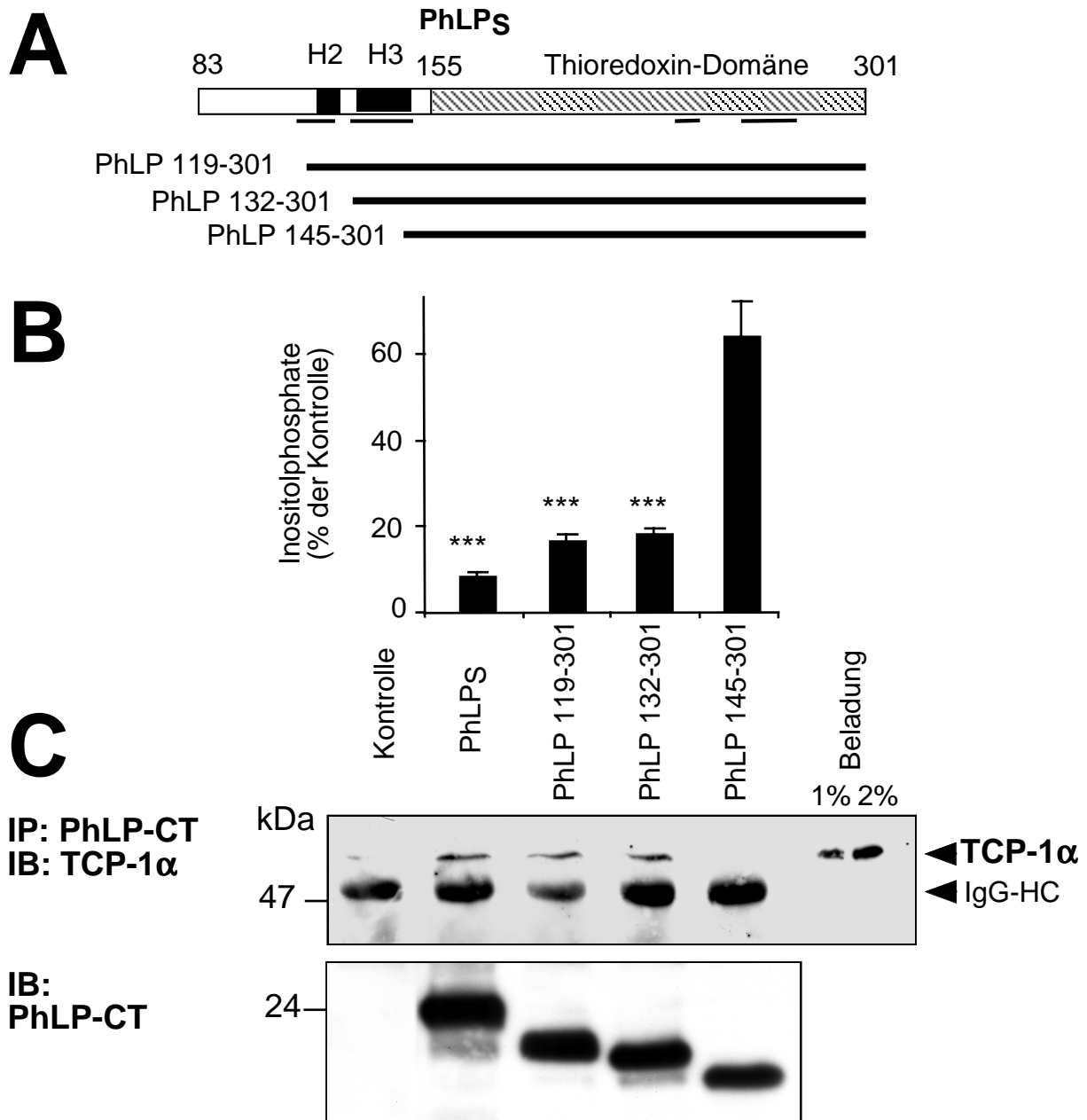
Im Vergleich zur alleinigen PLC $\beta_2$ -Transfektion (basal) konnte jede Kombination aus G $\beta_1$  und G $\gamma_2$  (und deren jeweilige AGT-Fusion) die Produktion von Inositolphosphaten stimulieren (Ktr). Genauso wie bei Wildtyp-G $\beta$  und -G $\gamma$ , zeigten alle Kombinationen dasselbe Muster bei der Hemmung durch PhLP $_L$  (L) und PhLP $_S$  (S). Abgebildet sind repräsentative Experimente (von jeweils drei bis fünf unabhängigen), die in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. C: Der Effekt von PhLP auf die Assoziation von AGT-G $\beta_1$  mit AGT-G $\gamma_2$ . Beide Konstrukte wurden mit leerem Vektor (Ktr), beziehungsweise mit cDNA für PhLP $_L$  oder PhLP $_S$  kotransfiziert (wie unter B, rechtes Diagramm). Die Präzipitation wurde durchgeführt mittels eines G $\beta$ -Antikörpers (IP: G $\beta$ ). Die Menge des kopräzipitierten AGT-G $\gamma_2$  wurde mit Hilfe eines anti-G $\gamma_2$ -Antikörpers im Immunoblot nach Westerntransfer bestimmt (IB: G $\gamma_2$ ). In Anwesenheit von PhLP $_S$  scheinen G $\beta$  und G $\gamma$  nicht mehr zu assoziieren. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot von vier unabhängigen Versuchen.

Untereinheit geschützt war vor Ubiquitinylierung und proteasomalen Abbau. Hier sollten nun die G $\beta\gamma$ -Untereinheiten durch N-terminale Fusion mit einem Protein stabilisiert werden, das für zelluläre Färbetechniken entwickelt wurde (AGT, Keppler et al., 2003). Diese Fusion stabilisierte tatsächlich sowohl die G $\beta_1$ -, als auch die G $\gamma_2$ -Untereinheit in Anwesenheit von PhLP $_S$  (Abb. 18A), während der jeweils wildtypische Partner gleichzeitig aber nicht vor Abbau geschützt wurde. Untersuchten wir nun die Funktion dieser Fusionsproteine, so fanden wir allerdings keine Unterschiede in der Hemmbarkeit der G $\beta\gamma$ -stimulierten Inositolphosphat-Generierung durch die PhLP-Splicevarianten (Abb. 18B, vergleiche den Graphen links, Wildtyp-G $\beta\gamma$ , mit den Kombinationen rechts). PhLP $_S$  vermittelt in allen Fällen die stärkste Hemmung. (Diese Experimente zeigen auch das die AGT-G-Proteinfusionen funktionell aktiv waren, hierfür vergleiche jeweils die Werte für basal und Kontrolle in Abb. 18B miteinander). Zusammenfassend kann man sagen, dass PhLP $_S$  zu einer Down-Regulation der G $\beta\gamma$ -Untereinheit in Zellen führte (am wahrscheinlichsten unter Beteiligung der „N-end rule“ and des Proteasoms), aber diese G $\beta\gamma$ -Down-Regulation scheint nicht die Ursache für die Hemmung der G $\beta\gamma$ -Funktion durch PhLP $_S$  gewesen zu sein (sondern möglicherweise die Folge). Um nun dem Mechanismus der G $\beta\gamma$ -Dysfunktion näher zu kommen, untersuchten wir die Interaktion zwischen G $\beta$  und G $\gamma$  mittels Kopräzipitation der beiden stabilisierten AGT-Fusionsproteine. In diesem Experiment führte die Koexpression von PhLP $_S$ , nicht aber die von PhLP $_L$ , zu einer

stark verminderten Interaktion zwischen  $G\beta_1$  und  $G\gamma_2$  (Abb. 18C). Die stabilisierte Untereinheit AGT- $G\beta_1$  konnte in Anwesenheit von PhLP<sub>S</sub> die Untereinheit AGT- $G\gamma_2$  nicht mehr präzipitieren. Da die effektive Interaktion der  $G\beta$  und  $G\gamma$ -Untereinheit einen Indikator für korrekte Proteinfaltung darstellt, könnte die Störung der Interaktion ein Hinweis auf Missfaltung einer der beiden oder beider Partner sein. Missfaltungen der  $G\beta$ -Untereinheit, induziert durch gezielte Mutationen, führten in früheren Untersuchungen zum Verlust der  $G\beta$ - $G\gamma$ -Assoziation (Garcia-Higuera, et al., 1998).

### **Die strukturellen Determinanten des PhLP<sub>S</sub>-Effektes und seine Bindung an TCP-1 $\alpha$**

Um den Effekt von PhLP<sub>S</sub> auf die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit nach strukturellen Gesichtspunkten zu untersuchen, wurde PhLP<sub>S</sub> nun ebenfalls schrittweise N-terminal verkürzt und die Konstrukte funktionell untersucht (Abb. 19A). Hier fanden wir, dass die C-terminalen Konstrukte PhLP119-301 und PhLP132-301 ebenso in der Lage waren wie PhLP<sub>S</sub> die  $G\beta\gamma$ -stimulierte Inositolphosphat-Generierung zu inhibieren. Eine weitere N-terminale Verkürzung des Proteins (wie in PhLP145-301) führte zu einer drastischen Abnahme der Hemmfunktion (Abb. 19A). Strukturell befindet sich in dieser Region die  $\alpha$ -Helix 3, die nach Kristallstrukturdaten ebenfalls ein  $G\beta\gamma$ -Kontaktregion darstellt (siehe auch Abb. 5 und Gaudet et al., 1996). Ohne  $\alpha$ -Helix 3 kann also eine PhLP<sub>S</sub>-typische Regulation nicht vermittelt werden. Eine Expression nur von  $\alpha$ -Helix 3 oder  $\alpha$ -Helices 2 mit 3 konnte in HEK 293 Zellen nicht erreicht werden (Protein für eukaryotische Expression zu kurz?). Daher konnte die Frage, ob diese kleine Region für funktionelle Effekte ausreichend gewesen wäre, nicht restlos beantwortet werden. Im Zusammenhang mit dem N-Terminus von PhLP<sub>L</sub> (Konstrukt PhLP1-155, Abb.17A), konnte die  $\alpha$ -Helix 3 allerdings keine PhLP<sub>S</sub>-typische Hemmung hervorrufen. Das heißt,  $\alpha$ -Helix 3 und höchst wahrscheinlich weitere C-terminale Strukturen in PhLP sind notwendig, um die Effekte von PhLP<sub>S</sub> zu vermitteln.



**Abb. 19: Kartierung der PhLP<sub>S</sub>-Domänen, die sowohl für die Gβγ-Hemmung als auch die TCP-1α-Bindung verantwortlich sind.** A: Design der C-terminalen PhLP-Konstrukte und Alignment mit PhLP<sub>S</sub> (die Ziffern beziehen sich auf die Position der Aminosäuren in PhLP<sub>L</sub>, siehe auch Abb. 5): schrittweise Deletion der N-terminalen Schleifenregion (in PhLP 119-301), der α-Helix 2 (H2, Konstrukt PhLP 132-301) und α-Helix 3 (H3, Konstrukt PhLP 145-301). B: Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen mit den angegebenen Konstrukten und Bestimmung der Inositolphosphate (wie beschrieben). Abgebildet sind Mittelwerte ± Standardfehler von drei bis sechs unabhängigen Versuchen (ANOVA:  $p < 0,0001$ ; Bonferoni-Test: \*\*\*,  $p < 0,001$  versus PhLP 145-301). C: Ko-Immünpräzipitation von endogenem TCP-1α mit PhLPS und seinen Konstrukten. HEK 293-Zellen wurden mit den angegebenen cDNAs transfiziert und 42 Stunden später lysiert. PhLP wurde mit dem PhLP-CT-

