Universität Ulm
Abteilung Pharmakologie und Toxikologie
Leiter: Prof. Dr. Peter Gierschik

Funktionelle Charakterisierung von vier Varianten der murinen Kinase G-Protein-gekoppelter Rezeptoren GRK6

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Petra Vatter
geb. in Ulm
Ulm 2000

Amtierender Dekan:	**Prof. Dr. P. Gierschik**
1. Berichterstatter:	**Prof. Dr. P. Gierschik**
2. Berichterstatter:	**Prof. Dr. W. Knöchel**
Tag der Promotion:	**17. Juli 2000**

Für meine Eltern

Es ist nicht genug zu wissen,
man muss es auch anwenden.
Es ist nicht genug zu wollen,
man muss es auch tun.

J.W.v.G.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Allgemeine Einführung 1
1.2 Signaltransduktion über Transmembran-Rezeptoren 1
1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren 3
1.3.1 Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren 3
1.3.2 Heterotrimere G-Proteine 4
1.3.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren 6
1.4 Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren 9
1.4.1 Mechanismen der heterologen und homologen Desensibilisierung 10
1.4.2 Arrestine 12
1.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen 13
1.5.1 Struktureller Aufbau der GRKs 14
1.5.2 Regulation der GRKs 16
1.6 Zielsetzung der Arbeit 18
2 Material 19
3 Methoden 30
3.1 Mikrobiologische Methoden 30
3.2 Molekularbiologische Methoden 32
3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA 32
3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 32
3.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren 33
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese 33
3.2.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen 34
3.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 34
3.2.7 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA 35
3.2.8 Auffüllreaktion 35
3.2.9 Modifizierung des Vektors pBluescript II SK(-) durch T-*tailing* 36
3.2.10 Ligation 37
3.2.11 RNA-Extraktionsmethoden 37
3.2.12 RNA *in situ*-Hybridisierung 39
3.2.13 cDNA-Synthese 41

3.2.14 Polymerasekettenreaktion 42
3.2.15 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung 45
3.2.16 DNA-Sequenzierung 45
3.2.17 Autoradiographie 49
3.2.18 *Northern blot* 50
3.2.19 *In vitro*-Markierung von DNA-Sonden 51
3.2.20 Hybridisierung 52
3.2.21 *Single nucleotide primer extension* 52
3.3 Eukaryontische Zellkultur 55
3.4 Proteinexpression in Insektenzellen 57
3.5 Proteinexpression in COS-7-Zellen 60
3.6 Proteinbiochemie 63
3.7 Chromatographische Methoden 71
3.8 Bestimmung der Kinaseaktivität von GRKs 73
3.9 Untersuchung von GRK-Lipid-Wechselwirkungen 79
3.10 Untersuchung von GRK-Rezeptor-Wechselwirkungen 80
4 Ergebnisse 82
4.1 Genomische Organisation des GRK6-Gens der Maus 82
4.2 mRNA-Expressionsanalysen 88
4.3 Analyse der Proteinexpression 96
4.4 Expression und Charakterisierung rekombinant hergestellter Proteine der mGRK6 100
4.5 Zelluläre Lokalisation der mGRK6-Proteine 116
4.6 GRK-Lipid-Wechselwirkungen 120
4.7 Struktur-Funktions-Analyse der mGRK6-Varianten 122
4.8 GRK-Rezeptor-Wechselwirkungen 124
5 Diskussion 130
6 Zusammenfassung 148
7 Literaturverzeichnis 150
8 Danksagung 168
9 Lebenslauf 169

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
BAA	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
Bpb	Bromphenolblau
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosin-5´-monophosphat
cDNA	*complementary* DNA
Ci	Curie
CIP	*alkaline calf intestinal phosphatase*
CMF-PBS	Calcium- und magnesiumfreies PBS
d	Tage
DAG	*sn*-Diacylglycerol
dATP	2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphat
dCTP	2´-Desoxycytidin-5´-triphosphat
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	2´-, 3´-Didesoxynukleosid-5´-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphat
dsDNA	*double stranded* DNA
DTT	1, 4-Dithiothreitol
dTTP	2´-Desoxythymidin-5´-triphosphat

ECL	*enhanced chemiluminescence*
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	*epidermal growth factor*
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Rinderserum
FPLC	*fast protein liquid chromatography*
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s^2)
G	Guanin
β-Gal	β-Galaktosidase
GAP	*GTPase-activating protein*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GDP	Guanosin-5´-diphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GRF	*guanine nucleotide releasing factor*
GST	Glutathion-*S*-transferase
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
GTP[S]	Guanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)
h	Stunde
HA	Influenza-Virus-Hämagglutinin-12CA5-Epitop
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
hnRNA	*heterogenous nuclear* RNA
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
InsP_3	Inositol-1, 4, 5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB-Amp-Medium	Luria-Bertani-Medium mit Ampicillin

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MCP-1	*monocyte chemoattractant protein* 1
MEN	MOPS-EDTA-Natriumacetat
MeOH	Methanol
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
m/V	Masse pro Volumen
NGF	*nerve growth factor*
OD	optische Dichte
p. a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*phosphate-buffered saline*
PC	L-α-Phosphatidylcholin
PCR	*polymerase chain reaction*
PDGF	*platelet-derived growth factor*
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PS	L-α-Phosphatidylserin
PtdInsP_2	Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat
RE	Restriktionsendonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	*rod outer segment*
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SDF-1α	*stromal cell derived factor* 1α
SDS	Natriumdodecylsulfat
*Sf*9-Zellen	Ovarialzellen von *Spodoptera frugiperda*

SNuPE	*single nucleotide primer extension*
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
ssDNA	*single stranded* DNA
T	Temperatur
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	*tris-buffered saline*
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TFB	*transformation buffer*
TNF	*tumor necrosis factor*
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	Transfer-RNA
U	*unit*
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5´-triphosphat
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
VT	Volumenteil
V/V	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp-Form
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Zellen lebender Organismen sind permanent Signalen chemischer und physikalischer Natur ausgesetzt, wobei es sich dabei sowohl um Umweltreize wie Licht oder Geruch als auch um Signale anderer Zellen, z. B. Hormone, Neurotransmitter oder Wachstumsfaktoren, handeln kann (Hepler und Gilman, 1992). Eine Grundvoraussetzung für das Überleben der Zellen ist ihre Fähigkeit, Reize aufzunehmen und auf diese zu reagieren. Die Wahrnehmung extrazellulärer Stimuli, welche die Zellmembran nicht überwinden können, erfolgt über membranständige Rezeptoren, Proteine, die physikalische Reize oder Signalmoleküle spezifisch erkennen und an intrazelluläre Effektorproteine weiterleiten. Um die normale Funktion einer Zelle aufrechtzuerhalten und die Zellen vor einer Dauerstimulation zu schützen, muss das An- und Abschalten von Signalwegen koordiniert erfolgen.

1.2 Signaltransduktion über Transmembran-Rezeptoren

Drei verschiedene Mechanismen können die Signaltransduktion über Transmembran-Rezeptoren vermitteln. Zum einen kann die Bindung eines Signalstoffes (Liganden) an transmembranäre Rezeptoren, die zugleich Ionenkanäle darstellen, direkt das Öffnen oder Schließen des Kanals auslösen (Barnard, 1992). Beispiele für diesen Rezeptortyp stellen die nikotinischen Acetylcholin- oder die Glycin-Rezeptoren dar. Der zweite Mechanismus beinhaltet die Signaltransduktion über Tyrosinkinasen, die wiederum in Rezeptor-Tyrosinkinasen und zytoplasmatische, durch membranständige Rezeptoren aktivierte Tyrosinkinasen untergliedert werden. Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) weisen eine gemeinsame Struktur auf: eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität, ein einziges transmembranäres Segment und eine extrazelluläre Domäne (s. Abb. 1A). Zu den Liganden zählen Hormone wie Insulin und Wachstumsfaktoren, z.B. der *epidermal growth factor* (EGF), der *platelet-derived growth factor* (PDGF), der *fibroblast growth factor* (FGF) und der *nerve growth factor* (NGF). Der Bindung eines dieser Liganden an die RTK folgt die Dimerisierung des Rezeptors und die Autophosphorylierung von Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne. Proteine wie Phospholipase C-γ (PLCγ), Phosphoinositol (PI)-3-Kinase, GAP (*GTPase-activating protein*), *growth factor receptor binding protein*

(Grb2), Phosphotyrosin-Phosphatase SHPTP-2 und Mitglieder der Src-Familie der Tyrosinkinasen können über Src-Homologie (SH)-2 und SH-3-Domänen mit den Phosphotyrosin-Resten der RTK interagieren (Pouyssegur und Seuwen, 1992; Malarkey *et al.*, 1995). Die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen wie Syk, Tyk, Janus Kinase (JAK), *focal adhesion kinase* (FAK) oder die Mitglieder der Src-Familie koppeln an membranständige Rezeptoren, z. B. an Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder Zytokine (z. B. IL-1, IL-2, IL-4), an Integrine oder an STAT (*signal transducers and activators of transcription*)-Proteine. Die aktivierten Tyrosinkinasen phosphorylieren und aktivieren anschließend Effektoren wie PI-3-Kinase oder Phospholipase C-γ (PLCγ) (Malarkey *et al.*, 1995; Parsons und Parsons, 1997).

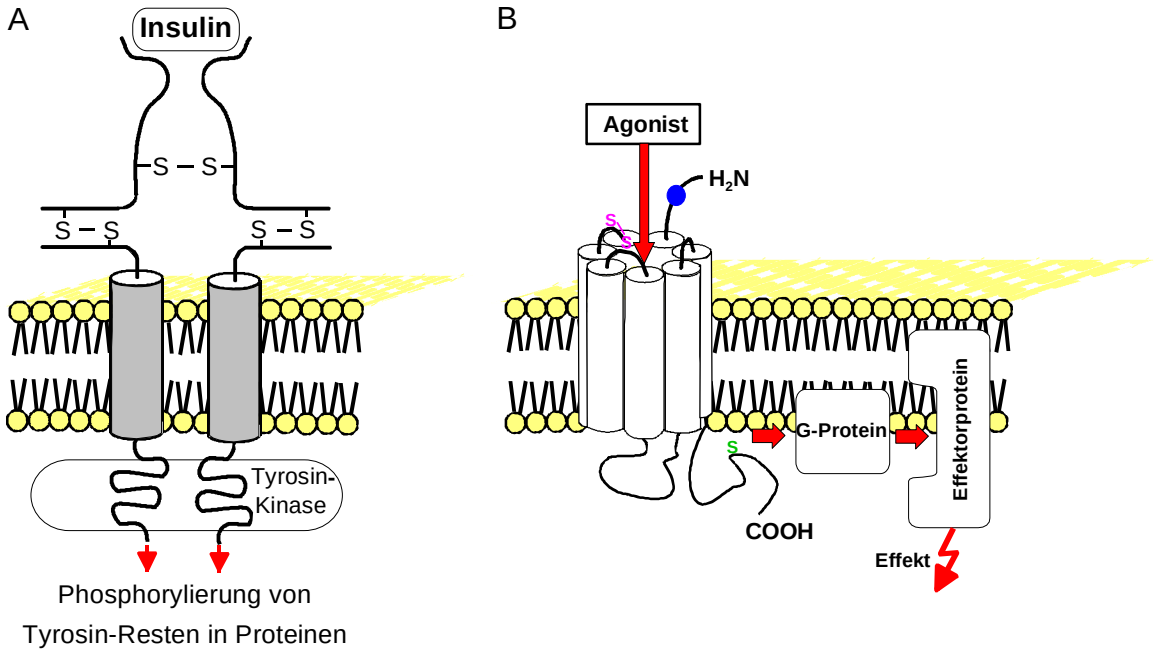


Abb. 1: Schematische Darstellung der Signalübertragung über eine Rezeptor-Tyrosinkinase am Beispiel des Insulinrezeptors (A) und eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (B). (B) Die potentielle Glykosylierungsstelle ist mit einem blauen Punkt markiert, die potentielle Acylierungsstelle mit einem grünen S. Zu Aufbau und Funktion der Rezeptoren siehe Text.

Der dritte Weg der Signalübertragung erfolgt über membranständige Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die auf der zytosolischen Seite mit heterotrimeren, Guaninnukleotid-bindenden Proteinen (G-Proteinen) interagieren (s. Abb. 1B). Nach Aktivierung dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) dissoziiert das heterotrimere G-Protein in seine α- und βγ-Untereinheiten, wobei jede Untereinheit verschiedene Effektorproteine,

z. B. Adenylylzyklasen, Phospholipasen C, Ionenkanäle oder PI-3-Kinasen, regulieren kann (Gudermann *et al.*, 1997; Hamm, 1998).

1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bildet bei Säugern mit über 1000 Mitgliedern die größte Familie der Zelloberflächenmoleküle. In Vertebraten kodieren über 1 % des Genoms für GPCRs (Bockaert und Pin, 1999).

1.3.1 Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Ein typischer und zudem intensiv untersuchter Vertreter der GPCRs ist das Rhodopsin. Da die Struktur von Rhodopsin bisher nur mit geringer Auflösung ermittelt werden konnte (Wess, 1997), basiert das Strukturmodell der GPCRs auf der Röntgenkristallstruktur des funktionell verwandten bakteriellen Homologs Bakteriorhodopsin (Pebay-Peyroula *et al.*, 1997; Luecke *et al.*, 1998). Alle GPCRs besitzen ein extrazelluläres aminoterminales und ein intrazelluläres carboxyterminales Segment sowie sieben kreisförmig angeordnete α-helikale Transmembrandomänen (25-30 Aminosäuren), die über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen verbunden sind (s. Abb. 1B) (Strader *et al.*, 1994). Durch Palmitoylierung eines C-terminalen Cysteinrestes kann eine vierte zytoplasmatische Schleife entstehen (Ji *et al.*, 1998). Zwei Cysteinreste in der ersten und zweiten Extrazellulärschleife können eine Disulfidbrücke bilden, welche möglicherweise die Konformation der sieben Transmembrandomänen stabilisiert (Bockaert und Pin, 1999). Viele GPCRs sind Glykoproteine mit mindestens einer Konsensussequenz für N-Glykosylierung (Arg-X-Ser/Thr) im extrazellulären Aminoterminus (Strader *et al.*, 1994; Watson und Arkinstall, 1994). Abgesehen von Sequenzunterschieden differieren die GPCRs auch in Länge und Funktion des Amino- und Carboxyterminus sowie der intrazellulären Schleife (Ji *et al.*, 1998; Bockaert und Pin, 1999). Basierend auf Sequenzhomologien werden die GPCRs in drei Hauptfamilien eingeteilt. Die Familie 1 bildet die umfangreichste Gruppe der GPCRs und wird je nach Interaktionsstellen zwischen Rezeptor und Ligand und nach Größe der Liganden in drei Untergruppen eingeteilt: kleine Liganden wie Retinal oder Catecholamine binden im Kern der sieben Transmembrandomänen, Peptide (z. B. Chemokine) interagieren mit dem N-Terminus und den extrazellulären Schleifen des GPCRs, Glykoproteinhormone wechselwirken mit dem bei diesen Rezeptoren besonders langen Aminoterminus sowie mit

Extrazellulärschleifen des GPCRs. Die Rezeptoren der Familie 2 erkennen hochmolekulare Hormone wie Glukagon, zur Rezeptorfamilie 3 zählt beispielsweise der metabotrophe Glutamatrezeptor (Bockaert und Pin, 1999). Die Ligandenbindung verursacht eine Lageveränderung einzelner transmembranärer Domänen zueinander, wodurch auch eine Konformationsänderung der intrazellulären Oberflächen induziert wird und Aminosäurereste exponiert werden, die mit bestimmten Regionen eines heterotrimeren G-Proteins interagieren können (Wess, 1997; Gether und Kobilka, 1998).

1.3.2 Heterotrimere G-Proteine

Die heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine) gehören zur Superfamilie der GTPasen und vermitteln die Signalübertragung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) zu Effektoren. Sie sind in eukaryontischen Zellen ubiquitär exprimiert und an der Zellmembran verankert (Gilman, 1987; Simon *et al.*, 1991). Alle G-Proteine setzen sich aus den drei Untereinheiten α, β und γ zusammen und werden nach Aminosäuresequenzhomologie der α-Untereinheiten in vier Klassen unterteilt: G_s aktiviert die Adenylylzyklase, G_i inhibiert die Adenylylzyklase, G_q aktiviert die Phospholipase C-β und von G_{12} ist die Funktion noch nicht bekannt (Hepler und Gilman, 1992). Das G-Protein liegt im inaktiven Zustand als Heterotrimer vor, wobei die α-Untereinheit in Anwesenheit des Kofaktors Mg^{2+} GDP gebunden hat (Hepler und Gilman, 1992) (s. Abb. 2). Die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCRs) durch einen Liganden induziert die Wechselwirkung zwischen heterotrimerem G-Protein und der zweiten und dritten intrazellulären Schleife des aktivierten GPCR (Wess, 1997). Vermutlich durch einen allosterischen Mechanismus wird das an die α-Untereinheit gebundene GDP gegen GTP ausgetauscht (Bourne, 1997). GTP liegt im Zytosol in hoher Konzentration vor und stellt daher keinen limitierenden Faktor für die Aktivierung der α-Untereinheit dar (Clapham und Neer, 1993). Das heterotrimere, GTP-gebundene G-Protein dissoziiert in seine α_{GTP}- und $\beta\gamma$-Untereinheiten und jede Untereinheit interagiert mit unterschiedlichen Effektoren (Hamm, 1998). Die Deaktivierung erfolgt durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α-Untereinheit (Carty *et al.*, 1990), welche durch Proteine der RGS-Familie (*regulators of G protein signaling*) 100fach gesteigert werden kann (Berman und Gilman, 1998). Nach der

GTP-Hydrolyse assoziieren die α_{GDP}- und die βγ-Untereinheiten wieder zum Heterotrimer (Neer, 1995; Clapham und Neer, 1997).

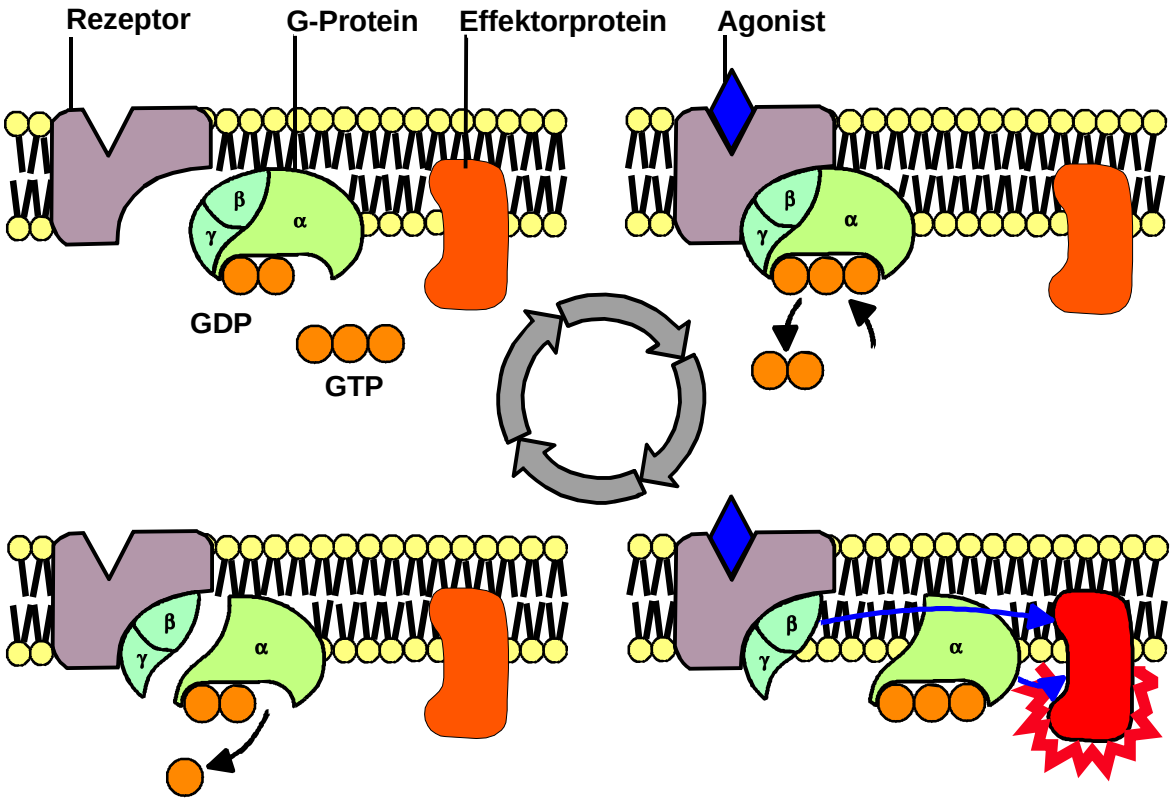


Abb. 2: Schematische Darstellung des Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine. Erläuterungen zum Aufbau der G-Proteine und zu deren Aktivierung siehe Text.

Bisher sind die Genprodukte von 20 verschiedenen α-, 6 β- und 12 γ-Untereinheiten bekannt (Hamm, 1998). Die α-Untereinheiten der G-Proteine (39-46 kD) werden mit Ausnahme von Transducin an einem aminoterminalen Cysteinrest mit einer Fettsäure, meist Palmitinsäure, verestert, die α-Untereinheiten der G_i-Klasse werden zusätzlich an einem Glycinrest über eine Amidbindung myristoyliert (Duncan und Gilman, 1996). Diese posttranslationalen Lipidmodifikationen verankern die Proteine in der Membran und erleichtern die Wechselwirkung mit βγ-Untereinheiten (Wedegaertner *et al.*, 1995; Wedegaertner, 1998). Bakterielle Toxine können α-Untereinheiten modifizieren: α_s- und α_t-Untereinheiten werden durch Choleratoxin ADP-ribosyliert, wodurch die intrinsische GTPase-Aktivität gehemmt und das G-Protein permanent aktiviert wird (Gierschik *et al.*, 1987; Gierschik und Jakobs, 1992). Die Mitglieder der α_i-Klasse mit Ausnahme von α_z werden durch Pertussistoxin an einem Cystein (Position –4 vom Carboxyterminus) ADP-

ribosyliert. Diese Modifikation verhindert den GDP/GTP-Austausch und führt zur Entkopplung des modifizierten G-Proteins vom aktivierten Rezeptor (Gierschik, 1992; Gierschik und Jakobs, 1992). Die β-Untereinheiten (35-39 kD) lassen zwei strukturelle Domänen erkennen: eine etwa 20 Aminosäuren lange aminoterminale α-Helix und eine Region mit sieben sich wiederholenden Sequenzen aus je *ca.* 40 Aminosäuren, die als WD40-*repeats* bezeichnet werden. Die Struktur der WD40-*repeats* besteht aus kleinen, antiparallelen β-Faltblattstrukturen, die propellerförmig zu einem Ring angeordnet sind (Lupas *et al.*, 1992; Clapham und Neer, 1997). Die γ-Untereinheiten (6-10 kD) werden am Carboxyterminus durch Isoprenylierung, Proteolyse und Carboxymethylierung posttranslational modifiziert (Casey und Seabra, 1996). Der Aminoterminus der γ-Untereinheit formt eine α-Helix aus, die eine *supercoil*-Struktur (*coiled-coil*) mit der aminoterminalen α-Helix der β-Untereinheit ausbildet (Clapham und Neer, 1997; Sprang, 1997). Die βγ-Untereinheit stellt ein funktionelles Monomer dar, welches nur durch Denaturierung dissoziierbar ist. Neben der Verstärkung der Wechselwirkung zwischen dem GPCR und der α-Untereinheit beeinflusst die βγ-Untereinheit eine Vielzahl von Effektorproteinen wie Ionenkanäle, Phospholipasen C-β, Adenylylzyklasen, Phosphoinositol (PI)-3-Kinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen GRK2 und GRK3 (Clapham und Neer, 1997; Hamm, 1998). Außerdem wird für die βγ-Untereinheiten eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase-Signalweges nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren diskutiert (Gutkind, 1998; Luttrell *et al.*, 1999).

1.3.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine, chemotaktisch wirksame Zytokine, bilden eine eigene Superfamilie von Proteinen, deren Mitglieder zwischen 8 und 14 kD groß sind und ausschließlich Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren darstellen (Baggiolini *et al.*, 1997; Luster, 1998; Locati und Murphy, 1999; Zlotnik und Yoshie, 2000). Chemokine steuern die Migration von Leukozyten während der Homöostase und bei inflammatorischen Prozessen. Darüber hinaus wird ihre Beteiligung an Wundheilungsprozessen, der Elimination infektiöser Organismen, der Hämatopoese und der Angiogenese diskutiert (Murphy, 1996; Rollins, 1997; Ward und Westwick, 1998). Die Einteilung der Chemokine in vier Subfamilien basiert auf Sequenzhomologien und der Anordnung zweier hochkonservierter aminoterminaler Cysteine, CXC (α)-, CC (β)-, C (γ)- und CX_3C-Chemokine, wobei C die Cysteine und X die interponier-

te(n) Aminosäure(n) darstellen (Baggiolini *et al.*, 1997; Rollins, 1997). Während die ersten beiden Subfamilien mehrere Mitglieder umfassen, ist von den C- und CX_3C-Chemokinen jeweils nur ein Vertreter bekannt (Devalaraja und Richmond, 1999; Zlotnik und Yoshie, 2000). Die Chemokine enthalten zwei weitere, innerhalb der Chemokinsuperfamilie hochkonservierte Cysteine. Die vier Cysteine bilden untereinander Disulfidbrücken aus und sind somit für die Tertiärstruktur und Funktion der Chemokine von Bedeutung (Rollins, 1997). Die Chemokinrezeptoren werden entsprechend ihrer Ligandeninteraktion ebenfalls in CXC-, CC-, C- und CX_3C-Chemokinrezeptoren eingeteilt und bilden innerhalb der Superfamilie der GPCRs aufgrund einiger konservierter Sequenzmotive eine eigenständige Gruppe (Baggiolini *et al.*, 1997; Locati und Murphy, 1999; Zlotnik und Yoshie, 2000). Viele Chemokinrezeptoren koppeln an Mitglieder der G_i-Klasse der G-Proteine, die aktivierten α_i- und $\beta\gamma$-Untereinheiten beeinflussen ihrerseits beispielsweise die Adenylylzyklasen oder Phospholipasen C (Haribabu *et al.*, 1997; Locati und Murphy, 1999). Die anfängliche Annahme, dass CXC-Chemokinrezeptoren vorwiegend auf neutrophilen Granulozyten vorkommen, während Monozyten hauptsächlich CC-Chemokinrezeptoren besitzen, ist weitgehend revidiert. Die heute bekannten CXC-Chemokinrezeptoren werden auch von anderen Leukozyten wie Lymphozyten oder Monozyten sowie von Endothelzellen oder Keratinozyten exprimiert. Ebenso produzieren verschiedene Leukozyten und nichtleukozytäre Zellen, z.B. Nervenzellen, CC-Chemokinrezeptoren. Allerdings konnten bis heute keine CC-Chemokinrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten identifiziert werden (Locati und Murphy, 1999; Devalaraja und Richmond, 1999). In Tabelle 1 sind die bisher bekannten Chemokinrezeptoren mit ihren Liganden, den Chemokinen aufgelistet.

Tab. 1: Chemokinrezeptoren und ihre Liganden

Subfamilie	**Chemokinrezeptor**	**Liganden**
CXC	CXCR1	IL-8, GCP-2
	CXCR2	IL-8, GCP-2, GROα, GROβ, GROγ, NAP-2, ENA78, LIX
	CXCR3	IP-10, Mig, I-TAC, SLC
	CXCR4	SDF-1α, SDF-1β
	CXCR5	BCA-1
CC	CCR1	MIP-1α, MCP-2, -3, -4, RANTES, MIP-5, HCC-1, -2
	CCR2	MCP-1, -2, -3, -4, -5
	CCR3	Eotaxin, Eotaxin-2, -3, MCP-2, -3, -4, -5, RANTES
	CCR4	TARC, MDC
	CCR5	MIP-1α, MIP-1β, RANTES, MCP-2
	CCR6	LARC/MIP-3α/Exodus-1
	CCR7	SLC/Exodus-2, ELC/Exodus-3/MIP-3β
	CCR8	TARC, I-309, MIP-1β
	CCR9	MCP-1, -2, -3, -4, RANTES, MIP-1α, -1β, TECK
	CCR10	CTACK/ILC
C	XCR1	Lymphotactin-1, -2
CX_3C	CX_3CR1	Fractalkin/Neurotactin

Die Bezeichnung der Chemokinrezeptoren entspricht der auf der *Gordon Conference of Chemotactic Cytokines* (1996) festgelegten Nomenklatur. Abkürzungen: BCA (*B-cell activating chemokine*), CTACK (*cutaneous T cell-attracting chemokine*), ELC (*EB/1-ligand chemokine*), ENA (*epithelial neutrophil activator*), GCP (*granulocyte chemotactic protein*), GRO (*growth related oncogene*), HCC (*hemofiltrate CC-chemokine*), IL-8 (*interleukin* 8), ILC (*interleukin-11 receptor α-locus chemokine*), IP (*interferon-γ inducible protein*), I-TAC (*interferon-inducible T-cell α chemoattractant*), LARC (*liver and activation-regulated chemokine*), LIX (*lipopolysaccharid-induced CXC-chemokine*), MCP (*monocyte chemoattractant protein*), MDC (*monocyte derived chemokine*), Mig (*monocyte induced by interferon-γ*), MIP (*macrophage inflammatory protein*), NAP (*neutrophil activating peptide*), RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*), SDF (*stromal cell-derived factor*), SLC (*secondary-lymphoid tissue chemokine*), TARC (*thymus and activation-regulated chemokine*), TECK (*thymus-expressed chemokine*). Literaturquellen: Locati und Murphy, 1999; Devalaraja und Richmond, 1999; Morales *et al.*, 1999; Zlotnik und Yoshie, 2000.

Neben den in Tabelle 1 aufgeführten Chemokinrezeptoren wurden weitere Rezeptoren kloniert, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie der Familie der Chemokinrezeptoren zuzuordnen sind. Da für diese Rezeptoren bisher aber kein Ligand gefunden werden konnte, werden sie als *orphan receptors* bezeichnet (Baggiolini *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 1998). Interessanterweise exprimieren auch mit humanpathogenen Viren infizierte Zellen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die den Chemokinrezeptoren verwandt sind, z. B. das von dem humanen Cytomegalievirus (HCMV) kodierte Protein US 28 (Baggiolini *et al.*, 1997). In den letzten Jahren wurde deutlich, dass neben dem Oberflächenrezeptor CD4 bestimmte CXC- und CC-Chemokinrezeptoren als Kofaktoren für eine Infektion von Leukozyten durch humane Immundefizienz-Viren (HIV) benötigt werden (Locati und Murphy, 1999).

1.4 Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) reagieren bei kontinuierlicher oder wiederholter Stimulation mit verminderter Empfindlichkeit auf ihre Liganden. Dieses Phänomen wird als Desensibilisierung bezeichnet (Freedman und Lefkowitz, 1996). Obwohl von der Desensibilisierung des Rezeptor/G-Protein/Effektor-Signaltransduktionssystems alle drei Komponenten betroffen sind, scheint vor allem für die kurzfristige Abnahme der Sensibilität die beeinträchtigte Interaktion zwischen GPCR und G-Protein verantwortlich zu sein (Dohlman *et al.*, 1991). Bei der Hemmung der GPCR/G-Protein-Wechselwirkung spielen posttranslationale Modifikationen der Rezeptoren, insbesondere die Proteinphosphorylierung, eine entscheidende Rolle, wobei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sowohl von Serin/Threonin-Kinasen als auch von Tyrosinkinasen phosphoryliert werden können (Morris und Malbon, 1999; Luttrell *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 1999). Ist der Rezeptor einem Agonist über mehrere Stunden oder Tage hinweg ausgesetzt, kommt es zu einer längerfristigen Desensibilisierung, die mit einer Reduktion der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche einhergeht (*downregulation*) und sowohl durch Proteinabbau als auch durch transkriptionale oder posttranskriptionale Mechanismen gekennzeichnet ist (Morris und Malbon, 1999).