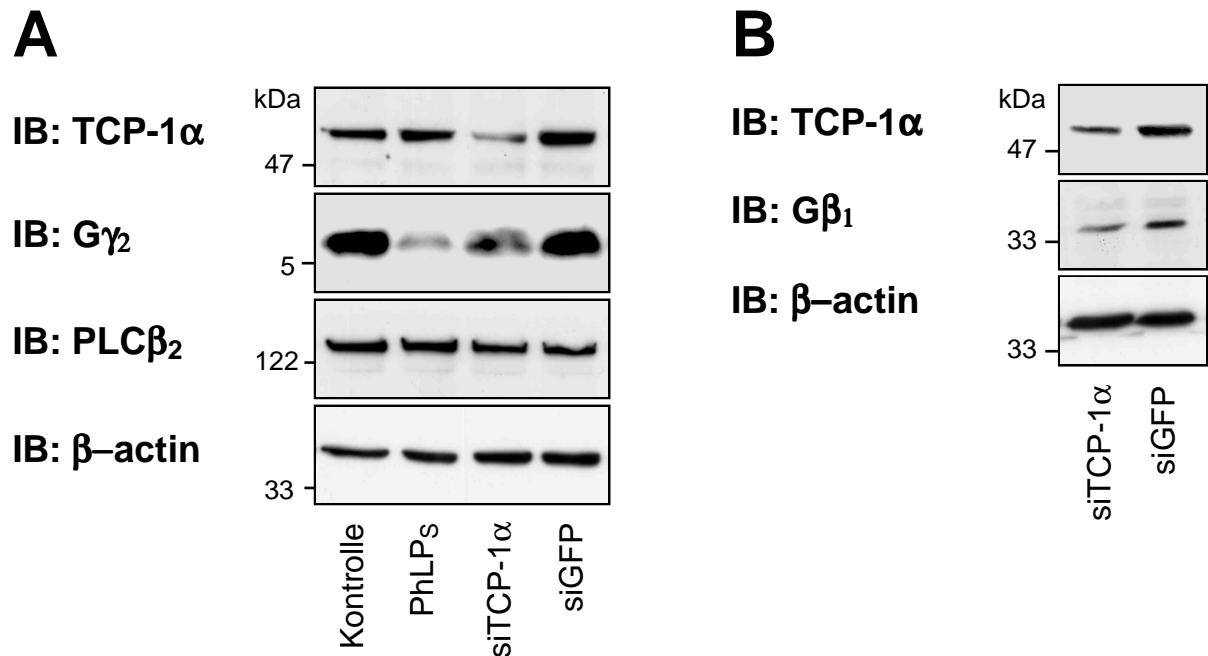
Antikörper präzipitiert (IP: PhLP-CT). Nach Auftrennung der Proben in der SDS-Gelelektrophorese wurde die Menge an ko-präzipitiertem TCP-1 $\alpha$  mit dem entsprechenden Antikörper dargestellt (IB: TCP-1 $\alpha$ ). Ein und zwei Prozent des Kontrolllysates wurde als Beladungskontrolle mitgeführt (1% und 2% Beladung, IgG-HC bedeutet "Schwere Kette" von IgG). Die Expression der verschiedenen PhLP-Konstrukte wurde mit dem PhLP-CT-Antikörper im Western Blot kontrolliert (IB: PhLP-CT).

Kürzlich wurde demonstriert, dass PhLP<sub>L</sub> an einen Komplex binden kann, der für die Faltung von bestimmten Proteinen verantwortlich ist, den sogenannten Cytosolischen Chaperonin-Komplex CCT (McLaughlin et al., 2002). In jener Arbeit konnte gezeigt werden, dass in bestimmten Assaysystemen (unter Verwendung von Hasenretikulozyten-Lysaten) die Faltung von Luciferase und G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten (beides bekannte Substrate von CCT) durch rekombinantes PhLP gehemmt werden konnte. Eine Rolle bei der Faltung von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten wurde bisher allerdings nicht beschrieben, obwohl die G $\beta$ -Untereinheit zur Proteinfamilie der WD40-Repeatproteine gehört (Garcia-Higuera et al., 1998). Mitglieder dieser Proteinstrukturfamilie werden hauptsächlich über CCT endgültig gefaltet. Daher war eine Rolle bei der Faltung von G $\beta$  von anderen Autoren bereits postuliert worden (Hartl und Hayer-Hartl, 2002, Valpuesta et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit sollte nun zunächst untersucht werden, ob sich die Domänen in PhLP näher eingrenzen lassen, die für die Bindung an TCP-1 $\alpha$  verantwortlich sind. TCP-1 $\alpha$  ist eine Untereinheit des CCT-Komplexes und zeigte die stärkste Interaktion mit rekombinantem PhLP<sub>L</sub> (McLaughlin et al., 2002). Die Frage war, ob auch PhLP<sub>S</sub> oder eines seiner Fragmente eine Bindung mit TCP-1 $\alpha$  unter den Bedingungen einer lebenden Zelle eingehen konnten. Folgendes Ergebnis wurde mit Hilfe einer Ko-Immünpräzipitation gefunden (Abb. 19C): Nach Transfektion von PhLP<sub>S</sub> oder seiner N-terminal deletierten Konstrukte PhLP119-301 und PhLP132-301 konnte endogenes TCP-1 $\alpha$  zusammen mit den PhLP-Formen kopräzipitiert werden. Unter Kontrollbedingungen (Transfektion mit leerem Plasmid) oder nach Transfektion des Konstruktes PhLP145-301 wurde unter diesen Bedingungen kein endogenes TCP-1 $\alpha$  kopräzipitiert. Zusammenfassend bedeutet dieser Befund: Funktionelle Aktivität von PhLP<sub>S</sub> (maximale und hochpotente Hemmung zellulärer G $\beta\gamma$ -Funktion) und Bindung an den CCT-Komplex sind von

denselben strukturellen Determinanten in PhLP abhängig. Im Zusammenhang mit dem Mechanismus der G $\beta$  $\gamma$ -Hemmung durch PhLP<sub>s</sub> (Entstehung dysfunktioneller G $\beta$  und G $\gamma$ -Untereinheiten, Abb. 18C) und der postulierten Bedeutung des CCT-Komplexes bei der Faltung von G $\beta$ , liegt der Schluss nahe, dass PhLP<sub>s</sub> die G $\beta$  $\gamma$ -Faltung durch den CCT-Komplex effektiv stören könnte. Nicht korrekt gefaltete G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten würden anschließend durch proteasomale Abbauewege aus der Zelle entfernt, der Gehalt an nachweisbaren G $\beta$ - und G $\gamma$ -Untereinheiten fällt daher dramatisch ab. Weitere Unterstützung für diese Hypothese kommt von der Überlegung, dass bei einer Hemmung des CCT-Komplexes durch eine andere Methode schließlich dasselbe Resultat zu erzielen sein müsste. Da gegenwärtig keine niedermolekularen und zellgängigen Inhibitoren des CCT-Komplexes zur Verfügung stehen, entschieden wir uns für die Hemmung des CCT-Komplexes mittels spezifisch hergestellter siRNA. Die Interferenz zwischen kurzen und leicht zu transfizierenden RNA-Molekülen mit endogener RNA hatte sich in den letzten Jahren zu einer sehr starken Methode der gezielten Proteinregulation (man spricht hier von Knock-Down) erwiesen (Elbashir et al., 2001, Hannon und Rossi, 2004). Kommerzielle Anbieter offerieren im Internet verschiedene Design-Werkzeuge für diese siRNA-Konstrukte, die nach publizierten Algorithmen eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein Knock-Down-Ereignis bieten. In diese Arbeit wurden zwei siRNA-Moleküle gegen TCP-1 $\alpha$  getestet. Als Kontrolle für unspezifische siRNA-Effekte diente eine Sequenz, die sich gegen GFP richtet und publiziert war (Lewis et al., 2002). Der Vorteil dieser Art von Kontrolle liegt darin, dass diese Konstrukte auch, im Gegensatz zu Nonsense-Kontrollen, in den sogenannten RISC-Komplex eintreten (siehe auch Hannon und Rossi, 2004). In Pilotstudien konnte zunächst gezeigt werden, dass beide siRNA-Konstrukte gegen TCP-1 $\alpha$  die Menge an detektierbarem Protein (bestimmt mittels Western Blot) um etwa 50-70% reduzieren konnte (Daten nicht gezeigt). In der eigentlichen Untersuchung wurde nun eine Mischung zu gleichen Teilen von beiden anti-TCP-1 $\alpha$ -RNAs verwendet, da dieses Vorgehen unspezifische siRNA-Toxizität weiter reduzieren, spezifische Effekte aber addieren kann (Hannon und Rossi, 2004). Wie in Abbildung 20 gezeigt führte nun die spezifische Unterdrückung von TCP-1 $\alpha$  ebenso zur Unterdrückung von G $\beta$ - und G $\gamma$ -Untereinheiten, und zwar sowohl von transfizierten, als auch von endogenen (gezeigt sind die Daten für transfiziertes G $\gamma$ <sub>2</sub> und endogenes G $\beta$ <sub>1</sub>). Kontrollproteine, transfiziert



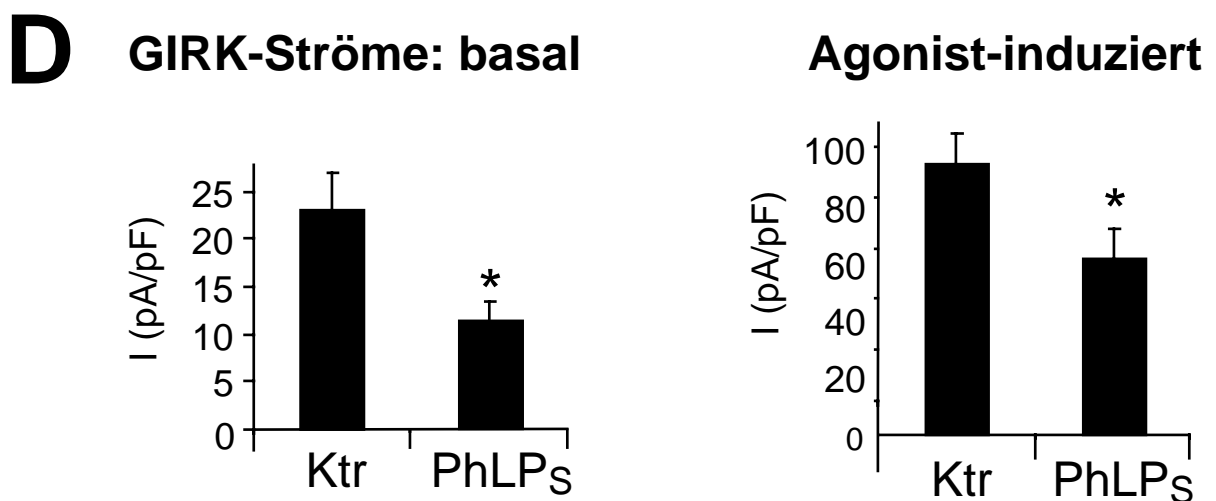
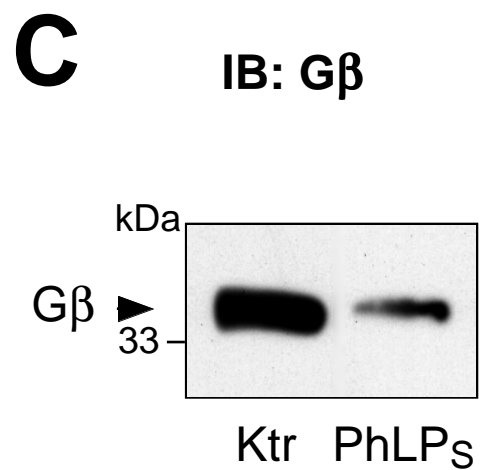
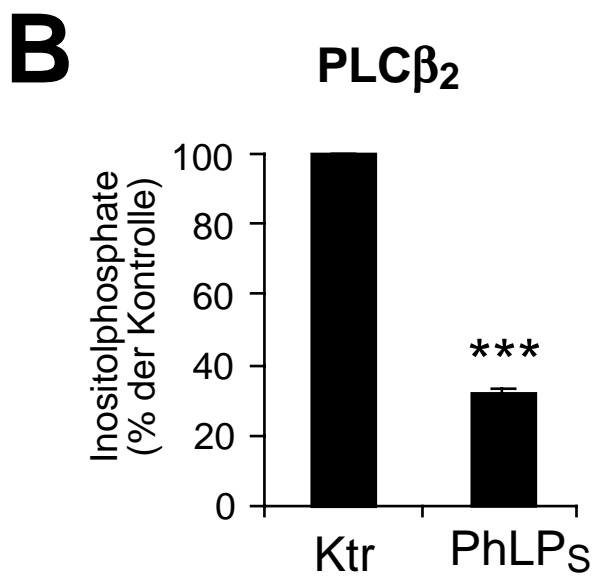
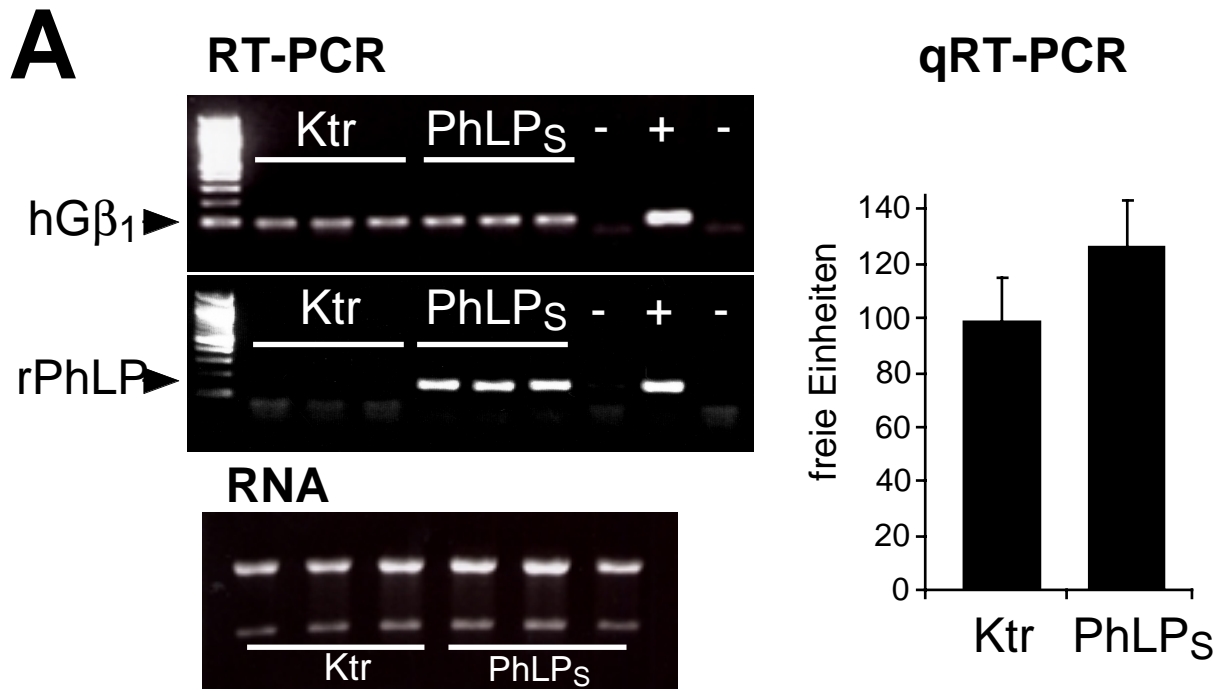
oder endogen, wurden hiedurch nicht beeinflusst. Wir zogen daraus den Schluss, dass die Hemmung des CCT-Komplexes (beziehungsweise einer seiner Untereinheiten) entweder durch PhLP<sub>S</sub> oder durch siRNA sehr ähnliche funktionelle Effekte auf Gβγ-Komplexe ausübt.



**Abb. 20: Knock-Down von TCP-1α führt zur Herabregulation von transfizierten und endogenen Gβ- und Gγ-Untereinheiten.** A: Die RNA-Interferenz mit endogenem TCP-1α führte zur Reduktion der Proteinmenge an transfizierten Gγ<sub>2</sub>-Untereinheiten. HEK 293-Zellen wurden in einer 12-Well-Platte (bei 50% Konfluenz) simultan mit cDNA für Gβ<sub>1</sub>, Gγ<sub>2</sub> und PLCβ<sub>2</sub> (jeweils 0,3 μg) transfiziert und weiterhin entweder mit leerem Vektor (Kontrolle, 1 μg), PhLP<sub>S</sub>-cDNA (1 μg) oder siRNA gegen TCP-1α beziehungsweise GFP (jeweils 1 μg entsprechend 80 pmol). Zweiundvierzig Stunden später wurden die Zellen in Laemmli-Puffer lysiert, einer SDS-Gelelektrophorese auf einem Tris/Tricin-Gel (10%) unterzogen und auf PVDF-Membrane geblottet. Abgebildet sind die Immunoblots aus einem repräsentativen Experiment (von fünf unabhängigen Experimenten). Sie zeigen, dass - wie bisher-Kotransfektion von PhLP<sub>S</sub> aber auch der Knock-Down von TCP-1α die transfizierte Gγ<sub>2</sub>-Untereinheit herabreguliert. Andere transfizierte (hier: PLCβ<sub>2</sub>) oder endogene (hier: β-Actin) Proteine sind hiervon nicht betroffen. Kontroll-siRNA (siGFP) hat keinen Einfluss auf die hier getesteten endogenen und transfizierten Proteine. B: Effekt von siTCP-1α und Kontroll-siRNA (siGFP) auf die Proteinmenge von endogenem Gβ<sub>1</sub>. HEK 293-Zellen wurden hier nur mit siRNA transfiziert (jeweils 80 pmol/ Well einer 12-Well-Platte) und 42 Stunden später aufgearbeitet wie unter A beschrieben. Die Immunoblots eines repräsentativen Experiments (von sechs unabhängigen Versuchen) sind gezeigt und demonstrieren, dass Hemmung von TCP-1α zur Reduktion auch von endogenem Gβ<sub>1</sub> führt.

## PhLP<sub>s</sub> reguliert endogene Gβγ-Signalwege

Abschließend sollte demonstriert werden, dass die Effekte von PhLP<sub>s</sub> auch auf endogene Gβγ-Signalwege wirken können. Um zunächst eine mögliche Interaktion von PhLP<sub>s</sub> auf die mRNA-Produktion von Gβ auszuschließen, wurde die gesamte RNA aus HEK 293-Zellen nach der Transfektion mit PhLP<sub>s</sub> (und entsprechender Kontrolle) präpariert. Die Bedingungen waren identisch mit denen für die Messung von Inositolphosphaten. Zellen jeder Transfektion wurden parallel funktionell überprüft (siehe unten). Die mRNA wurde dann mittels oligo-dT-Primern revers transkribiert, und die Menge an Gβ<sub>1</sub>-cDNA durch quantitative PCR bestimmt. Es konnten keine Unterschiede in der mRNA-Expression von Gβ<sub>1</sub> nach Transfektion von PhLP<sub>s</sub> im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (Abb. 21A). Dieser Befund unterstreicht nochmals, dass eine Down-Regulation der Gβγ-Untereinheiten durch PhLP<sub>s</sub> auf posttranslationaler Ebene stattfindet (proteasomaler Abbau, siehe auch Abb 17C). Im Anschluss wurde die Funktion endogener Gβγ im Inositolphosphat-Assay überprüft. Die endogen stimulierte Aktivität von PLCβ<sub>2</sub> lässt sich durch PhLP<sub>s</sub> signifikant hemmen (Abb. 21B). In parallel durchgeführten Western Blots ließ sich auch endogen eine deutliche Abnahme des Gehaltes an Gβ nachweisen (Abb. 21C). Um nun zu zeigen, dass auch Rezeptor-stimulierte Signalwege durch diese Regulation betroffen sind, wurden die Kaliumströme des GIRK-Kanals (siehe auch Einleitung) nach Kotransfektion mit PhLP<sub>s</sub> gemessen. Diese Experimente wurden an HEK 293-Zellen durchgeführt, die die GIRK-Kanaluntereinheiten 1 und 4 stabil exprimierten. Nach transienter Transfektion des α<sub>2A</sub>-adrenerge Rezeptors konnte die Aktivität des Kanals vor und nach Agonist-Stimulation in der Patch-Clamp-Technik bestimmt werden. Sowohl basale, als auch Agonist-induzierte Kaliumströme sind am GIRK von Gβγ-Untereinheiten abhängig (Ito et al., 1994, Chan et al., 1996, Bünemann und Hosey, 1998). Das Ergebnis zeigte auch hier, dass durch PhLP<sub>s</sub> sowohl basale als auch durch den Agonisten Noradrenalin (1 μM) stimulierte Kaliumströme des GIRK-Kanals gehemmt werden konnten (Abb. 21D). PhLP<sub>s</sub> ist also mit seinem neuartigen Mechanismus in der Lage unterschiedliche endogene Gβγ-abhängige Signaltransduktionswege zu hemmen.



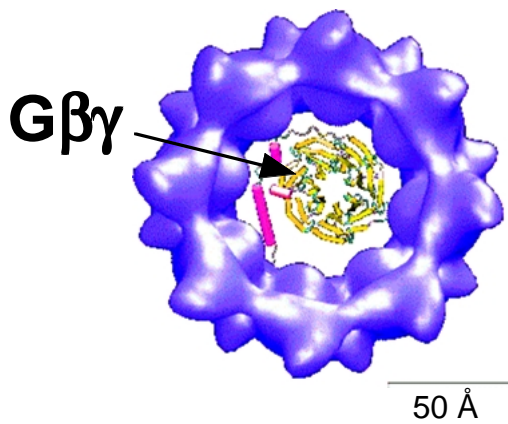
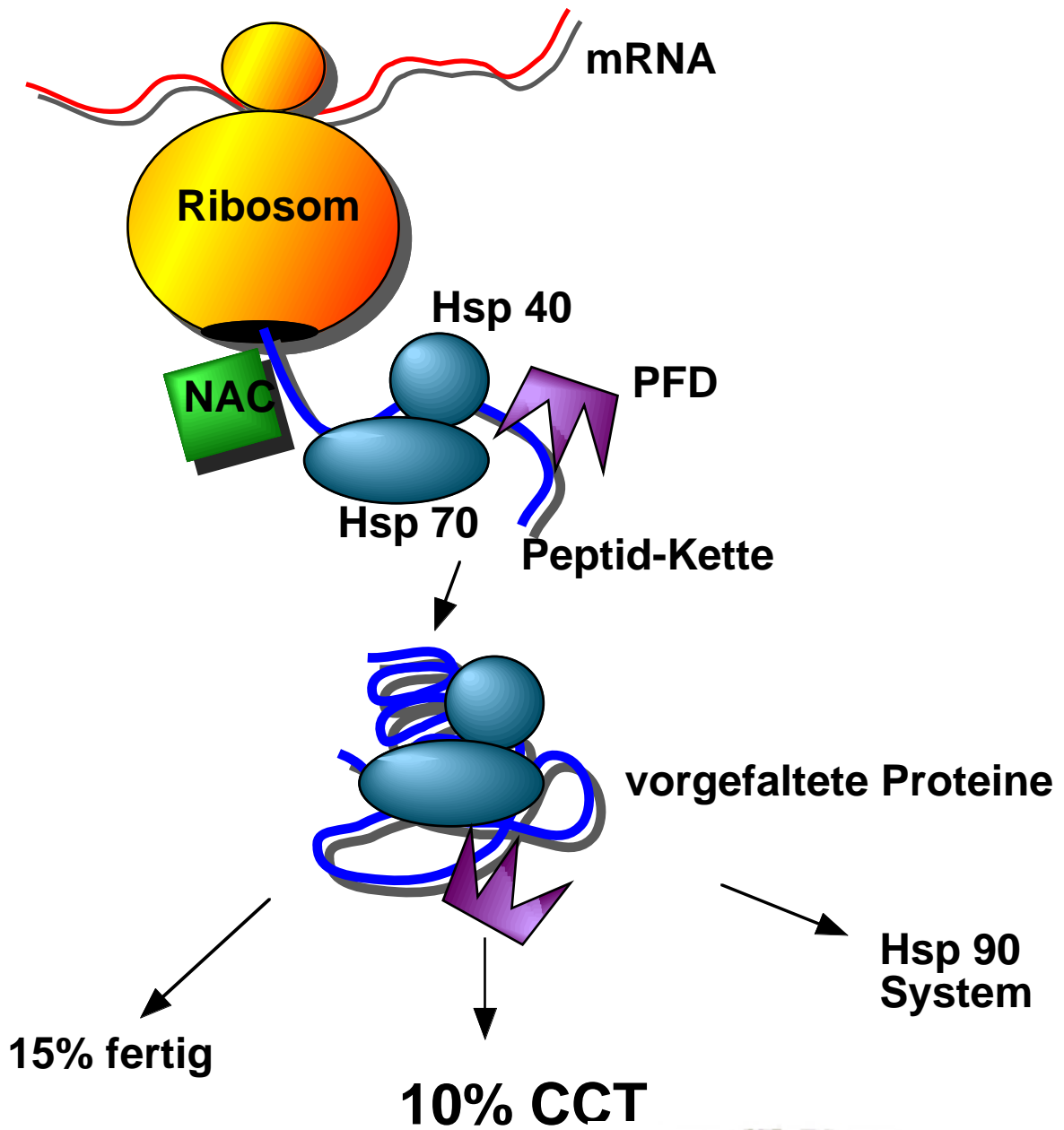
**Abb. 21: Der Effekt von PhLP<sub>s</sub> auf Expression und Funktion endogener Gβγ Untereinheiten.** A: Quantitative Analyse der mRNA-Expression von humanem Gβ<sub>1</sub> nach Transfektion von HEK 293-TSA-Zellen mit cDNA von PhLP<sub>s</sub>, analog durchgeführt wie zur Messung von Inositolphosphaten. Links: durchgeführt wurde eine PCR reverser Transkriptionen (RT-PCR) von humanem Gβ<sub>1</sub> (hGβ<sub>1</sub>, endogen) und transfiziertem PhLP der Ratte (rPhLP) nach RNA-Präparation. Jeweils drei unabhängige Transfektionen (wie angegeben) sind in einem DNA-Gel nach Ethidiumbromidfärbung dargestellt (- bedeutet links PCR einer RNA-Probe ohne vorherige reverse Transkription, und rechts PCR ohne DNA-Muster, + bedeutet PCR von Gβ<sub>1</sub>cDNA). Rechts: Ergebnisse einer quantitativen RT-PCR nach Normalisierung durch einen Verdünnungsstandard. B: Hemmung der Inositolphosphat-Produktion. HEK 293-TSA-Zellen wurden mit cDNA für PLCβ<sub>2</sub> und entweder cDNA für PhLP<sub>s</sub> oder leerem Vektor (Ktr) transient transfiziert und Inositolphosphate bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler von acht unabhängigen Experimenten (jeweils in Dreifachbestimmung; p < 0,001 versus Ktr). C: Herabregulation von endogenem Gβ. Parallel zur Inositolphosphat-Messung in B wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. D: Hemmung von Gβγ-abhängigen GIRK-Strömen. HEK 293-Zellen, die den G-Protein-aktivierten einwärtsgerichtenden Kaliumkanal 1 und 4 (GIRK) stabil exprimierten, wurden transient mit cDNA für den adrenergen α<sub>2</sub>-Rezeptor und parallel mit leerem Vektor (Ktr) beziehungsweise PhLP<sub>s</sub>-cDNA transfiziert. Im Patch-Clamping bestimmte Basalströme und Agonist-induzierte Ströme (1 μM Noradrenalin) wurden durch Ba<sup>2+</sup>-Kanalblockade determiniert. Basale GIRK-Ströme wurden durch PhLP<sub>s</sub> um 50,1 ± 9,1% (n=15) und Agonist-induzierte GIRK-Ströme um 34,9 ± 11,3% (n=15) reduziert (Mittelwerte ± Standardfehler; \*, p < 0,05 versus Kontrolle).