1.4.1 Mechanismen der heterologen und homologen Desensibilisierung

Bei der kurzfristigen Desensibilisierung wird in Abhängigkeit von der beteiligten Serin/Threonin-Proteinkinase, von der Lage der phosphorylierten Aminosäurereste und von der Kinetik der Reaktion zwischen der heterologen und der homologen Desensibilisierung unterschieden (Morris und Malbon, 1999). Bei der heterologen Form der Desensibilisierung (s. Abb. 3B) hat die Stimulation eines Rezeptors durch einen Agonist die Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine durch *second messenger*-abhängige Proteinkinasen A und C (PKA und PKC) zur Folge (Freedman und Lefkowitz, 1996). Die PKA wird von dem *second messenger* cAMP, die PKC von Diacylglycerin (DAG) und Ca^{2+} aktiviert. Beide Proteinkinasen können sowohl den ursprünglich aktivierten GPCR als auch andere, nicht aktivierte Rezeptoren an Serin- und Threoninresten phosphorylieren, wodurch deren Rezeptorfunktion um 40-50 % reduziert wird (Chuang *et al.*, 1996). Die heterologe Desensibilisierung von Rezeptoren dauert einige Minuten ($t_{0.5}$ *ca.* 3 min) und ist vor allem dann von Bedeutung, wenn die Agonistkonzentration niedrig und die Rezeptoraktivierung gering ist. Die heterologe Desensibilisierung kann als zelluläres Pendant der endokrinen Rückkopplungshemmung verstanden werden, da die durch Aktivierung eines GPCRs ausgelöste *second messenger*-Antwort letztendlich die Aktivität des Rezeptors und die *second messenger*-Produktion vermindert. Beispielsweise führt die Bindung von Adrenalin an den G_s-gekoppelten β_2-Adrenozeptor zur Aktivierung der Adenylylzyklase und folglich zum Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. Die dadurch stimulierte cAMP-abhängige PKA kann nun den β_2-Adrenozeptor sowie andere Rezeptoren und bestimmte Isoformen der Adenylylzyklase an Serin- und Threoninresten phosphorylieren. Der phosphorylierte, Agonist-gebundene β_2-Adrenozeptor koppelt weniger effektiv an G_s, die phosphorylierte Adenylylzyklase verliert an Aktivität, beides Auswirkungen der negativen Rückkopplung (Freedman und Lefkowitz, 1996; Morris und Malbon, 1999). Dem gegenüber steht die homologe Form der Desensibilisierung (s. Abb. 3A), bei der ausschließlich der aktivierte, Agonist-besetzte Rezeptor von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) an Serin- oder Threoninresten innerhalb der dritten zytoplasmatischen Domäne oder im Carboxyterminus des GPCRs phosphoryliert werden kann, wobei sich die von den GRKs phosphorylierten Aminosäurereste allerdings von den durch PKA und PKC phosphorylierten unterscheiden (Chuang *et al.*, 1996; Palczewski, 1997; Pitcher *et al.*, 1998; Bünemann und Ho-

sey, 1999). Die Phosphorylierung des Rezeptors durch die GRK beeinflusst die Desensibilisierung des GPCRs nur minimal, die Affinität für Inhibitorproteine, sog. Arrestine, wird aber um ein Vielfaches gesteigert (Krupnick und Benovic, 1998). Die Arrestine konkurrieren mit den G-Proteinen um die Bindung an den aktivierten GPCR und verhindern so die Signaltransduktion (vgl. 1.4.2). Diese zweistufige GRK-initiierte homologe Desensibilisierung erfolgt sehr schnell ($t_{0.5}$ im Bereich von Millisekunden bis *ca.* 15 s) und kann 70-80 % der Agonist-gebundenen Rezeptoren inaktivieren. Da die GRKs nur Agonist-aktivierte GPCRs desensibilisieren, ist es nicht erstaunlich, dass sie besonders unter Bedingungen hoher Rezeptorbelegung aktiv sind (Freedman und Lefkowitz, 1996).

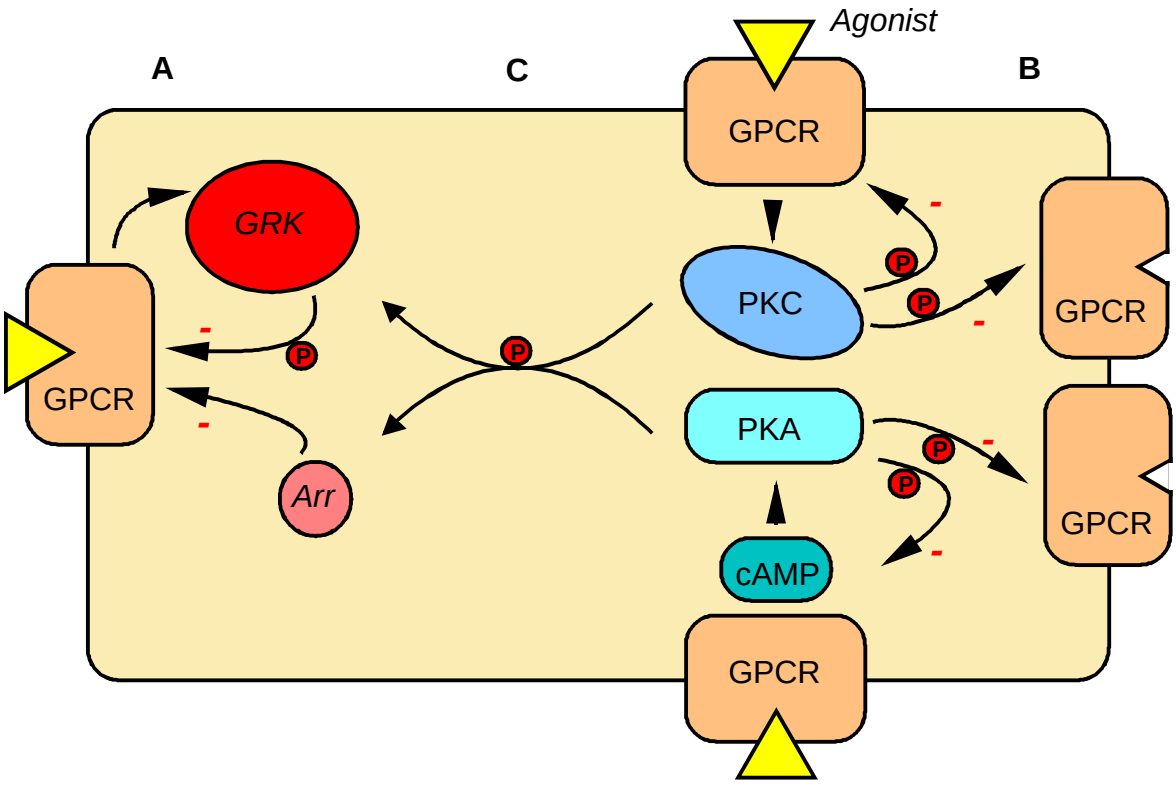


Abb. 3: Schematische Darstellung der homologen und heterologen Desensibilisierung sowie der heterologen Regulation der homologen Desensibilisierung. Die homologe Desensibilisierung Agonist-aktivierter Rezeptoren wird von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) und Arrestinen (Arr) vermittelt (**A**). Bei der heterologen Desensibilisierung werden sowohl Agonist-gebundene als auch nicht-aktivierte Rezeptoren durch *second messenger*-aktivierte Proteinkinasen A und C (PKA und PKC) phosphoryliert (**B**). Die für die homologe Desensibilisierung verantwortlichen GRKs und Arrestine können von PKA und PKC reguliert werden (**C**) (Chuang *et al.*, 1996).

Die an der homologen Desensibilisierung beteiligten GRKs und Arrestine können durch *second messenger*-aktivierte Proteinkinasen A und C phosphoryliert werden, d. h. es kann eine heterologen Regulation der homologen Desensibilisierung stattfinden (vgl. 1.5.2). Dieses Verhalten wird auch als *cross-talk* zwischen heterologer und homologer Desensibilisierung bezeichnet (Chuang *et al.*, 1996).

1.4.2 Arrestine

Arrestine sind lösliche Proteine mit Molekülmassen um 48 kD, die zusammen mit den GRKs für die homologe Desensibilisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren verantwortlich sind. Bisher konnten vier verschiedene Arrestine identifiziert werden: Arrestin und *cone*-Arrestin in den Stäbchen und Zapfen (*cones*) der Retina sowie die ubiquitär exprimierten Proteine β-Arrestin (Arrestin 2) und β-Arrestin 2, auch Arrestin 3 genannt (Krupnick und Benovic, 1998). Die Arrestine wechselwirken mit der dritten intrazellulären Schleife und dem Carboxyterminus des durch die GRK phosphorylierten Rezeptors und treten dadurch mit den G-Proteinen in Konkurrenz, während GPCRs, die durch andere Kinasen phosphoryliert werden, keine Affinität zu Arrestinen aufweisen (Krupnick und Benovic, 1998; Bünemann und Hosey, 1999). So bindet Arrestin nicht an einen von der PKA phosphorylierten β_2-Adrenozeptor (Lohse *et al.*, 1992). Arrestin 2 und 3 können an Clathrin binden und den GPCR in die Clathrin-abhängige Endozytose dirigieren, der entweder die Dephosphorylierung des GPCRs durch ein Mitglied der Phosphatase 2a-Familie und die anschließende Resensibilisierung oder ein lysosomaler Abbau des Rezeptors folgt (Palczewski, 1997; Lefkowitz, 1998; Bünemann *et al.*, 1999; Bünemann und Hosey, 1999). Die Endozytose der GPCRs muss nicht zwangsläufig über den Arrestin- und Clathrin-abhängigen Mechanismus verlaufen, da für einige GPCRs wie den muskarinen Acetylcholinrezeptor auch eine Arrestin-unabhängige Internalisierung beschrieben wurde (Bünemann *et al.*, 1999). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Arrestinbindung auch neue Signalwege initiieren kann, z. B. kann β-Arrestin innerhalb des β_2-Adrenozeptor-Signalkomplexes als Adapterprotein für die Src-Tyrosinkinase dienen, die wiederum den MAP-Kinase-Signalweg aktiviert (Lefkowitz, 1998; Luttrell *et al.*, 1999).

1.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) bilden innerhalb der Serin/Threonin-Kinasen eine eigene Subfamilie, die Agonist-gebundene oder aktivierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) phosphorylieren und so die homologe Desensibilisierung der GPCRs initiieren (Pitcher *et al.*, 1998). Die Konservierung der Aminosäuresequenz der GRKs in verschiedenen Spezies verdeutlicht die biologische Relevanz dieser Kinasen. Beispielsweise kodieren GPRK1 und wj283.2 aus *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* für Proteine, die 62 % und 51 % Homologie zu der bovinen GRK2 aufweisen (Pitcher *et al.*, 1998). Die Familie der GRKs der Säuger umfasst derzeit sechs Mitglieder, die untereinander 53-93 % Sequenzübereinstimmung aufweisen (Freedman und Lefkowitz, 1996; Pitcher *et al.*, 1998). Aufgrund von Sequenzhomologien und funktionalen Ähnlichkeiten werden die Rezeptorkinasen in drei Subfamilien eingeteilt: (a) die GRK1 (Rhodopsinkinase)-Subfamilie, (b) die GRK2-Subfamilie mit GRK2 (β-adrenerge Rezeptorkinase 1) und GRK3 (β-adrenerge Rezeptorkinase 2) und (c) die GRK4-Subfamilie mit GRK4 (IT-11), GRK5 und GRK6. Mit Ausnahme von GRK1, die fast ausschließlich in der Retina gefunden wird, und GRK4, die in signifikanten Mengen nur in Hodengewebe vorhanden ist, sind die GRKs ubiquitär exprimiert (Inglese *et al.*, 1993; Premont *et al.*, 1995; Freedman und Lefkowitz, 1996; Pitcher *et al.*, 1998). Von der humanen GRK1 existieren zwei Spleißvarianten, für die humane GRK4 wurden vier Spleißvarianten beschrieben (Zhao *et al.*, 1998; Premont *et al.*, 1996). In der Ratte konnten zwei Spleißvarianten der GRK6 nachgewiesen werden (Firsov und Elalouf, 1997). Für die anderen Mitgliedern der GRK-Familie sind bisher keine alternativ gespleißten Transkripte identifiziert worden. Vor kurzem konnte aus den Zapfen der Retina eines Knochenfisches eine cDNA isoliert werden, die für ein weiteres Mitglied der GRK-Familie, für die GRK7, kodiert und die am Carboxyterminus eine Konsensussequenz für Geranylgeranylierung aufweist (Hisatomi *et al.*, 1998). Die GRK7 findet sich auch in Zapfen und Stäbchen der Retina von Säugern und *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente haben gezeigt, dass das rekombinante Protein Rhodopsin lichtabhängig phosphorylieren kann (Weiss *et al.*, 1998). Da GRK-regulierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine Vielzahl vitaler Funktionen steuern, ist es wahrscheinlich, dass Störungen der GRK-vermittelten Desensibilisierung zur Entstehung von Krankheiten beitragen oder sogar verursachen (Pitcher *et al.*, 1998). Bisher wurden die GRKs mit verschiedenen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. Bei der Retinitis pigmentosa, einer degenerativen Erkrankung der Netzhaut, wird Rhodopsin nicht mehr desensibilisiert, die

Folge ist der Zelltod der Photorezeptoren. Möglicherweise kann die GRK1 Rhodopsin nicht mehr phosphorylieren, da der Rezeptor mehrere Mutationen aufweist, die teilweise auch im zytoplasmatischen Carboxyterminus lokalisiert sind (Chen *et al.*, 1995; Pitcher *et al.*, 1998). Bei einer Gruppe von Patienten mit Bluthochdruck, die eine beeinträchtigte β_2-Adrenozeptor-vermittelte Vasodilatation aufwiesen, wurden in peripheren Blutlymphozyten erhöhte GRK2-Spiegel detektiert. Da die in Lymphozyten beobachtete β_2-Adrenozeptor-Regulation mit der in glatten Gefäßmuskelzellen einhergeht, könnte eine GRK2-Aufregulation die abgeschwächte β_2-Adrenozeptor-vermittelte Vasodilatation bei Bluthochdruck-Patienten erklären (Gros *et al.*, 1997; Gros *et al.*, 1999). Die myokardiale Ischämie könnte u. a. durch eine Zunahme der GRK2 bedingt sein, da im Herzmuskel der Ratte nach länger andauerndem Sauerstoffentzug eine erhöhte GRK2-Expression beobachtet wurde, die zeitlich mit einer reduzierten β_2-Adrenozeptor-stimulierten Adenylylzyklase-Aktivität korrelierte (Ungerer *et al.*, 1996). Sowohl an Herzmuskelzellen von Patienten mit chronischem Herzversagen als auch in zahlreichen Tiermodellen wurde eine verminderte Kontraktilität und Adenylylzyklase-Aktivität nach Gabe von β-Adrenozeptor-Agonisten, eine reduzierte Anzahl und G_s-Kopplung myokardialer β_1-Adrenozeptoren und eine erhöhte myokardiale GRK2-Aktivität festgestellt. Die GRK2 scheint demnach wesentlich an der Regulation der Kontraktilität des Herzens beteiligt zu sein (Bristow *et al.*, 1990; Pitcher *et al.*, 1998).

1.5.1 Struktureller Aufbau der GRKs

Alle GRKs besitzen eine zentrale, hochkonservierte katalytische Domäne (263-266 Aminosäuren), die von einer regulatorischen amino- und carboxyterminalen Domäne flankiert ist (s. Abb. 4). Die katalytische Domäne der GRKs ist aus zwölf Subdomänen (I, II, III, IV, V, VIa, VIb, VII, VIII, IX, X, XI) aufgebaut, die in der gesamten Proteinkinase-Superfamilie konserviert sind (Inglese *et al.*, 1993; Hanks und Hunter, 1995). Die aminoterminale Domäne ist bei allen Mitgliedern ungefähr 185 Aminosäuren lang und weist innerhalb der GRK-Familie einen gewissen Grad an struktureller Homologie auf, weshalb vermutet wird, dass diese Region an der Rezeptorerkennung der GRKs beteiligt ist (Inglese *et al.*, 1993; Premont *et al.*, 1995; Pitcher *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu variiert die carboxyterminale Domäne der GRKs sowohl in der Länge als auch bezüglich der Struktur. Der C-Terminus der GRK1 besteht aus *ca.* 100 Aminosäuren, die GRK2-Subfamilie besitzt

einen ungefähr 230 Aminosäuren langen Carboxyterminus und die C-terminale Domäne der GRK4-Subfamilie umfasst etwa 130 Aminosäuren (Freedman und Lefkowitz, 1996; Pitcher *et al.*, 1998). Die C-Termini der GRKs bieten Möglichkeiten für diverse posttranslationale Modifikationen und regulatorische Protein/Protein bzw. Protein/Lipid-Interaktionen (s. Abb. 4).

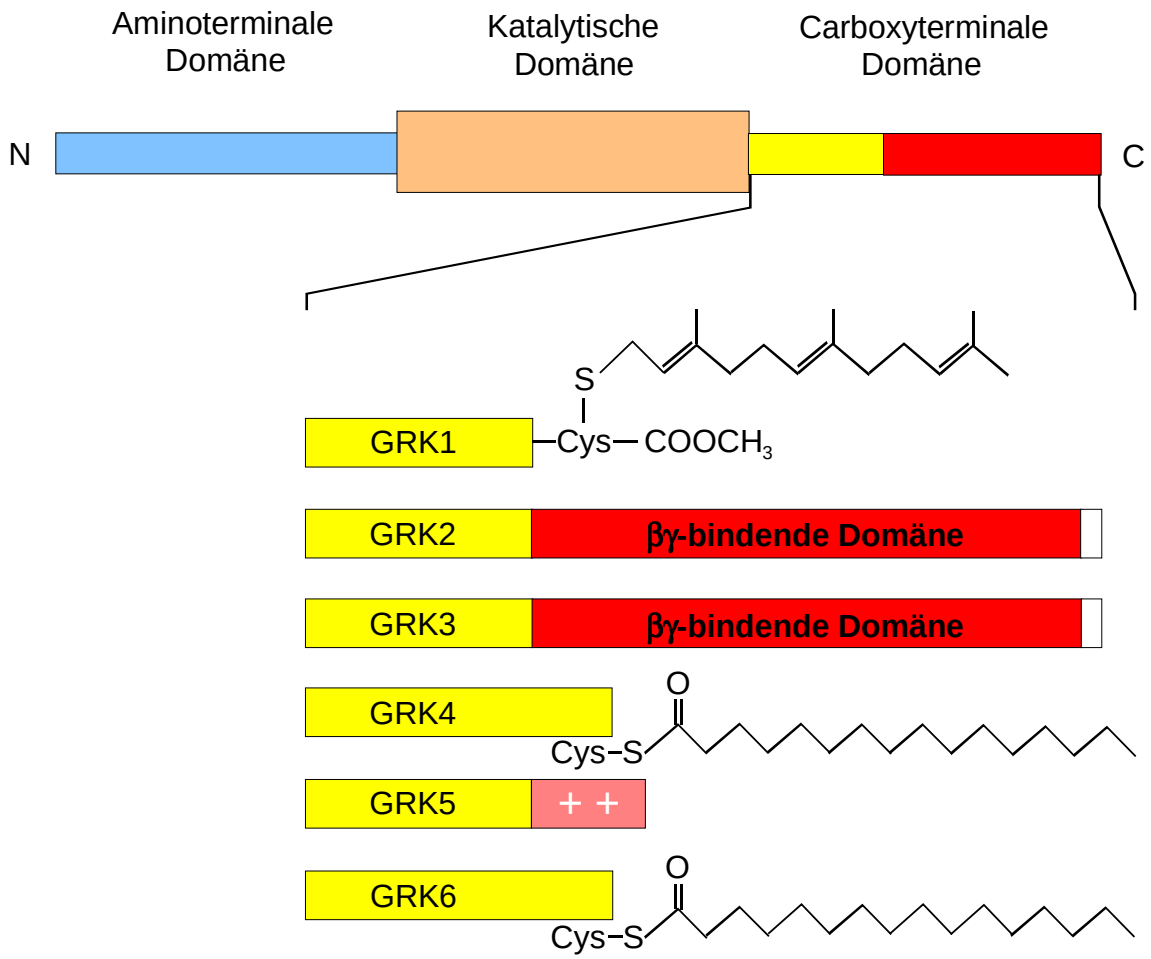


Abb. 4: Domänenstruktur der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs). Die Mitglieder der GRK-Familie besitzen eine zentrale, hochkonservierte katalytische Domäne, eine konservierte aminoterminale Domäne, die mit den Rezeptoren interagiert und einen variablen C-Terminus, der für die Lokalisation der GRKs an die Membran verantwortlich ist. Die unterschiedlichen Mechanismen der carboxyterminalen Membranverankerung sind hervorgehoben: GRK1 ist farnesyliert, GRK2 und GRK3 besitzen βγ-Bindungsdomänen, GRK4 und GRK6 sind palmitoyliert und GRK5 ist reich an basischen Aminosäuren (Inglese *et al.*, 1993).

Derartige Mechanismen sind nötig, um die vorwiegend zytoplasmatischen Rezeptorkinasen an die Membran zu translozieren, damit sie mit ihren Substraten, den GPCRs interagieren können (Inglese *et al.*, 1993; Freedman und Lefkowitz, 1996; Stoffel *et al.*, 1997).

1.5.2 Regulation der GRKs

Die Mitglieder der GRK-Familie weisen mehrere funktionelle Kennzeichen auf, die für diese Proteinfamilie typisch sind: (a) Die GRKs phosphorylieren aktivierte, Agonist-besetzte GPCRs. (b) Die Interaktion zwischen GRK und Rezeptor aktiviert diese Enzyme, wobei die aktivierenden Regionen des GPCRs nicht mit den zu phosphorylierenden Serin- oder Threoninresten identisch sind. (c) Die GRK-vermittelte GPCR-Phosphorylierung ist von regulatorischen Mechanismen abhängig, welche die Membranlokalisation und das Rezeptor-*targeting* steuern (Stoffel *et al.*, 1997; Pitcher *et al.*, 1998). Die Membranassoziation wird in der GRK-Familie durch verschiedene Mechanismen realisiert. Drei Mitglieder der GRK-Familie (GRK1, GRK4 und GRK6) sind am Carboxyterminus posttranslational durch Lipide modifiziert (vgl. Abb. 4) und können auf diese Weise mit der Plasmamembran wechselwirken. Die Aminosäuresequenz der GRK1 endet mit einem CAAX-Motiv, wobei C ein Cystein, A eine kleine aliphatische Aminosäure (AS) und X eine ungeladene AS repräsentiert. Diese Sequenz, im Falle der GRK1 CVLS, legt die Farnesylierung, Proteolyse und Carboxymethylierung der GRK1 fest (Lorenz *et al.*, 1991). Die Anwesenheit der Farnesylgruppe ist für die lichtabhängige Membranassoziation der GRK1 essenziell (Inglese *et al.*, 1992a; Inglese *et al.*, 1992b). GRK4 und die bis vor kurzem einzig bekannte humane GRK6 sind an einem oder mehreren C-terminalen Cysteinen palmitoyliert und mit dieser Modifikation ausschließlich membranständig (Premont *et al.*, 1996; Stoffel *et al.*, 1994; Stoffel *et al.*, 1998). Die Palmitoylierung erhöht die Phosphorylierungsaktivität der humanen GRK6 gegenüber membranständigen Rezeptoren (Loudon und Benovic, 1997; Stoffel *et al.*, 1998). Innerhalb der C-Termini der GRKs 2 und 3 findet sich eine ungefähr 100 AS lange Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne. PH-Domänen sind auch in funktionell verwandten Proteinen wie Tyrosin-Kinasen, Phospholipasen C oder *GTPase-activating proteins* (GAPs) anzutreffen und dienen vermutlich als Mediatoren der Protein/Protein- und der Protein/Membran-Wechselwirkung (Pitcher *et al.*, 1998). Bisher konnten mehrere Liganden der PH-Domäne identifiziert werden, z. B. die Proteinkinase C, Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdInsP_2), βγ-Untereinheiten und Inosit-1, 4, 5-trisphosphat (InsP_3) (Pitcher *et al.*, 1998). Die PH-Domäne der GRK2 liegt innerhalb der

etwa 125 AS umfassenden βγ-Bindungsregion (vgl. Abb. 4) (Touhara *et al.*, 1995). Die membranständigen βγ-Untereinheiten erleichtern die GPCR/GRK-Interaktion und fördern auf diese Weise die rezeptorvermittelte allosterische Aktivierung der GRKs 2 und 3 (Stoffel *et al.*, 1997). PtdInsP_2 bindet an den Aminoterminus der PH-Domäne der GRK2 und fördert die GRK2/βγ-Komplexbildung und somit die Phosphorylierung des GPCRs durch diese Kinase (Pitcher *et al.*, 1995; Debburman *et al.*, 1996). Die letzten 48 C-terminalen AS der GRK5 sind stark basisch (vgl. Abb. 4) und für die elektrostatische Wechselwirkung dieser Rezeptorkinase mit negativ geladenen Phospholipidkopfgruppen der Plasmamembran verantwortlich (Premont *et al.*, 1994). Neben diesen, für die einzelnen GRKs charakteristischen Regulationsmechanismen existieren weitere funktionelle Domänen, welche die Aktivität der GRKs beeinflussen. Die funktionellen Domänen sind schematisch in Abbildung 5 zusammengefasst.

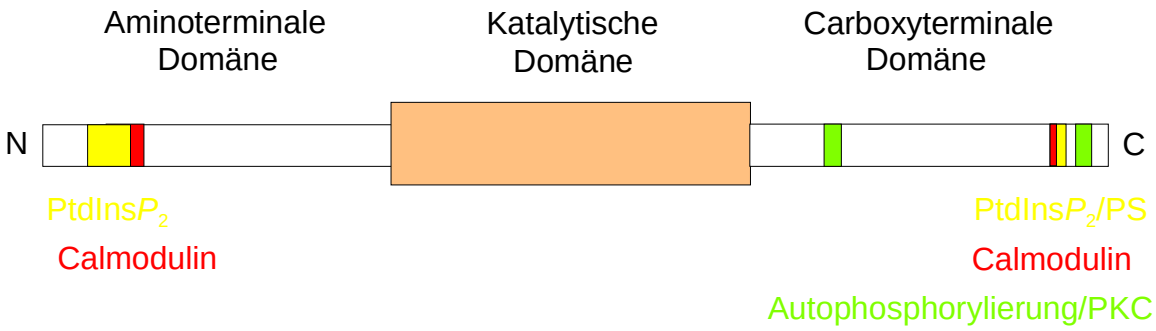


Abb. 5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der GRKs. Die Phospholipid-Bindungsdomänen für Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdInsP_2) und Phosphatidylserin (PS) sind gelb, die Calmodulin-Bindungsdomänen rot markiert. Autophosphorylierungsstellen sowie Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen C (PKC) sind grün abgesetzt.

Das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) bindet außerhalb der PH-Domäne an den Carboxyterminus der GRK2 und erhöht damit direkt deren katalytische Aktivität (Onorato *et al.*, 1995; Debburman *et al.*, 1996). Die Mitglieder der GRK4-Subfamilie (GRK4, GRK5 und GRK6) weisen eine amino- und eine carboxyterminale Phospholipid-Bindungsdomäne auf, wobei die N-terminale Region für PtdInsP_2 spezifisch ist (Pitcher *et al.*, 1996; Pronin *et al.*, 1998). Die C-terminale PS-Bindung an GRK5 stimuliert deren Autophosphorylierung und fördert die GRK5-vermittelte Rezeptorphosphorylierung (Kunapuli *et al.*, 1994). Der GRK5 vergleichbare Konsensussequenzen für Autophosphorylierung finden sich auch in GRK4, GRK6 und GRK1. Die Fähigkeit der autophosphorylierten GRK1, Rhodopsin zu

binden oder zu phosphorylieren, verändert sich durch die Phosphorylierung nicht (Palczewski *et al.*, 1995; Premont *et al.*, 1995). Die GRKs sind sensitiv gegenüber Calciumsensorproteinen wie Calmodulin (CaM) oder Recoverin (Pitcher *et al.*, 1998). Die CaM- bzw. Recoverin-Bindungsdomänen befinden sich im vorderen Abschnitt des Aminoterminus und im C-Terminus der GRKs (Levay *et al.*, 1998). GRK2 und GRK5 können carboxyterminal durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden, wobei dies bei der GRK2 zu einer Aktivierung und bei der GRK5 zu einer Inhibierung der Phosphorylierungsaktivität führt (Chuang *et al.*, 1995; Winstel *et al.*, 1996; Pronin *et al.*, 1997). Die verschiedenen Regulationsmechanismen erlauben eine umfassende Kontrolle der zellulären Lokalisation und der katalytischen Aktivität der Rezeptorkinasen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die sechs Mitglieder der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) sind an der homologen Desensibilisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren beteiligt. Von der GRK6 war lange Zeit nur ein Vertreter bekannt. Unsere Arbeitsgruppe konnte vier cDNAs isolieren, welche für unterschiedliche Varianten der GRK6 der Maus kodieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Entstehung sowie das mRNA- und Protein-Expressionsmuster der vier murinen GRK6-Isoformen aufzuklären und die mGRK6-Proteine funktionell zu charakterisieren.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid-Lösung 30 % 4K Mix	AppliChem, Darmstadt
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Ampicillin, Natrium-Salz	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
ATP, Dinatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Bacto Yeast Extract	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
BCA-Proteinassay Reagenz A	KMF, St. Augustin
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
Bind-Silane (Silane A-174)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Boviner IgG Proteinstandard	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva - Bioproducts, Heidelberg
BSA Fraktion V	Boehringer, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Dithiothreitol	Serva - Bioproducts, Heidelberg
DMEM	Life Technologies GmbH, Eggenstein
DMF	Roth, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
DSP	KMF, St. Augustin
ECL™ Western Blotting Detection Reagent	Amersham Pharmacia, Freiburg
E. coli RNA	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
EDTA, Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Fungizone®	Life Technologies GmbH, Eggenstein

GDP, Dinatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Gentamicin	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Glutathion	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
β-Glycerophosphat	Sigma, Deisenhofen
Grace's Insect Medium	Biowhittaker Bioproducts, Heidelberg
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hank's *balanced salt solution*	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Sigma, Deisenhofen
HEPES (für Zellkultur)	Life Technologies GmbH, Eggenstein
HydroLink Long Ranger™	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Insect Xpress	Biowhittaker - Bioproducts, Heidelberg
IPTG	Boehringer, Mannheim
Kupfersulfatlösung, 4 %	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Serva - Bioproducts, Heidelberg
L-Arginin	Life Technologies GmbH, Eggenstein
L-Cystein	Life Technologies GmbH, Eggenstein
L-Glutamin	Life Technologies GmbH, Eggenstein
L-Leucin	Life Technologies GmbH, Eggenstein
L-Methionin	Life Technologies GmbH, Eggenstein
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Natriumdesoxycholat	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Natriumthiosulfat-pentahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PCR-Mineralöl	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Penicillin	Life Technologies GmbH, Eggenstein

Pepstatin A	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Phenol	Sigma, Deisenhofen
Phosphatidylcholin	Sigma, Deisenhofen
Phosphatidylserin	Sigma, Deisenhofen
Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat	Sigma, Deisenhofen
Phosvitin	Sigma, Deisenhofen
Pierce SuperSignal® Substrat	KMF, St. Augustin
Pluronic F-68®	Life Technologies GmbH, Eggenstein
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Polymax RT Entwickler/Fixierer	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S-Konzentrat	Sigma, Deisenhofen
Pyronin Y	Sigma, Deisenhofen
Repel-Silane ES	Amersham Pharmacia, Freiburg
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Streptomycin	Life Technologies GmbH, Eggenstein
TEMED	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Thimerosal	Sigma, Deisenhofen
TNM-FH-Insect Medium	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
TRIzol®	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom KG, Berlin
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	Fluka, Neu-Ulm
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Boehringer, Mannheim

Alle verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien, Biochemikalien und Lösungsmittel wurden in p. a.-Qualität von Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Radioaktiv markierte Chemikalien

[^{32}P]Orthophosphat	(370 MBq/ml)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[α-^{32}P]dATP	(111 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[α-^{32}P]dCTP	(111 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[α-^{32}P]dGTP	(111 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[α-^{32}P]dTTP	(111 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[γ-^{32}P]ATP	(185 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[α-^{35}S]dATP	(37 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
[α-^{35}S]UTP	(14.8 TBq/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.3 Enzyme, Kits und Nukleinsäuren

ABI PRISM™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
BaculoGold™ Baculovirus DNA	Pharmingen, Hamburg
Biosizer III, IV	AGS, Heidelberg
Desoxynukleosidtriphosphat-Set	Boehringer, Mannheim
DNase I	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Klenow Enzym	Boehringer, Mannheim
Nucleobond™ AX PC-Kit-100	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin™-Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Boehringer, Mannheim
Ready-to-go™ T4-DNA-Ligase	Amersham Pharmacia, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	AGS, Heidelberg
RNA Leiter 0.24-9.5 kb	Life Technologies GmbH, Eggenstein
RNase A	Boehringer, Mannheim
SP6/T7-Transkriptionskit	Boehringer, Mannheim
SuperFect™ Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
SuperScript™ cDNA-Synthese-Kit	Life Technologies GmbH, Eggenstein
TaKaRa LA PCR Kit Ver.2	Bioproducts, Heidelberg

Taq-DNA-Polymerase	Sigma, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T7 Sequenase™ Version 2.0	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.4 Verbrauchsmaterial

Blotpapier GB002	Schleicher & Schuell, Dassel
Dialyseschlauch Spectra/Por® (Porengröße: 6-8 kDa)	Roth, Karlsruhe
Kodak X-OMAT™ AR X-ray film	Sigma, Deisenhofen
Konzentratoren für Proteinlösungen	GelmanScience, Roßdorf
Nitrozellulosemembranfilter (0.45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonmembran Biodyne B	Pall, Portsmouth, GB
Protran Nitrozellulose	Schleicher & Schuell, Dassel
PVDF-Membran	Sigma, Deisenhofen
6-*well*-Platten	Renner, Dannstadt
Zellkulturflaschen, 75 cm^2 und 150 cm^2	Renner, Dannstadt
Zellkulturschalen, ∅ 100 mm	Renner, Dannstadt

2.5 Säulen und Gele für die Chromatographie

Glutathion Sepharose® 4B	Amersham Pharmacia, Freiburg
HiTrap® Heparin-Sepharose-Säule, 1 ml	Amersham Pharmacia, Freiburg
HiTrap® Protein A-Sepharose-Säule, 1 ml	Amersham Pharmacia, Freiburg
HiTrap® SP-Sepharose-Säule, 1 ml und 5 ml	Amersham Pharmacia, Freiburg
Oligo(dT)-Cellulose-Tabletten	Invitrogen, Leek, NL
Protein G-Agarose	Boehringer, Mannheim
Sephadex G-50	Amersham Pharmacia, Freiburg
Superdex™ 75 (HiLoad 26/60)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Superdex™ 75 (PC 3.2/30)	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.6 Pro- und eukaryontische Zellstämme

African green monkey kidney (COS-7)-Zellen	American Type Culture Collection, Rockville, USA
Escherichia coli DH5α	Clontech/ITC Biotechnology, Heidelberg
Escherichia coli XL1-Blue MRF´	Stratagene, Heidelberg
Spodoptera frugiperda (*Sf*9)-Zellen	Invitrogen, Heidelberg
Trichoplusia ni HighFive™ (H5)-Zellen	Invitrogen, Heidelberg

2.7 Plasmide

pBluescript™ II SK(-)	Stratagene, Heidelberg
pMT2SM	Dr. Moolenaar, Amsterdam, NL
pVL1393	Invitrogen, Leek, NL
pAcG2T	Dr. Bernd Nürnberg, Berlin

2.8 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden in der Sektion Polymere der Universität Ulm und von der Firma Interaktiva, Ulm hergestellt.