## 4. Diskussion

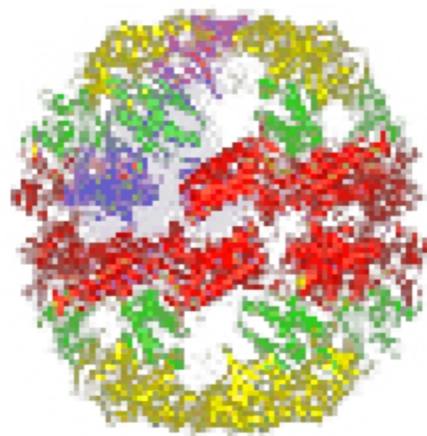
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Regulator Phosducin-like Protein G-Protein  $\beta\gamma$ -Untereinheiten auf zwei vollkommen verschiedene Weisen regulieren kann: Zum einen durch direkte Bindung über eine hochaffine Bindungsstelle im N-Terminus der langen Splice-Variante PhLP<sub>L</sub>. Zum zweiten indirekt durch Regulation der G-Protein  $\beta\gamma$ -Faltung (mit anschließender G $\beta\gamma$ -Downregulation) durch die kurze Splice-Variante PhLP<sub>S</sub>, die die N-Terminale G $\beta\gamma$ -Bindungsstelle nicht besitzt. Proteinfaltung und Downregulation können hierbei nicht nur durch den Splice-Prozess von PhLP reguliert werden (vermutlich eher langfristige Signalregulation), sondern auch durch Phosphorylierung im N-Terminus der langen Splice-Variante. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Casein-Kinase 2 für die Phosphorylierung in intakten Zellen verantwortlich ist. Im Gegensatz zu den Verhältnissen beim homologen Protein Phosducin, welches durch die Phosphorylierung im N-Terminus (durch PKA und CamK) die Affinität zur G $\beta\gamma$ -Untereinheit verliert, beeinflusst die konstitutive Phosphorylierung des N-Terminus von PhLP<sub>L</sub> die Affinität zur G $\beta\gamma$ -Untereinheit nicht. Das heißt, dass PhLP<sub>L</sub>, welches in intakten HEK 293 Zellen, ebenso wie in einigen Gewebetypen (Herz, Gehirn, embryonales Gewebe) konstitutiv phosphoryliert vorliegt, G $\beta\gamma$ -abhängigen Signalwege durch direkte G $\beta\gamma$ -Bindung regulieren und hemmen kann. Zusätzlich scheint auch PhLP<sub>L</sub> im nicht-phosphorylierten Zustand dieselbe Fähigkeit zur Regulation der G $\beta\gamma$ -Faltung zu besitzen wie PhLP<sub>S</sub>. Als Indikator für die Missfaltung von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten diene zunächst die Downregulation der Proteinmenge von G $\beta$  und G $\gamma$  im Western Blot, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Degradation durch das Proteasom abhängig war. In Zellen existiert eine Art Qualitätskontrollmechanismus, der irreversibel missgefaltete oder denaturierte Proteine einer Ubiquitin-abhängigen Degradierung zuführt (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Beispielsweise bindet das Protein Bag-1 sowohl an Hsc70 (ein konstitutiv exprimiertes eukaryotisches Mitglied der Hsp70-Chaperon-Familie) als auch an proteasomale Proteine und stellt somit eine direkte Verbindung zwischen missgefalteten Proteinen und ihrem Abbau dar (Lüders et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass G-Protein  $\beta\gamma$ -Untereinheiten nicht nur degradiert werden, sondern dass sie tatsächlich in einem unfunktionellen Zustand in der Zelle vorliegen, wenn der Regulator PhLP<sub>S</sub> anwesend ist: verhindert man den proteasomalen Abbau von G $\beta$  und G $\gamma$  durch N-terminale Fusion mit einem stabilisierenden Konstrukt, bleiben die beiden Untereinheiten dennoch unfunktionell. Dies zeigte sich in der ausbleibenden Fähigkeit der G $\beta$ - und G $\gamma$ -Untereinheit, in Anwesenheit von PhLP<sub>S</sub>, die Inositolphosphat-Produktion zu stimulieren und sich zu vollständigen heterodimeren G $\beta\gamma$ -Untereinheiten zusammenzuschließen. Gerade der Verlust der Dimerisierungsfähigkeit wurde bisher als wesentliches Kennzeichen einer missgefalteten G $\beta$ -Untereinheit herangezogen (Garcia-Higuera et al., 1998).

Vor kurzen wurde berichtet, dass rekombinantes PhLP<sub>L</sub> an Untereinheiten des zytosolischen Chaperonin-Komplexes CCT (chaperonine containing TCP-1) binden kann und diesen zu hemmen scheint (McLaughlin et al., 2002). CCT gehört zu den sogenannten Gruppe II Chaperonen, die für die endgültige Faltung von ca. 15% der Proteine einer Zelle verantwortlich sind (Abb. 22). Diese Chaperone sind im Zytosol von eukaryotischen Zellen angesiedelt und besitzen eine fassförmige Struktur, bestehend aus zwei Ringen von je acht verschiedenen, aber homologen Untereinheiten (TCP-Untereinheiten). Chaperone erkennen ihre ungefalteten Substrate an hydrophoben Polypeptiden am Eingang ihrer Kavität. Die Faltung erfolgt dann unter Verbrauch von ATP im Inneren der Höhle und unter zu Hilfenahme von Ko-Chaperon-Proteinen. Zu den am besten untersuchten CCT-Substraten zählen die Zytoskelett-Proteine Aktin und Tubulin, aber auch einige Vertreter aus der Gruppe der sogenannten WD40-Repeatproteine (Hartl und Hayer-Hartl, 2002, Valpuesta et al., 2002). WD40-Repeatproteine sind gekennzeichnet durch eine 7-blättrigen Propellerstruktur und die G $\beta$ -Untereinheit ist ein prominenter Vertreter dieser Gruppe (Garcia-Higuera et al., 1998, Valpuesta et al., 2002). Die Arbeit von McLaughlin et al. ließ in diesem Zusammenhang die wichtige Frage unbeantwortet, ob auch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten über CCT gefaltet und dies durch PhLP gehemmt werden könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass genau jene Abschnitte von PhLP<sub>S</sub>, die für Funktionshemmung und Downregulation von G $\beta\gamma$  in intakten Zellen verantwortlich sind, auch die Bindung an TCP-1 $\alpha$  (einer



Aufsicht

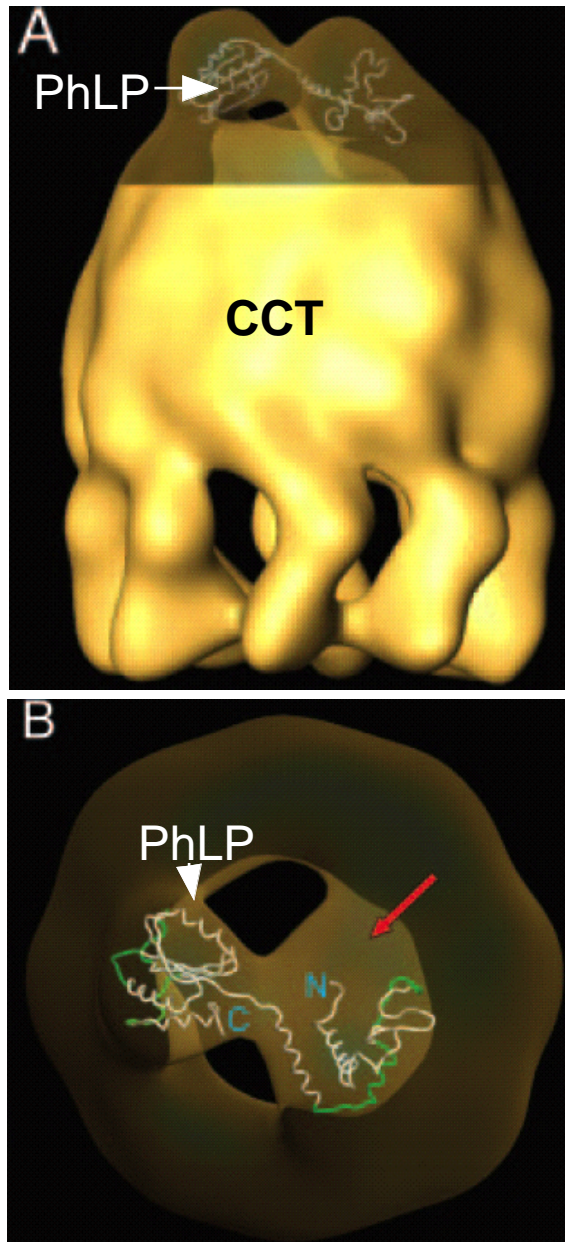


Seitenansicht

**Abb. 22: Die Faltungsmaschinerie im Zytosol.** Gereifte Messenger-RNA wird an Ribosomen in eine Aminosäurekette übersetzt. Damit ein funktionierendes Protein entstehen kann, muss die Aminosäurekette zunächst sofort nach "Geburt" von schützenden Proteinen in Empfang genommen werden (hier NAC: nascent chain associated complex), um ein unkontrolliertes "Verkleben" zu verhindern. Die vollständige Polypeptidkette wird dann mit Hilfe sogenannter Chaperon-Proteine zu einem dreidimensionalen Protein gefaltet. Typischerweise hieran beteiligt sind zunächst die Hitzeschockproteine HSP 40 und HSP 70. Weitere Hilfsmoleküle mit Adapterfunktion wie zum Beispiel Prefoldin (PFD) unterstützen den Faltungsprozess. Etwa 15% der zytosolischen Proteine sind danach funktionsbereit, während die große Mehrheit der Polypeptide ihre endgültige Faltung im sogenannten HSP 90-System erfährt. Allerdings werden schätzungsweise zirka 10% der zytosolischen Proteine zur endgültigen Faltung dem CCT-Komplex zugeführt (chaperonin containing TCP). Viele der bisher identifizierten CCT-Substrate sind Proteine mit einer WD40 Repeatstruktur. Ein prototypischer Vertreter dieser Proteinfamilie und ein bisher postuliertes Substrat von CCT ist die G $\beta$ -Untereinheit (hier in die Struktur des CCT einmodelliert, (nach Hartl und Hayer-Hartl, 2002 und Valpuesta et al., 2002).

Untereinheit des CCT-Komplexes) vermittelten (Abb. 19). Ferner wird diese Hypothese gestützt durch den Befund, dass die direkte Hemmung des CCT-Komplexes (in diese Arbeit durch Knock-Down von TCP-1 $\alpha$  durch siRNA) ebenfalls zur Herabregulation von G $\beta$ -Untereinheiten führte (Abb. 20). Diese Korrelation zwischen den funktionellen Daten zur G $\beta$ -Missfaltung und den Daten zur CCT-Bindung und Hemmung lassen den Schluss zu, dass PhLP<sub>s</sub> in der Lage ist, über Interaktion mit dem CCT-Chaperonin-Komplex eine neuartige Regulation von G $\beta$ -Untereinheiten auszuüben. Unterstützung erfährt unsere Hypothese durch zwei kürzlich erschienenen Arbeiten: 1) Die dreidimensionale Rekonstruktion des CCT:PhLP-Komplexes, gewonnen aus kryoelektronenmikroskopischen Studien, konnte zeigen, dass PhLP auf dem Deckel zum Eingang der Chaperonhöhle bindet, selbst also nicht wie ein Substrat in die Höhle eindringt. Hierbei scheint PhLP mit jeweils mehreren CCT-Untereinheiten zu interagieren (unter anderem auch TCP-1 $\alpha$ , Abb. 23). Ferner bestätigten Bindungsstudien zwischen verschiedenen PhLP/Phosducin-Chimären und TCP-1 $\alpha$  die von uns charakterisierten funktionellen Domänen in PhLP<sub>s</sub> (Martin-Benito et al., 2004). 2) Eine weitere Arbeit bestätigt nun den dominant negativen Effekt von PhLP<sub>s</sub> und PhLP<sub>L</sub>A18-20 auf die Bildung

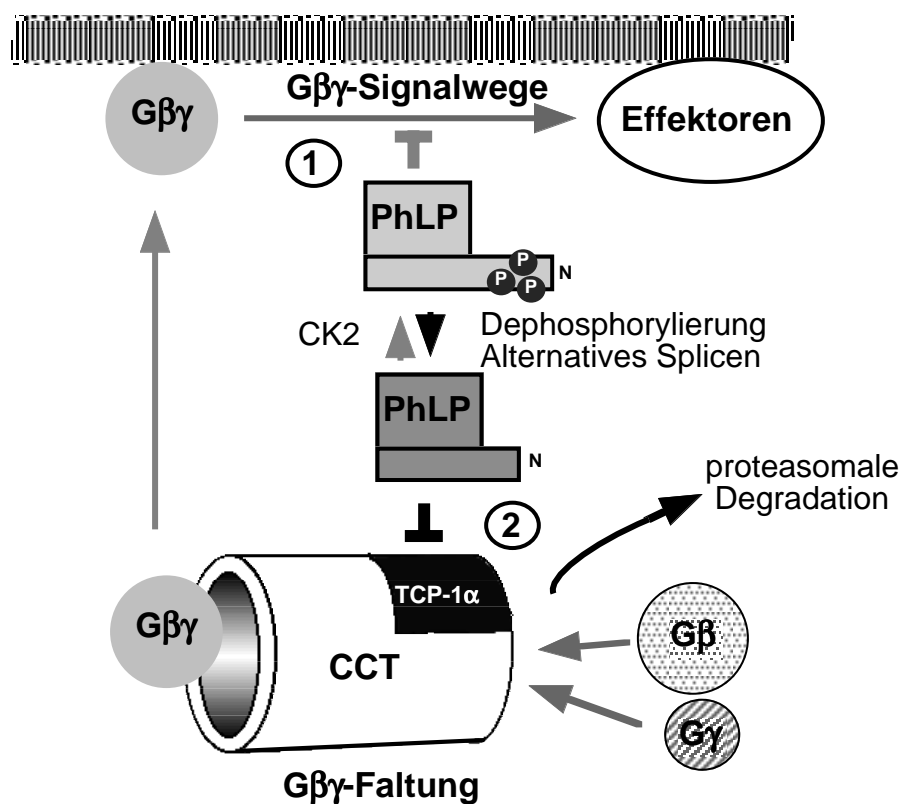




**Abb. 23:**  
**Kryo-elektronen-**  
**mikroskopische**  
**dreidimensionale**  
**Rekonstruktion des**  
**CCT:PhLP-Komplexes.**  
 Die atomare PhLP-  
 Struktur ist auf das Modell  
 aus der kryoelektronen-  
 mikroskopischen  
 Untersuchung projiziert.  
 A) Seitenansicht und B)  
 vergrößerte Aufsicht auf  
 den PhLP:CCT-Komplex.  
 Der rote Pfeil kenn-  
 zeichnet die N-terminalen  
 50 Aminosäuren von  
 PhLP<sub>L</sub>, die in der  
 atomaren Struktur nicht  
 abgebildet sind (nach  
 Martin-Benito et al.,  
 2004).

funktioneller G $\beta$  $\gamma$ -Dimere in Zellen. Die Autoren zeigen aber ebenso, dass CK2-phosphoryliertes PhLP<sub>L</sub> notwendig zu sein scheint, um eine korrekte Faltung von G $\beta$  $\gamma$  überhaupt initiieren zu können. Die Autoren um Barry Willardson postulieren, dass wildtypisches phosphoryliertes PhLP<sub>L</sub> zunächst G $\beta$  in einem unreifen Zustand bindet, und anschließend die Dimerisierung mit G $\gamma$  stattfindet (Lukov et al., 2005). Diese These wird gestützt durch die frühere Beobachtung, dass in *Dictyostelium discoïdum* der Knock-Out eines PhLP-Gens zur Bildung unfunktionaler G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten führte (Blaauw et al., 2003). Ist PhLP also ein Chaperon oder ein Inhibitor für die G $\beta$  $\gamma$ -Faltung? Diese Frage muss nun zukünftig geklärt werden.

Darüberhinaus beschreibt die vorliegende Arbeit eine Art Schalter-Mechanismus, der zwischen unterschiedlichen Arten der G-Protein-Regulation wechseln kann (zusammenfassend dargestellt in Abb. 24). Herauszufinden, welche Bedingungen in Zellen und Organismen diesen Schalter bedienen, und ob es möglicherweise niedermolekulare Stoffe gibt, die diesen Mechanismus beeinflussen und somit Grundlage neuartiger Medikamente bilden können, wird eine weitere Herausforderung in der Zukunft sein.



**Abb. 24: Gβγ-Regulation durch PhLP: zwei Mechanismen eines Regulators.**

Die konstitutiv phosphorylierte Isoform PhLP<sub>L</sub> bindet Gβγ-Untereinheiten und hemmt so die Aktivierung Gβγ-abhängiger Signalwege wie zum Beispiel PLCβ<sub>2</sub> (1). Ein völlig neuartiger Mechanismus der Gβγ-Regulation führt hingegen zur Bildung von unfunktionellen Untereinheiten, die dann in der Folge durch das Proteasom degradiert werden. Dieser Mechanismus entsteht durch die Interaktion von PhLP mit CCT oder einer seiner Untereinheiten wie TCP-1α (2). Ein Umschalten zwischen beiden Mechanismen der Regulation kann entweder durch alternatives Splicing erfolgen (da PhLP<sub>S</sub> nur schwach an Gβγ bindet, aber effektiv die Faltung inhibiert) oder durch Casein Kinase 2-Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub> (da Phospho-PhLP<sub>L</sub> nicht die CCT-Funktion zu behindern scheint).

## 5. Zusammenfassung

Phosducin-like Protein existiert in zwei Splicevarianten: PhLP<sub>LONG</sub> (PhLP<sub>L</sub>) und PhLP<sub>SHORT</sub> (PhLP<sub>S</sub>). Sie unterscheiden sich in der Länge ihres N-Terminus und in ihrem Expressionsmusters: Die lange Form (PhLP<sub>L</sub>) wird ubiquitär exprimiert und bindet G-Protein-βγ-Untereinheiten (Gβγ), was zur Hemmung von Gβγ-abhängigen Funktionen führt. Der um 83 Aminosäuren verlängerte N-Terminus besitzt ein hoch konserviertes Motiv, welches für die Gβγ-Bindung und Regulation von entscheidender Bedeutung ist. Im Gegensatz hierzu besitzt die kurze Spliceform PhLP<sub>S</sub>, deren Expression in verschiedenen Gewebetypen deutlich geringer ist, diese hoch konservierte Region nicht. Daher schien - getestet an verschiedenen *in vitro*-Systemen - PhLP<sub>S</sub> keine herausragende Rolle bei der Regulation von G-Protein-βγ-Untereinheiten zu spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals die Rolle von PhLP<sub>L</sub> und PhLP<sub>S</sub> bei der Gβγ-Regulation in intakten Zellen untersucht. Hierbei konnte überraschenderweise gefunden werden, dass PhLP<sub>S</sub> der potentere und effizientere Regulator für Gβγ-abhängige Signale war. PhLP<sub>L</sub> hingegen schien in seiner Gβγ-regulierenden Fähigkeit limitiert zu werden. Die Ursache dieser Limitierung von PhLP<sub>L</sub> in intakten Zellen wurde auf eine konstitutive Phosphorylierung seines verlängerten N-Terminus durch die ubiquitäre Casein Kinase 2 (CK2) zurückgeführt. Die verantwortlichen Phosphorylierungsstellen (S18, T19, S20) wurde identifiziert und die Mutation der CK2-Phosphorylierungsstellen (PhLP<sub>L</sub>A18-20) führte zu einer Verbesserung der hemmenden Funktion von PhLP<sub>L</sub> in Zellen. Regulierte also die CK2-Phosphorylierung die Affinität von PhLP<sub>L</sub> zur Gβγ-Untereinheit? *In vitro*-Assays zur Bindungsfähigkeit von rekombinantem PhLP<sub>L</sub> (vor und nach CK2-Phosphorylierung) konnten diese Hypothese allerdings nicht bestätigen: die Phosphorylierung beeinflusste die Affinität nicht. Eine genaue Analyse der N-terminalen Strukturen von PhLP<sub>L</sub> zeigte indes, dass die Regulationsfähigkeit von PhLP<sub>L</sub> in intakten Zellen vor allem in dem konservierten Gβγ-Bindungsmotiv zu suchen war. Die Mutation einer einzigen Aminosäure (W66V) war ausreichend, um sowohl die Gβγ-Bindungsfähigkeit, als auch die Fähigkeit zur funktionellen Hemmung in intakten Zellen zu verlieren. Was war also der Mechanismus der Hemmung von Gβγ durch PhLP<sub>S</sub> und die phosphorylierungs-

defiziente Mutante von PhLP<sub>L</sub>? Ein erster Hinweis hierauf kam von der Beobachtung, dass die G $\beta$ - und G $\gamma$ -Untereinheiten in Anwesenheit von PhLP<sub>S</sub> in ihrem Proteingehalt deutlich reduziert vorlagen (wie in Western Blots gezeigt). Dieser Mechanismus schien von proteasomalen Abbauwegen abzuhängen (gezeigt durch Effekte des spezifischen Proteasominhibitors Lactazystin). Allerdings schien eine Stabilisierung der G $\beta$ - und G $\gamma$ -Untereinheiten (durch N-terminale Fusion mit einem Protein zur vitalen Proteinfärbung) nicht die Funktionsfähigkeit von G $\beta\gamma$  in Anwesenheit von PhLP<sub>S</sub> bewahren zu können. Ganz im Gegenteil, es wurde gezeigt, dass G $\beta$  und G $\gamma$  hierbei nicht mehr zu einem funktionellen Dimer assoziierten. Dies war ein Hinweis darauf, dass möglicherweise Proteinfaltungsmechanismen bei der Regulation essentiell sein könnten. Eine postulierte Rolle bei der Faltung von WD40-Repeatproteinen wie der G $\beta$ -Untereinheit wurde dem Chaperonin-Komplex CCT (chaperonin containing ICP) zugedacht. Folgerichtig konnte PhLP<sub>S</sub> mit seinen funktionell aktiven Domänen an endogenes TCP-1 $\alpha$  (einer Untereinheit von CCT) binden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des CCT-Komplexes durch RNA-Interferenz mit TCP-1 $\alpha$  ebenso wie PhLP<sub>S</sub> zur spezifischen Reduktion von G $\beta\gamma$  führte. In dieser Arbeit wurde also ein neuartiger Mechanismus der G-Protein-Regulation durch Hemmung der Proteinfaltung von G $\beta\gamma$  beschrieben. Ein Schaltmechanismus zwischen direkter G $\beta\gamma$ -Bindung (induziert durch CK2-Phosphorylierung von PhLP<sub>L</sub>) und Hemmung der Proteinfaltung von G $\beta\gamma$  (induziert durch alternatives Splicen oder durch Dephosphorylierung von PhLP) wird postuliert.