2.8.1 Vektorspezifische Oligonukleotide

pBluescript-*reverse*:	5´-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG T-3´
pBluescript-*universal*:	5´-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3´
pVL-*sense*:	5´-CTG TTT TCG TAA CAG T-3´
pVL-*antisense*:	5´-TGA GTT TTT GGT TCT TGC CG-3´
T7-*primer*:	5´-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA-3´

Die Oligonukleotid-*primer* für pBluescript wurden von der Firma Amersham Pharmacia, Freiburg bezogen.

2.8.2 GRK6-spezifische Oligonukleotide

A1:	5´-AGC CCA TGG AGC TCG AGA ACA TCG TA-3´
gen1:	5´-CAG CAC GTG CTT CAG GAA AGC CAG-3´
gen8:	5´-TGA TGA ATG GAG GTG ACC TAA AGT-3´
gen9:	5´-ACA CCA CTG TGC AAA ACT GTA AAC G-3´
gen13:	5´-AGT CTG CTC TGG GAG CCA GG-3´
G3:	5´-AGG ACT CGG TAC TGC CTG-3´
G4b:	5´-AGC ACG TGC TTC AGG AAA-3´
G6b:	5´-TTG ACC AGC CGC TCC ACC T-3´
G8:	5´-TGC AGT GGG CTG GCC CTT-3´
P1:	5´-AGC TTC GAC TCA GCC TTG A-3´
P2:	5´-CCC TGC AAA GAC CTC TTC CA-3´
P3a:	5´-CTA GAG GCG GGT GGG GAG CTC TTC-3´
P3b:	5´-AAG CAA GGG GTT AGC AGC TTG-3´
P4:	5´-GAA TGA GCG CTA CAC GTT CA-3´
P5:	5´-GGA GCT GGC ATG CTA GAG C-3´
P6b:	5´-GTG GAG ACC GAG TGC TTC-3´

2.8.3 GAPDH-spezifische Oligonukleotide

GAPDH1:	5´-TGG GAA GCT TGT CAT CAA CGG-3´
GAPDH2:	5´-GGC AGT GAT GGC ATG GAC TG-3´

2.8.4 Oligonukleotide für die SNuPE-Experimente

SNuPE-*primer* A/B:	5´-CAG AGA CTC TTC AGT CGC CAA-3´
SNuPE-*primer* C/D:	5´-TGG AGA AAG TGA ACA GTA GGT-3´

2.9 Rekombinante Baculoviren

bovine GRK2	Dr. Martin Lohse, Würzburg
$G\alpha_{i2}$	Dr. Alexander Dietrich, Ulm
$G\beta_1\gamma_3$	Dr. Alexander Dietrich, Ulm
HA-hCCR2a	Alexander Rösch, Ulm
HA-hCCR2b	Alexander Rösch, Ulm
HA-mCXCR4	Dr. Barbara Möpps, Ulm
hCXCR2	Elke Nüsseler, Ulm
hCXCR4	Dr. Barbara Möpps, Ulm
mGRK6-B M1	Susanne Zöllner, Ulm
mGRK6-B M2	Susanne Zöllner, Ulm
mGRK6-B M3	Susanne Zöllner, Ulm

2.10 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der *high molecular weight marker* (HMW) wurde von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen.

Protein	Molekulargewicht (kD)
Myosin, Kaninchenmuskel	205
β-Galaktosidase, *E. coli*	116
Phosphorylase b, Kaninchenmuskel	97.4
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	29

2.11 Peptide

hIL-8		Tebu, Frankfurt
hMCP-1		Tebu, Frankfurt
hSDF-1α		Tebu, Frankfurt
Pep1	H_2N-EGG GGN RKG KSK KWR C-$CONH_2$	Eurogentec, Belgien
Pep2	H_2N-VSE YEV TPD EKR KAC-$CONH_2$	Eurogentec, Belgien
Pep3	H_2N-CKK LEK KRI KKR KGE-$CONH_2$	Eurogentec, Belgien
Pep4	H_2N-CPP ASS PQA EAP TGG WR-COOH	Eurogentec, Belgien

2.12 Antikörper

Primäre Antikörper gegen:

HA (12CA5)	Monoklonales Maus-IgG	Boehringer, Mannheim
GRK2	Polyklonales Kaninchen-IgG	Dr. Martin Lohse, Würzburg
GRK6 (C20)	Polyklonales Kaninchen-IgG	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg
GST (Z5)	Polyklonales Kaninchen-IgG	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg
PY20, Peroxidase-gekoppelt	Monoklonales Maus-IgG	Transduction Laboratories, Kentucky

Antiseren gegen:

mGRK6 (Anti-Pep1)	Polyklonales Kaninchen IgG	Eurogentec, Belgien
mGRK6 (Anti-Pep2)	Polyklonales Kaninchen IgG	Eurogentec, Belgien
mGRK6 (Anti-Pep3)	Polyklonales Kaninchen IgG	Eurogentec, Belgien
mGRK6-B (Anti-Pep4)	Polyklonales Kaninchen IgG	Eurogentec, Belgien

Sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper:

Anti-Kaninchen-IgG	Ziegen-IgG	Sigma, Deisenhofen
Anti-Maus-IgG	Ziegen-IgG	Sigma, Deisenhofen

Sekundärer, Cy™3-gekoppelter Antikörper:

Anti-Kaninchen-IgG	Ziegen-IgG	Dianova, Hamburg

2.13 Spezielle Geräte

ABI 310 PRISM™ Genetic Analyser	Perkin-Elmer, Weiterstadt
ÄKTA™ *explorer* 100	Amersham Pharmacia, Freiburg
Axioplan-Mikroskop	Zeiss, Jena
CCD Kamera Olympus DP 10	Olympus, Hamburg
Concentrator 5301 (*speed vac*)	Eppendorf, Hamburg
Easy Breeze Air Gel Dryer, Hoefer	Amersham Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer groß (SDS-PAGE)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer klein (SDS-PAGE)	Sigma, Deisenhofen
FPLC™ System	Amersham Pharmacia, Freiburg
Horizontalgelkammer	MBT-Brand, Heidelberg
IMAC-CCD S30 Kamera	Compuloc, Böblingen
Immunoblot Transferkammer	Renner GmbH, Darmstadt
Immunoblot Transferkammer Hoefer™ miniVE	Amersham Pharmacia, Freiburg
IMT-2-Mikroskop	Olympus, Hamburg
J2-HS Zentrifuge	Beckman Instruments, München
Konfokales Mikroskop TCS 4D	Leica, Solms
Milli-Q^{UF}_{PLUS}	Millipore, Eschborn
Minifuge GL	Heraeus Christ, Osterode
Mini-Protean® II-System	BioRad, München
Optima™ TLX Ultrazentrifuge	Beckman Instruments, München
Rotixa-Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Rührzelle 8010, 8050	Amicon, Witten
Sammy Dry-Apparatur	Schleicher & Schuell, Dassel
SMART™ System	Amersham Pharmacia, Freiburg
Sorvall Ultrazentrifuge OTD50B	Du Pont Instruments, Bad Nauheim
Spektrophotometer DU 640	Beckman Instruments, München
Thermocycler 480	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Ultra Turrax	Janke & Kunkel, Staufen i. Breisgau
UV-Stratalinker™ 1800	Stratagene, Heidelberg
Videodokumentationsystem CF8/1 DX	Kappa Meßtechnik GmbH, Gleichen

2.14 Software

GraphPad Prism® Version 2.01, 32 bit version for Winsows95, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA.

Micrografx Designer 7.0, Micrografx Inc. 1987-1997, München.

Mircografx Picture Publisher 7, Micrografx Inc. 1987-1997, München.

PC/Gene: the nucleic acid and protein sequence analysis software system, release 6.85, IntelliGenetics, CH.

Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc., USA.

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Herstellung von Luria-Bertani (LB)-Medium

Die *E. coli*-Stämme DH5α und XL1-Blue MRF´ wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert. Das LB-Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Die Selektion der Bakterien erfolgte durch Zugabe von Ampicillin zum Medium (50 µg/ml). Der LB-Agar wurde autoklaviert, auf Handwärme abgekühlt, und nach Zugabe von Ampicillin in sterile Petrischalen gegossen. Diese wurden nach dem Erstarren des Agars bei 4 °C gelagert.

LB-Medium: 1 % (m/V) Bactotrypton, 0.5 % (m/V) Hefeextrakt, 1 % (m/V) NaCl

LB-Agar: 2 % (m/V) Agar in LB-Medium

Ampicillinlösung: 50 mg/ml in ddH_2O, durch einen Zelluloseacetatfilter (0.22 µm Porenweite) sterilfiltriert

3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Eine Einzelkolonie der Bakterienstämme *E. coli* DH5α oder XL1-Blue MRF´ wurde von der Agarplatte mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 2.5 ml LB-Medium überführt. Nach Inkubation über Nacht auf dem Bakterienschüttler bei Standardbedingungen (37 °C und 200 Upm), wurden mit dieser Vorkultur weitere 100 ml LB-Medium angeimpft und diese Bakterienkultur unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von 0.5 bei 600 nm (OD_{600}) weiterinkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (2.000 *g*, 10 min, RT), in 30 ml eiskaltem TFB1 resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2.000 *g*, 10 min, RT) wurden die Bakterien in 4 ml eiskaltem TFB2 resuspendiert. Die somit zur Aufnahme von DNA kompetenten Zellen wurden dann in 100 µl Aliquots portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TFB1: 10 mM $CaCl_2$, 35 mM KAc, 15 % (V/V) Glycerin, 100 mM RbCl, 50 mM $MnCl_2$
Zur Herstellung des Puffers wurden die eingewogenen Salze zunächst einzeln in ddH_2O gelöst. Die erhaltene $CaCl_2$- und die KAc-Lösung sowie das Glycerin wurden zu dem vorgelegten ddH_2O gegeben. Der pH-Wert wurde zunächst mit Essigsäure auf 6.1 eingestellt, die Rubidium- und Manganchloridlösungen zugegeben und dann auf pH 5.9 titriert. Abschließend wurde der TFB1 durch einen Zellulosefilter (Porengröße 0.22 µm) sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

TFB2: 75 mM $CaCl_2$, 15 % (V/V) Glycerin, 10 mM RbCl, 10 mM MOPS
Auch hier wurden die eingewogenen Salze zunächst einzeln in ddH_2O gelöst. Die erhaltenen $CaCl_2$- und RbCl-Lösungen wurden zusammen mit dem Glyerin zu vorgelegtem ddH_2O gegeben. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 6.8 eingestellt und nach Zugabe der MOPS-Lösung nochmals kontrolliert. Der TFB2 wurde ebenfalls sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

3.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter DH5α- oder XL1-Blue MRF´-Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, mit einem Ligationsansatz (s. 3.2.10) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock bei 42 °C für 90 s führte zur Aufnahme der zur Transformation zugesetzten Plasmid-DNA. Die Bakterien wurden danach 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl LB-Medium, in dem 10 mM $MgSO_4$ und 0.2 % (m/V) Glukose enthalten waren, wurden die Bakterien schließlich für 45 min unter Standardbedingungen inkubiert. Ein Aliquot dieser Bakterienkultur wurde mit einem Drygalsky-Spatel auf zuvor getrocknete LB^{Amp^+}-Platten ausplattiert.

3.1.4 Selektion von transformierten Bakterien

Die Selektion von Bakterien, welche die rekombinante Plasmid-DNA aufgenommen hatten, erfolgte in Anwesenheit des Antibiotikums Ampicillin. Bei Bakterien, die mit pBluescript-Vektoren transformiert worden waren, konnte zusätzlich eine blau/weiß-Selektionierung mit Hilfe der Substanzen IPTG und X-Gal durchgeführt werden. Blaue Bakterienkolonien enthielten Plasmide ohne rekombinante DNA und konnten eine funktionsfähige β-Galaktosidase herstellen. Nach Stimulation durch den Induktor IPTG setzte die

β-Galaktosidase das Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff um. Bei Bakterien mit rekombinanten Plasmiden verursachte die Insertion eine Inaktivierung des β-Galaktosidase-Gens (lacZ), es konnte keine β-Galaktosidase hergestellt werden und die Kolonien blieben milchig-weiß. Ein Aliquot (200 µl) des Transformationsansatzes wurde auf LB^{Amp+}-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Falle der blau/weiß-Selektion wurden vor dem Ausplattieren je 10 µl IPTG- und X-Gal-Lösung zu dem Aliquot gegeben.

IPTG-Lösung: 0.1 M in ddH_2O

X-Gal-Lösung: 10 % (m/V) in DMF

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5α oder XL1-Blue MRF´ wurden für die Minipräparationen aus 2.5 ml-Kulturen Nukleospin-Kits und für die Midipräparationen aus 50 ml-Kulturen Nukleobond AX 100 Kits nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Bakterien waren vorher über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 Upm) in LB^{Amp+}-Medium kultiviert worden. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration einer Lösung wurde spektralphotometrisch durch die Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Eine optische Dichte (1 OD) entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA oder 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde über das Verhältnis der Extinktionen der Lösung bei 260 und 280 nm ($OD_{260/280}$) bestimmt. Bei reinen Nukleinsäurelösungen erhält man Werte zwischen 1.8 und 2.0, niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch Proteine oder Phenol hin.

3.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Zur Entfernung von Proteinen, die bei der Extraktion von Nukleinsäuren aus Zellen, aber auch bei der Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen anfielen, wurden die wässrigen Nukleinsäurelösungen mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und nach dem Durchmischen für 5 min mit 15.800 *g* bei RT zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt, um das restliche Phenol zu entfernen und wie oben zentrifugiert. Die Nukleinsäuren konnten aus dem Überstand durch Zugabe von 2.5 Volumen 100 % Ethanol und 0.1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung pH 5.0 und einer Inkubation von mindestens 30 min bei -20 °C ausgefällt werden. Die Fällung von Nukleinsäuren aus größeren Volumina erfolgte durch den Zusatz von 0.7 Volumen Isopropanol und einer Inkubation von 20 min bei RT. Nach der Zentrifugation des Fällungsansatzes für 10 min mit 15.800 *g* bei RT wurde das Pellet mit 70 %igem (V/V) Ethanol gewaschen und wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend entweder im Heizblock (37 °C), im Exsikkator oder in einem Vakuumkonzentrator (*speed vac*) getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH_2O aufgenommen.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA entsprechend ihres Molekulargewichts in Agarosegelen erfolgte in einer Horizontalgelapparatur. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente.

Agarosekonzentration [% (m/V)]	Trennbereich linearer DNA [kb]
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

nach Sambrook *et al.* (1989)

Die Agarose wurde in Elektrophoresepuffer (1x TAE) aufgekocht, nach Abkühlen auf *ca.* 60 °C mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, der sich zwischen die Basen der Nukleinsäuren einlagert und unter UV-Beleuchtung eine rot-orange Fluoreszenzstrahlung (λ = 560 nm) emittiert. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 6:1 (V/V) mit Probenpuffer vermischt, in die Taschen des erstarrten Gels geladen und bei einer konstanten Feldstärke von 10 V/cm in 1 x TAE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung des Gels erfolgte unter UV-Beleuchtung (λ = 312 nm) auf einem Transilluminator (Bachofer). Das Gelbild wurde mit einem Videodokumentationssystem (Kappa Meßtechnik) erfasst.

1x TAE: 40 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1 % (V/V) Essigsäure
Ethidiumbromidlösung: 10 mg Ethidiumbromid in 1 ml ddH_2O, dunkel gelagert
6x DNA-Probenpuffer: 30 % (V/V) Glycerin, 50 mM EDTA, 0.25 % (m/V) Bromphenolblau

3.2.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurde die gewünschte DNA-Bande auf dem Transilluminator unter UV-Beleuchtung mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein vorgewogenes Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA wurde aus dem Gelstück mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert.

3.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA-Spaltungen wurden mit Restriktionsendonukleasen (RE) nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

Standardansatz:

1 µg	(Plasmid-)DNA
0.3 µl	Restriktionsendonukleasen (10 U/µl)
1.5 µl	10 x Restriktionspuffer
ad 15 µl mit ddH_2O	

Der Restriktionsansatz wurde bei der empfohlenen Temperatur für mindestens 1 h inkubiert und anschließend mit 5 µl 6 x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Spaltungsprodukte wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen unter UV-Beleuchtung analysiert.

3.2.7 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um bei der Ligation (s. 3.2.10) eine Rezirkularisierung zu verhindern, wurden die Vektoren nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) an den 5´-Enden dephosphoryliert.

CIP-Ansatz:	2-3 µg	linearisierter Vektor
	6 µl	50 mM Tris/HCl, pH 7.5
	1 µl	CIP (1 U/µl)
	ad 60 µl	mit ddH_2O

Nach der Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde die CIP für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde der Ansatz phenolisiert und das linearisierte Plasmid mit Ethanol ausgefällt. Zur DNA-Mengenabschätzung wurde ein Aliquot in einem 1 % (m/V) Agarosegel zusammen mit einem DNA-Größenstandard bekannter Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Aliquot des linearisierten, dephosphorylierten Vektors wurde zur Kontrolle in einen Ligationsansatz (s. 3.2.10) eingesetzt. Nach der Transformation und dem Ausstreichen der Bakterien auf LB^{Amp+}-Platten gibt die Zahl der Bakterienkolonien Aufschluss über die Qualität der CIP-Behandlung.

3.2.8 Auffüllreaktion

Mit dem Klenow-Fragment, der *E. coli*-DNA-Polymerase I ohne 3´→5´-Exonukleaseaktivität, können einzelsträngige, 5´-überhängende Enden von DNA-Fragmenten (*sticky ends*) partiell aufgefüllt werden. Es entsteht ein Doppelstrang mit glattem Ende (*blunt end*), sodass eine Ligation zwischen zwei DNA-Strängen, die mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden, möglich ist.

Auffüllansatz:	10 µl	DNA-Fragment (*ca.* 0.5 µg)
	2 µl	10 mM dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
	2 µl	10x One-Phor-All Puffer
	1 µl	Klenow-Fragment (2 U/µl)
	ad 20 µl mit ddH_2O	

Nach Inkubation bei RT für 30 min wurde das Enzym für 10 min bei 68 °C hitzeinaktiviert, die Probe mit Phenol behandelt und das DNA-Fragment mit Ethanol ausgefällt.

3.2.9 Modifizierung des Vektors pBluescript II SK(-) durch T-*tailing*

Für das T-*tailing* des Vektors pBluescript™ II SK(-) wurde eine nach Marchuk *et al.* (1991) veränderte Methode durchgeführt. *Taq*-DNA-Polymerasen hängen bei der Polymerasekettenreaktion (s. 3.2.14) an die 3´-OH-Enden der amplifizierten DNA-Fragmente jeweils ein einzelnes Nukleotid, meist ein Adenosin, an. Diese Eigenschaft wird beim T-*tailing* eines Vektors ausgenutzt. Dabei wird an die 3´-OH-Enden des mit *Eco*RV gerade geschnittenen Vektors durch Inkubation mit *Taq*-DNA-Polymerase und dTTP ein einzelnes Thymidin angehängt. Die A-T-Basenpaarung zwischen dem PCR-Fragment und dem Vektor erleichtert die Ligation und verhindert gleichzeitig eine Religation des Vektors. Zehn µg pBluescript™ II SK(-)-Plasmid-DNA wurden mit 40 U *Eco*RV für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die vollständige Linearisierung des Vektors wurde durch die elektrophoretische Auftrennung eines Aliquots des RE-Ansatzes in einem 1 % (m/V) Agarosegel überprüft. Nach 10 min Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen bei 65 °C wurde der Ansatz phenolisiert und anschließend das linearisierte Plasmid mit Ethanol ausgefällt. Das T-*tailing* erfolgte durch Inkubation des linearisierten Plasmids mit *Taq*-DNA-Polymerase (1 U/µg DNA) und 2 mM dTTP für 2 h bei 70 °C. Nach erneuter Phenolisierung und Fällung des T-*tailed*-Vektors wurde dieser in ddH_2O gelöst und ein Aliquot zur DNA-Mengenabschätzung in einem 1 % (m/V) Agarosegel zusammen mit einem DNA-Größenstandard bekannter Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle des T-*tailing* wurde ein Aliquot des T-*tailed*-Vektors in einen Ligationsansatz eingesetzt. Nach der Transformation und dem Ausstreichen der Bakterien auf LB^{Amp+}-Platten gibt die Zahl der Bakterienkolonien Aufschluss über die Qualität des Vektors.

3.2.10 Ligation

Um rekombinante Plasmide herstellen und in kompetente Bakterien einschleusen zu können, müssen das DNA-Fragment (*insert*) und der Plasmidvektor mit Hilfe einer Ligase über Phosphodiesterbindungen verknüpft werden.

Standard-Ligationsansatz:	1,5 µl	10 x Ligationspuffer
	1 µl	Vektor (*ca.* 20 ng)
	5 µl	DNA-Fragment (*ca.* 100 ng)
	1,5 µl	T4-Ligase (1 U/µl)
	ad 15 µl mit ddH_2O	

Die Inkubation erfolgte bei 15 °C für 16 h.

Ready-to-go Ligation:
Bei dieser Schnellligation wurden 20 ng Vektor und 100 ng eines DNA-Fragments zum fertigen, lyophilisierten Ligationsansatz (Amersham Pharmacia) hinzupipettiert. Nach dem Auffüllen des Ansatzes mit ddH_2O auf 20 µl erfolgte die Ligation bei 15 °C für 45 min.

3.2.11 RNA-Extraktionsmethoden

Ribonukleinsäuren wurden im Verlauf dieser Arbeit aus verschiedenen Geweben der Maus (C57BL/6J) isoliert. Je nach benötigter Menge und Reinheit der RNA kamen unterschiedliche Extraktionsmethoden zur Anwendung. Aufgrund der Kontaminationsgefahr durch RNasen wurde grundsätzlich mit Einmalhandschuhen, Einweggefäßen, RNase-freiem Wasser und eigens für RNA-Arbeiten verwendeten Chemikalien und Apparaturen gearbeitet.

3.2.11.1 Gesamt-RNA-Isolierung mit TRIzol®

Mit dem TRIzol®-Reagenz (Life Technologies) konnten parallel aus mehreren Geweben kleinere Mengen Gesamt-RNA isoliert werden (*ca.* 100 bis 300 µg). Das TRIzol®-Reagenz ermöglicht einen Zellaufschluss mit gleichzeitiger potenter RNase-Inhibition und besteht aus einer kombinierten Lösung aus Phenol und Guanidinoisothiocyanat. Je nach

Gewebetyp wurden 50-100 mg Mausgewebe mit 1 ml TRIzol®-Reagenz versetzt und mit Hilfe des Ultra-Turrax (Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau) für 30 s homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert, um Nukleoproteinkomplexe vollständig zu dissoziieren. Anschließend wurde pro 1 ml TRIzol®-Reagenz 0.2 ml Chloroform zugegeben, 15 s per Hand gemischt und 2-3 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde 15 min mit 12.000 *g* bei RT zentrifugiert, wobei eine untere, rötlich gefärbte Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere, farblose, wässrige Phase erhalten wurde. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die darin enthaltene RNA durch Isopropanolzugabe (0.5 ml Isopropanol/ml TRIzol®-Reagenz) ausgefällt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die RNA pelletiert (10 min mit 12.000 *g* bei RT), das Pellet mit 70 % (V/V) Ethanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und je nach Größe in 50-100 µl ddH_2O gelöst und bei -20 °C gelagert. Auf einem 1 % (m/V) Agarosegel wurde ein Aliquot der erhaltenen Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt, um eine mögliche Kontamination durch RNasen zu erkennen.

3.2.11.2 Poly(A)$^+$-RNA-Isolierung

Poly(A)$^+$-RNA wurde aus Gesamt-RNA durch Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Cellulose (Edmonds *et al.* 1971, Swan *et al.* 1972) isoliert. Da mRNA im Gegensatz zur Transfer- und ribosomalen RNA ein 3´-poly(A)-Ende besitzt, bindet sie an Oligo(dT)-Cellulose. Für die Herstellung der Oligo(dT)-Cellulose-Säule wurde eine Oligo(dT)-Tablette (Invitrogen, Leek, NL) in Bindungspuffer aufgeschlämmt und in eine mit etwas Glaswolle abgedichtete sterile Pasteurpipette gegossen. Die Gesamt-RNA wurde auf die mit Bindungspuffer äquilibrierte Oligo(dT)-Säule aufgetragen. Dazu wurde die RNA in 10 ml Bindungspuffer aufgenommen, 5 min bei 68 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu zerstören und nach dreiminütiger Inkubation auf Eis auf die Säule aufgebracht. Das Eluat wurde aufgefangen, erneut 5 min denaturiert und auf die Säule gegeben. Danach wurde die Cellulose mit Bindungspuffer solange gewaschen, bis die OD_{260} unter 0.02 gesunken war. Die Elution der mRNA erfolgte mit 10 mM Tris/HCl pH 7.5, die anschließende Fällung der mRNA mit 0.7 Volumen Isopropanol. Das mRNA-Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen ddH_2O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.2.12 RNA *in situ*-Hybridisierung

Die RNA *in situ*-Hybridisierung mit einer [α-^{35}S]UTP markierten Sonde wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Monika Wilda aus der Abteilung Klinische Genetik der Universität Ulm durchgeführt. Die für die Hybridisierung benötigten Schnitte von Mausembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden von Frau Dr. Monika Wilda angefertigt und entsprechend vorbehandelt.

3.2.12.1 *In vitro*-Transkription radioaktiv markierter RNA

Für die *in vitro*-Transkription wurden jeweils 10 µg des Transkriptionsvektors pBluescript^{TM} II SK(-), in den die für die mGRK6-C codierende cDNA einkloniert war, mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III linearisiert (s. 3.2.6). Die linearisierte DNA wurde phenolisiert, chloroformiert, mit Ethanol gefällt (s. 3.2.3) und in 9 µl ddH_2O gelöst, um eine DNA-Konzentration von ca. 1 µg/µl zu erhalten. Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit dem Transkriptionskit von Boehringer, Mannheim. Die linearisierte DNA diente als Matrize für die T7- und T3-RNA-Polymerasen: *antisense*-RNA wurde in diesem Fall mit *Hind*III-linearisierter DNA und der T3-RNA-Polymerase synthetisiert, *sense*-RNA mit *Bam*HI-geschnittener DNA und der T7-RNA-Polymerase.

Transkriptionsansatz:	1.5 µl	10 mM Nukleotide (je 0.5 µl 10 mM ATP, GTP, CTP)
	0.5 µl	400 mM DTT
	1 µl	10 x Transkriptionspuffer
	1 µl	linearisierte DNA (*ca.* 1 µg)
	1.5 µl	ddH_2O
	0.5 µl	RNase Inhibitor
	3 µl	[α-^{35}S]UTP (10 mCi/ml, > 400 Ci/mmol)
	1 µl	RNA-Polymerase

Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde 1 µl RNase-freie DNase zugegeben und der Ansatz für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgt nach Zugabe von 10 µl *E. coli* RNA (50 mg/ml, Calbiochem) und 79 µl 20 mM DTT eine Phenolextraktion. Die in der oberen, wässrigen Phase enthaltenen RNA-Transkripte wurde über eine selbst hergestellte Sephadex G-50-Säule von nicht eingebauten NTPs und abgedauten dNTPs getrennt (s.

3.2.19). Zwei µl des Eluats, in dem sich die RNA-Transkripte befanden, wurden mit 9 ml Scintillationscocktail im Flüssigscintillationszähler ausgezählt, um die Qualität der [^{35}S]-markierten RNA-Transkripte zu ermitteln. Die RNA-Transkripte wurden mit 1 Volumen 100 mM Na_2CO_3 pH 10.3 und 20 mM DTT bei 60 °C hydrolysiert. Die Inkubationszeit t (in min) der alkalischen Hydrolyse hängt von der Länge der RNA-Transkripte ab und berechnet sich nach folgender Formel:

$$t = \frac{L_0 - L_f}{0.11 \times L_0 \times L_f}$$

L_0 = Transkriptlänge in kb

L_f = gewünschte Transkriptlänge in kb (0.1 – 0.2 kb)

Nach der Hydrolyse der RNA wurde der Ansatz mit 1 Volumen 200 mM Natriumacetat pH 6.0 und 20 mM DTT neutralisiert und die RNA mit Ethanol über Nacht bei -80 °C gefällt.