## 6. Zusammenfassung in Englisch

Phosducin-like protein (PhLP) exists in two splice variants PhLP<sub>LONG</sub> (PhLP<sub>L</sub>) and PhLP<sub>SHORT</sub> (PhLP<sub>S</sub>): They differ in the length of their N-termini and their expression pattern: The long form (PhLP<sub>L</sub>) is a ubiquitously expressed protein and binds G-protein  $\beta\gamma$ -subunits ( $G\beta\gamma$ ) and thereby inhibits  $G\beta\gamma$ -mediated function. The extended N-terminus of PhLP<sub>L</sub> (83 amino acids) contains a highly conserved  $G\beta\gamma$ -binding motif, which plays the crucial role in binding and regulating  $G\beta\gamma$ -subunits. In contrast, the short splice variant PhLP<sub>S</sub>, which has a more restricted expression, lacks this motif and did not seem to exert a major  $G\beta\gamma$ -inhibition, when tested with purified proteins. In the present work, for the first time, we investigated the  $G\beta\gamma$ -inhibiting properties of PhLP<sub>L</sub> and PhLP<sub>S</sub> in intact cells. Surprisingly, PhLP<sub>S</sub> was the more potent and effective  $G\beta\gamma$  inhibitor, while PhLP<sub>L</sub> was limited in this respect. The reason for the limited ability to inhibit  $G\beta\gamma$  in intact cells was found in a constitutive phosphorylation by the ubiquitous kinase casein kinase 2 (CK2). The responsible phosphorylation sites could be identified (S18, T19, S20) and mutation of those sites into alanines could ameliorate the function of PhLP<sub>L</sub>. We therefore hypothesised that CK2 dependent phosphorylation of PhLP<sub>L</sub> should reduce binding affinity towards  $G\beta\gamma$  subunits. But instead, direct phosphorylation of recombinant PhLP<sub>L</sub> by CK2 did not reduce its binding affinities. A thorough analysis of the N terminus of PhLP<sub>L</sub> revealed that a single mutation of the conserved N terminal binding motif (W66V) was sufficient to ablate  $G\beta\gamma$  binding and  $G\beta\gamma$  inhibition in intact cells. A first hint to an alternative mechanism came from the observation that - in the presence of PhLP<sub>S</sub> - the protein content of  $G\beta$  and  $G\gamma$  subunits was dramatically reduced (as determined by Western blotting). This phenomenon seemed to be dependent on a proteasomal pathway (which was shown by effects of the specific proteasome inhibitor lactacystine). But a stabilization of the  $G\beta$  and  $G\gamma$  subunits through N terminal fusion of a dye-labeling protein could not restore the function of  $G\beta\gamma$  in the presence of PhLP<sub>S</sub>. Instead, it could be demonstrated that under these conditions  $G\beta$  and  $G\gamma$  did not form functional dimers any more. This finding led to the conclusion that a protein folding mechanism was possibly involved. A postulated role in the folding of WD40 repeat proteins (like the  $G\beta$  subunit) was assumed for the cytosolic chaperonin

complex CCT in the literature. PhLP<sub>S</sub> was able to bind to TCP-1 $\alpha$ , a subunit of CCT, as were the functionally active domains of PhLP<sub>S</sub>. We further demonstrated that the inhibition of CCT by RNA interference with TCP-1 $\alpha$  also led to down-regulation of G $\beta$  and G $\gamma$  subunits. So, in this thesis, a novel mechanism of G-protein regulation through inhibition of G $\beta\gamma$  protein folding was described. Further, a switch mechanism between direct G $\beta\gamma$  binding (induced by phosphorylation of PhLP<sub>L</sub>) and inhibition of G $\beta\gamma$  folding (induced by alternative splicing or dephosphorylation of PhLP) is postulated.

## 7. Literaturverzeichnis

**J. E. Allende und C. C. Allende, (1995)**

Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *Faseb J*, **9**, 313-23.

**C. Antos, N. Frey, S. Marx, S. Reiken, M. Gaburjakova, J. Richardson, A. Marks und E. Olson, (2001)**

Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase A. *Circ Res*, **89**, 997-1004

**P. H. Bauer und M. J. Lohse, (1998)**

Effects of phosducin on the GTPase cycle of Go. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **357**, 371-7.

**P. H. Bauer, S. Müller, M. Puzicha, S. Pippig, B. Obermaier, E. J. Helmreich und M. J. Lohse, (1992)**

Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator. *Nature*, **358**, 73-6.

**I. Bettahi, C. Marker, M. Roman und K. Wickman, (2002)**

Contribution of the Kir3.1 subunit to the muscarinic-gated atrial potassium channel IKACH. *J Biol Chem.*, **277**, 48282-48288

**G. E. Billman, (1993)**

Intracellular calcium chelator, BAPTA-AM, prevents cocaine-induced ventricular fibrillation. *Am J Physiol*, **265**, H1529-35.

**M. Blaauw, J. C. Knol, A. Kortholt, J. Roelofs, Ruchira, M. Postma, A. J. Visser und P. J. van Haastert, (2003)**

Phosducin-like proteins in Dictyostelium discoideum: implications for the phosducin family of proteins. *The Embo Journal*, **22**, 5047-57

**K. Block, T. G. Boyer und P. R. Yew, (2001)**

Phosphorylation of the human ubiquitin-conjugating enzyme, CDC34, by casein kinase 2. *J Biol Chem*, **276**, 41049-58.

**K. Blüml, W. Schnepf, S. Schröder, M. Beyermann, M. Macias, H. Oschkinat und M. J. Lohse, (1997)**

A small region in phosphodiesterase-3 inhibits G-protein  $\beta\gamma$ -subunit function. *Embo J*, **16**, 4908-15.

**J. Bockaert und J. Pin, (1999)**

Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J*, **18**, 1723-1729

**M. M. Bradford, (1976)**

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254

**M. Bünemann und M. M. Hosey, (1998)**

Regulators of G protein signaling (RGS) proteins constitutively activate G $\beta$ gamma-gated potassium channels. *J Biol Chem*, **273**, 31186-90

**K. W. Chan, M. N. Langan, J. L. Sui, J. A. Kozak, A. Pabon, J. A. Ladas und D. E. Logothetis, (1996)**

A recombinant inwardly rectifying potassium channel coupled to GTP-binding proteins. *J Gen Physiol*, **107**, 381-97

**C. Chen und H. Okayama, (1987)**

High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, **7**, 2745-2752

**F. Chen, K. Spicher, M. Jiang, L. Birnbaumer und G. Wetzel, (2001)**

Lack of muscarinic regulation of Ca<sup>2+</sup> channels in G $_{i2}\alpha$  knockout mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**, H1989-1995



**C. M. Craft, R. N. Lolley, M. F. Seldin und R. H. Lee, (1991)**

Rat pineal gland phosducin: cDNA isolation, nucleotide sequence, and chromosomal assignment in the mouse. *Genomics*, **10**, 400-9.

**C. M. Craft, J. Xu, V. Z. Slepak, X. Zhan-Poe, X. Zhu, B. Brown und R. N. Lolley, (1998)**

PhLPs and PhLOPs in the phosducin family of G beta gamma binding proteins. *Biochemistry*, **37**, 15758-72.

**S. Danner und M. J. Lohse, (1996)**

Phosducin is a ubiquitous G-protein regulator. *PNAS*, **93**, 10145-50.

**C. Dessauer, B. Posner und A. Gilman, (1996)**

Visualizing signal transduction: receptors, G proteins, and adenylate cyclases. *Clin Sci (Lond)*, **91**, 527-537

**F. Dicker, U. Quitterer, R. Winstel, K. Honold und M. J. Lohse, (1999)**

Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *PNAS*, **96**, 5476-81.

**S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber und T. Tuschl, (2001)**

Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498

**S. Engelhardt, L. Hein, F. Wiesmann und M. Lohse, (1999)**

Progressiv hypertrophy and heart failure in  $\beta_1$ -adrenergic receptor transgenic mice. *PNAS*, **96**, 7059-7064

**K. Freeman, C. Colon-Rivera, M. C. Olsson, R. L. Moore, H. D. Weinberger, I. L. Grupp, K. L. Vikstrom, G. Iaccarino, W. J. Koch und L. A. Leinwand, (2001)**

Progression from hypertrophic to dilated cardiomyopathy in mice that express a mutant myosin transgene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**, H151-159

**I. Garcia-Higuera, C. Gaitatzes, T. F. Smith und E. J. Neer, (1998)**

Folding a WD Repeat Propeller. Role of Highly Conserved Aspartic Acid Residues in the G Protein  $\beta$  Subunit and Sec13. *J Biol Chem*, **273**, 9041-9049

**R. Gaudet, A. Bohm und P. B. Sigler, (1996)**

Crystal structure at 2.4 Ångstrom resolution of the complex of transducin  $\beta\gamma$  and its regulator, phosducin. *Cell*, **87**, 577-88.

**R. Gaudet, J. R. Savage, J. N. McLaughlin, B. M. Willardson und P. B. Sigler, (1999)**

A molecular mechanism for the phosphorylation-dependent regulation of heterotrimeric G proteins by phosducin. *Mol Cell*, **3**, 649-60.

**J. Gehrman, M. Meister, C. T. Maguire, D. C. Martins, P. E. Hammer, E. J. Neer, C. I. Berul und U. Mende, (2002)**

Impaired parasympathetic heart rate control in mice with a reduction of functional G protein  $\beta\gamma$ -subunits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **282**, H445-56

**M. Gense, N. Vitale, S. Chasserot-Golaz und M. F. Bader, (2000)**

Regulation of exocytosis in chromaffin cells by phosducin-like protein, a protein interacting with G protein  $\beta\gamma$  subunits. *FEBS Lett*, **480**, 184-8.

**O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann und F. J. Sigworth, (1981)**

Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*, **391**, 85-100

**M. H. Hamilton, L. A. Cook, T. R. McRackan, K. L. Schey und J. D. Hildebrandt, (2003)**

$\gamma$  2 subunit of G protein heterotrimer is an N-end rule ubiquitylation substrate.

*PNAS*, **100**, 5081-5086

**H. Hamm, (1998)**

The many faces of G protein signaling.

*J Biol Chem.*, **273**, 669-672

**H. Hamm, (2001)**

How activated receptors couple to G proteins.

*PNAS*, **98**, 4819-4821

**J. G. Hannon und J. J. Rossi, (2004)**

Unlocking the potential of human genome with RNA interference.

*Nature*, **431**, 371-8

**V. B. Harding, L. R. Jones, R. J. Lefkowitz, W. J. Koch und H. A. Rockman, (2001)**

Cardiac  $\beta$ ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure.

*PNAS*, **98**, 5809-5814

**F. U. Hartl und M. Hayer-Hartl, (2002)**

Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein.

*Science*, **295**, 1852-1858

**B. E. Hawes, K. Touhara, H. Kurose, R. J. Lefkowitz und J. Inglesse, (1994)**

Determination of the G  $\beta\gamma$ -binding domain of phosducin. A regulatable modulator of G  $\beta\gamma$  signaling.