3.2.12.2 Hybridisierung

Um eine unspezifische Bindung der transkribierten *sense*- und *antisense*-RNA an die Schnitte von Mausembryonen zu verhindern, mussten die Schnitte mit Prähybridisierungslösung vorbehandelt werden. Dazu wurden *ca.* 15 µl Prähybridisierungslösung pro Schnitt aufgebracht, die Schnitte mit silikonisierten Deckgläschen abgedeckt und in einer feuchten Kammer für 2 h bei 54 °C prähybridisiert. Die Deckgläschen wurden in 2 x SSC abgespült und die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (je 1 min in 65 % (V/V), 85 % (V/V), 95 % (V/V) und 100 % (V/V) Ethanol) entwässert und anschließend luftgetrocknet. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der markierten RNA-Proben, die über Nacht bei -80 °C gefällt worden waren (s. 3.2.12.1). Die gewaschenen, luftgetrockneten RNA-Pellets wurde in einem entsprechenden Volumen 50 % Formamid und 20 mM DTT gelöst, um eine Aktivität der markierten RNAs von *ca.* 400.000 cpm/µl zu erhalten, 10 min bei 80 °C denaturiert, auf Eis überführt und mit 4 Volumen Hybridisierungslösung verdünnt. Pro Schnitt wurden *ca.* 15 µl RNA-Probe aufgetragen. Die Schnitte wurden anschließend mit silikonisierten Deckgläschen abgedeckt und die Deckgläschen mit Fixogum™ fixiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 54 °C in einer Wasserdampfgesättigten Atmosphäre (feuchte Kammer), um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern. Am nächsten Tag wurde das Fixogum™ abgezogen und die Deckgläschen in 54 °C

warmer Waschlösung abgelöst. Danach folgten für die Schnitte mehrere Waschschritte in Küvetten im Wasserbad: zweimal je 1 h in Waschlösung bei 54 °C, nach kurzer Spülung in TEN-Puffer 15 min bei 37 °C in TEN-Puffer mit einer Spatelspitze DTT, 30 min bei 37 °C in TEN-Puffer mit DTT und 40 µg/ml RNase A (Sigma, Deisenhofen) und 15 min bei 37 °C in TEN-Puffer mit DTT. Anschließend wurden die Schnitte jeweils 30 min bei 37 °C mit 2 x SSC und 0.1 x SSC gespült, wobei die Lösungen 4- bis 5-mal gewechselt wurden. Über eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2 min in 65 % (V/V), 85 % (V/V), 95 % (V/V) und 100 % (V/V) Ethanol mit jeweils 300 mM Ammoniumacetat) wurden die Präparate entwässert und luftgetrocknet. Die getrockneten Präparate wurden zusammen mit einem Röntgenfilm für 3 Tage in einer Filmkassette exponiert. Danach wurden die Präparate mit Photoemulsion beschichtet, nach drei Wochen entwickelt, mit Giemsa gefärbt und mit einem Videodokumentationssystem ausgewertet.

Prähybridisierungslösung: 50 % (V/V) deionisiertes Formamid, 300 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 6.8, 10 mM Na_2HPO_4 pH 6.8, 5 mM EDTA, 0.02 % (V/V) Denhardts Reagenz, 10 % (V/V) Dextransulfat, 0.5 mg/ml *E. coli* RNA, 20 mM DTT, 0.2 µM UTP[S], 0.5 % (V/V) Triton X-100

2 x SSC: 300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat pH 7.0

Hybridisierungslösung: Prähybridisierungslösung ohne *E. coli* RNA

Waschlösung: 50 % (V/V) deionisiertes Formamid, 300 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 6.8, 10 mM Na_2HPO_4 pH 6.8, 5 mM EDTA, 0.02 % (V/V) Denhardts Reagenz, 10 mM DTT

TEN-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 7.4, 300 mM NaCl

3.2.13 cDNA-Synthese

Nach der Anbindung von *antisense*-Oligo(dT)-Nukleotiden an Gesamt- oder mRNA können mit Hilfe der reversen Transkriptase komplementäre einzelsträngige cDNA-Stränge synthetisiert werden. Die Herstellung der cDNA erfolgte mit dem SuperScript™ cDNA-Synthese-Kit (Life Technologies) nach Herstellerangaben.Um eine eventuelle Kontamination der cDNA mit genomischer DNA zu vermeiden, wurden zunächst 2 µg Gesamt-RNA oder 0.5 µg poly$(A)^+$-RNA mit DNase I (Life Technologies) behandelt.

DNase I-Verdau:	1 µl	10 x DNAse I-Puffer
	x µl	RNA
	1 µl	DNase I (*amplification grade*, 1 U/µl)
	ad 10 µl mit ddH_2O	

Nach mindestens 1 h Inkubation bei RT wurde 1 µl 25 mM EDTA zugesetzt und das Enzym für 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurden 1 µl (0.5 µg/µl) Oligo$(dT)_{12\text{-}18}$-Nukleotide und 3 µl ddH_2O zugesetzt. Durch eine Inkubation für 10 min bei 70 °C konnten Sekundärstrukturen der einzelsträngigen RNA-Moleküle aufgelöst werden, da diese die Oligonukleotidanbindung (*annealing*) behindern würden. Danach wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert, um die Oligo$(dT)_{12\text{-}18}$-Nukleotide an die poly(A)-Enden der mRNAs zu binden. Auf Eis wurden nun die für die eigentliche cDNA-Synthese benötigten Substanzen zugegeben.

Ansatz cDNA-Synthese:	15 µl	*annealing*-Ansatz
	2.5 µl	10 x PCR-Puffer
	2.5 µl	100 mM DTT
	1 µl	10 mM dNTP-Mix
	3 µl	25 mM $MgCl_2$

Nach 5 min Präinkubation bei 42 °C wurde 1 µl (200 U) reverse Transkriptase (SUPERSCRIPT II RT) hinzupipettiert und der Ansatz für 50 min bei 42 °C inkubiert. Nach 15 min Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die RNA durch Zusatz von 1 µl *E. coli* RNase H (2 U/µl) für 10 min bei 55 °C abgebaut. Die Qualität der cDNA wurde durch eine Standard-PCR mit GAPDH-spezifischen Oligonukleotiden kontrolliert. Das GAPDH-Gen wird konstitutiv in allen Geweben exprimiert.

3.2.14 Polymerasekettenreaktion

Mit der *polymerase chain reaction* (PCR) kann enzymatisch *in vitro* ein bestimmter DNA- oder cDNA-Bereich mit Hilfe zweier Oligonukleotide (*primer*) vervielfältigt werden, die den zu amplifizierenden Bereich in 5´→3´-Richtung begrenzen. Das Grundprinzip basiert auf sich wiederholenden Zyklen der DNA-Doppelstrangdenaturierung (*denaturation*), der

Anbindung beider Oligonukleotide an ihre jeweilige Matrize (*annealing*) und der Verlängerung der Komplementärstränge an der entsprechenden Matrize (*primer extension*) durch eine thermostabile DNA-Polymerase entweder aus dem thermophilen Archaebakterium *Thermus aquaticus* (Mullis und Faloona 1987, Saiki *et al.* 1988) oder anderen thermophilen Bakterien. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die PCR-Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus cDNA und genomischer DNA sowie für nichtradioaktives *cycle sequencing* in einem DNA-Sequenzer angewendet. PCR-Experimente mit einzelsträngiger cDNA als Matrize werden als RT-PCR (reverse Transkriptase-PCR) bezeichnet. Alle PCR-Versuche wurden in einem *thermocycler* (Perkin-Elmer 480) durchgeführt.

3.2.14.1 Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von etwa 300 bis 2000 bp angewendet.

Standard-PCR-Ansatz:	5 µl	10 x *Taq*-Puffer
	1 µl	10 µM Oligonukleotid 1
	1 µl	10 µM Oligonukleotid 2
	1 µl	10 mM dNTP-Mix
	x µl	Matrizen-DNA
	0.3 µl	*Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)
	ad 50 µl mit ddH_2O	

Die Konzentration jedes Oligonukleotids im PCR-Ansatz beträgt 0.2 µM. Um Verdunsten während der einzelnen Temperaturzyklen zu vermeiden, wurden alle PCR-Ansätze vor der Zugabe des Enzyms mit je 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Die *Taq*-DNA-Polymerase wurde bei Erreichen der *annealing*-Temperatur im ersten Zyklus oder bereits vor Beginn des Programms hinzupipettiert (*hot start*). Die *annealing*-Temperatur lässt sich anhand der Oligonukleotid-Sequenzen berechnen: Jedem A- und T-Nukleotid entsprechen 2 °C, jedem G- und C-Nukleotid 4 °C (Nelson und Brutlag, 1979).

PCR-Standardprogramm:

	Denaturierung	*annealing*	Extension
Start	94 °C, 3 min		
Zyklen 1-30	94 °C, 1 min	x °C, 2 min	72 °C, 2 min
Ende			72 °C, 10 min; dann 4 °C

Vor dem Zyklusprogramm wurden alle Matrizenstränge vollständig denaturiert (Start); die Schlußextension (Ende) diente dazu, unvollständig synthetisierte Stränge aufzufüllen. Nach Beendigung der PCR wurde ein 10 µl-Aliquot des PCR-Ansatzes auf ein 1 % (m/V) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Beleuchtung analysiert.

3.2.14.2 *Long range*-PCR

Zur Amplifikation langer Fragmente aus genomischer DNA wurden *long range*-PCR-Experimente mit dem TaKaRa LA PCR Kit Version 2 (Bioproducts, Heidelberg) durchgeführt. Die in diesem Kit vorhandene Enzymkombination besitzt im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase *proof reading*- (d. h. 3´→5´-Exonuklease-) Aktivität, die die Fehleinbaurate von Nukleotiden in die neusynthetisierten Stränge reduziert. Die genomische DNA aus embryonalen Stammzellen der Maus (129/SvJ) wurde freundlicherweise von Frau Dr. Claudia Geerkens aus der Abteilung Medizinische Genetik der Universität Ulm zur Verfügung gestellt. Als Oligonukleotid-Paare wurden entweder A1 (*sense*) und gen1 (*antisense*) oder gen8 (*sense*) und gen9 (*antisense*) eingesetzt.

Long range-PCR-Ansatz:

5 µl	10 x LA PCR-Puffer II (Mg^{2+}-frei)
1 µl	10 µM Oligonukleotid 1
1 µl	10 µM Oligonukleotid 2
8 µl	dNTP-Mix (je 2.5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
x µl	Matrizen-DNA (1 µg genomische DNA)
0.5 µl	TaKaRa LA *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl	mit ddH_2O

Long range-PCR-Programm:

	Denaturierung	*Annealing*	Extension
Start	94 °C, 3 min		
Zyklen 1-30	94 °C, 30 s	60 od. 63 °C, 1 min	72 °C, 15 min
Ende			72 °C, 10 min; dann 4 °C

Für das Oligonukleotid-Paar A1/gen1 wurde eine *Annealing*-Temperatur von 60 °C, für das Oligonukleotid-Paar gen8/gen9 63 °C verwendet. Alle folgenden Schritte wurden analog zu 3.2.14.1 durchgeführt.

3.2.15 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) wurde freundlicherweise von Frau Dr. Christa Dixkens aus der Abteilung Medizinische Genetik der Universität Ulm durchgeführt. Neugeborene WMP/WMP-Mäuse, die neun leicht identifizierbare Chromosomenpaare mit Robertsonschen Translokationen besitzen (Said *et al*., 1986), wurden mit dem murinen Moloney Leukämie-Virus injiziert. Aus den sich entwickelnden Tumorzellen wurde eine stabile WMP-1-Zelllinie etabliert (Zörnig *et al*., 1995). Aus dieser Zelllinie wurden Metaphasenchromosomen präpariert und mit biotinylierten Sonden hybridisiert (Lichter *et al*., 1988). Um die Sonden herzustellen, wurden die in pBluescript™ II SK(-) subklonierten, rekombinanten DNA-Fragmente, die zusammen für die Nukleotide 3870 bis 14402 der genomischen mGRK6-Sequenz kodieren, durch Nick-Translation mit Biotin-16-dUTP markiert. Die Detektion der Hybride erfolgte über Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-markiertes Avidin. Die Chromosomen wurden mit 4´, 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht. Mit Hilfe einer CCD-Kamera wurden die DAPI- und FITC-Färbungen der Metaphasenchromosomen getrennt aufgenommen und die Bilder anschließend unter Verwendung der CytoVision-Software (Applied Imaging, Pittsburg, PA) bearbeitet.

3.2.16 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Die rekombinante DNA eines Plasmids kann je nach Bedarf von beiden Seiten der *multiple cloning site* mit zwei vektorspezifischen Oligonukleotiden

ansequenziert werden, das eine Oligonukleotid bindet komplementär zum *sense*-Strang, das andere zum *antisense*-Strang des Vektors. Ausgehend von den damit erhaltenen Sequenzen der 5´- und 3´-Regionen der rekombinanten DNA können *insert*-spezifische *primer* synthetisiert werden, mit deren Hilfe Sequenzen weiter stromabwärts (*downstream*) vom Startkodon bzw. stromaufwärts (*upstream*) vom Stopkodon ermittelt werden können. Diese als *primer-walking* bezeichnete Methode wurde zur Analyse der genomischen Sequenz angewandt. Pro Sequenzieransatz wird ein Oligonukleotid eingesetzt, damit eine unidirektionale Strangsynthese mit einem definierten Startpunkt erfolgen kann. Vom 3´-OH-Ende des gebundenen Oligonukleotids aus beginnend wird ein zur Matrize komplementärer Strang unter Verwendung der vier 2´-Desoxynukleotide (dNTPs) synthetisiert. Parallel dazu erfolgt der Einbau von 2´, 3´-Didesoxynukleotiden (ddNTPs) und damit der rein statistische Strangabbruch, da bei den ddNTPs die für die Elongation nötige 3´-OH-Gruppe fehlt. Somit entstehen unterschiedlich lange radioaktiv- oder fluoreszenzfarbstoffmarkierte DNA-Stücke, die in einem Harnstoff/Polyacrylamidgel aufgetrennt, per Autoradiographie sichtbar gemacht und Base für Base abgelesen bzw. auf einem automatischen Sequenzer analysiert werden können.

3.2.16.1 Radioaktiv markierte DNA-Sequenzierungen

Alle radioaktiv markierten Sequenzierreaktionen wurden mit dem Sequenase® Version 2.0 Sequencing Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA wurde unter alkalischen Bedingungen denaturiert. Dazu wurden in einem 20 µl Ansatz 7 µl (1-2 µg) doppelsträngige DNA mit 4 µl 2 M NaOH versetzt, gut gemischt, und nach 10minütiger Inkubation bei RT wurden zur Fällung der DNA 6 µl 3 M Natriumacetat pH 5.0, 14 µl ddH_2O und 250 µl 100 % Ethanol zugegeben. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20 °C. Das gewaschene und getrocknete DNA-Pellet wurde für die *annealing*-Reaktion in 6 µl ddH_2O, 2 µl *annealing*-Puffer und 2 µl Sequenzier-*primer* (1 pmol/µl) aufgenommen, 3 min bei 94 °C inkubiert und sofort auf Eis überführt.

Labeling-Reaktion:	10 µl	DNA-*primer*-Mix
	1 µl	100 mM DTT
	2 µl	*labeling*-Mix (1:5 Verdünnung in ddH_2O)
	0.5 µl	[α-^{35}S]dATP (*ca.* 37 TBq/mmol)
	2 µl	Sequenase Enzym (1.5 U/µl)

Die Reaktion wurde für 5 min bei RT inkubiert; dabei wurde radioaktiv markiertes dATP in die neu synthetisierten Stränge eingebaut.

Sequenzierreaktion:
In vier vorbereitete Eppendorf-Gefäße wurden je 2.5 µl eines der vier ddNTPs vorgelegt. Dazu wurden jeweils 3.5 µl des *labeling*-Ansatzes pipettiert und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Sequenzierreaktion wurde durch Zugabe von je 4.5 µl Stoplösung beendet.

Auftrennung der DNA-Nukleotide auf Polyacrylamidgelen
Es wurden 6% (m/V) Polyacrylamidgele verwendet, die mit der LongRanger™-Gellösung (Biozym, Oldendorf) hergestellt wurden. Die Glasplatten (20 x 60 cm) und Abstandhalter (0.35 mm Dicke) wurden gründlich mit 96 % Ethanol entfettet. Die Antihaft-Platte wurde mit 5 ml *repel silane*, die Haft-Platte mit 5 ml *bind silane*-Lösung bestrichen. Nach 15 min wurden die Glasplatten nochmals mit 96 % Ethanol abgewischt und, durch die Abstandhalter getrennt, zusammengeklammert.

Gellösung:	29.4 g	Harnstoff (bei 50 °C in 50 ml ddH_2O gelöst)
	4.2 ml	10x TBE
	8.4 ml	LongRanger™-Gellösung
	ad 70 ml mit ddH_2O	

Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde die Gellösung für 5 min entgast. Durch Zugabe von 35 µl TEMED und 350 µl 10 % (m/V) APS wurde die Polymerisation des Gels gestartet.

Die Gellösung wurde zwischen die Platten gegossen und der Haifischzahnkamm mit der glatten Seite in die flüssige Gellösung gesteckt und mit zwei Klammern fixiert. Nach Po-

lymerisation des Gels wurde der Kamm umgedreht und mit den Haifischzähnen in das Gel gesteckt. Nach einem Vorlauf des Gels von 30 min bei 40 W mit 0.6 x TBE-Puffer wurden je 4 µl der für 5 min bei 94 °C denaturierten Sequenzierreaktionsansätze aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 0.6 x TBE-Puffer bei 40 W/2500 V durchgeführt. Je nach benötigter Leseweite wurde der Lauf gestoppt, wobei Farbstoffe als Größenstandard dienten. In einem 6 % (m/V) Polyacrylamidgel migrieren Bromphenolblau und Xylencyanol bei 20 bp bzw. 138 bp. Zur Entfernung des Harnstoffs wurde das auf der Gelplatte haftende Gel für 15 min in 10 % Essigsäure fixiert und danach für 15 min in 15 % Methanol entwässert. Anschließend wurde das Gel für 2 h bei 80 °C getrocknet und ein Röntgenfilm über Nacht exponiert.

10x TBE-Puffer:	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH 8.0
***bind-silane*-Lösung:**	5 ml 100 % Ethanol/10 % (V/V) Essigsäure (4 VT/1 VT), 30 µl *bind-silane*

3.2.16.2 Automatisierte, nichtradioaktive DNA-Sequenzanalyse

Dieses Sequenzierverfahren besteht aus einer Kombination von linearer (*single primer*) PCR und der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). Bei der *dye terminator*-Methode sind die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach der Elongation der Oligonukleotide durch PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase (*cycle sequencing*) wurde die DNA gefällt, in Ladepuffer gelöst und nach der Denaturierung auf die Gelmatrix aufgetragen. Durch Laserabtastung der mit Farbstoff markierten DNA-Fragmente während der Kapillargelelektrophorese im Sequenzer wurde die DNA-Sequenz ermittelt.

Standardansatz:	4 µl	Big*Dye™ Terminator Ready Reaction Mix*
	1 µl	dsDNA-Plasmid (200-400 ng)
	2.5 µl	Sequenzier-*primer* (2 pmol/µl)
	ad 10 µl mit ddH_2O	

Cycle sequencing-Programm:

	Denaturierung	*Annealing*	Extension
Start	96 °C, 1 min		
Zyklen 1-25	96 °C, 30 s	51 °C, 20 s	60 °C, 4 min
Ende			60 °C, 5 min; dann 4 °C

Nach Beendigung der PCR wurden 90 µl ddH_2O zugegeben, die DNA für 10 min bei 4 °C mit 2,5 Volumen 100 % Ethanol gefällt und für 20 min bei Raumtemperatur und 15.800 *g* zentrifugiert. Das DNA-Pellet des Sequenzieransatzes wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in der *speed vac* getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 11 µl *Template Suppression Reagent* (ABI) gelöst, für 2 min bei 90 °C denaturiert, auf Eis inkubiert und in den Probenwechsler des Sequenzers gestellt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillargelelektrophorese (POP6 Rapid Polymer, ABI) mit 1 x *Genetic Analysis Buffer* (ABI) für 36 min bei 50 °C und 15 kV.

3.2.17 Autoradiographie

Autoradiographie ist der indirekte Nachweis radioaktiver Substanzen durch Exposition von Röntgenfilmen. Der Röntgenfilm wird v. a. von β- und γ-Strahlen geschwärzt, wobei die Schwärzung von der Intensität der Strahlung und der Expositionszeit abhängig ist. Dieser Effekt kann durch Verwendung von Verstärkerfolien gesteigert werden, da diese Folien auf ihrer Oberfläche phosphoreszierende Stoffe enthalten, die radioaktive Strahlung in Licht umwandeln. Da Röntgenfilme gegenüber Licht empfindlicher sind als gegenüber radioaktiver Strahlung, kommt es zu einer Empfindlichkeitssteigerung des Nachweises. Eine Exposition bei -80 °C erhöht die Empfindlichkeit des Röntgenfilmes zusätzlich.

Die Röntgenfilme wurden manuell wie folgt entwickelt:

2-3 min Polymax RT Entwickler-Lösung

Waschen mit H_2O

1-3 min Polymax RT Fixierlösung

Danach wurde der Film mit ddH_2O gewaschen und luftgetrocknet.

3.2.18 *Northern blot*

Die *Northern blot*-Experimente erfolgten in Anlehnung an die Protokolle von Lehrach *et al.* (1977) und Sambrook *et al.* (1989). Um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden, wurde die Poly(A)$^+$-RNA in einem denaturierenden Formaldehyd-1 % (m/V) Agarosegel aufgetrennt.

Gelzusammensetzung:	0.8 g	Agarose
	8 ml	10 x MEN
	57,6 ml	ddH_2O

Nach dem Aufkochen wurde die Gellösung auf 68 °C im Wasserbad abgekühlt, bevor 14 ml Formaldehyd zu der Lösung gegeben wurden. Die RNA-Proben und der RNA-Marker wurden für die Auftrennung wie folgt behandelt: Je 2 µg poly(A)$^+$-RNA bzw 4 µl RNA-Marker (1 µg/µl) wurden in der *speed vac* eingeengt, in 10 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen, 20 min bei 68 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Nach Zugabe von 4 µl RNA-Ladepuffer wurden die Proben bei 45 V in 1 x MEN-Puffer für 4-5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel zweimal 20 min in 20 x SSC-Lösung geschwenkt, um das Formaldehyd abzudampfen. Die mRNA wurde dann über Nacht auf eine Nylonmembran (Biodyne B) transferiert. Der Kapillarblot erfolgte nach dem von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Aufbau der Blotapparatur mit 20 x SSC. Die RNA wurde am nächsten Tag mittels UV *crosslinking* auf der Membran fixiert. Dabei wurde die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (λ = 254 nm) mit der Membran kovalent quervernetzt (UV-Stratalinker™ 1800). Nach dem Transfer wurde der RNA-Markerstreifen abgeschnitten, 15 min in 5 % (V/V) Essigsäure geschwenkt und für 10 min mit 0,25 % (m/V) Methylenblau in 0.5 M Natriumacetat pH 5.2 gefärbt und luftgetrocknet. Durch Anlegen des Markerstreifens wurde die Größe der RNA auf dem Röntgenfilm des *Northern blots* bestimmt.

Bpb-Lösung: 5 mg Bromphenolblau in 10 ml 25 mM Tris/HCl (pH 7.5)

10 x MEN: 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat (pH 7.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

RNA-Ladepuffer: 700 µl 1 x MEN, 300 µl Glycerin, 50 µl Bpb-Lösung

RNA-Probenpuffer: 500 µl Formamid, 222 µl ddH_2O, 178 µl 32 % (m/V) Formaldehyd, 100 µl 10 x MEN

3.2.19 *In vitro*-Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung mit dem *Random Primed DNA Labeling Kit* (Boehringer Mannheim) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip der *random primed* DNA-Markierung nach Feinberg und Vogelstein (1983) beruht auf der Hybridisierung einer Mischung von Hexanukleotiden beliebiger Sequenz an die Matrizen-DNA. Die Hexanukleotide dienen als *primer* für das Klenow-Fragment, das in Anwesenheit aller vier dNTPs, von denen eines radioaktiv markiert ist ([α-^{32}P]dCTP), radioaktiv markierte Komplementärstränge synthetisiert. Zur Herstellung einer DNA-Sonde wurden 2 µg rekombinante Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten, um die einklonierte cDNA (*insert*) zu isolieren. Dieser RE-Ansatz wurde auf ein 1 % (m/V) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die rekombinante DNA wurde aus dem Gel mittels eines Skalpells unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten und aus dem Gelstück extrahiert.

Standardansatz:	x µl	DNA-Matrize (50-100 ng)
	3 µl	0.5 mM dNTP-Mix (dATP, dGTP, dTTP)
	2 µl	10 x Hexanukleotid-Mix
	ad 20 µl mit ddH_2O	

Nach der DNA-Denaturierung für 5 min bei 100 °C wurde der Ansatz für 3 min auf Eis gestellt, mit 3 µl [α-^{32}P]dCTP (10 µCi/µl bzw. 3000 Ci/mmol) sowie 2 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) versetzt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die DNA-Synthese mit 5 µl Bpb-Lösung und 250 µl TE-Puffer gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide, Hexanukleotide und kurze DNA-Fragmente wurden durch Gelfiltration in einer Sephadex G-50-Säule mit 1 ml Säulenvolumen durch Zentrifugation für 90 s bei RT und 200 *g* abgetrennt. Aufgrund ihres großen Molekulargewichtes können die längeren DNA-Stränge nicht in die Poren der Gelmatrix eindringen und eluieren deshalb mit dem Ausschlussvolumen der Säule. Das Eluat mit der radioaktiv markierten Sonde wurde 5 min bei 100 °C denaturiert und sofort in die Hybridisierungsröhre pipettiert, in der sich bereits 10 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung (s. 3.2.20) und der zu hybridisierende Filter befanden.

Bpb-Lösung: 5 mg Bromphenolblau in 10 ml 25 mM Tris/HCl (pH 7.5)

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0)

3.2.20 Hybridisierung

Die Hybridisierung von Nylonmembranen wurde mit geringfügigen Abwandlungen nach der von Chruch und Gilbert (1984) beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurde die Membran zunächst für 2-5 h bei 65 °C im Schüttelbad in einer entsprechenden Menge Prähybridisierungslösung (2 ml/cm^2 Membran) prähybridisiert, um unspezifische Bindungen der markierten DNA-Sonde an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Membran in eine vorgewärmte Hybridisierungsröhre mit 10 ml Prähybridisierungslösung transferiert, die markierte DNA-Sonde (s. 3.2.19) hinzu gegeben und im Rotationsofen (Biometra) über Nacht bei 60 °C hybridisiert. Am folgenden Tag wurde die Membran durch mehrere Waschschritte bei zunehmender Stringenz und Waschtemperatur unter Monitorkontrolle solange gewaschen, bis alle unspezifischen Bindungen der Sonde beseitigt waren. Die Waschlösungen bestanden aus 5 x und 2 x SSC mit jeweils 0,1 % (m/V) SDS, die Waschtemperatur betrug 64 °C. Die Spezifität, mit der die Sonde an die RNA bindet, nimmt mit steigender Temperatur und sinkender Na^+-Ionenkonzentration zu (Sambrook *et al.*, 1989). Die Identifizierung von Hybridisierungssignalen erfolgte unter Verwendung eines Phosphorimagers (Molecular Dynamics) oder über Röntgenfilme.

Hybridisierungslösung: 0,125 M NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 pH 7.2, 1 mM EDTA pH 8.0, 7 % (m/V) SDS, 1 % (m/V) BSA

20 x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat pH 7.0

3.2.21 *Single nucleotide primer extension*

Mit *single nucleotide primer extension* (SNuPE)-Experimenten können allelische Varianten eines Gens auf DNA- und RNA-Ebene nachgewiesen werden (Singer-Sam und Riggs, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde die *single nucleotide primer extension* so modifiziert, dass *splice*-Varianten der murinen GRK6 auf cDNA-Ebene nachgewiesen werden konnten. Zuerst wurden durch RT-PCR cDNA-Fragmente der mGRK6 *splice*-Varianten aus verschiedenen Mausgeweben amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 % (m/V) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarosegel extrahiert und als Matrizen in SNuPE-Experimente eingesetzt. Die für jeweils zwei *splice*-Varianten mGRK6-A/B und mGRK6-C/D spezifischen SNuPE-*primer* waren so konstruiert, dass sie

an die letzten noch identischen Basen der cDNA-Fragmente der zu unterscheidenden *splice*-Varianten mGRK6-A und -B bzw. mGRK6-C und -D binden konnten. Durch die *Taq*-DNA-Polymerase wurde in dem folgenden PCR-Zyklus das jeder Variante entsprechende, radioaktiv markierte Nukleotid eingebaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Harnstoff/Polyacrylamidgel erfolgte der Nachweis der radioaktiv markierten Oligonukleotide durch Autoradiographie des Gels.

3.2.21.1 Herstellung von Matrizen für SNuPE-Experimente

Die Gesamt-RNA wurde mittels TRIzol™-Reagenz aus Thymus, Knochenmark, peripheren und mesenteriellen Lymphknoten (pLN und mLN), Milz, Lunge, Leber und Niere der Maus isoliert (s. 3.2.11.1). Nach DNase I-Behandlung von je 5 µg Gesamt-RNA und anschließendem *annealing* von Oligo(dT)$_{12\text{-}18}$-Nukleotiden wurden einzelsträngige cDNAs synthetisiert (s. 3.2.13). Je 2 µl-Aliquots wurden als Matrizen für die RT-PCR (36 Zyklen: 1 min 94 °C, 2 min 52 oder 66 °C, 2 min 72 °C gefolgt von 10 min 72 °C) mit den Oligonukleotiden A1 (*sense*) und P3a (*antisense*) als *primer* für mGRK6-A/B bzw. A1 (*sense*) und P3b (*antisense*) als *primer* für mGRK6-C/D eingesetzt. Jeweils 13 µl der RT-PCR-Ansätze wurden parallel mit einem DNA-Größenstandard bekannter Konzentration in die Taschen eines 1 % (m/V) Agarosegel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten, extrahiert und je 20 ng als Matrizen für SNuPE-Experimente eingesetzt.

3.2.21.2 SNuPE-Experimente

Für jedes Gewebe wurden zwei SNuPE-Reaktionen, und für jede SNuPE-Reaktion wurden zwei Ansätze benötigt: Neben jeweils 20 ng mGRK6-cDNA-Fragmenten als Matrize und dem Reaktionsgemisch enthielten die zwei Ansätze der ersten SNuPE-Reaktion im Falle von mGRK6-A/B [α-^{32}P]dGTP oder [α-^{32}P]dATP, um die relative Häufigkeit der *splice*-Varianten mGRK6-A versus mGRK6-B zu ermitteln. Die zweite SNuPE-Reaktion für mGRK6-C/D enthielt in den beiden Ansätzen neben Matrize und Reaktionsgemisch [α-^{32}P]dTTP oder [α-^{32}P]dGTP, um das Vorkommen der *splice*-Varianten mGRK6-C und mGRK6-D zu untersuchen.

Reaktionsgemisch:	10 µl	10 x *Taq*-Puffer (Perkin-Elmer)
(10 Ansätze)	2 µl	*Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl, Sigma)
	10 µl	20 µM SNuPE-*primer*
	2 µl	[α-^{32}P]dATP, [α-^{32}P]dGTP oder [α-^{32}P]dTTP (3000 Ci/mmol)

Pro Ansatz wurden 2.4 µl des Reaktionsgemisches eingesetzt und mit jeweils 20 ng mGRK6-cDNA-Fragmenten aus verschiedenen Geweben der Maus und einem entsprechenden Volumen ddH_2O auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte die *primer extension* im *thermocycler*.

PCR-Programm für SNuPE:

Zyklus	Denaturierung	*Annealing*	Extension
1	94 °C, 1 min	62 °C, 2 min	72 °C, 2 min

Nach Ablauf dieser Amplifikationsrunde wurden die Ansätze mit je 10 µl Sequenzgelladepuffer versetzt, für 2 min bei 94 °C denaturiert und bis zum Auftrag auf das Gel auf Eis gestellt. Die Proben wurden auf einem denaturierenden 7 M Harnstoff-15 % (m/V) Polyacrylamidgel elektrophoretisch bei konstanter Stromstärke (I = 35 mA) in 1 x TBE in einer Vertikalgelelektrophoreseapparatur (MBT) aufgetrennt. Das verwendete Gel hatte eine Größe von 14 cm x 12 cm x 0,1 cm und wurde analog zu 3.2.16.1 hergestellt, jedoch ohne Silanisierung der Glasplatten. Nach dem Ablösen wurde das Gel in Frischhaltefolie eingeschlagen und autoradiographisch ausgewertet.

7 M Harnstoff-15 % (m/V) Polyacrylamidgellösung:

15 ml LongRanger™ Sequenziergelkonzentrat, 4 ml 10 x TBE, 17.4 g Harnstoff, ddH_2O ad 40 ml. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 250 µl 10 % (m/V) APS und 25 µl TEMED.

3.3 Eukaryontische Zellkultur

3.3.1 Insektenzellkultur

3.3.1.1 Medien

Für die Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* (*Sf*9)- und *Trichoplusia ni* (H5)-Zellen wurden Medien verwendet, die von den Firmen Biowhittaker Bioproducts, Heidelberg und Sigma, Deisenhofen bezogen wurden. Dem Medium mussten teilweise noch FCS und Antibiotika zugesetzt werden.

Medium für adhärente *Sf*9-Zellkultur

500 ml TNM-FH-Insect-Medium
50 ml fötales Kälberserum (steril filtriert)
500 µl Gentamicin (50 mg/ml)

Medium für adhärente H5-Zellkultur

500 ml Insect-Xpress
500 µl Gentamicin (50 mg/ml)

Medium für Suspensionskultur

Grace's Insect Medium (enthält bereits 10 % FCS und Gentamicin) für *Sf*9-Zellen oder Insect-Xpress mit 50 µg/ml Gentamicin für H5-Zellen versetzt mit
- 2 ml Pluronic F-68® (10 % m/V) auf 100 ml Medium
- 1 ml Fungizone® (250 µg/ml) auf 100 ml Medium

3.3.1.2 Kultivierung von Insektenzellen

Für die adhärente Kultur wurden *Spodoptera frugiperda* (*Sf*9)-Zellen in 15 ml TNM-FH-Medium bei 27 °C in 75 cm^2-Kulturflaschen (Renner, Dannstadt) kultiviert. Wenn die Zellen konfluent gewachsen waren (*ca.* 2 x 10^7 Zellen/Flasche), wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen vom Boden der Kulturflaschen mit frischem Medium abgespült, 1:3 verdünnt und in neue Kulturflaschen überführt. *Trichoplusia ni* (H5)-Zellen wurden in Insect-Xpress mit Gentamicin gehalten und analog den *Sf*9-Zellen kultiviert. Für die Suspen-

sionskultur wurde von 7-10 konfluent gewachsenen Kulturschalen mit *Sf*9- bzw. H5-Zellen das Medium abgesaugt, die Zellen mit frischem Medium abgelöst und in einen sterilen Fernbachkolben überführt. Die Zellzahl pro ml wurde durch Auszählen eines mit Trypanblau-Lösung (0.5 % in 0.85 %iger NaCl-Lösung) verdünnten Aliquots mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Sie betrug im günstigsten Fall 2 x 10^6 Zellen/ml (das entspricht 800 x 10^6 Zellen in 400 ml Medium), mindestens jedoch 0.5 x 10^6 und maximal 3.5 x 10^6 Zellen/ml. Die Zellen wurden bei Bedarf durch Zugabe von neuem Medium verdünnt. Der Fernbachkolben wurde bei 27 °C mit 80 Upm geschüttelt. Die Generationszeit der Zellen betrug unter diesen Umständen ungefähr 36 h.

3.3.2 Säugerzellkultur

3.3.2.1 Medium

Für die Kultivierung von COS-7 (*African green monkey kidney*)-Zellen wurde DMEM (ohne Natriumpyruvat, mit 4.500 mg/l Glucose, mit Pyridoxin HCl) verwendet, das von der Firma Life Technologies, Eggenstein bezogen wurde. Dem Medium wurden 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM Glutamin, je 50 µg/ml Penicillin und Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat und 25 mM HEPES pH 7.2 zugesetzt.

3.3.2.2 Kultivierung von Säugerzellen

Die adhärenten COS-7-Zellen wurden in 10 ml DMEM-Medium bei 37 °C in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre und 10 % CO_2 in 55 cm^2-Kulturschalen (Renner, Dannstadt) kultiviert. Die konfluent gewachsenen Zellen (*ca.* 4 x 10^6 Zellen/Schale) wurden in CMF-PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min im Brutschrank von der Kulturschale abgelöst (trypsiniert). Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt, die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt und die Zellen für 3 min bei 173 x *g* pelletiert. Das Zellpellet wurde in 7 ml frischem Medium resuspendiert und 1 ml Zellsuspension in eine neue Kulturschale ausgesät.

10 x CMF-PBS: 677 mM Tris, 27 mM KCl, 80 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 14.7 mM KH_2PO_4, pH 7.2

Trypsin/EDTA-Lösung: 0.05 %/ 0.02 % (m/V) in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Biochrom KG, Berlin)

3.4 Proteinexpression in Insektenzellen

Für die Expression von Proteinen in Insektenzellen wurde das Baculovirus-Expressionssystem (Pharmingen) verwendet. In diesem eukaryontischen Expressionssystem sind die meisten posttranslationalen Modifikationen der rekombinant exprimierten Proteine wie Acylierungen, Phosphorylierungen und Methylierungen möglich. Bei der Baculovirus-DNA handelt es sich um eine modifizierte Form der DNA des *Autographa californica nuclear polyhedrosis viruses* (AcNPV), die eine letale Deletion enthält. Durch homologe Rekombination mit einem entsprechenden Transfervektor (z.B. pVL1392 oder pVL1393) kann diese Deletion kompensiert werden. Die Baculovirus-Transfervektoren besitzen zudem einen starken Promotor für das viruseigene Polyhedringen, das in der modifizierten Baculovirus-DNA deletiert ist. Nach erfolgreicher Rekombination kontrolliert dieser, der einklonierten cDNA vorgeschaltete, Polyhedrinpromotor die Expression der rekombinanten Proteine.

3.4.1 Transfektion

Die Insektenzellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode nach Graham und van der Eb (1973) transfiziert. Von frisch umgesetzten, zu 60 % konfluent gewachsenen Insektenzellen (*ca.* 4 x 10^6 Zellen pro 25 cm^2-Kulturflasche) wurde nach maximal 30 min das Medium abgesaugt und durch 750 µl frisches Medium für die adhärente Zellkultur ersetzt. Der Transfektionsansatz bestand aus 10 µg rekombinanter Transfervektor-DNA und 0.5 µg Baculogold™ Baculovirus DNA, welche vor der Zugabe von 750 µl Transfektionspuffer für 5 min bei RT inkubiert wurden. Danach wurde der Ansatz gemischt und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Durch die Zugabe von Calciumchlorid zu dem phosphatgepufferten Zellkulturmedium entsteht ein Calciumphosphatpräzipitat mit darin eingeschlossener DNA, das auf die Zellen absinkt und von diesen durch Endozytose aufgenommen wird. Nach Inkubation für 4 h bei 27 °C wurde der Überstand abgenommen und 3 ml frisches Medium zupipettiert. Die Zellen wurden 4 Tage bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium, das die rekombinanten Viren enthielt, abgenommen und bei 4 °C im Dunkeln

aufbewahrt. Vor einer Infektion von Insektenzellen zur Proteinexpression musste der Virustiter durch mindestens zwei Amplifikationen erhöht werden.

Transfektionspuffer: 25 mM HEPES/NaOH pH 7.1, 125 mM NaCl, 125 mM $CaCl_2$

3.4.2 Amplifikation der Baculoviren

Für die Amplifikation der Viren wurden 6.5 x 10^6 Zellen (das entspricht 60 % konfluenten Zellen) in eine 60 cm^2 Petrischale (Renner, Dannstadt) ausgesät. Nach dem Absetzten der Zellen (*ca*. 30 min) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Virusüberstand für 1 h bei 27 °C stehen gelassen. Anschließend wurden 10-13 ml Medium zugegeben und die Zellen für 3 Tage bei 27 °C inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, abgelöste Zellen abzentrifugiert (250 *g*) und der Überstand (Viruslösung) bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.4.3 Infektion von Insektenzellen

Die Infektion erfolgte analog zur Amplifikation. Die Virusmenge sowie die Dauer der Infektion für eine optimale Expression des rekombinanten Proteins wurde anhand der Proteinmenge auf SDS-Polyacrylamidgelen bestimmt. Gleiches galt für das Verhältnis der Virusmengen bei Koinfektionen. Das Volumen der eingesetzten Viruslösungen lag zwischen 0.3 und 1 ml pro Petrischale, die Infektion erfolgte 2 Tage. Um größere Proteinmengen zu produzieren, wurden Suspensionskulturen von Insektenszellen infiziert. Die Zellen (8-10 x 10^8) wurden mit 250 *g* für 5 min abzentrifugiert und in 20 ml Medium und 30 ml Virussuspension in einem sterilen 50 ml-Röhrchen resuspendiert. Nach Inkubation bei 27 °C für 1 h wurden die Zellen in einen sterilen Fernbachkolben überführt und mit 350 ml frischem Medium auf eine Zellzahl von 2 x 10^6 Zellen/ml verdünnt.

3.4.4 Proteinpräparation

Zur Ernte wurden die Zellen von den Kulturschalen oder -flaschen abgespült und in 50 ml Röhrchen bei 250 *g* abzentrifugiert. Ebenso wurde mit Zellen aus den Suspensionskulturen verfahren. Der Überstand konnte als Viruslösung für weitere Infektionen steril abgenom-

men und bei 4 °C dunkel gelagert werden. Die Proteinpräparation von bGRK2 und mGRK6-Varianten wurde im Wesentlichen nach Loudon und Benovic (1994) durchgeführt. Die Zellen wurden einmal mit kaltem CMF-PBS gewaschen, auf Eis überführt und in HE-Puffer, der 250 mM NaCl enthielt resuspendiert (*ca*. 1 ml Puffer pro 2 x 10^7 Zellen). Die Zellsuspension wurde mindestens sechsmal durch eine 0.5 x 23 mm (18 gauge) Kanüle auf- und abgezogen und dadurch homogenisiert. Durch Zentrifugation für 30 min bei 40.000 *g* und 4 °C wurden Zelltrümmer und Zellorganellen abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals für 30 min bei 300.000 *g* und 4 °C zentrifugiert. Bei kleineren Ansätzen aus Kulturflaschen wurde dieser Überstand (lösliche Fraktion) nach der Proteinbestimmung (s. 3.6.2.1) in 50 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Im Falle von Suspensionskulturen wurde von dem Überstand ein Aliquot für Proteinbestimmung, Aktivitätsuntersuchung und SDS-PAGE abgenommen, der weitaus größere Teil (*ca.* 35 ml) wurde für spätere säulenchromatographische Auftrennungen in ein 50 ml Röhrchen überführt, ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die mit Viren für G-Protein gekoppelte Rezeptoren infizierten Insektenzellen wurden nach der Ernte in 600 µl Lysepuffer 1 pro Kulturschale resuspendiert und homogenisiert, indem die Zellsuspension ebenfalls mindestens sechsmal durch eine 0.5 x 23 mm (18 gauge) Kanüle auf- und abgezogen wurde. Zelltrümmer und nicht lysierte Zellen wurden durch Zentrifugation für 45 s bei 2.450 *g* und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und 30 min bei 26.000 *g* und 4 °C zentrifugiert, um die partikuläre Fraktion (Pellet) von der löslichen (Überstand) zu trennen. Der Überstand wurde abgenommen und ebenso wie das in *ca.* 200 µl Lysepuffer1 resuspendierte und aliquotierte Pellet nach erfolgter Proteinbestimmung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

HE-Puffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EDTA pH 7.5, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 20 µg/ml Leupeptin, 200 µg/ml Benzamidin

Lysepuffer 1: 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5, 3 mM Benzamidin, 0.1 mM PMSF, 1 µM Pepstatin, 1 µM Leupeptin, 2 µg/ml Trypsininhibitor aus Sojabohnen, 1 µg/ml Aprotinin, evtl. 3 µM GDP

3.4.5 Reinigung von GST-Fusionsproteinen im *Batch*-Verfahren

Die nach der Proteinpräparation im 300.000 *g*-Überstand enthaltenen GST-Fusionsproteine (0.3 mg Gesamtprotein) wurden für 1 h bei 4 °C an 100 µl Glutathion-Sepharose 4B-Matrix (Amersham Pharmacia) gebunden. Die Abtrennung nicht gebundener Proteine erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 5.000 *g*. Die Fusionsproteine wurde nach zweimaligem Waschen der Matrix in kaltem CMF-PBS (s. 3.3.2.2) mit 10 mM Glutathion in 50 mM Tris/HCl pH 8.0 eluiert. Dazu wurde die Matrix zweimal je 10 min bei RT mit Elutionspuffer inkubiert, anschließend 5 min zentrifugiert und der erhaltene Überstand abpipettiert. Die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine wurden über SDS-PAGE und Immuno*blotting* analysiert.

3.5 Proteinexpression in COS-7-Zellen

3.5.1 Transfektion

Die COS-7-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz SuperFect™ (Qiagen, Hilden) transfiziert. Bei diesem Transfektionsreagenz handelt es sich um hochverzweigte sphärische Moleküle, deren Verzweigungen von einem Zentrum in der Mitte ausgehen und an der Oberfläche mit geladenen Aminogruppen enden. Die zu transfizierende DNA wird in diese Moleküle eingelagert, wobei die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren mit den positiv geladenen Aminogruppen wechselwirken. Dieser Transfektionskomplex wird durch Endozytose aufgenommen. Für die Transfektion von COS-7-Zellen in einer 100 mm Kulturschale (6-*well* Platte) wurden am Vortag 1 x 10^6 Zellen (3 x 10^5 Zellen/*well*) ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden 300 µl (100 µl/*well*) serumfreies DMEM, 10 µg (2 µg/*well*) DNA und 40 µl (10 µl/*well*) SuperFect™ in einem sterilen Reaktionsgefäß 15-20 s mit Hilfe des Vortexers gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 3 ml (600 µl/*well*) Komplettmedium in den Transfektionsansatz gegeben und diese Mischung auf die mit sterilem CMF-PBS gewaschenen Zellen aufgetropft. Die Inkubation der Zellen mit DNA und Transfektionsreagenz erfolgte für 3 h im Brutschrank (37 °C, 10 % CO_2, mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen einmal mit sterilem CMF-PBS gewaschen und nach Zugabe von 10 ml (3

ml/well) frischem DMEM für 48 h im Brutschrank inkubiert. Bei Bedaft erfolgte nach 24 h ein Medienwechsel, um tote Zellen zu entfernen.

3.5.2 Proteinpräparation

Transient mit den verschiedenen mGRK6-Varianten A, B, C und D transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 h nach Transfektion einmal in CMF-PBS gewaschen und in 1 ml kaltem CMF-PBS mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale abgelöst. Die Aufarbeitung der Zellen wurde in Anlehnung an die von Stoffel *et al.* (1998) beschriebene Methode durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 2 min bei 300 *g* und 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde in je 200 µl TE-Puffer (100 µl/*well*) homogenisiert, indem die Zellsuspension sechsmal durch eine 0.5 x 25 mm Kanüle auf- und abgezogen wurde. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation für 2 min bei 300 *g* und 4 °C. Der erhaltene Überstand wurde erneut für 30 min bei 350.000 *g* und 4 °C zentrifugiert und dabei in eine lösliche (Überstand) und eine partikuläre (Pellet) Fraktion separiert. Die lösliche Fraktion wurde vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt und auf Eis bei 4 °C gelagert. Das Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer resuspendiert, indem die Suspension sechsmal durch eine Kanüle (0.5 x 25 mm) auf- und abgezogen wurde. Von dieser partikulären Fraktion wurde ein 50 µl Aliquot abgenommen und ebenfalls auf Eis gelagert. Zu den restlichen 150 µl der partikulären Fraktion wurden 50 µl 4 x Lysepuffer 2 gegeben und dieser Ansatz für 1 h bei 4 °C über Kopf rotiert, um membranständige Proteine zu solubilisieren. Danach erfolgte die Abtrennung unlösliche Partikel durch Zentrifugation für 15 min bei 350.000 *g* und 4 °C. Der Überstand mit den solubilisierten Proteinen wurde abgenommen und wie die anderen Fraktionen bis zur Verwendung bei 4 °C auf Eis gelagert (maximal 6 Tage).

TE-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA pH 7.5, 10 µg/ml Leupeptin, 20 µg/ml Aprotinin, 0.5 mM PMSF

4 x Lysepuffer 2: 400 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 7.5, 6 % Triton X-100

3.5.3 Immunofluoreszenz an transient transfizierten COS-7-Zellen

Die Immunofluoreszenz an transient transfizierten COS-7-Zellen wurde mit kleinen Änderungen nach Pronin *et al.* (1998) durchgeführt. Pro Vertiefung einer 6-*well* Platte wurden 1 x 10^5 Zellen mit je 1 µg mGRK6-A, -B, -C oder -D cDNA, die in den eukaryontischen Expressionsvektor pMT2SM einkloniert war, wie unter 3.5.1 beschrieben transfiziert. Acht Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit je 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung trypsiniert (s. 3.3.2.2), nach Zugabe von 3 ml DMEM abgespült und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml frischem Medium resuspendiert und je 500 µl der Zellsuspension in 12 Vertiefungen einer 24-*well* Platte ausgesät. In jede Vertiefung wurde zuvor ein steriles Glasplättchen mit 12 mm Durchmesser gelegt, auf dem die COS-7-Zellen wachsen sollten. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion zweimal mit CMF-PBS gewaschen und für 30 min mit 4 % (m/V) Paraformaldehyd in CMF-PBS bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit CMF-PBS wurden die Zellen für 10 min mit 0.2 % (V/V) Triton X-100 in CMF-PBS bei RT permeabilisiert und anschließend für 30 min mit 5 % (m/V) Magermilchpulver in PBS/Triton (Blocklösung) bei 37 °C in einer feuchten Kammer abgeblockt. Der in Blocklösung verdünnte erste Antikörper wurde ebenfalls in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 1 h mit den Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS/Triton gewaschen und mit einem zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper unter gleichen Bedingungen für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden fünfmal mit PBS/Triton, einmal mit CMF-PBS und direkt vor dem Eindeckeln mit Elvanol in ddH_2O gespült. Die Objektträger mit den fluoreszenzmarkierten COS-7-Zellen wurden im Dunkeln aufbewahrt.

PBS/Triton: CMF-PBS mit 0.05 % (V/V) Triton X-100

Elvanol: 3 g Elvanol (Polyvinylalkohol) wurden in 40 ml CMF-PBS 16 h gerührt. Danach wurde 15 ml Glycerin zugegeben, weitere 16 h gerührt und die Lösung 15 min bei 11.300 *g* zentrifugiert. Im Überstand wurde 1 mg/ml Phenylendiamin gelöst, der pH-Wert auf 8.0 eingestellt und solange β-Mercaptoethanol zugegeben (*ca*. 100 µl), bis die Lösung klar wurde.

3.6 Proteinbiochemie

3.6.1 Proteinpräparation aus Mausgewebe

Verschiedene Gewebe der Maus (C57BL/6J) wie Lunge, Leber, Herz, Gehirn, Milz, Thymus, periphere und mesenterielle Lymphknoten, Skelettmuskel und Niere wurden je nach Größe in 0.5 bis 3 ml HE-Puffer mit 250 mM NaCl für 45 s auf Eis mit Hilfe des Ultra-Turrax homogenisiert. Zelltrümmer, Zellkerne und Bindegewebe wurden für 45 s mit 2.000 *g* bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde duch Zentrifugation für 30 min mit 26.000 *g* bei 4 °C in eine lösliche (Überstand) und eine partikuläre (Pellet) Fraktion separiert. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wurde das Pellet je nach Größe in 0.1 bis 1 ml HE-Puffer mit 250 mM NaCl resuspendiert, indem die Suspension sechsmal duch eine Kanüle (0.5 x 23 mm) auf- und abgezogen wurde. Überstand und partikuläre Fraktion wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

HE-Puffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EDTA pH 7.5, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 20 µg/ml Leupeptin, 200 µg/ml Benzamidin

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.6.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach der Methode von Bradford (1976) wurden alle Werte durch Doppelbestimmung ermittelt. Zur Erstellung einer Eichgerade wurden 0, 10, 20, 30 und 40 µl (entsprechend 0, 3.4, 6.8, 10.2 und 13.6 µg Protein) einer Proteinstandardlösung (0.34 mg/ml Rinder-IgG) eingesetzt. Von den zu messenden Proben wurden jeweils 30 µl einer geeigneten Verdünnung (bei 300.000 *g*-Überständen eine 1:30-Verdünnung, bei Rezeptorpräparationen eine 1:20-Verdünnung) eingesetzt. Die Proben wurden mit ddH_2O auf 800 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 200 µl Bradfordreagenz gemischt. Die Extinktion wurde bei 595 nm bestimmt und die Proteinkonzentration der Probe durch lineare Regression der Eichgerade mittels eines Basic-Computerprogramms ermittelt.

Bradfordreagenz: 0.04 % (m/V) Coomassie Brilliantblau G 250, 21 % (V/V) Ethanol, 42.5 % (V/V) ortho-Phosphorsäure

Zur Herstellung des Bradfordreagenz wurde ein 1 l-Glasgefäß und ein Magnetrührstab mit 85%iger H_3PO_4 gespült und mit ddH_2O gewaschen. Das Coomassie-Brilliantblau wurde im Glasgefäß in dem entsprechenden Volumen Ethanol gelöst. Nach Zugabe der Phosphorsäure wurde die Lösung für weitere 60 min gerührt, mit ddH_2O auf das Endvolumen aufgefüllt und anschließend über einen Faltenfilter abfiltriert und bei 4 °C gelagert.

3.6.2.2 BCA-Bestimmung der Proteinkonzentration

Die BCA (*Bicinchoninic acid*)-Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eingesetzt, wenn in der Proteinlösung Detergenzien enthalten waren. Detergenzien absorbieren wie Coomassie im Bereich um 595 nm und würden somit das Ergebnis bei der Messung nach Bradford verfälschen. Für die Eichgerade wurden 0, 10, 20, 30 und 40 µl (entsprechend 0, 3.4, 6.8, 10.2 und 13.6 µg Protein) einer Proteinstandardlösung (0.34 mg/ml Rinder-IgG) pipettiert. Die zu messenden Proben wurden unverdünnt eingesetzt (5-10 µl). Die Proben wurden mit ddH_2O auf 50 µl aufgefüllt, nach Zugabe von 1 ml Reagenzlösung gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm bestimmt und die Proteinkonzentration analog zu der Methode nach Bradford ermittelt.

Reagenzlösung: 10 ml BCA-Proteinassay Reagenz A (Pierce), 200 µl 4 % (m/V) $CuSO_4$ x 5 H_2O (Sigma); frisch angesetzt

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurden drei Vertikalapparaturen verwendet: Ein Hoefer-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) mit 16 x 18 cm großen Glasplatten und 1.5 mm dicken Abstandshaltern für große Gele, ein Sigma-System (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) mit 8 x 10 cm großen Glasplatten und 1 mm dicken Abstandshaltern für kleine Gele sowie ein Mini-Protean® II System (BioRad, München) mit 8 x 10 cm großen Glasplatten und 1 mm dicken Abstandshaltern für die Auftrennung radioaktiv markierter Proteine. Zuerst wurde die Trenngellösung zwischen die Glasplatten gegossen.

Trenngellösung:

Prozent (m/V) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	10 %
Monomerlösung	10 ml
Trenngelpuffer	7.5 ml
H_2O	12 ml
10 % (m/V) SDS	0.3 ml
10 % (m/V) APS	150 µl
TEMED	10 µl

Vor der Zugabe von SDS, APS und TEMED wurde die Lösung kurz entgast. Die angegebene Menge von 30 ml war für ein großes Gel oder vier kleine Gele ausreichend. Die Trenngellösung wurde mit H_2O überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Wasser abgekippt, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und der Kamm eingesetzt.

Sammelgellösung:

Prozent (m/V) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	6 %
Monomerlösung	2 ml
Sammelgelpuffer	2.5 ml
H_2O	5.3 ml
10 % (m/V) SDS	100 µl
10 % (m/V) APS	50 µl
TEMED	5 µl

Die angegebene Menge von *ca*. 10 ml war für ein großes Gel oder vier kleine Gele ausreichend. Die Proteinproben sowie die Markerproteinlösung wurden mit gleichen Volumina 2 x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und mit einer 100 µl Hamilton Spritze in die mit 1 x Tankpuffer gespülten Geltaschen geladen. Proteinproben, in denen G-Protein gekoppelte Rezeptoren enthalten waren, durften nicht gekocht werden, da diese Rezeptoren sonst zu hochmolekularen Komplexen aggregieren, die im *Western blot* nicht mehr nachweisbar sind. Die Elektrophorese wurde in 1 x Tankpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 45 mA für ein großes Gel (90 mA bei zwei Gelen) oder bei konstanter Spannung

von 100 V für kleine Gele durchgeführt. Die Auftrennung wurde beendet, wenn der Farbmarker das Ende des Geles erreicht hatte.

Monomerlösung: 30% (m/V)-Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)-Fertiglösung

Trenngelpuffer: 1.5 M Tris/HCl pH 8.8
90.75 g Tris wurden in 400 ml ddH_2O gelöst, der pH mit *ca*. 16 ml konz. HCl auf 8.8 eingestellt, mit ddH_2O auf 500 ml aufgefüllt und die Lösung über einen 0.45 µm Filter filtriert.

Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris/HCl pH 6.8
12 g Tris wurden in 160 ml ddH_2O gelöst, der pH mit *ca*. 9 ml konz. HCl auf 6.8 eingestellt, mit ddH_2O auf 200 ml aufgefüllt und die Lösung über einen 0.45 µm Filter filtriert.

10 x Tankpuffer: 250 mM Tris, 1.9 M Glycin

1 x Tankpuffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0.1% (m/V) SDS pH 8.6

2 x Probenpuffer: 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 4 % (m/V) SDS, 20 % (V/V) Glycerin, 10 % (V/V) β-Mercaptoethanol, 0.002 % (m/V) PyroninY

3.6.4 Färbung von Polyacrylamidgelen

3.6.4.1 Coomassie Blau-Färbung

Nach der Gelelektrophorese wurde das Trenngel in einer Schale mit 200 ml Färbelösung für 30 min bei 60 °C im Schüttelbad inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel in Entfärber überführt und so lange bei 60 °C inkubiert, bis sich die gefärbten Proteinbanden deutlich vom entfärbten Hintergrund abhoben. Nach 30 min wurde die Entfärbelösung gewechselt.

Färbelösung: 0.14 % (m/V) Coomassie Brilliantblau R 250, 50 % (V/V) Methanol, 10 % (V/V) Essigsäure

Entfärber: 10 % (V/V) Methanol, 10 % (V/V) Essigsäure

3.6.4.2 Silberfärbung

Das Trenngel wurde nach der Elektrophorese für 1 h in 200 ml Fixierlösung auf dem Schüttler fixiert. Nach dreimaligem Waschen für je 30 min mit 50 % (V/V) Ethanol wurde das Gel für 2 min in 200 ml $Na_2S_sO_3$-Lösung (100 µg/ml) inkubiert. Das Gel wurde dreimal für je 30 s in ddH_2O gewaschen und anschließend für 40 min in 200 ml 0.1 % (m/V) Silbernitratlösung geschüttelt, dann zweimal für jeweils 20 s mit ddH_2O gewaschen und schließlich in Entwicklerlösung so lange inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren, der Hintergrund sich aber noch nicht einfärbte. Nach einmaligem Waschen mit ddH_2O wurde die Reaktion mit 200 ml 0.01 M EDTA pH 8.0 gestoppt und das Gel darin aufbewahrt.

Fixierlösung: 47.5 % (V/V) Ethanol, 12 % (V/V) Essigsäure, 0.0185 % (V/V) Formaldehyd

Entwicklerlösung: 3 % (m/V) Na_2CO_3, 0.0185 % (V/V) Formaldehyd, 2 µg/ml $Na_2S_sO_3$

3.6.5 Trocknen von gefärbten Gelen

Um Gele für längere Zeit aufbewahren zu können, wurden diese mit dem Easy Breeze-System (Hoefer - Amersham Pharmacia, Freiburg) getrocknet. Hierzu wurden die Gele über Nacht in 5 % (V/V) Glycerin eingelegt, danach luftblasenfrei zwischen zwei, in warmem Leitungswasser vorgequollene Cellulosefolien in einen Rahmen eingespannt und für *ca*. 4 h in dem *Gel Dryer* getrocknet.

3.6.6 Immunoblotting von Proteinen (*Western blot*)

Um Proteine mit spezifisch gegen sie gerichteten Antikörpern nachweisen zu können, musste das Protein bzw. das Proteingemisch zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden anschließend aus dem Gel auf Nitrocellulosemembran transferiert werden.

3.6.6.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel und ein Stück Nitrozellulosemembran (Protran) passender Größe mit Transferpuffer getränkt. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt, das Sandwich zwischen zwei Schaumstoffschwämmen und einer Lage Blotpapier GB002 (Schleicher & Schuell, Dassel) in eine Plastikhalterung eingespannt und in die mit Transferpuffer I gefüllte Immunoblot-Transferkammer überführt. Das Gel war der Kathode, die Membran der Anode zugewandt, sodass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel zur Membran hinwanderten. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 125 mA und einer Leistung von 2 W für 12 h. Die Markerstreifen wurden nach dem Transfer abgetrennt, kurz in ddH_2O gewaschen und die transferierten Markerproteine mit Ponceaurot (0.2 % (m/V)) oder blauer Tinte (0.1 % (V/V) in 0.3 % (V/V) Tween 20-Lösung) gefärbt und anschließend markiert.

Transferpuffer I: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (V/V) Methanol pH 8.6

Für kleine Gele wurde wahlweise eine zweite, wesentlich schnellere Transfermethode in einer Blotkammer von Amersham Pharmacia (Hoefer™ miniVE) eingesetzt. Die eigentliche Blotkammer besteht aus zwei nach aussen abgedichteten Graphitplatten (Anode und Kathode), zwischen denen das Sandwich aus Blotpapier, Gel, Nitrozellulosemembran und Blotpapier mit Hilfe von Schaumstoffschwämmen eingespannt war. Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer II gefüllt, in einen Kühlwassertank gehängt und die Proteine bei konstanter Stromstärke von 400 mA für 1.25 h auf die Membran transferiert.

Transferpuffer II: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (V/V) Methanol, 0.1 % (m/V) SDS, pH 8.6

3.6.6.2 *Semidry*-Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Der *semidry*-Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Sigma, Deisenhofen) wurde in einer Sammy Dry-Apparatur von Schleicher & Schuell, Dassel durchgeführt. Um die PVDF-Membranen zu benetzen, wurden diese in 50 % (V/V) Methanol eingelegt und danach kurz in ddH_2O gespült. Das Sandwich aus Blotpapier, Membran und Gel war, ausgehend von der unteren Graphitplatte (Anode), wie folgt aufgebaut: Zwei Lagen Blotpapier,

die mit Anodenpuffer 1 getränkt waren, drei Lagen Blotpapier in Anodenpuffer 2, PVDF-Membran, für 15 min in Kathodenpuffer equilibriertes Gel und 4 Lagen mit Kathodenpuffer befeuchtetes Blotpapier. Diesem Sandwich lag die obere Graphitplatte (Kathode) auf. Der Transfer erfolgte für 1 h bei konstanter Stromstärke (100 mA pro 6 x 8 cm Gel).

Anodenpuffer 1: 300 mM Tris, 20 % (V/V) Methanol

Anodenpuffer 2: 30 mM Tris, 20 % (V/V) Methanol

Kathodenpuffer: 25 mM Tris, 20 % (V/V) Methanol, 40 mM 6-Aminocapronsäure

3.6.6.3 Immunchemischer Nachweis transferierter Proteine

Die Membran wurde nach dem Transfer für 1 h in Blotto inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu blockieren. Die nachfolgende Inkubation mit dem in Blotto verdünnten ersten Antikörper (1:500 für Antikörper gegen Rezeptorkinasen) wurde für 1 h durchgeführt. Der Antikörperlösung wurde als Konservierungsmittel entweder 0.05 % (m/V) Thimerosal oder 0.02 % NaN_3 zugesetzt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBS/Tween wurde der zweite, in Blotto 1:2000 verdünnte Antikörper (Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG) für 30-60 min auf den Blot gegeben und danach dreimal mit TBS/Tween und einmal mit TBS (jeweils für 5 min) gewaschen. Sämtliche Inkubationen wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt. In Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper wurde anstelle von TBS auch PBS verwendet. Der Nachweis der Immunkomplexe erfolgte mit Hilfe des ECL™-Systems oder des Super-Signal®-Substrats durch Inkubation der Membran in einer 1:1-Mischung der jeweiligen Lösungen 1 und 2 für 1-5 min. Die Chemolumineszenzsignale wurden durch Schwärzung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

TBS: 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl

PBS: 80 mM Na_2HPO_4, 20 mM NaH_2PO_4, 100 mM NaCl pH 7.5

TBS/Tween: 0.05 % (V/V) Tween 20 in TBS

PBS/Tween: 0.5 % (V/V) Tween 20 in PBS

Blotto: 5 % (m/V) Magermilchpulver in TBS/Tween

3.6.6.4 Immunchemischer Nachweis von phosphorylierten Aminosäureresten

Um Proteine auf ihren Grad der Phosphorylierung zu untersuchen, wurden diese nach der SDS-PAGE und dem *semidry*-Transfer auf PVDF-Membran mit einem Antikörper analysiert, der gegen phosphorylierte Tyrosinreste gerichtet war. Nach dem Transfer wurde die Membran wie unter 3.6.6.3 beschrieben mit 2 % (m/V) BSA in TBS/Tween abgeblockt, dreimal mit TBS/Tween gewaschen und für 2 h mit einem Anti-Phosphotyrosin-AK (PY20) inkubiert, an den kovalent Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Anschließend wurde die Membran gewaschen und die Immunkomplexe mit Hilfe des ECL™-Systems nachgewiesen.