*J Biol Chem*, **269**, 29825-30.

**M. Hekman, P. H. Bauer, P. Sohlmann und M. J. Lohse, (1994)**

Phosducin inhibits receptor phosphorylation by  $\beta$ -adrenergic receptor kinase in a PKA-regulated manner. *FEBS Lett*, **343**, 120-4.

**J. R. Hepler, (2003)**

RGS Protein and G Protein Interactions: A Little Help from Their Friends.  
*Mol Pharmacol*, **64**, 547-549

**S. P. Heximer, R. H. Knutsen, X. Sun, K. M. Kaltenbronn, M.-H. Rhee, N. Peng, A. Oliveira-dos-Santos, J. M. Penninger, A. J. Muslin, T. H. Steinberg, J. M. Wyss, R. P. Mecham und K. J. Blumer, (2003)**

Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice.  
*J. Clin. Invest.*, **111**, 445-452

**S. Hollinger und J. R. Hepler, (2002)**

Cellular Regulation of RGS Proteins: Modulators and Integrators of G Protein Signaling. *Pharmacol Rev*, **54**, 527-559

**L. G. Hommers, M. J. Lohse und M. Bünemann, (2003)**

Regulation of the inward rectifying properties of G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) channels by G $\beta\gamma$  subunits. *J Biol Chem*, **278**, 1037-43

**G. Iaccarino, H. A. Rockman, K. F. Shotwell, E. D. Tomhave und W. J. Koch, (1998)**

Myocardial overexpression of GRK3 in transgenic mice: evidence for in vivo selectivity of GRKs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **275**, H1298-1306

**H. Ito, K. Ono und A. Noma, (1994)**

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

**M. Iwase, S. Bishop, M. Uechi, D. Vatner, R. Shannon, R. Kudej, D. Wight, T. Wagner, Y. Ishikawa, C. Homcy und S. Vatner, (1996)**

Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression. *Circ Res*, **78**, 517-524

**M. Jiang, M. S. Gold, G. Boulay, K. Spicher, M. Peyton, P. Brabet, Y. Srinivasan, U. Rudolph, G. Ellison und L. Birnbaumer, (1998)**

Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein G<sub>o</sub>.  
*PNAS*, **95**, 3269-3274

**S. Jiang, S. C. Chow, P. Nicotera und S. Orrenius, (1994)**

Intracellular Ca<sup>2+</sup> signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor thapsigargin. *Exp Cell Res*, **212**, 84-92.

**M. E. Jurman, L. M. Boland, Y. Liu und G. Yellen, (1994)**

Visual identification of individual transfected cells for electrophysiology using antibody-coated beads. *Biotechniques*, **17**, 876-81

**S. Kasahara, P. Wang und D. L. Nuss, (2000)**

Identification of bdm-1, a gene involved in G protein β-subunit function and α-subunit accumulation. *PNAS*, **97**, 412-7.

**A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel und K. Johnsson, (2003)**

A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nature Biotech*, **21**, 86-9

**J. R. Keys, E. A. Greene, W. J. Koch und A. D. Eckhart, (2002)**

Gq-Coupled Receptor Agonists Mediate Cardiac Hypertrophy Via the Vasculature.  
*Hypertension*, **40**, 660-666

**S. J. Kim und C. R. Kahn, (1997)**

Insulin stimulates p70 S6 kinase in the nucleus of cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **234**, 681-5.

**S. A. Kotecha und J. F. MacDonald, (2003)**

Signaling molecules and receptor transduction cascades that regulate NMDA receptor-mediated synaptic transmission. *Int Rev Neurobiol.*, **54**, 51-106

**T. Kozasa, X. Jiang, M. J. Hart, P. M. Sternweis, W. D. Singer, A. G. Gilman, G. Bollag und P. C. Sternweis, (1998)**

p115 RhoGEF, a GTPase Activating Protein for  $G\alpha_{12}$  and  $G\alpha_{13}$ .  
*Science*, **280**, 2109-2111

**D. Lambricht, J. Sondek, A. Bohm, N. Skiba, H. Hamm und P. Sigler, (1996)**

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

**D. Lee, S. George und B. O'Dowed, (2003)**

Continued discovery of ligands for G protein-coupled receptors.  
*Life Science*, **74**, 293-297

**R. H. Lee, B. M. Brown und R. N. Lolley, (1984)**

Light-induced dephosphorylation of a 33K protein in rod outer segments of rat retina.  
*Biochemistry*, **23**, 1972-7.

**R. H. Lee, B. M. Brown und R. N. Lolley, (1990)**

Protein kinase A phosphorylates retinal phosducin on serine 73 in situ.  
*J Biol Chem*, **265**, 15860-6.

**R. H. Lee, B. S. Lieberman und R. N. Lolley, (1987)**

A novel complex from bovine visual cells of a 33,000-dalton phosphoprotein with  $\beta$ - and  $\gamma$ -transducin: purification and subunit structure. *Biochemistry*, **26**, 3983-90.

**R. H. Lee, T. D. Ting, B. S. Lieberman, D. E. Tobias, R. N. Lolley und Y. K. Ho, (1992)**

Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin in bovine rod photoreceptor cells. Interaction of phosducin and transducin. *J Biol Chem*, **267**, 25104-12.

**J. Lem, N. V. Krasnoperova, P. D. Calvert, B. Kosaras, D. A. Cameron, M. Nicolo, C. L. Makino und R. L. Sidman, (1999)**

Morphological, physiological, and biochemical changes in rhodopsin knockout mice. *PNAS*, **96**, 736-41.

**D. L. Lewis, J. E. Hagstrom, A. G. Loomis, J. A. Wolff und H. Herweijer, (2002)**

Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice.

*Nature Genetics*, **32**, 107-8

**Z. Li, K. L. Laugwitz, K. Pinkernell, I. Pragst, C. Baumgartner, E. Hoffmann, K. Rosport, G. Munch, A. Moretti, J. Humrich, M. J. Lohse und M. Ungerer, (2003)**

Effects of two G $\beta\gamma$ -binding proteins -N-terminally truncated phosducin and  $\beta$ -adrenergic receptor kinase C terminus ( $\beta$ ARKct)--in heart failure.

*Gene Therapy*, **10**, 1354-61

**A. Lin, J. Frost, T. Deng, T. Smeal, N. al-Alawi, U. Kikkawa, T. Hunter, D. Brenner und M. Karin, (1992)**

Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity.

*Cell*, **70**, 777-89.

**A. Loew, Y. K. Ho, T. Blundell und B. Bax, (1998)**

Phosducin induces a structural change in transducin  $\beta\gamma$ .

*Structure*, **6**, 1007-19.

**M. Lohse und S. Engelhardt, (2001)**

Protein kinase A transgenes: the many faces of cAMP.

*Circ Res*, **89**, 938-940

**M. J. Lohse, S. Engelhardt und T. Eschenhagen, (2003)**

What Is the Role of  $\beta$ -Adrenergic Signaling in Heart Failure?

*Circ Res*, **93**, 896-906

**R. N. Lolley, B. M. Brown und D. B. Farber, (1977)**

Protein phosphorylation in rod outer segments from bovine retina: Cyclic nucleotide-activated protein kinase and its endogenous substrate.

*Biochem Biophys Res Commun.*, **78**, 572-578

**R. N. Lolley, C. M. Craft und R. H. Lee, (1992)**

Photoreceptors of the retina and pinealocytes of the pineal gland share common components of signal transduction. *Neurochem Res*, **17**, 81-9.

**Y.-M. Lu, Z. Jia, C. Janus, J. T. Henderson, R. Gerlai, J. M. Wojtowicz und J. C. Roder, (1997)**

Mice Lacking Metabotropic Glutamate Receptor 5 Show Impaired Learning and Reduced CA1 Long-Term Potentiation (LTP) But Normal CA3 LTP.

*J Neurosci*, **17**, 5196-5205

**J. Lüders, J. Demand und J. Höfeld, (2000)**

The Ubiquitin-related BAG-1 Provides a Link between the Molecular Chaperones Hsc70/Hsp70 and the Proteasome. *J Biol Chem*, **275**, 4613-4617

**G. L. Lukov, T. Hu, J. N. McLaughlin, H. E. Hamm und B. M. Willardson, (2005)**

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

**N. Malecz, T. Bambino, M. Bencsik und R. A. Nissenson, (1998)**

Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. *Mol Endocrinol*, **12**, 1846-56.



**M. D. Mark und S. Herlitze, (2000)**

G-protein mediated gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels.

*Eur J Biochem*, **267**, 5830-5836

**M. D. Mark, S. Wittemann und S. Herlitze, (2000)**

G protein modulation of recombinant P/Q-type calcium channels by regulators of G protein signalling proteins. *J Physiol (Lond)*, **528**, 65-77

**J. Martin-Benito, S. Bertrand, T. Hu, P. J. Ludtke, J. N. Mc Laughlin, B. M. Willardson, J. L. Carrascosa und J. M. Valpuesta, (2004)**

Structure of the complex between the cytosolic chaperonin CCT and phosphducin-like protein. *PNAS*, **101**, 17410-17415

**J. N. McLaughlin, C. D. Thulin, S. M. Bray, M. M. Martin, T. S. Elton und B. M. Willardson, (2002)**

Regulation of angiotensin II-induced G protein signaling by phosphducin-like protein.

*J Biol Chem*, **277**, 34885-95

**J. N. McLaughlin, C. D. Thulin, S. J. Hart, K. A. Resing, N. G. Ahn und B. M. Willardson, (2002)**

Regulatory interaction of phosphducin-like protein with the cytosolic chaperonin complex. *PNAS*, **99**, 7962-7

**D. Michaelson, I. Ahearn, M. Bergo, S. Young und M. Philips, (2002)**

Membrane Trafficking of Heterotrimeric G Proteins via the Endoplasmic Reticulum and Golgi. *Mol Biol Cell*, **13**, 3294-3302

**M. F. Miles, S. Barhite, M. Sganga und M. Elliott, (1993)**

Phosphducin-like protein: an ethanol-responsive potential modulator of guanine nucleotide-binding protein function. *PNAS*, **90**, 10831-5.

**M. Miura, M. Watanabe, S. Offermanns, M. I. Simon und M. Kano, (2002)**

Group I Metabotropic Glutamate Receptor Signaling via  $G\alpha_q$  /  $G\alpha_{11}$  Secures the Induction of Long-Term Potentiation in the Hippocampal Area CA1.

*J Neurosci*, **22**, 8379-8390

**S. Müller, A. Straub, S. Schröder, P. H. Bauer und M. J. Lohse, (1996)**

Interactions of phosducin with defined G protein  $\beta\gamma$ -subunits.

*J Biol Chem*, **271**, 11781-6.

**K. Nagata, C. Ye, M. Jain, D. Milstone, R. Liao und R. Mortensen, (2000)**

$G\alpha_{12}$  but not  $G\alpha_{13}$  is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. *Circ Res.*, **87**, 903-909

**E. Neer, (1995)**

Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals.

*Cell*, **80**, 249-257

**E. Neer, J. Lok und L. Wolf, (1984)**

Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase. *J Biol Chem*, **259**, 14222-14229

**M. Obin, B. Y. Lee, G. Meinke, A. Bohm, R. H. Lee, R. Gaudet, J. A. Hopp, V. Y. Arshavsky, B. M. Willardson und A. Taylor, (2002)**

Ubiquitylation of the transducin  $\beta\gamma$  subunit complex. Regulation by phosducin.

*J Biol Chem*, **277**, 44566-75

**K. Pagh-Roehl, D. Lin, L. Su und B. Burnside, (1995)**

Phosducin and PP33 are in vivo targets of PKA and type 1 or 2A phosphatases, regulators of cell elongation in teleost rod inner-outer segments.

*J Neurosci*, **15**, 6475-88.

**K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. Behnke, H. Motoshima, B. Fox, I. Le Tronq, D. Teller, T. Okada, R. Stenkamp, M. Yamamoto und M. Miyano, (2000)**  
Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, **289**, 739-749

**K. Pierce, R. Premont und R. Lefkowitz, (2002)**  
Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **3**, 639-650

**L. A. Pinna und F. Meggio, (1997)**  
Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res*, **3**, 77-97

**U. Quitterer und M. J. Lohse, (1999)**  
Crosstalk between  $G\alpha_i$ - and  $G\alpha_q$ -coupled receptors is mediated by  $G\beta\gamma$  exchange. *PNAS*, **96**, 10626-31.

**E. M. Ross und T. M. Wilkie, (2000)**  
GTPase-Activating Proteins For Heterotrimeric G Proteins: Regulators of G Protein Signaling (RGS) and RGS-Like Proteins. *Annu Rev Biochem.*, **69**, 795-827

**A. A. Roy, K. E. Lemberg und P. Chidiac, (2003)**  
Recruitment of RGS2 and RGS4 to the Plasma Membrane by G Proteins and Receptors Reflects Functional Interactions. *Mol Pharmacol*, **64**, 587-593

**U. T. Rugg und G. M. Burgess, (1989)**  
Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci*, **10**, 218-20.

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

**J. R. Savage, J. N. McLaughlin, N. P. Skiba, H. E. Hamm und B. M. Willardson, (2000)**

Functional Roles of the Two Domains of Phosducin and Phosducin-like Protein.

*J Biol Chem*, **275**, 30399-407.

**S. Schröder und M. J. Lohse, (1996)**

Inhibition of G-protein  $\beta\gamma$ -subunit functions by phosducin-like protein.

*PNAS*, **93**, 2100-4.

**S. Schröder und M. J. Lohse, (2000)**

Quantification of the tissue levels and function of the G-protein regulator phosducin-like protein (PhIP). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **362**, 435-9.

**K. Schulz, S. Danner, P. Bauer, S. Schroder und M. J. Lohse, (1996)**

Expression of phosducin in a phosducin-negative cell line reveals functions of a Gbetagamma-binding protein. *J Biol Chem*, **271**, 22546-51.

**R. Seifert und K. Wenzel-Seifert, (2002)**

Constitutive activity of G protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors.

*Naunyn Schmiedebergs Arch Phamacol.*, **366**, 381-416

**P. Sternweis und J. Robishaw, (1984)**

Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem*, **259**, 13806-13813

**K. Sunayashiki-Kusuzaki, T. Kikuchi, E. F. Wawrousek und T. Shinohara, (1997)**

Arrestin and phosducin are expressed in a small number of brain cells.

*Brain Res Mol Brain Res*, **52**, 112-20.

**H. Tanaka, C. Iwami, C. H. Kuo, Y. Ding, E. Do, Y. Irie und N. Miki, (1997)**

Analysis of the T  $\beta\gamma$ -binding domain of MEKA/phosducin. *Neurochem Int*, **31**, 625-34.

**C. Thibault, J. Feng Wang, R. Charnas, D. Mirel, S. Barhite und M. F. Miles, (1999)**

Cloning and characterization of the rat and human phosphodiesterase-like protein genes: structure, expression and chromosomal localization.

*Biochim Biophys Acta*, **1444**, 346-54.

**C. Thibault, M. W. Sganga und M. F. Miles, (1997)**

Interaction of phosphodiesterase-like protein with G protein  $\beta\gamma$  subunits.

*J Biol Chem*, **272**, 12253-6.

**C. D. Thulin, J. R. Savage, J. N. McLaughlin, S. M. Truscott, W. M. Old, N. G. Ahn, K. A. Resing, H. E. Hamm, M. W. Bitensky und B. M. Willardson, (2001)**

Modulation of the G protein regulator phosphodiesterase by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation and 14-3-3 protein binding.

*J Biol Chem*, **276**, 23805-15.

**D. Valenzuela, X. Han, U. Mende, C. Fankhauser, H. Mashima, P. Huang, J. Pfeffer, E. Neer und M. Fishman, (1997)**

$G\alpha_o$  is necessary for muscarinic regulation of  $Ca^{2+}$  channels in mouse heart.

*PNAS*, **94**, 1727-1732

**J. M. Valpuesta, J. Martin-Benito, P. Gomez-Puertas, J. L. Carrascosa und K. R. Willison, (2002)**

Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *Febs Letters*, **529**, 11-6

**D. Vassilatis, J. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J. Ranchalis, M. Mortrud, A. Brown, S. Rodriguez, J. Weller, A. Wright, J. Bergmann und G. Gaitanaris, (2003)**

The G protein-coupled receptor repertoire of human and mouse.

*PNAS*, **100**, 4903-4908

**J. Vilardaga, M. Bünemann, C. Krasel, M. Castro und M. Lohse, (2003)**

Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol*, **21**, 807-812

**M. Wall, D. Coleman, E. Lee, J. Iniguez-Lluhi, B. Posner, A. Gilman und S. Sprang, (1995)**

The structure of the G protein heterotrimer  $G_{i\alpha_1} \beta_1 \gamma_2$ . *Cell*, **83**, 1047-1058

**Q. Wang, M. Liu, B. Mullah, D. P. Siderovski und R. R. Neubig, (2002)**

Receptor-selective Effects of Endogenous RGS3 and RGS5 to Regulate Mitogen-activated Protein Kinase Activation in Rat Vascular Smooth Muscle Cells.

*J Biol Chem*, **277**, 24949-24958

**P. Wedegaertner, (1998)**

Lipid modifications and membrane targeting of  $G_{\alpha}$ .

*Biol Signals Recept.*, **7**, 125-135

**A. Wehmeyer und R. Schulz, (1998)**

Phosducin expression in NG 108-15 hybrid cells enhances prostaglandin E1 stimulated adenylate cyclase activity. *Life Sci*, **62**, L127-34

**N. Wettschureck, A. Moers und S. Offermanns, (2004)**

Mouse models to study G-protein-mediated signaling.

*Pharm. Therap.*, **101**, 75-89

**K. Wickman, J. Nemec, S. Gendler und D. Clapham, (1998)**

Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice.

*Neuron*, **20**, 103-114

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

The N terminus of phosducin is involved in binding of  $\beta\gamma$  subunits of G protein.

*PNAS*, **92**, 2086-90.

**T. Yoshida, B. M. Willardson, J. F. Wilkins, G. J. Jensen, B. D. Thornton und M. W. Bitensky, (1994)**

The phosphorylation state of phosphodiesterase-3 determines its ability to block transducin subunit interactions and inhibit transducin binding to activated rhodopsin.

*J Biol Chem*, **269**, 24050-7.

**S. Yu, D. Yu, E. Lee, M. Eckhaus, R. Lee, Z. Corria, D. Accili, H. Westphal und L. S. Weinstein, (1998)**

Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric G<sub>s</sub> protein  $\alpha$ -subunit (G<sub>s</sub> $\alpha$ ) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the Gs $\alpha$  gene.

*PNAS*, **95**, 8715-8720

**R. O. Zandomeni, (1989)**

Kinetics of inhibition by 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole on calf thymus casein kinase II. *Biochem J*, **262**, 469-73.

**B. Zheng, Y.-C. Ma, R. S. Ostrom, C. Lavoie, G. N. Gill, P. A. Insel, X.-Y. Huang und M. G. Farquhar, (2001)**

RGS-PX1, a GAP for G $\alpha_s$  and Sorting Nexin in Vesicular Trafficking.

*Science*, **294**, 1939-1942

**S. Zhuo, J. C. Clemens, D. J. Hakes, D. Barford und J. E. Dixon, (1993)**

Expression, purification, crystallization, and biochemical characterization of a recombinant protein phosphatase. *J Biol Chem*, **268**, 17754-61.

## 8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Lohse erstellt.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Lohse danken für die langjährige und beharrliche Unterstützung in diesem Projekt, ebenso wie für die zahlreichen kritischen und fruchtbaren Diskussionen. An seinem Institut hatte ich immer die Freiheit, eigene Ideen zu entwickeln und experimentell verfolgen zu können. Ebenso war mir Prof. Lohse mit seinem didaktisch hochwertigen Studentenunterricht und seinem fantastischem Vortragsstil ein herausragendes Vorbild. Hierfür danke ich ihm sehr.

Weiterhin möchte ich mich für die enge Zusammenarbeit bei folgenden Personen bedanken: Ursula Qitterer, die oft den richtigen Riecher bei der Entwicklung von Hypothesen zeigte, bei Michaela Hofmann (zahlreiche Assays) und Christian Dees (Reinigung von G-Proteinen und diverse radioaktive Versuche), ohne deren Mitarbeit ich vermutlich noch heute an den zahlreichen Messreihen sitzen würde. Bei Christina Bermel, die im Rahmen ihrer eigenen medizinischen Dissertation das Projekt wesentlich mit voran bringen konnte, bedanke ich mich ganz besonders. Viele weitere Persönlichkeiten müssen hier noch erwähnt werden: Kristina Lorenz, Marian Castro, Cornelius Krasel, Moritz Bünemann, Stefan Engelhard, Lutz Hein, Eva Schmitteckart und viele andere, die auf die eine oder andere Weise alle dazu beigetragen haben, dass es in diesem Projekt immer wieder vorwärts ging.

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner geliebten Frau Stefanie und meinen Kindern Lotta, Nils und Clara für die wahre Freude im Leben und die stete Erinnerung daran, dass die Wirklichkeit außerhalb des Labors auch spannend und ereignisreich ist.



## Publikationen und Vorträge

---

Vaccinia virus impairs directional migration and chemokine receptor switch of human dendritic cells.

Humrich, J.Y., Thumann, P., Greiner S., **Humrich, J.H.**, Averbek, M., Schwank, C., Kampgen, E., Schuler, G., Jenne, L. (2007) *Eur J Immunol*, **37**, 954-965

Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration.

Humrich, J.Y., **Humrich, J.H.**, Averbek, M., Thumann, P., Termeer, C., Kampgen, E., Schuler, G., Jenne, L. (2006) *Immunology*, **117**, 238-47

SUMO-1 controls the protein stability and the biological function of phosducin.

Klenk, C., **Humrich, J.**, Quitterer, U., Lohse, M.J. (2006) *J Biol Chem* **281**, 8357-64

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 G $\beta\gamma$  folding.

**Humrich, J.**, Bermel, C., Bünemann, M., Harmark, L., Frost, R., Quitterer, U., Lohse, M.J. (2005) *J Biol Chem* **280**, 20042-50

Regulation of phosducin-like protein by casein kinase 2 and N-terminal splicing

**Humrich, J.**, Bermel, C., Grübel, T., Quitterer, U., and Lohse, M. J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 4474-81

Effects of two G $\beta\gamma$ -binding proteins -N-terminally truncated phosducin and beta-adrenergic receptor kinase C terminus (betaARKct)- in heart failure.

Li, Z., Laugwitz, K. L., Pinkernell, K., Pragst, I., Baumgartner, C., Hoffmann, E., Rosport, K., Munch, G., Moretti, A., **Humrich, J.**, Lohse, M. J., and Ungerer, M. (2003) *Gene Therapy* **10**, 1354-61

Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G-protein coupled receptor kinase 2.

Ruiz-Gomez, A., **Humrich, J.**, Murga, C., Quitterer, U., Lohse, M. J., and Mayor, F., Jr. (2000) *J Biol Chem* **275**, 29724-30.

Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease.

Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.G., Engelsberger, S., **Humrich, J.**, Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Türk, A., Hoyer, S., Zochling, R., Boissl, K.W., Jellinger, K., Riederer, P. (1998) *J Neural Transm.*, **105**(4-5):423-38.

## Frühjahrstagungen der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie

- 1999 G $\beta\gamma$ -unabhängige Effekte von Phosducin (*Vortrag*)
- 2000 Phosducin-Phosphorylierung durch GRKs (*Vortrag*)
- 2001 Regulation von Phosducin durch Rezeptor-stimulierte Phosphorylierung (*Vortrag*)
- 2002 PKC, aber nicht CaMK II sind beteiligt an der Rezeptor-vermittelten Phosducin-Phosphorylierung (*Vortrag*)  
Hemmung der G $\beta\gamma$ -stimulierten Signaltransduktion durch Phosducin-like Proteine (*Poster*)
- 2003 Phosducin-like Protein reguliert G $\beta\gamma$ -abhängige Funktionen in Abhängigkeit von Casein Kinase 2 (*Vortrag*)
- 2004 Phosducin-like Protein reguliert die Proteinmenge von G-Protein  $\beta\gamma$ -Untereinheiten (*Vortrag*)
- 2005 Phosducin-like Protein inhibiert die Bildung von G-Protein  $\beta\gamma$ -Komplexen (*Vortrag*)

Leinach, Januar 2009

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre ferner, dass ich diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ich habe im Januar 1999 an der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg promoviert (Dr. med.).

Leinach, 11. Januar 2009