3.6.6.5 Amidoschwarz-Färbung von Nitrozellulosemembranen

Mit Amidoschwärz-Färbung können Proteinmengen bis 50 ng/Bande auf der Nitrozellulosemembran nachgewiesen werden. Die Membran wurde dreimal je 5 min mit ddH_2O gewaschen, 1 min in Amidoschwarz-Färbelösung gefärbt, zweimal je 1 min in 2 % (V/V) Essigsäure entfärbt, dreimal je 10 min in ddH_2O gewaschen und auf Blotpapier getrocknet.

Färbelösung: 0.1 % (m/V) Amidoschwarz 10B in 2 % (V/V) Essigsäure

3.6.7 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mit verschiedenen Methoden in Abhängigkeit vom Probenvolumen einkonzentriert. Bei Volumina unter 10 ml wurden Spindown-Konzentratoren von GelmanScience verwendet, wobei Microsep- (3.5 ml max. Volumen, Omega-Membran, 10 kDa Ausschluss) oder Nanosep-Säulchen (500 µl, Omega-Membran, 10 kDa Ausschluss) eingesetzt wurden. Bei größeren Volumina (10 bis 30 ml) wurden Rührzellen von Amicon benutzt, die mit Disc Membranen (Omega, ∅ 25 mm, 10 kDa Ausschluss) von GelmanScience beschickt wurden.

3.6.8 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse von Proteinlösungen diente dem Austausch des Puffers. Für die Dialyse wurden Schläuche von Roth, Karlsruhe verwendet:
Spectra/Por® 1.23 x 14.6 mm (Breite x Durchmesser), 1.7 ml/cm, 6-8 kDa Ausschluss
Spectra/Por® 1.10 x 6.4 mm (Breite x Durchmesser), 0.32 ml/cm, 6-8 kDa Ausschluss
Die Dialyseschläuche wurden auf die benötigte Länge zugeschnitten, in ddH_2O vorgequollen und/oder mehrmals aufgekocht und gegebenenfalls bei 4 °C gelagert. Vor dem Einfüllen der Proteinlösung wurde der Schlauch kurz mit dem jeweiligen Austauschpuffer gewaschen. Der Dialyseschlauch wurde mit Klammern verschlossen und in einem 25- bis 50-fachen Volumen an Dialysepuffer unter Rühren inkubiert. Die Dialyse wurde für *ca*. 16 h bei 4 °C durchgeführt, wobei der Puffer mindestens einmal ausgetauscht wurde.

3.7 Chromatographische Methoden

Alle säulenchromatographischen Auftrennungen wurden bei 4 °C durchgeführt.

3.7.1 Kationenaustausch-Chromatographie

Zur Anreicherung der in *Sf*9-Insektenzellen rekombinant hergestellten Rezeptorkinasen wurde die Kationenaustausch-Chromatographie an einer SP-Sepharose-Matrix (Amersham Pharmacia) eingesetzt (Loudon und Benovic, 1994). Die dafür verwendeten 1 (5) ml-HiTrap®-Säulen und das FPLC-System stammten von Amersham Pharmacia, Freiburg. Die Säulen wurden mit HE-Puffer mit 12.5 (für mGRK6-A, -B, -D und bGRK2) bzw. 20 % (V/V) NaCl (für mGRK6-C) äquilibriert. Die verdünnten Proben (bis 50 ml, je nach Säulenvolumen 40 bis 400 mg Gesamtprotein) wurden filtriert (0.45 µm) und auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 0.5 (1) ml/min und es wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt. Die Matrix wurde mit 8 Säulenvolumina gewaschen und die Proteine mit einem 50 ml-Gradient von HE-Puffer mit 50 % (V/V) NaCl eluiert. Die Analyse der in den Fraktionen enthaltenen Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und Immunoblotting oder Coomassie Blau-Färbung und durch lichtabhängige Rhodopsin-Phosphorylierung. Wahlweise wurde die Kationenaustausch-Chromatographie unter den gleichen Bedingungen an einem ÄKTA-System (Amersham Pharmacia) durchgeführt.

HE-Puffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EDTA pH 7.5, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 20 µg/ml Leupeptin, 200 µg/ml Benzamidin

HE-Puffer + 1 M NaCl

3.7.2 Affinitätschromatographie

3.7.2.1 Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose

Die Affinitätschromatographie an der Heparin-Sepharose-Matrix (Amersham Pharmacia) wurde zur weiteren Reinigung der über Kationenaustausch-Chromatographie angereicherten Proteine eingesetzt. Die 1 ml-HiTrap®-Säule wurde mit Hilfe des FPLC- oder ÄKTA-Systems mit HE-Puffer gewünschter NaCl-Konzentration äquilibriert. Das vorgereinigte Protein (mGRK6-Variante oder bGRK2) wurde gegebenenfalls mit HE-Puffer verdünnt, um die Salzkonzentration zu reduzieren und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Matrix mit 30 Säulenvolumina (Flussgeschwindigkeit 0.5 ml/min) wurde das Protein mit HE-Puffer mit 1 M NaCl in einem linearen Gradienten von 40 ml (z. B. 0.4-1 M NaCl für mGRK6-C) eluiert. Die Analyse der in den Fraktionen (1 ml) enthaltenen Proteine erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließender Silber- oder Coomassie Blau-Färbung und durch den Nachweis der lichtabhängigen Phosphorylierung von Rhodopsin.

3.7.2.2 Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose

Durch Affinitätschromatographie mit 1 ml-HiTrap® Protein A-Sepharose-Säulen (Amersham Pharmacia) wurden die polyklonalen Anti-GRK6-Antikörper der Immunglobulin G (IgG)-Klasse aus Kaninchenserum mit Hilfe des FPLC-Systems gereinigt. Die Äquilibrierung der Matrix erfolgte mit Puffer AS. Das Kaninchenserum wurde vor dem Auftrag auf die Säule gegen Puffer AS dialysiert und anschließend filtriert (0.45 µm). Pro Säulenlauf wurden 1 ml (90 mg Gesamtprotein) Serum mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 ml/min aufgetragen. Die Matrix wurde solange mit Puffer AS gewaschen, bis im Durchfluss kein Protein mehr detektiert werden konnte. Die IgGs wurden mit Puffer AE in einem Stufengradient mit sinkenden pH-Werten (pH 6.0-3.0, ΔpH = 1) eluiert, wobei jede Stufe 2 ml umfasste. In die Fraktionsröhrchen wurden je 50 µl 1 M Tris/HCl pH 9.0 vorgelegt, um das Eluat (500 µl-Fraktionen) zu neutralisieren. Die Analyse der gereinigten Antikörper er-

folgte über *Western blot*. Dazu wurden Nitrocellulosestreifen, auf welche die Proteine der vier mGRK6-Varienten nach SDS-PAGE transferiert worden waren, mit gereinigten IgGs aus verschiedenen Fraktionen in einer 1:100-Verdünnung inkubiert.

Puffer AS: 20 mM Natriumphosphat pH 7.0

Puffer AE: 0.1 M Zitronensäure pH 3.0, 4.0, 5.0 oder 6.0

3.7.3 Gelfiltration

Für die Gelfiltration wurden Fertigsäulen von Amersham Pharmacia verwendet, die mit Superdex™ 75-Gel befüllt waren. Neben der Superdex™ 75-HiLoad-Säule (prep grade, 26 mm x 60 cm, 320 ml Volumen, FPLC-System), die mit bis zu 4 ml gefilterter (0.45 µm) Probe beladen werden konnte, wurde für das SMART-System eine Superdex™ 75-PC 3.2/30-Säule verwendet, die ein Probenvolumen von 50 µl erlaubte. Die Flussgeschwindigkeit bei der HiLoad-Säule betrug 1 ml/min (PC 3.2/30-Säule 50 µl/min) und es wurden 5 ml-Fraktionen (50 µl-Fraktionen) gesammelt. Die Säulenmatrix wurde in 20 % (V/V) Ethanol gelagert und vor dem Probenauftrag zunächst mit ddH_2O und anschließend mit 1.5 Säulenvolumina Puffer S äquilibriert. Die Trennung der Proteine wurde über SDS-PAGE und *Western blot* oder Coomassie Blau-Färbung kontrolliert.

Puffer S: 20 mM HEPES pH 7.5,10 mM EDTA pH 7.5, 1 mM DTT, 100 mM NaCl

3.8 Bestimmung der Kinaseaktivität von GRKs

Die Aktivität G-Protein gekoppelter Rezeptokinasen wurde über die Phosphorylierung verschiedener Substrate durch diese Kinasen ermittelt. In Anwesenheit von [γ–^{32}P]ATP überträgt die Kinase die radioaktiv markierte γ-Phosphatgruppe des Adenosintriphosphates auf das Substrat. Das somit radioaktiv markierte, phosphorylierte Substrat kann nach Auftrennung über SDS-PAGE autoradiographisch nachgewiesen werden.

3.8.1 *In vitro*-Bestimmung der Kinaseaktivität von GRKs

3.8.1.1 Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Phosvitin als Substrat

Die Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Phosvitin als Substrat wurde in Anlehnung an Loudon und Benovic (1994) durchgeführt. Phosvitin ist ein 45 kD großes saures Protein, das als Substrat für die hGRK6 beschrieben wurde (Loudon und Benovic, 1994). Die zu untersuchende GRK (25 bis 100 nM) wurde in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM $MgCl_2$ zusammen mit 12.5 µg Phosvitin (Sigma, Deisenhofen) und 1.3 µl ATP-Mix (final 100 µM ATP) für 1 h bei 30 °C in 15 µl Gesamtvolumen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 µl 2 x Probenpuffer (s. 3.6.3) gestoppt und die Proteine über SDS-PAGE auf einem 10 % Acrylamidgel bei konstanter Stromstärke (100 V) aufgetrennt. Die Exposition des Coomassie-gefärbten Gels mit einem Röntgenfilm erfolgte über Nacht bei -80 °C in einer Filmkassette.

ATP-Mix (für 19 Ansätze)**:** 19 µl 1.5 mM ATP
5 µl [γ–^{32}P]ATP (10 mCi/ml, > 5000 Ci/mmol)

3.8.1.2 Lichtabhängige Phosphorylierung von Rhodopsin durch GRKs

3.8.1.2.1 Präparation der äusseren Segmenten von Stäbchenzellen der Rindernetzhaut

Die Membranen der äusseren Segmente von Stäbchenzellen (*rod outer segments*, ROS) der Rindernetzhaut enthalten 10^5 Moleküle Rhodopsin pro µm^2 (Alberts *et al.*, 1987). Die Präparation dieser rhodopsinreichen ROS-Membranen wurde nach Papermaster (1982) bei 4 °C unter Rotlicht durchgeführt. Vom Schlachthof wurden 25 an Dunkelheit adaptierte Rinderaugen frisch geschlachteter Tiere bezogen. Die vorderen Abschnitte und der Glaskörper der Rinderaugen wurde entfernt und die Retina durch Zugabe von Puffer A vom Augenhintergrund abgelöst und am optischen Nerv abgetrennt. Die 25 Retinas wurden in 15 ml Homogenisatiospuffer mit einem Teflon-Homogenisator homogenisiert, indem der Pistill dreimal auf- und abgezogen wurde. Das Homogenat wurde 4 min bei 4.000 Upm (JA20-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Messzylinder gesammelt, das Pellet nochmals in 15 ml Homogenisationspuffer homogenisiert und anschließend zentrifugiert.

Zu den vereinigten Überständen (*ca*. 40 ml) wurden unter Rühren langsam 2 Volumen 10 mM Tris/Acetat pH 7.4 gegeben und diese Lösung erneut bei 4.000 Upm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen, das Pellet in 0.77 M Saccharose in 1 mM Tris/Acetat pH 7.4, 0.1 mM $MgCl_2$ resuspendiert, indem die Lösung dreimal durch eine Stahlkanüle (Nr. 18) gezogen und für 5 s mit dem Ultra-Turrax gemischt wurde. Das gesamte Volumen der Lösung von 4 ml wurde auf einen Saccharosedichtegradient (Zentrifugenröhrchen gefüllt mit 15 ml 1.14 M, 15 ml 1.0 M und 12 ml 0.84 M Saccharose in 1 mM Tris/Acetat pH 7.4, 0.1 mM $MgCl_2$) aufgetragen und 30 min bei 24.000 Upm (SW25.2-Rotor) zentrifugiert. Mit Hilfe einer Kanüle wurde die rötlich scheinende Interphase zwischen 0.84 und 1.0 M Saccharose abgenommen (*ca.* 5 ml), mit 1 Volumen 10 mM Tris/Acetat pH 7.4 gemischt und bei 20.000 Upm (JA20-Rotor) für 20 min pelletiert. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Puffer A: 100 mM NaH_2PO_4, 0.1 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$, pH 6.5
0.1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin, 3 mM Benzamidin, 1 µg/ml Trypsininhibitor

Homogenisationspuffer: 34 % (m/V) Saccarose, 65 mM NaCl, 0.2 mM $MgCl_2$, 5 mM Tris/Acetat pH 7.4

3.8.1.2.2 Inaktivierung der Rhodopsinkinase

Die Inaktivierung der Rhodopsinkinase erfolgte mit 5 M Harnstoff nach der von Shichi und Somers (1978) beschriebenen Methode. Alle Arbeiten wurden bei 4 °C unter Rotlicht durchgeführt. Das Pellet aus 3.8.1.2.1 wurde aufgetaut, in 25 ml (1 ml/Retina) Puffer B resuspendiert und die Suspension für 3 min auf Eis mit Ultraschall behandelt. Die Suspension wurde mit 2 Volumen 50 mM Tris/HCl pH 7.4 verdünnt und 45 min mit 100.000 *g* zentrifugiert. Die Pellets wurden vereinigt, viermal mit 50 mM Tris/HCl pH 7.4 gewaschen und am Ende in 500 µl 50 mM Tris/HCl pH 7.4 resuspendiert, indem die Probe sechsmal durch eine 0.5 x 25 mm Kanüle und dreimal durch eine 0.4 x 20 mm Kanüle auf- und abgezogen wurde. Nach der Proteinbestimmung (s. 3.6.2.1) wurden die Rhodopsin enthaltenden ROS-Membranen aliquotiert (10 µl Aliquots), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C dunkel gelagert.

Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 5 M Harnstoff

3.8.1.2.3 Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Rhodopsin als Substrat

Die Aktivitätsbestimmung der GRKs mit Rhodopsin als Substrat wurde ebenfalls in Anlehnung an Loudon und Benovic (1994) durchgeführt. Rhodopsin und der ATP-Mix wurden unter Rotlicht zu der Rezeptorkinase und dem Puffer gegeben und die Reaktion anschließend durch Belichtung gestartet.

Reaktionsansatz:	1.5 µl	10 x TEM-Puffer
	x µl	GRK (25-100 nM)
	1 µl	ROS-Membranen (120 nM, d. h. 1:100 Verdünnung in 50 mM Tris/HCl pH 7.4)
	1.3 µl	ATP-Mix [1 µl 1.5 mM ATP, 0.3 µl [γ–^{32}P]ATP (10 mCi/ml, > 5000 Ci/mmol)]
	ad 15 µl mit ddH_2O	

Die Belichtung erfolgte für 10 min bei 30 °C. Die Reaktion wurde duch Zugabe von 15 µl 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine auf einem 10 % Acrylamidgel bei einer konstanten Spannung von 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Coomassie-gefärbte Gel wurde über Nacht mit einem Röntgenfilm bei -80 °C in einer Filmkassette exponiert.

10 x TEM-Puffer: 200 mM Tris/HCl pH 7.5, 20 mM EDTA und 37 mM $MgCl_2$

3.8.1.3 Aktivitätsbestimmung der GRKs mit rekombinant in Insektenzellen exprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren als Substrat

Die Aktivitätsbestimmung der GRKs mit rekombinant in Insektenzellen exprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren erfolgt unter den gleichen Pufferbedingungen wie die Phosphorylierung von Rhodopsin (s. 3.8.1.2.3). Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren befanden sich in den Membranen der *Sf*9-Insektenzellen, die mit Baculoviren infiziert worden waren, die für verschiedene, teilweise mit Hämagglutinin (HA)-gekoppelte, Chemokin-

rezeptoren kodieren. Die Chemokinrezeptoren wurden nach Zugabe von Rezeptorkinase und radioaktiv markiertem [γ–^{32}P]ATP mit ihren Liganden, den Chemokinen, stimuliert.

Reaktionsansatz:	1.5 µl	10 x TEM-Puffer
	x µl	GRK (25-100 nM)
	2 µl	Membranen infizierter *Sf*9-Zellen
	1.3 µl	ATP-Mix [1 µl 1.5 mM ATP, 0.3 µl [γ–^{32}P]ATP (10 mCi/ml, > 5000 Ci/mmol)]
	1 µl	1.5 mM Ligand (final 100 µM)
	ad 15 µl mit ddH_2O	

Nach Inkubation für 1 h bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 µl 2 x Probenpuffer gestoppt. Die Auftrennung der Proteine und die Autoradiographie erfolgte wie unter 3.8.1.2.3 beschrieben.

3.8.2 *In vivo*-Bestimmung der Kinaseaktivität von GRKs

Für die *in vivo*-Bestimmung der Kinaseaktivität von GRKs wurde ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor zusammen mit einer GRK in *Sf*9-Insektenzellen oder in COS-7-Zellen koexprimiert. Die Zellen wurden mit [^{32}P] radioaktiv markiert und mit einem Ligand für den transfizierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor stimuliert. Nach der Lyse der Zellen wurde der Rezeptor immunpräzipitiert und über SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

3.8.2.1 Markierung infizierter *Sf*9-Insektenzellen mit [^{32}P]

Die Makierung infizierter Insektenzellen erfolgte in Anlehnung an die von Blaukat *et al.* (1999) beschriebene Methode. Für die Infektion mit Baculoviren wurden pro Vertiefung einer 6-*well*-Platte 1 x 10^6 *Sf*9-Zellen ausgesät und mit Baculoviren infiziert, die für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor oder eine mGRK6-Variante kodieren. Die infizierten Insektenzellen wurden nach 36 h zweimal mit phosphatfreiem Insektenzellmedium gewaschen, für 1 h bei 27 °C in dem gleichen Medium inkubiert und anschließend für 3 h mit 250 µCi/ml [^{32}P]Orthophosphat (370 MBq/ml, 10 mCi/ml) in einem Volumen von 0.5 ml

markiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte für 10 min mit 100 nM Ligand. Die Zellen wurden auf Eis überführt und wie unter 3.8.2.3 beschrieben behandelt.

3.8.2.2 Markierung transient transfizierter COS-7-Zellen mit [^{32}P]

Am Tag vor der Transfektion wurden pro Vertiefung einer 6-*well*-Platte 3 x 10^5 COS-7-Zellen ausgesät. Die Zellen wurden mit cDNA-Vektorkonstrukten transfiziert (s. 3.5.1), die für verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder für eine mGRK6-Variante kodieren und in den eukaryontischen Expressionsvektor pMT2SM einkloniert sind. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit phosphatfreiem DMEM gewaschen, bevor den Zellen pro Vertiefung 0.5 ml phosphatfreies DMEM und 12.5 µl [^{32}P]Orthophosphat (370 MBq/ml, 10 mCi/ml) in einer Endkonzentration von 250 µCi/ml zugesetzt wurden. Die Zellen wurden zur Markierung für 2 h bei 37 °C, 10 % CO_2 und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre (Standardbedingungen im Inkubator) inkubiert. Nach zehnminütiger Stimulation der Zellen durch Zugabe der entsprechenden Liganden (100 nM Endkonzentration) wurden die Zellen sofort auf Eis überführt und wie unter 3.8.2.3 beschrieben behandelt.

3.8.2.3 Zelllyse und Immunpräzipitation

Die zu lysierenden Zellen wurden zweimal mit kaltem TBS gewaschen. Pro Vertiefung einer 6-*well* Platte wurden 500 µl Lysepuffer 3 zugegeben und die Zellen für 1 h bei 4 °C auf dem Schüttler lysiert. Erfolgte die Zelllyse nach *in vivo*-Phosphorylierung, wurden dem Lysepuffer vier Phosphataseinhibitoren zugesetzt. Nicht solubilisierte Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 min mit 15.300 *g* bei 4 °C abgetrennt. Aus dem erhaltenen klaren Überstand wurden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die N-terminal mit einem Hämagglutinin (HA)-*tag* versehen waren, mit einem gegen diesen HA-*tag* gerichteten Antikörper immunpräzipitiert. Dazu wurden 5 µl Anti-HA-Antikörper (Boehringer, Mannheim) mit 25 µl Protein G-Agarose (Boehringer, Mannheim) in 500 µl Lysepuffer 3 für 30 min bei 4 °C über Kopf rotierend präinkubiert, um den Antikörper mit seinem Fc-Teil an die Protein G-Agarose zu binden. Der Antikörper/Protein G-Agarose-Komplex wurde durch Zentrifugation für 1 min bei 2.000 *g* pelletiert und anschließend zusammen mit dem klaren Lysat der COS-7-Zellen für mindestens 2 h bei 4 °C über Kopf rotierend

inkubiert. Die mit Rezeptor/Antikörper-Komplex beladene Protein G-Agarose wurde danach durch Zentrifugation pelletiert, der erhaltene Überstand in ein neues Gefäß überführt und das Pellet dreimal mit Lysepuffer 3 gewaschen. Die Agarose wurde in 2 x Probenpuffer resuspendiert, die daran gebundenen Proteine auf einem 10 % SDS-Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel im *Western blot* analysiert.

TBS:	10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5, 150 mM NaCl
Lysepuffer 3:	TBS mit 1 % (V/V) Triton X-100, 0.5 % (m/V) Natriumdeoxycholat, 0.1 % (m/V) SDS, 5 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Trypsininhibitor, 100 ng/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin
Phosphataseinhibitoren:	10 mM NaF, 10 mM $Na_2P_2O_7$, 1 mM Na_3VO_4, 25 mM β-Glycerophosphat

3.9 Untersuchung von GRK-Lipid-Wechselwirkungen

Die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen mGRK6-Varianten und Phospholipiden wurde nach der von Pronin *et al.* (1998) beschriebenen Methode durchgeführt. Für diese Analyse wurden säulenchromatographisch gereinigte mGRK6-Varianten (s. 3.7) eingesetzt.

3.9.1 Herstellung von Lipidvesikeln

Zur Herstellung von Phospholipidvesikeln wurden L-α-Phosphatidylcholin (PC), L-α-Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdInsP_2) verwendet. Alle Lipide wurden in Chloroform gelöst, PC und PS in einer Konzentration von 10 mg/ml, PtdInsP_2 mit 5 mg/ml, und bei 4 °C dunkel gelagert. Als Grundsubstanz für die Vesikel diente PC, dem entweder 5 % (m/V) PS oder 5 % (m/V) PtdInsP_2 zugesetzt wurde. Um die verschiedenen Vesikel herzustellen, wurden die in Chloroform gelösten Phospholipide in einem Glasröhrchen gemischt und unter Stickstoff-Atmosphäre eingedampft. Das Pellet wurde in Vesikel-Puffer aufgenommen. Zur Bildung der Phospholipidvesikel wurde die Suspension 30 min bei RT gut gemischt und anschließend für 15 min im Ultraschallbad behandelt.

Vesikel-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0

3.9.2 Bindungsexperimente an Lipidvesikel

Um die Bindung der mGRK6-Varianten an Phospholipide zu untersuchen, wurden 30 pmol GRK6 ohne und mit frisch hergestellten Phospholipidvesikeln (0.017, 0.17, 1.7 und 10 mg Phospholipid pro ml) in Inkubationspuffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 25 min mit 200.000 *g* bei 4 °C wurden die Ansätze in eine lösliche (Überstand) und eine lipidhaltige, partikuläre Fraktion (Pellet) separiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 30 µl Inkubationspuffer resuspendiert. Jeweils 15 µl der löslichen und partikulären Fraktion wurden mit 2 x Probenpuffer versetzt und die Proteine auf einem 10 % Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Über *Western blot* (s. 3.6.6) wurde die Verteilung der mGRK6 in den verschiedenen Fraktionen analysiert.

Inkubationspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl

3.10 Untersuchung von GRK-Rezeptor-Wechselwirkungen

Um zu klären, ob und mit welchen Rezeptoren die mGRK6-Varianten wechselwirken, wurden verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zusammen mit GRK2 oder mGRK6-Varianten in *Sf*9-Insektenzellen koexprimiert. Vor der Zelllyse wurden die Zellen mit dem *crosslinking*-Reagenz Dithiobissuccinimidylpropionat (DSP, Pierce) (s. Abb. 6) behandelt. Für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und GRK wurden pro Vertiefung einer 6-*well* Platte 8 x 10^5 *Sf*9-Zellen mit 300 µl Baculoviren für Rezeptoren bzw. mit 200 µl Baculoviren für mGRK6-Varianten infiziert (s. 3.4.3). Nach 40 h wurden die Zellen vorsichtig einmal mit serumfreiem Medium gespült und für 15 min bei 27 °C mit 100 nM Ligand in 0.5 ml serumfreiem Medium stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 0.5 ml *crosslinking*-Puffer ohne oder mit 2.5 mM DSP in Anwesenheit von 100 nM Ligand für 30 min bei 27 °C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit kaltem CMF-PBS wurden die Zellen in 500 µl Lysepuffer 3 aufgenommen, wie unter 3.8.2.3 beschrieben lysiert und die solubilisierten Rezeptoren mit Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Vor der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden

die Agarosekügelchen für 30 min bei 37 °C erhitzt, um die Immunkomplexe zu dissoziieren und den *crosslink* zu reduzieren. GRKs und Rezeptoren wurden mit verschiedenen Antikörpern im *Western blot* nachgewiesen.

***Crosslinking*-Puffer:** Hank's *balanced salt solution*, modifiziert (Sigma), 10 mM HEPES pH 7.5, 10 % (V/V) DMSO

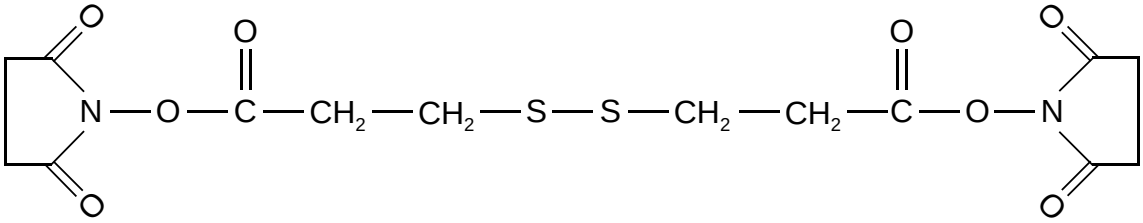


Abb. 6: Struktur des *crosslinking*-Reagenz Dithiobissuccinimidylpropionat (DSP).

4 Ergebnisse

4.1 Genomische Organisation des GRK6-Gens der Maus

In unserer Arbeitsgruppe konnten vier cDNAs isoliert werden, die für verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 6-Isoformen der Maus (mGRK6) kodieren und mit mGRK6-A bis mGRK6-D bezeichnet wurden (Wächter, 1999). Die schematische Struktur der cDNAs dieser vier mGRK6-Varianten und der humanen GRK6-cDNA ist in Abbildung 7 dargestellt.

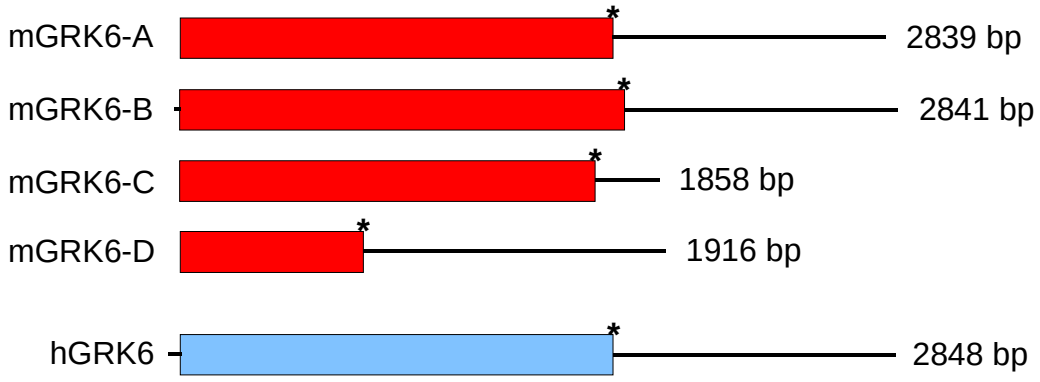


Abb. 7: cDNA-Struktur der murinen GRK6-Varianten A, B, C und D im Vergleich mit der humanen GRK6-cDNA. Die kodierenden Bereiche sind in Form dicker Balken, die nichtkodierenden Abschnitte mit horizontalen Linien gekennzeichnet. Das Stopkodon ist mit einem Stern (*) markiert. Die mGRK6-A entspricht dem murinen Äquivalent der einzigen bislang bekannten menschlichen GRK6 (hGRK6), der kodierende Bereich endet mit einem Stopkodon an Position 577, dem sich 1111 bp nichttranslatiertes 3´-Ende anschließen. Die cDNA der mGRK6-B umfasst neben der vollständig für mGRK6-B kodierenden Sequenz (589 AS) 22 bp des nichttranslatierten 5´-Endes und 1052 bp des nichttranslatierten 3´-Endes. Die cDNA der mGRK6-C enthält neben dem für 560 AS kodierenden einen 178 bp langen nichtkodierenden Bereich am 3´-Ende. Die mGRK6-D-cDNA besitzt in Position 245 des kodierten Proteins ein Stopkodon, dem 1184 bp des nichtkodierenden 3´-Endes folgen.

Die mGRK6-A entspricht dem murinen Äquivalent der einzigen bislang bekannten menschlichen GRK6 (hGRK6, 576 AS). Die Isoformen mGRK6-B (589 AS) und mGRK6-C (560 AS) unterscheiden sich von der humanen GRK6 ausgehend vom Carboxyterminus ab Aminosäure -17 und sind um 13 Aminosäuren länger bzw. 16 Aminosäuren kürzer als

hGRK6. Die cDNA der vierten Variante, mGRK6-D, enthält in Position 245 des kodierten Proteins ein Stopkodon. Das mGRK6-D Polypeptid besteht daher lediglich aus dem vermutlich für die Rezeptorinteraktion wichtigen aminoterminalen Bereich und den ersten 59 der insgesamt 263 Aminosäuren der katalytischen Domäne der GRK6 (Hanks und Hunter, 1995). Die Variante mGRK6-D ist daher sehr wahrscheinlich katalytisch inaktiv. Computeranalysen haben gezeigt, dass die Primärstruktur des Carboxyterminus von mGRK6-B Konsensussequenzen für Phosphorylierungen durch Proteinkinasen C und cAMP- oder cGMP-regulierte Kinasen aufweist, während die mGRK6-A wie die hGRK6 im carboxyterminalen Anteil höchstwahrscheinlich palmitoyliert wird. Die mGRK6-C-Isoform wird wegen ihres verkürzten Carboxyterminus voraussichtlich weder palmitoyliert noch phosphoryliert.

Um die Frage zu klären, ob die *messenger*-RNAs der vier mGRK6-Varianten Produkte verwandter Gene sind oder von einem einzigen Gen transkribiert werden und um die Existenz von Pseudogenen ausschließen zu können, wurde die strukturelle Architektur der Gene/des Gens der mGRK6 (*mGRK6*) analysiert. Die chromosomale Lokalisation von *mGRK6* durch Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) sollte Aufschluss darüber geben. Die Hybridisierung der *mGRK6*-Sonden an WMP-1 Metaphasenchromosomen zeigt Abbildung 8. Auf zwei Chromosomenarmen unterschiedlicher Länge war ein symmetrisches doppeltes Fluoreszenzsignal zu sehen. Nach Färbung des Präparates mit 4´, 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) konnte ein Chromosomenarm als Translokationschromosom T(13.17)1Lub identifiziert werden, das von Zörnig *et al*. (1995) in WMP-1-Zellen beschrieben worden war. Die Translokation war zwischen Rb(10.17)9Mpl und Rb(13.15)10Mpl aufgetreten. Das gesamte Chromosom 13 war mit Teilen seiner centromeren DNA mit dem proximalen Arm von Chromosom 17 von Rb(10.17)9Mpl fusioniert. Dieses Markerchromosom erlaubte die sichere Lokalisation des Signals auf Chromosom 13B1-3. Das humane GRK6-Gen ist distal auf 5q35 festgestellt worden (Bullrich *et al.*, 1995). Zwischen dem distalen humanen Chromosom 5 und dem distalen Mauschromosom 13 ist eine verlängerte Kopplungsgruppe konservierter Syntänie beschrieben (http://www.informaticx.jax.org/homology.html). Das mGRK6-Gen bildet zusammen mit den Genen des Dopamin D_1- (*DRD1*) und des Histamin H2-Rezeptors (*HRH2*) und dem Homöobox-Gen *MSX2* den größten Teil des proximalen Endes von 13B1-3 der Syntänie-Beziehung zwischen dem humanen Chromosom 5 und dem Mauschromosom 13. Die

FISH-Analyse hat bestätigt, dass das GRK6-Gen der Maus als *single copy*-Gen vorliegt. Zudem konnte mit dieser Methode die Existenz von Pseudogenen der mGRK6 ausgeschlossen werden.

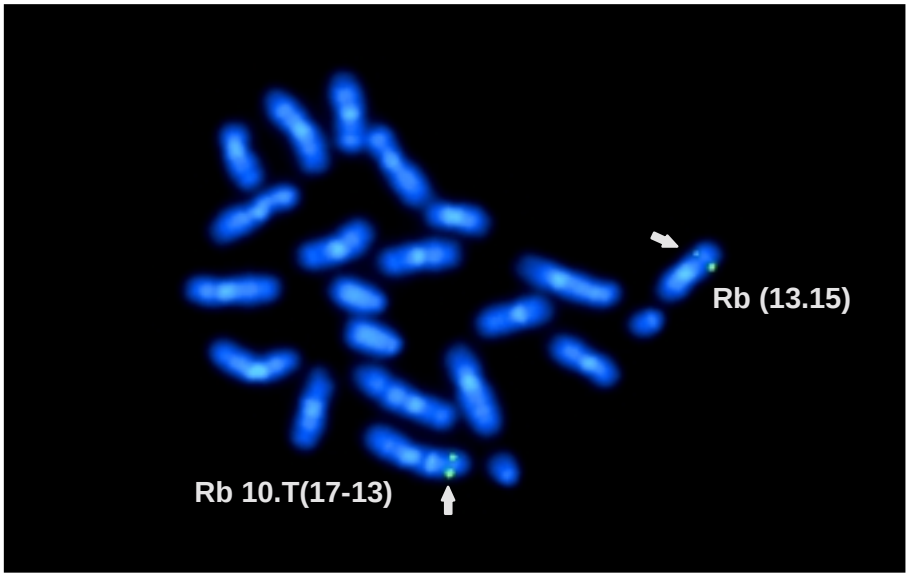


Abb. 8: Analyse der chromosomalen Lokalisation des GRK6-Gens der Maus durch Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung. Maus *GRK6*-Sonden wurden mit Metaphasenchromosomen aus WMP/WMP-Mäusen hybridisiert. Die biotinylierten Sonden wurde mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-markiertem Avidin detektiert. Die Chromosomen wurden mit DAPI sichtbar gemacht. Das Translokationschromosom Rb(10.T(17-13)) und das normale Fusionschromosom Rb(13.15) sind gekennzeichnet.

Die Struktur von *mGRK6* wurde über *long range*-PCR mit genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen der Maus (129/SvJ) als Matrize und mGRK6-spezifischen Oligonukleotiden als *primer* ermittelt. Die Lage der eingesetzten *primer* kann Abbildung 9 entnommen werden. Die PCR-Produkte mit einer Länge von ungefähr 7 (mit Oligonukleotid-Paar A1/gen1) und 8 kbp (mit Oligonukleotid-Paar gen8/gen9) wurden nach elektrophoretischer Trennung aus dem 1 % (m/V) Agarosegel extrahiert. Aus diesen Extrakten wurden jeweils 2 µl in *nested*-PCRs mit sieben weiteren Oligonukleotid-Paaren eingesetzt. Die Lage der dafür verwendeten *primer* ist ebenfalls aus Abbildung 9 ersichtlich. Die resultierenden PCR-Produkte wurden in einen T-*tailed* pBluescript™ II SK(-) kloniert und diese Subklone durch DNA-Sequenzierung analysiert.

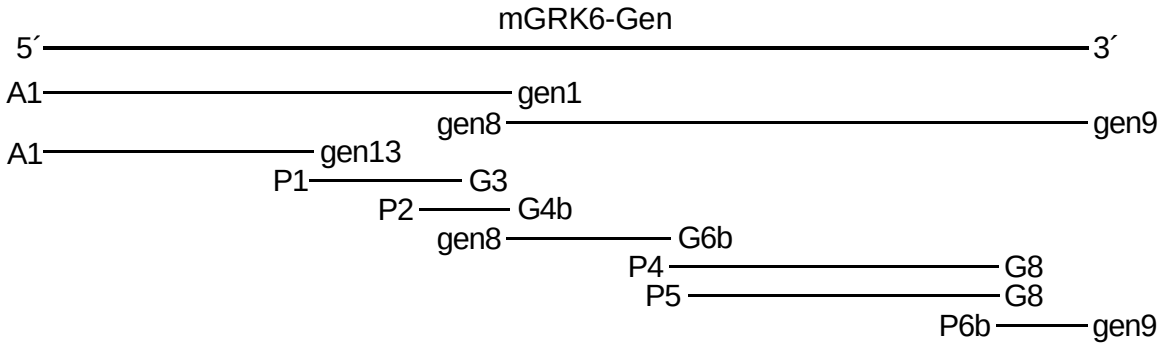


Abb. 9: Analyse der genomischen Organisation von *mGRK6*. In der *long range*-PCR wurden genomische DNA als Matrize und mGRK6-spezifische Oligonukleotide A1 (*sense*) und gen1 (*antisense*) bzw. gen8 (*sense*) und gen9 (*antisense*) als *primer* eingesetzt. Die erhaltenen 7 bzw. 8 kbp langen PCR-Produkte wurden als Matrizen für die *nested*-PCRs verwendet. Als mGRK6-spezifische Oligonukleotide dienten die *primer*-Paare (*sense*/*antisense*) A1/gen13, P1/G3, P2/G4b, gen8/G6b, P4/G8, P5/G8, P6b/gen9.

Die Sequenzierung der amplifizierten DNA-Fragmente zeigte, dass sich der kodierende Anteil des Gens der mGRK6 über 14.5 kbp erstreckt und aus 17 Exons und 16 Introns besteht (s. Abb. 10).

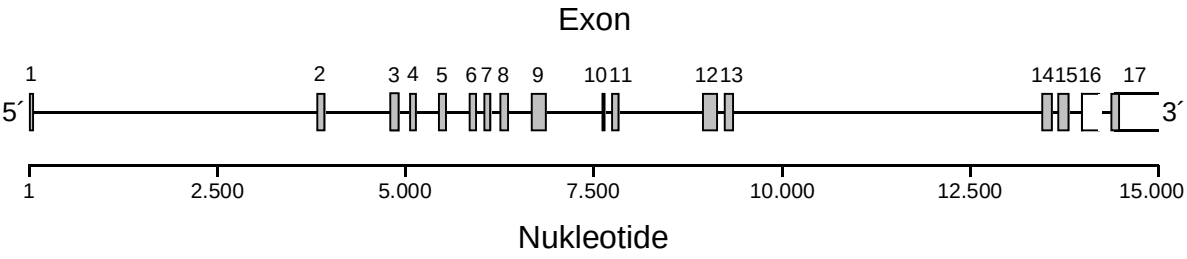


Abb. 10: Exon/Intron-Organisation des Maus GRK6-Gens. Das Gen umfasst 17 Exons und 16 Introns, die in Form von Kästchen und horizontalen Linien dargestellt sind. Die Numerierung der Exons beginnt mit dem Exon, welches das für die initiale Aminosäure Methionin kodierende ATG-Triplett enthält. Die Nukleotid-Numerierung fängt mit dem Initiationskodon ATG an (A = 1). Geschlossene Kästchen repräsentieren Protein-kodierende Sequenzen, offene Kästchen stellen nicht-translatierte Regionen eines Exons dar.

Ein Vergleich der Nukleotidsequenzen der mGRK6-cDNAs mit der Sequenz des mGRK6-Gens deutete darauf hin, dass die vier mGRK6-mRNAs durch alternatives Spleißen aus einer einzigen hnRNA-Spezies hervorgehen. Die Spleißvorgänge zeigt Abbildung 11.

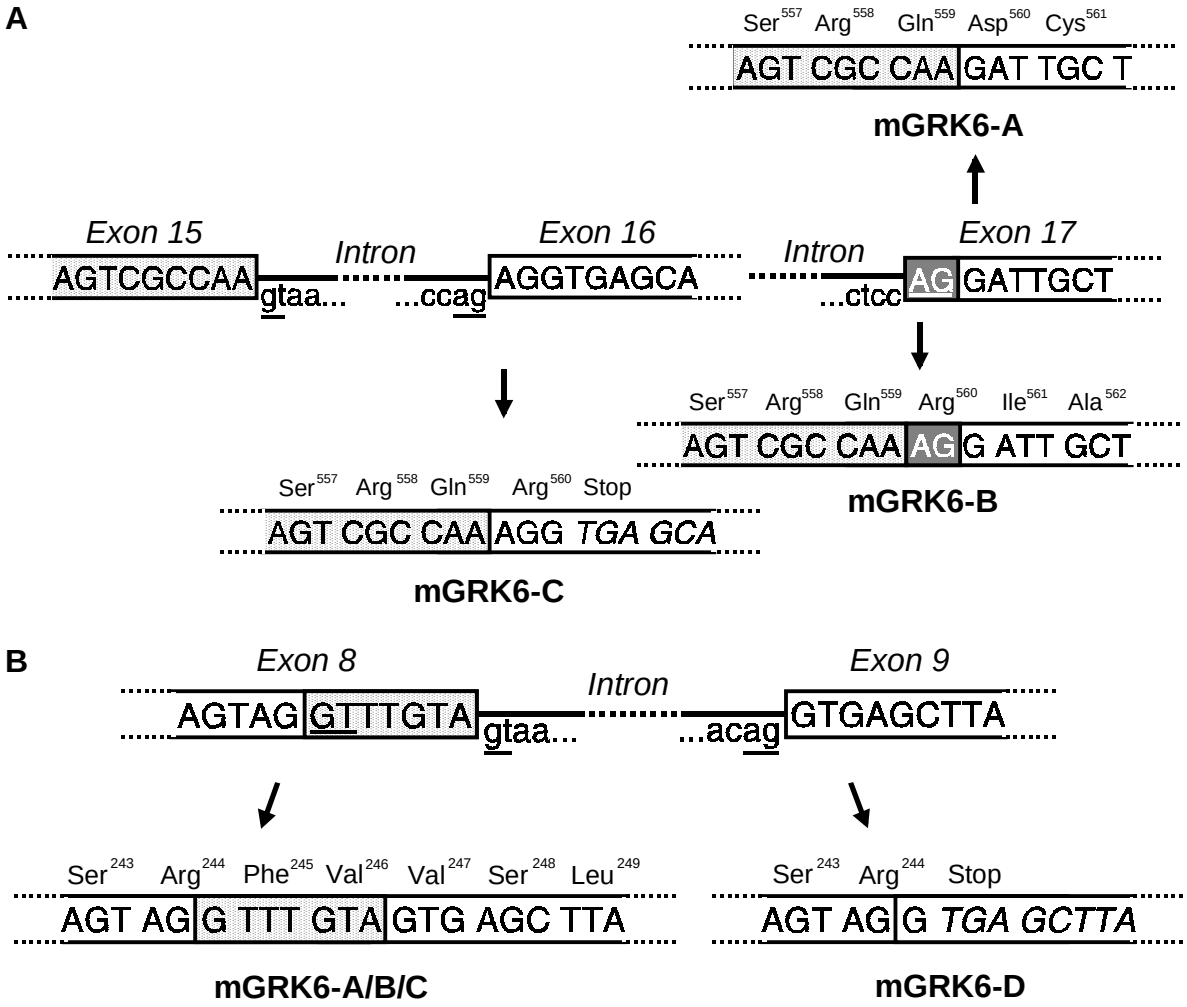


Abb. 11: Modell zur Bildung von vier Maus GRK6-Varianten durch alternatives Spleißen der RNA. Die Balken und horizontalen Linien repräsentieren die am alternativen Spleißen der mGRK6-hnRNA beteiligten Exons und Introns. Die Nukleotidsequenzen der Exon/Intron-Übergänge sind abgebildet. Die für die 5´- und 3´-Enden der Introns typischen GT- und AG-Dinukleotide sind unterstrichen. (**A**) Aus der mGRK6-hnRNA entstehen drei verschiedene mRNAs, die für mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C kodieren, durch Verwendung einer einzigen Spleißdonorstelle mit dem Konsensusdinukleotid GT am 3´-Ende von Exon 15 (hellgrau) und entweder Spleißakzeptorstellen mit dem Konsensusdinukleotid AG am 5´-Ende von Exon 16 (mGRK6-C) bzw. Exon 17 (mGRK6-A) oder einer atypischen Spleißakzeptorstelle am 5´-Ende von Exon 17 (dunkelgrau) (mGRK6-B). (**B**) Zwei Gruppen von mRNAs werden aus mGRK6-hnRNA gebildet, bestehend aus mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C auf der einen und mGRK6-D auf der anderen Seite. Der alternative Einsatz eines zweiten GT-Konsensusdinukleotids als Spleißdonorstelle am 3´-Ende von Exon 8 führt zu einer Deletion von sieben Nukleotiden (hellgrau) in der für mGRK6-D kodierenden mRNA und folglich zu einer Verschiebung des Leserahmens und einer vorzeitigen Termination bei Kodon 245.

Die Entstehung der Varianten mGRK6-A bis mGRK6-C kann durch alternative Verwendung der Konsensus-AG-Spleißakzeptorstelle an den 5´-Enden der Exons 17 (mGRK6-A) oder 16 (mGRK6-C) oder einer atypischen Spleißakzeptorstelle am 5´-Ende von Exon 17 (mGRK6-B) erklärt werden (s. Abb. 11A). Durch diesen Mechanismus kommt es in Kodon 560 zu einer Verschiebung des Leserahmens für die Translation, woraus die drei verschiedenen carboxyterminalen Enden der mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C resultieren. Die Bildung der mRNA für mGRK6-D ist auf die alternative Verwendung einer zweiten Spleißdonorstelle mit dem Konsensusdinukleotid GT am 3´-Ende von Exon 8 zurückzuführen (s. Abb. 11B). Diese Veränderung verursacht eine Deletion von sieben Nukleotiden im fertigen Transkript; ein Rasterschub und ein vorzeitiger Kettenabbruch bei Kodon 245 sind die Folge.

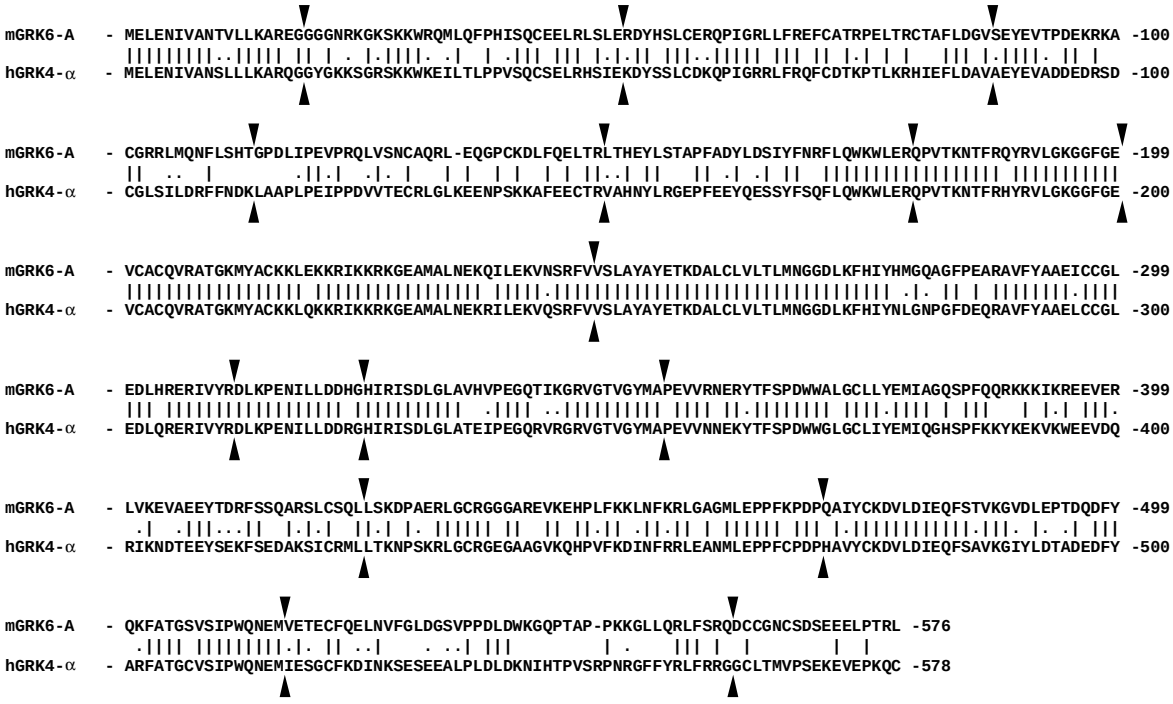


Abb. 12: Vergleich der Primärstruktur und der Exon/Exon-Übergänge zwischen mGRK6-A und humaner GRK4-α. Die Aminosäuresequenzen von mGRK6-A und humaner GRK4-α wurden mit Hilfe des im PC/GENE Softwarepaket enthaltenen PALIGN-Programms verglichen. Die Striche (-) wurden als Platzhalter eingeführt, um die Gegenüberstellung zu optimieren. Vertikale Linien repräsentieren identische Aminosäuren, Punkte zeigen ähnliche Aminosäuren innerhalb der beiden Sequenzen an. Als ähnliche Aminosäuren werden A, S, T; D, E; N, Q; R, K; I, L, V und F, Y, W bezeichnet. Die Lage der Exon/Exon-Übergänge innerhalb der zu vergleichenden Polypeptide ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die GRK-Familie kann entsprechend ihren Gemeinsamkeiten bezüglich der Primärstruktur in drei Subfamilien eingeteilt werden. GRK4, GRK5 und GRK6 gehören der gleichen Subfamilie an. Die bekannte Struktur des humanen GRK4-Gens (*humane GRK4*) und die Tatsache, dass aus diesem Gen ebenfalls vier verschiedene mRNAs durch alternative Spleißprozesse hervorgehen (Premont *et al.*, 1996), war ausschlaggebend für den Vergleich der genomischen Organisation zwischen *mGRK6* und *humaner GRK4*. Dazu wurden die Primärstrukturen und insbesondere die Exon/Exon-Übergänge der mGRK6-A und der humanen GRK4-α gegenübergestellt. Abbildung 12 zeigt die konservierte Lage der Exon/Exon-Übergänge innerhalb dieser beiden Sequenzen. Somit sind die Gene der mGRK6 und der humanen GRK4, was die Exon/Intron-Organisation anbelangt, konvergent. Die Mechanismen der alternativen RNA-Spleißvorgänge der humanen GRK4 sind allerdings nicht mit denen der mGRK6 zu vergleichen, da die vier GRK4-mRNAs durch An- oder Abwesenheit von Exon 2 und/oder Exon 15 gebildet werden.

4.2 mRNA-Expressionsanalysen

Um zu klären, wo und in welcher Menge die mRNA der mGRK6 exprimiert wird, wurden lymphatischen und nichtlymphatischen Gewebe der Maus im *Northern blot* untersucht (s. Abb. 13). Es konnte ein ungefähr 3.2 kb großes Transkript nachgewiesen werden, das vorwiegend in mesenteriellen Lymphknoten, in der Milz, in peripheren Lymphknoten, im Thymus und im Knochenmark exprimiert wurde. Nach längerer Exposition des Röntgenfilms mit dem *blot* konnte auch in Niere, Leber, Skelettmuskel, Lunge, Gehirn und Herz eine geringe Menge an mRNA-Transkripten gefunden werden (nicht abgebildet).

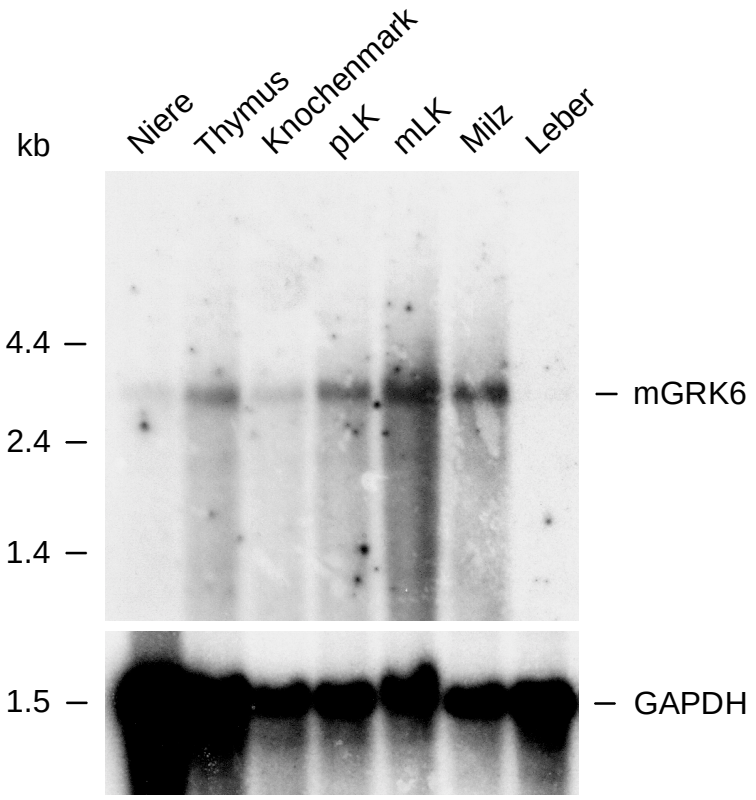


Abb. 13: *Northern blot*-Analyse der mGRK6-mRNA-Expression in Mausgeweben. Poly(A)$^+$-RNA wurde aus Niere, Thymus, Knochenmark, peripheren Lymphknoten (**pLK**), mesenteriellen Lymphknoten (**mLK**), Milz und Leber isoliert, durch Elektrophorese auf einem denaturierenden Formaldehyd-1 % (m/V) Agarosegel aufgetrennt (2 µg/ Spur), auf eine Nylonmembran transferiert und mit einem radioaktiv markierten cDNA-Fragment der mGRK6 (Nukleotide 18-1680) hybridisiert (**oben**). Um die Qualität der analysierten Poly(A)$^+$-RNA abzuschätzen, wurde der *blot* mit einem radioaktiv markierten cDNA-Fragment der mGAPDH (Nukleotide 232-589, EMBL Datenbank, Zugangsnummer M32599) hybridisiert (**unten**). Die Positionen der mGRK6- und GAPDH-mRNAs und des Größenstandards sind angegeben.

Da der *Northern blot* keine Aussage über das Expressionsmuster der einzelnen Spleißvarianten der mGRK6 erlaubt, wurden RT-PCR-Analysen mit Gesamt-RNA durchgeführt. Abbildung 8 stellt die dabei erhaltenen Ergebnisse dar. Die eingesetzten Oligonukleotid-*primer* waren komplementär zu dem 5´-Ende der kodierenden Sequenz aller vier mGRK6-mRNAs und zu den 3´-Enden der nichtkodierenden mRNA-Regionen von entweder mGRK6-A/B (Abb. 14, oben) oder mGRK6-C/D (Abb. 14, Mitte). Es zeigte sich, dass die mRNAs der mGRK6-Varianten differentiell in den Geweben der Maus exprimiert werden. RT-PCR-Produkte, die für mGRK6-A oder mGRK6-B kodierten, wurden in allen unter-

suchten Geweben nachgewiesen. Eine große Anzahl an Transkripten konnte sowohl in der Leber als auch in mesenteriellen und peripheren Lymphknoten detektiert werden, gefolgt von geringeren Transkriptmengen in Knochenmark, Niere, Lunge und Thymus (Abb. 14, oben). Für mGRK6-C oder mGRK6-D kodierende RT-PCR-Produkte waren im Gegensatz dazu nur in der Milz und in mesenteriellen und peripheren Lymphknoten vorhanden (Abb. 14, Mitte). Erst nach einer zweiten PCR konnten auch in den RNA-Proben aus Lunge, Leber, Knochenmark, Thymus und Niere wenige Transkripte von mGRK6-C und mGRK6-D gefunden werden (nicht abgebildet).

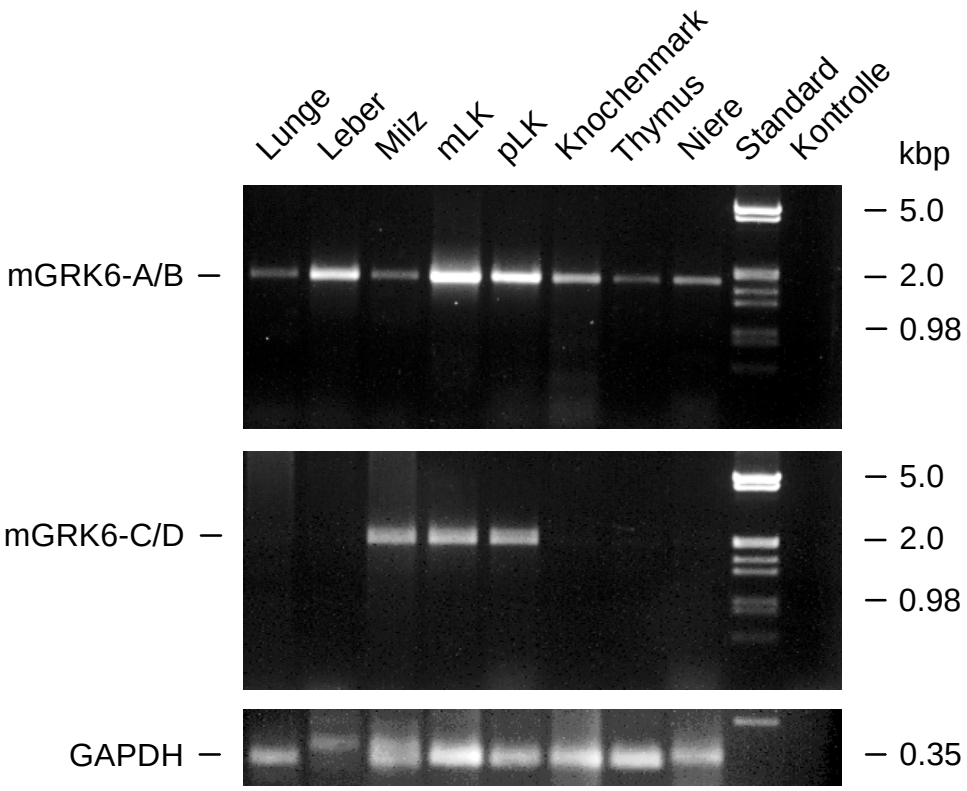


Abb. 14: RT-PCR-Analyse der mGRK6-mRNA-Expression in Mausgeweben. Gesamt-RNA wurde aus Lunge, Leber, Milz, mesenteriellen Lymphknoten (**mLK**), peripheren Lymphknoten (**pLK**), Knochenmark, Thymus und Niere isoliert und als Matrize für RT-PCR-Experimente mit für mGRK6-A/B (*primer*-Paar A1/P3a) (**oben**), mGRK6-C/D (*primer*-Paar A1/P3b) (**Mitte**) oder GAPDH (**unten**) spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt. Die amplifizierten DNA-Fragmente und die Größenstandards (**Standard**) wurden durch Elektrophorese auf einem 1% (m/V) Agarosegel aufgetrennt und über Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Ansätze ohne einzelsträngige cDNA als Matrize wurden als Negativkontrolle eingesetzt (**Kontrolle**). Die Positionen der RT-PCR-Produkte und einiger Größenstandards sind gekennzeichnet.

RT-PCR-Experimente ließen nicht zu, zwischen den Varianten mGRK6-A und mGRK6-B bzw. zwischen den Varianten mGRK6-C und mGRK6-D zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurden *single nucleotide primer extension* (SNuPE)-Experimente durchgeführt. Diese ermöglichten, zu bestimmen, mit welcher relativen Häufigkeit die mRNA der mGRK6-A gegenüber der mGRK6-B (Abb. 16A) bzw. die mRNA der mGRK6-C gegenüber der mGRK6-D (Abb. 16B) in den Geweben gefunden werden konnte, die bereits in RT-PCR-Analysen (s. Abb. 14) positiv bezüglich des Vorkommens der jeweiligen mGRK6-Spleißvariante bewertet worden waren. Der Versuchsansatz der SNuPE-Experimente ist am Beispiel von mGRK6-A und mGRK6-B in Abbildung 15 dargestellt.

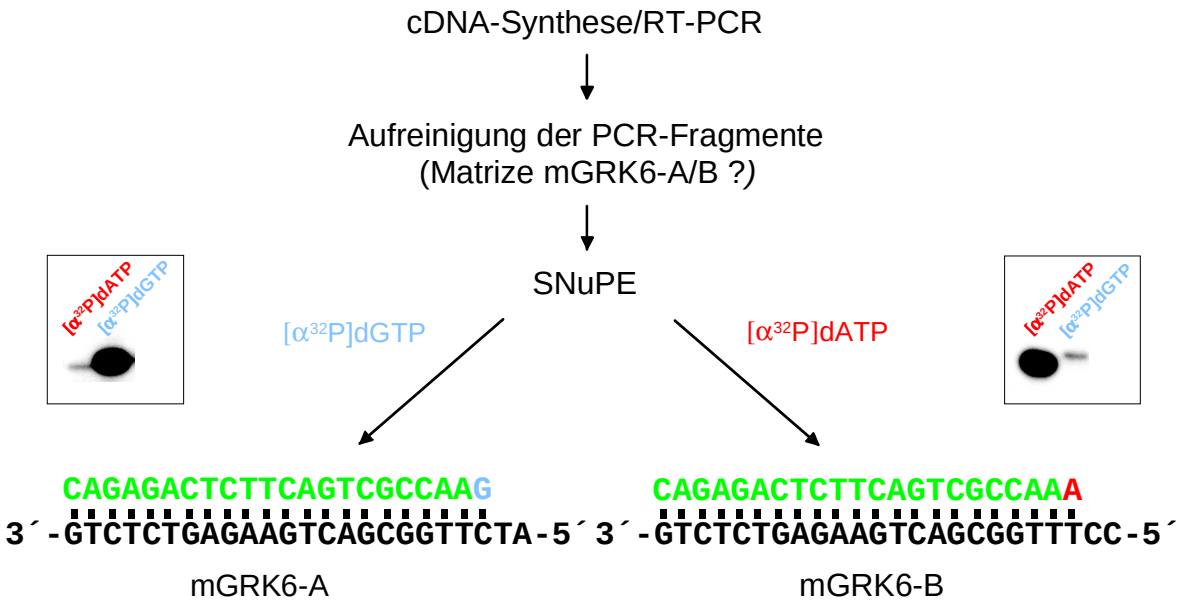


Abb. 15: Schematische Darstellung der *single nucleotide primer extension*-Experimente am Beispiel der *splice*-Varianten mGRK6-A und -B. Als Vorlage dienten die mittels RT-PCR amplifizierten DNA-Fragmente mGRK6-A/B (RT-PCR mit *primer* A1, *sense* und *primer* P3a, *anti-sense*) aus den einzelnen Geweben der Maus, die über ein Agarosegel aufgereinigt wurden. Der eingesetzte SNuPE-*primer* mGRK6-A/B war so konstruiert, dass er an die letzten noch identischen Basen (Exon 14) der zu unterscheidenden Varianten mGRK6-A und -B binden konnte. Als Nukleotide wurden entweder [α–^{32}P]dGTP oder [α–^{32}P]dATP eingesetzt. War in einem Gewebe die Variante mGRK6-A vorhanden, wurde in dem folgenden PCR-Zyklus radioaktiv markiertes Guanin eingebaut; im Falle von Variante mGRK6-B radioaktiv markiertes Adenin. Die erhaltenen radioaktiv markierten Oligonukleotide entsprachen den in den Geweben vorhandenen mRNAs der mGRK6-Varianten.

Die Ergebnissen der SNuPE-Analysen sind aus Abbildung 16 ersichtlich.

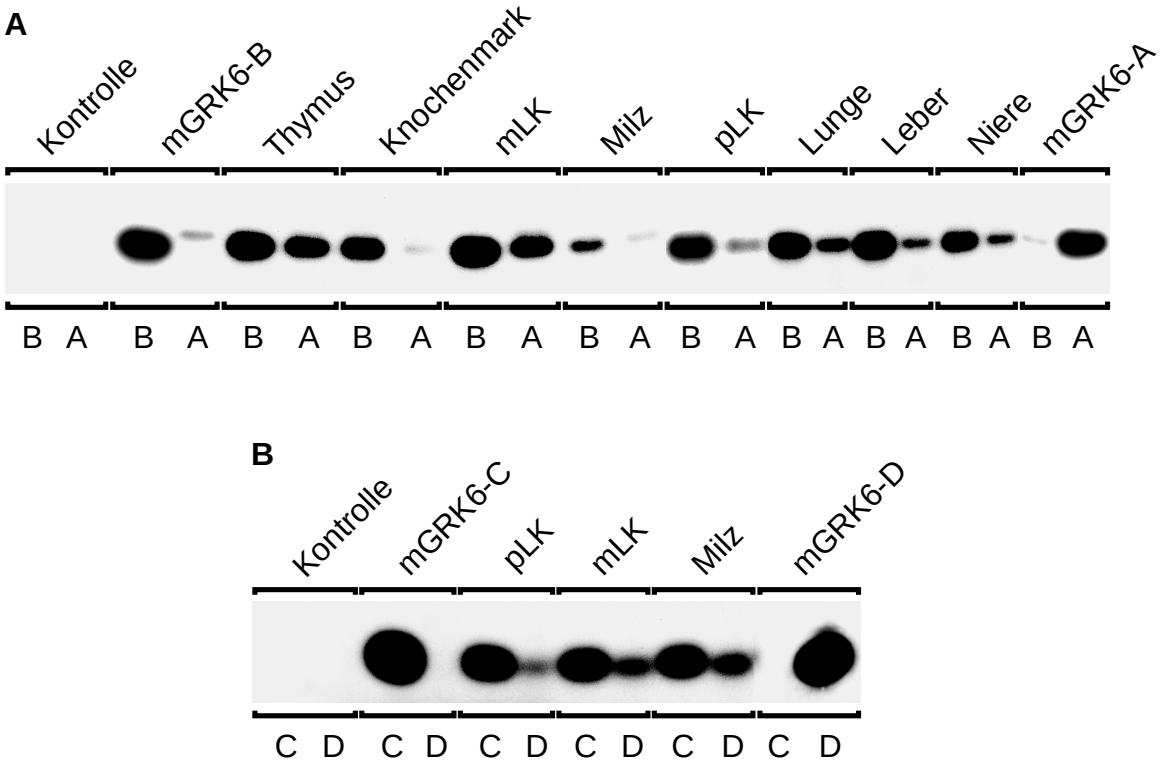


Abb. 16: Bestimmung der mGRK6-mRNA-Expression in Mausgeweben durch *single nucleotide primer extension*. Gesamt-RNA wurde aus Thymus, Knochenmark, mesenteriellen Lymphknoten (**mLK**), Milz, peripheren Lymphknoten (**pLK**), Lunge, Leber und Niere (**A**) oder aus peripheren Lymphknoten (**pLK**), mesenteriellen Lymphknoten (**mLK**) und Milz (**B**) isoliert und als Matrize für RT-PCR-Experimente eingesetzt, die mit für mGRK6-A/B (A) oder mGRK6-C/D (B) spezifischen *primern* durchgeführt wurde (vgl. Abb. 14). Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem 1 % (m/V) Agarosegel extrahiert und als Matrize (20 ng/Reaktion) in die SNuPE-Reaktionen eingesetzt. Die einzelnen Oligonukleotid-*primer* banden an die letzten noch identischen Nukleotide der zu unterscheidenden Varianten mGRK6-A und mGRK6-B (SNuPE-*primer* A/B, Nukleotide 1679-1699) (**A**) oder mGRK6-C und mGRK6-D (SNuPE-*primer* C/D, Nukleotide 735-755) (**B**) und wurden in Anwesenheit von [α-^{32}P]dGTP oder [α-^{32}P]dATP (**A**) oder in Anwesenheit von [α-^{32}P]dTTP oder [α-^{32}P]dGTP (**B**) durch ein Nukleotid verlängert. Dabei wurden radioaktiv markierte Oligonukleotide erhalten, die der mRNA von mGRK6-A oder mGRK6-B (**A**) oder von mGRK6-C oder mGRK6-D (**B**) entsprachen. Als Negativkontrollen wurden Ansätze ohne cDNA-Matrize (**Kontrolle**), als Positivkontrollen Ansätze mit mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C oder mGRK6-D (50 ng/Reaktion) verwendet.

In den Untersuchungen mittels SNuPE waren Transkripte der mGRK6-B generell häufiger vertreten als mGRK6-A-Transkripte (Abb. 16A). Diese Unterschiede in der Zahl der Transkripte traten besonders deutlich im Knochenmark, in der Milz und in peripheren Lymphknoten zutage. In den anderen Geweben wie der Leber, der Niere, der Lunge, den mesenteriellen Lymphknoten und dem Thymus nahm der mRNA-Anteil an mGRK6-A etwas zu, die Menge an mGRK6-B-Transkript überwog aber immer noch. Abbildung 16 B zeigt, dass mRNA beider Varianten mGRK6-C und mGRK6-D in peripheren und mesenteriellen Lymphknoten und in der Milz detektiert werden konnte, wobei die mGRK6-C in allen drei Geweben stärker exprimiert war als die mGRK6-C.

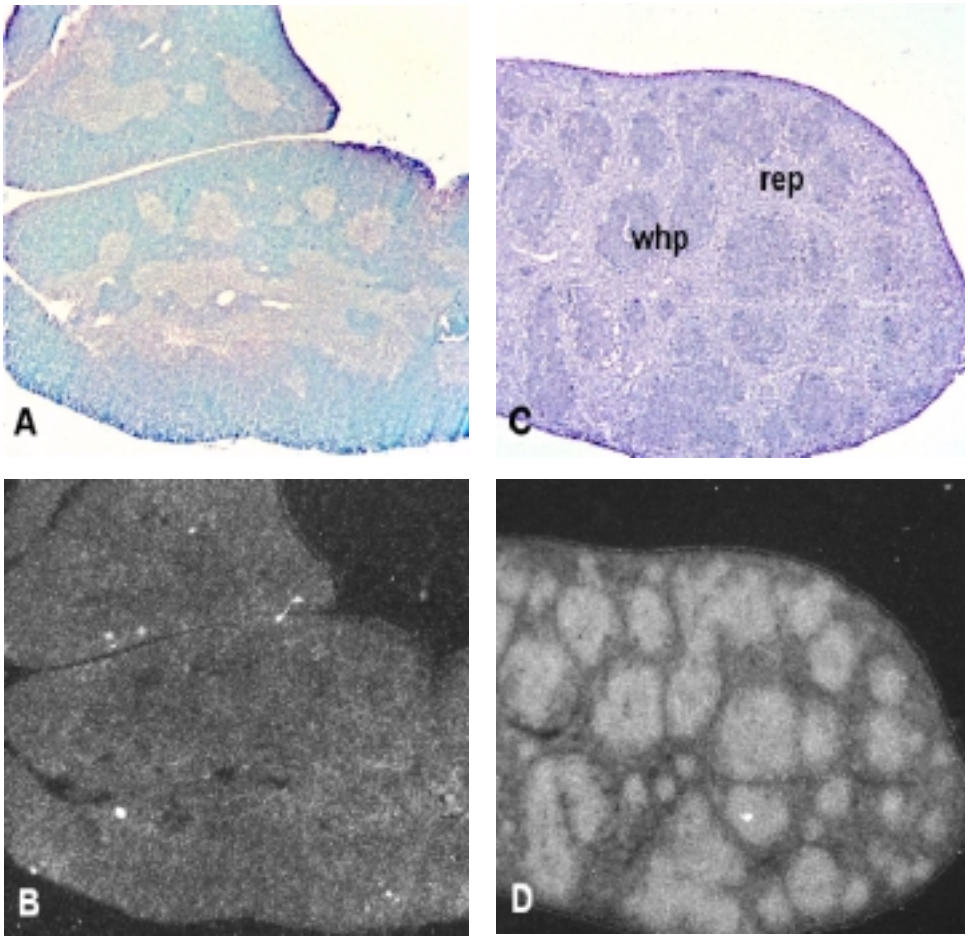


Abb. 17: Lokalisation von mGRK6-Transkripten in Thymus- und Milzgewebe adulter Mäuse durch RNA *in situ*-Hybridisierung. Mit [α-^{35}S]UTP markierte *antisense*-RNA der mGRK6-C wurde mit Gewebeschnitten von Thymus (**A**, **B**) und Milz (**C**, **D**) der adulten Maus hybridisiert. Die Schnitte wurden nach dreiwöchiger Beschichtung mit Fotoemulsion in Giemsa gefärbt und die Bilder mit einer digitalen Kamera im Hell- (**A**, **C**) und Dunkelfeld (**B**, **D**) aufgenommen. In der Milz sind rote (**rep**) und weiße Pulpa (**whp**) gekennzeichnet.

In den mRNA-Expressionsanalysen wie *Northern blot*, RT-PCR und SNuPE hatte sich gezeigt, dass Transkripte der mGRK6 hauptsächlich in lymphatischen Geweben vorkamen. Um Aussagen über eine genauere räumliche Lokalisation der mRNA-Expression machen zu können, wurden Thymus und Milz einer adulten Maus mit Hilfe der RNA *in situ*-Hybridisierung untersucht (Abb. 17). Die Gewebeschnitte wurden vor den Aufnahmen mit Giemsa gefärbt, wobei Kerne violett, Zytoplasma blau und Erythrozyten rosa sichtbar werden. Die Hellfeldaufnahme des Gewebeschnittes des Thymus (Abb. 17A) zeigte den bläulich gefärbten Cortex mit unreifen, noch proliferierenden Thymozyten und die leicht violett scheinende Medulla, in der sich v. a. die reifen Thymozyten befinden. Die Dunkelfeldaufnahme des Thymusgewebeschnittes (Abb. 17B) ließ keine deutlich abgegrenzten Signale, sondern eine diffuse Streuung der mGRK6-Transkripte erkennen, die Rezeptorkinase-mRNA war im gesamten Thymus exprimiert. In der Hellfeldaufnahme des Gewebeschnittes der Milz (Abb. 17C) konnten zwei Gewebetypen unterschieden werden, die rote und die weiße Pulpa. Während die rote Pulpa hauptsächlich für den Abbau gealterter Erythrozyten und Plättchen verantwortlich ist, kommt der weißen Pulpa eine Bedeutung in der antigeninduzierten Differenzierung und Proliferation von B- und T-Lymphozyten zu. Hybridisierungssignale der radioaktiv markierten *antisense*-RNA der mGRK6-C waren im Dunkelfeld ausschließlich in der aus lymphatischem Gewebe bestehenden weißen Pulpa sichtbar (Abb. 17D). Die zur Kontrolle ebenfalls mit Thymus- und Milzgewebeschnitten hybridisierte *sense*-RNA der mGRK6-C lieferte keinerlei Hybridisierungssignale (nicht abgebildet), womit von einer spezifischen Bindung der *antisense*-RNA an die Transkripte ausgegangen werden konnte.

Neben der Expression der mGRK6 in Geweben adulter Mäuse war auch das Expressionsmuster der mGRK6 im Verlauf der Embryogenese der Maus von Interesse. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Entwicklung des lymphatischen Systems. Als geeignete Methode bot sich auch hier die RNA *in situ*-Hybridisierung an Mausembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien an. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der RNA *in situ*-Hybridisierung dargestellt. Bereits in Stadium 9.5 (nicht abgebildet), d. h. in der frühen Organogenese, fanden sich mRNA-Transkripte der mGRK6 in der Leber, in verschiedenen Gehirnabschnitten wie Mesencephalon und Telencephalon und in der Mandibula. In Stadium 12.5 konnte die mGRK6 in vielen Geweben lokalisiert werden: in der Lunge, der Leber, dem Telencephalon und dem Darm (Abb. 18A, B). Dieses Verteilungsmuster der

mRNA blieb bis zum Ende der Organogenese in Stadium 14.5 erhalten (Abb. 18C, D). Neben Transkripten in Lunge, Leber und Telencephalon konnte mRNA in der Niere, im Thymus, in der Unterkieferspeicheldrüse und in den Zahnanlagen detektiert werden. In Stadium 17.5 (Abb. 18 E, F), also kurz vor der Geburt (Stadium 19.5), war die mRNA der mGRK6 besonders stark im Thymus exprimiert. Des Weiteren fand sich mRNA in der Lunge, der Leber, dem Telencephalon, dem braunen Fettgewebe und in den Proliferationszonen von Niere, Darm und Blase.

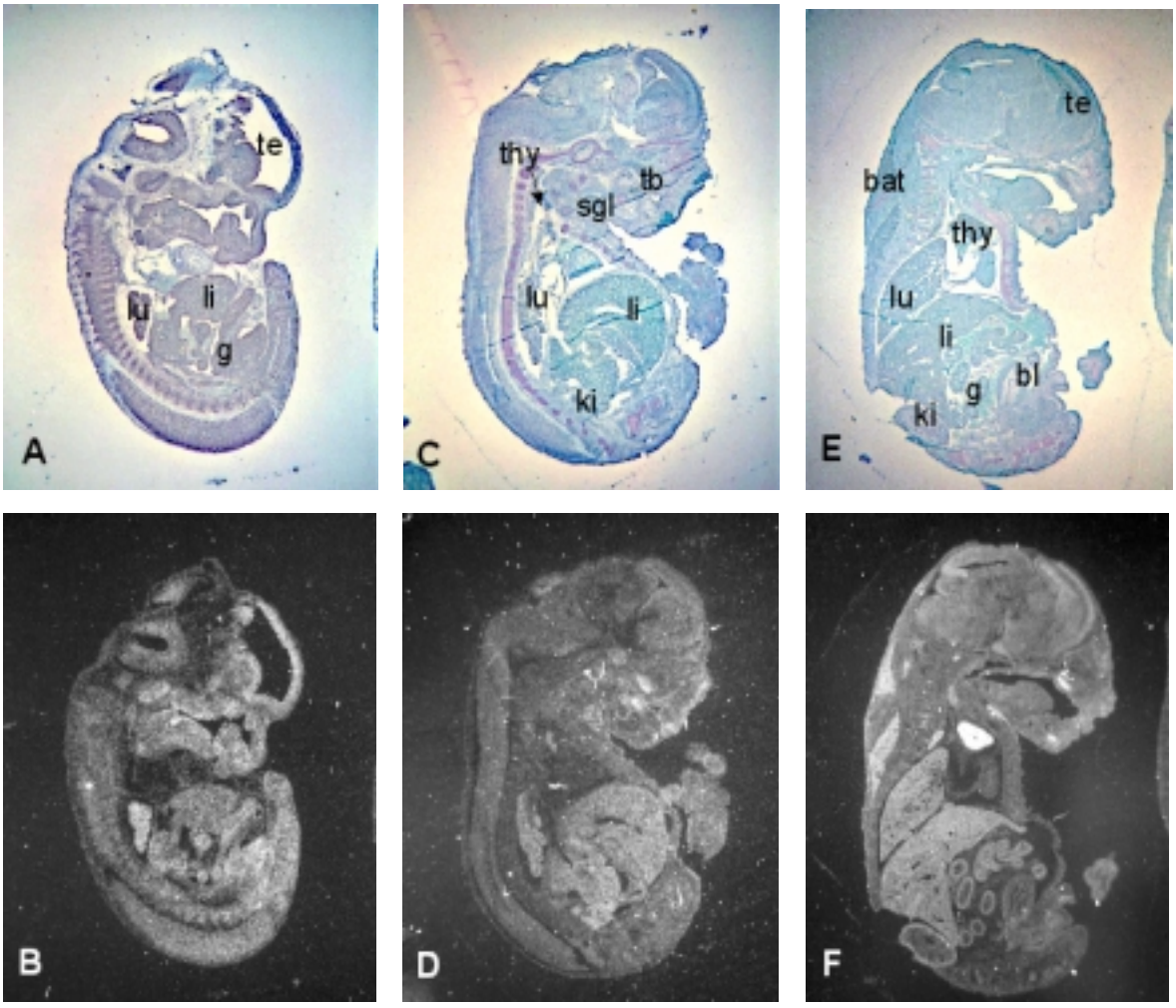


Abb. 18: Lokalisation von mGRK6-Transkripten in Mausembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien durch RNA *in situ*-Hybridisierung. Mit [α-^{35}S]UTP markierte *antisense*-RNA der mGRK6-C wurde mit Schnitten von Mausembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien (**A**, **B**: Stadium 12.5; **C**, **D**: Stadium 14.5; **E**, **F**: Stadium 17.5) hybridisiert. Die Schnitte wurden nach dreiwöchiger Beschichtung mit Fotoemulsion in Giemsa gefärbt und mit einer digitalen Kamera im Hell- (**A**, **C**, **E**) und Dunkelfeld (**B**, **D**, **F**) aufgenommen. Die Gewebe sind beschriftet mit **bat**, braunes Fettgewebe; **bl**, Blase; **g**, Darm; **ki**, Niere; **li**, Leber; **lu**, Lunge; **sgl**, Unterzungenspeicheldrüse; **tb**, Zahnanlagen; **te**, Telencephalon und **thy**, Thymus.

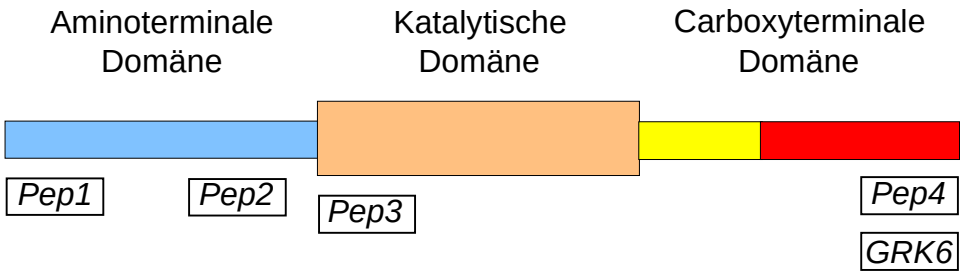
Die mRNA-Transkripte der mGRK6 konnten meist in proliferierenden Bereichen detektiert werden: beispielsweise entwickelt sich im Bereich der Unterzungenspeicheldrüse Drüsengewebe. Auffällig war die in allen untersuchten Entwicklungsstadien vorhandene Expression der mGRK6 in der Leber, der Lunge und dem Telencephalon und die deutliche Lokalisation von mGRK6-Transkripten im Thymus. Fötale Leber und Thymus spielen bei Säugern eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen und Thymozyten. Die mRNA-Expression der mGRK6 konnte somit bereits während der Bildung des lymphatischen Systems im Embryo und darüber hinaus in adulten lymphatischen Geweben der Maus nachgewiesen werden.

4.3 Analyse der Proteinexpression

Die Anzahl der mRNA-Transkripte muss nicht zwangsläufig die Quantität der translatierten Proteine widerspiegeln. Neben spezifischen intrinsischen Nukleotidsequenzen, z. B. den *AU-rich elements* (AREs), und RNA-bindenden Proteinen können entwicklungsbedingte Faktoren und Umwelteinflüsse wie Zytokine, Hormone, Temperaturschwankungen und virale Infektionen die Stabilität der mRNA bestimmen (Day und Tuite, 1998). Um festzustellen, ob eine Korrelation zwischen dem mRNA-Expressionsmuster von *mGRK6* und der Proteinenexpression bestand, mussten die Polypeptide der verschiedenen mGRK6-Varianten in Geweben der Maus nachgewiesen werden. Der Nachweis sollte mit Hilfe der *Western blot*-Technik erfolgen. Der einzige kommerziell erhältliche Antikörper war gegen die humane GRK6 gerichtet und konnte laut Herstellerangaben u. a. mit dem murinen Äquivalent der GRK6 kreuzreagieren. Um auch die Expression der anderen Proteinvarianten der mGRK6 untersuchen zu können, wurden vier verschiedene polyklonale Antikörper hergestellt, die gegen synthetische Peptide gerichtet waren. Die Peptidsequenz und die Lage der Peptide innerhalb des mGRK6-Polypeptids sind Abbildung 19 zu entnehmen.

Die Peptide 1, 2 und 3 entsprechen Aminosäuresequenzabschnitten des Aminoterminus und des N-terminalen Bereiches der katalytischen Domäne der mGRK6. Da die vier Proteine mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C und mGRK6-D bis Aminosäure 244 identisch sind (vgl. Abb. 11B), sollten die gegen die Peptide 1, 2 und 3 gerichteten Antikörper alle vier Proteinvarianten der mGRK6 erkennen können. Die letzten 29 Aminosäuren des Carboxyterminus der mGRK6-B sind für die B-Variante charakteristisch (vgl. Abb. 32). Das

Peptid 4 repräsentiert das in diesem Bereich lokalisierte Epitop für den mGRK6-B-spezifischen Antikörper. Die Erkennungssequenz (Aminosäuren 557-576) des bereits erwähnten käuflichen, für mGRK6-A spezifischen polyklonalen Antikörpers ist mit GRK6 bezeichnet. Es war nicht möglich, einen Antikörper herzustellen, der ausschließlich mit der 560 Aminosäuren langen mGRK6-C reagieren konnte, da die Varianten mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C bis zu der Aminosäure in Position 559 identisch sind (vgl. Abb. 11A).



Pep1 = AS 17 - 31: H_2N - EGG GGN RKG KSK KWR C - $CONH_2$
Pep2 = AS 87 - 101: H_2N - VSE YEV TPD EKR KAC - $CONH_2$
Pep3 = AS 214 - 228: H_2N - CKK LEK KRI KKR KGE - $CONH_2$
Pep4 = AS 574 - 589: H_2N - CPP ASS PQA EAP TGG WR - COOH

Abb. 19: Lokalisation und Aminosäuresequenz der synthetischen Peptide zur Herstellung polyklonaler Antikörper. Die Lage der mit Pep1, Pep2, Pep3, Pep4 und GRK6 bezeichneten Peptide innerhalb des mGRK6-Polypeptids und die Aminosäuresequenz der für die Immunisierung von Kaninchen synthetisierten Peptide Pep1, Pep2, Pep3 und Pep4 sind dargestellt.

Mit Hilfe der Antiseren war es möglich, die Proteinexpression der mGRK6-Varianten im *Western blot* zu untersuchen (Abb. 20). Der Immunoblot mit dem für die mGRK6-A spezifischen Antikörper (Abb. 20, oben) zeigte, dass die 66 kD große Variante A in den partikulären Fraktionen von Mausgewebe aus Milz, mesenteriellen und peripheren Lymphknoten, Thymus und Gehirn vorhanden war. In Milz- und Lymphknotengewebe war in der partikulären Fraktion eine Doppelbande zu erkennen, die auf unterschiedlich modifizierte Formen der mGRK6-A zurückgeführt werden könnte. In den löslichen Fraktionen aus Lungen-, Herz-, Thymus-, mesenteriellem Lymphknoten- und Milzgewebe reagierte der

Antikörper mit einem Protein von etwa 57 kD, bei dem es sich möglicherweise um eine aminoterminal degradierte Form der mGRK6-A handelt.

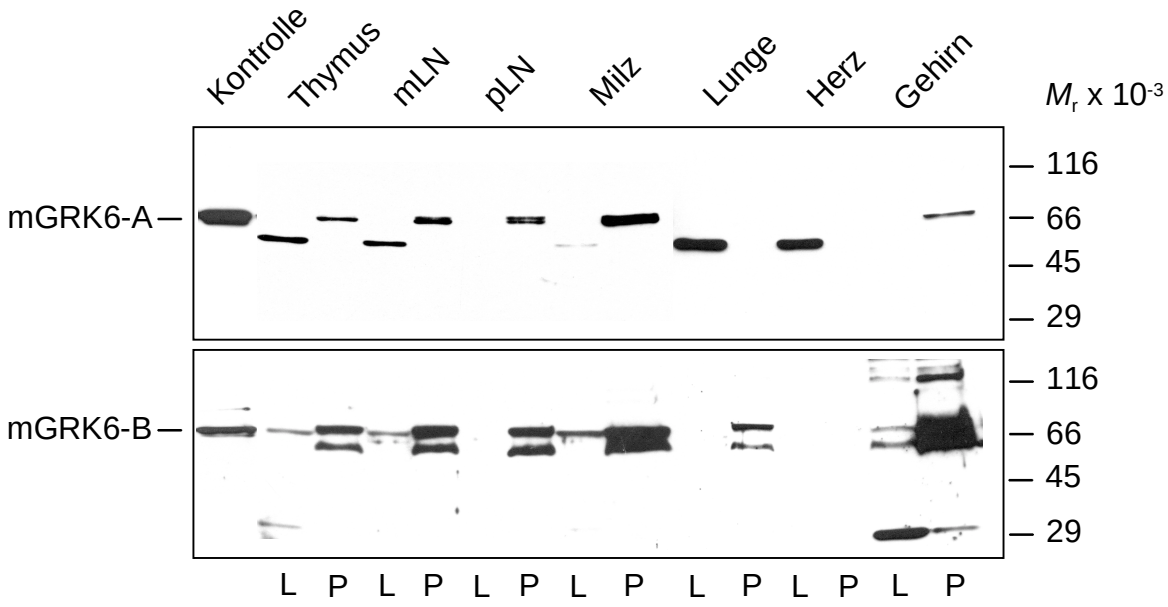


Abb. 20: Proteinexpression der mGRK6-A und mGRK6-B in verschiedenen Mausgeweben. Aus Thymus, mesenteriellen Lymphknoten (**mLK**), peripheren Lymphknoten (**pLK**), Milz, Lunge, Herz und Gehirn wurde Gesamtprotein isoliert, durch Zentrifugation in eine lösliche (**L**) und eine partikuläre Fraktion (**P**) separiert, mittels 10 % (m/V) SDS-PAGE aufgetrennt (50µg/Spur), auf Nitrozellulosemembranen transferriert und mit spezifischen Antikörpern gegen mGRK6-A (**oben**) oder mGRK6-B (**unten**) detektiert. Als Positivkontrolle (**Kontrolle**) diente rekombinant in Baculovirus-infizierten Insektenzellen hergestellte mGRK6-A (**oben**) oder mGRK6-B (**unten**) (vgl. Abb. 22). Die Lage des Molekulargewichtsstandards ist angegeben.

Der affinitätschromatographisch über eine Protein A-Sepharose-Säule aus dem mGRK6-B-spezifischen Antiserum gereinigte Antikörper erkannte im Immunoblot (Abb. 20, unten) in den partikulären Fraktionen des Gehirns, der Milz, der mesenteriellen und peripheren Lymphknoten, des Thymus und der Lunge neben der Variante B mit einer Größe von 67 kD ein etwas kleineres Protein (*ca.* 62 kD). Dieses Protein könnte eine aminoterminal degradierte Form der mGRK6-B reflektieren, da das Epitop des Antikörpers im Carboxyterminus der B-Variante lokalisiert ist. Die löslichen Fraktionen von Gewebe aus der Milz, dem Gehirn, den mesenteriellen Lymphknoten und dem Thymus enthielten ebenso wie die partikulären Fraktionen die mGRK6-B, die in der löslichen Fraktion aber ein geringeres Molekulargewicht zu besitzen schien. Verschiedene posttranslationale Modifikationszu-

stände, die diesen Größenunterschied erklären könnten, wären auch für die Variante mGRK6-B denkbar. Parallel zu den in Abbildung 14 dargestellten Immunoblots wurden gleich beladene Nitrozellulosemembranen mit dem Präimmunserum des anschließend mit synthetischem Peptid Pep 4 (vgl. Abb. 19) immunisierten Kaninchens inkubiert (nicht abgebildet). Auf diesen Immunoblots war selbst bei längerer Exposition des Röntgenfilms keine Schwärzung im Größenordnungsbereich der mGRK6 sichtbar. Außerdem konnte der Anti-Pep4-Antikörper nach Vorinkubation mit dem synthetischen Peptid Pep4 im *Western blot* kein Protein detektieren. Bei den Reaktionen des mGRK6-B-Antikörpers musste es sich demnach um spezifische Signale handeln.

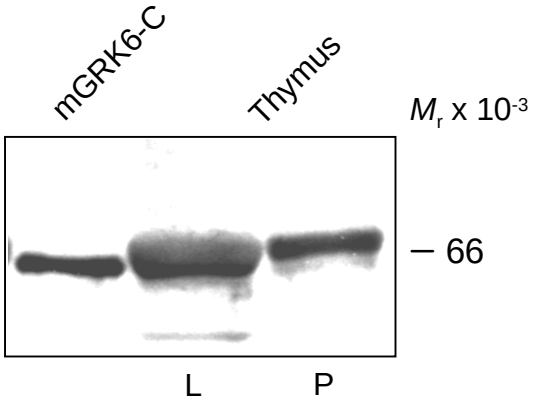


Abb. 21: Proteinexpression der mGRK6-C in Thymusgewebe der Maus. Aus Mausthymus wurde Gesamtprotein isoliert, durch Zentrifugation in eine lösliche (**L**) und eine partikuläre Fraktion (**P**) separiert, mittels 10 % (m/V) SDS-PAGE aufgetrennt (50µg/Spur), auf Nitrozellulosemembranen transferriert und mit einem Antikörpern gegen das Peptid Pep 1 (vgl. Abb. 19) detektiert. Als Positivkontrolle diente rekombinant in Baculovirus-infizierten Insektenzellen hergestellte mGRK6-C (vgl. Abb. 22). Die Position des Molekulargewichtsstandards ist angegeben.

In Abbildung 21 ist der Nachweis der Variante C in Thymusgewebe der Maus dargestellt. Der Anti-Pep1-Antikörper (vgl. Abb. 19) erkannte in der partikulären Fraktion die mit den spezifischen mGRK6-A-und mGRK6-B-Antikörpern bereits identifizierten Proteinvarianten mGRK6-A und mGRK6-B. In der löslichen Fraktion konnte der eingesetzte Antikörper neben der im oberen Teil der Bande enthaltenen und im Immunoblot mit dem spezifischen Antikörper schon nachgewiesenen (vgl. Abb. 20) mGRK6-B die dritte Variante, die mGRK6-C, im unteren Bereich des Signals detektieren. Die mit der rekombinanten mGRK6-C (64 kD) vergleichbare Größe des die mGRK6-C repräsentierenden Signals

sprach zudem für diese Zuordnung. Mit Hilfe der Antikörper konnte eine differentielle Expression der Proteine mGRK6-A, -B und -C in vorwiegend lymphatischen Geweben der Maus festgestellt werden. Es war allerdings nicht möglich, die D-Variante der mGRK6 als Protein zu identifizieren.

4.4 Expression und Charakterisierung rekombinant hergestellter Proteine der mGRK6

Das Auftreten von Proteinen der mGRK6-Varianten in verschiedenen Geweben der Maus warf die Frage auf, ob die mGRK6-Proteine neben der unterschiedlichen Lokalisation auch bezüglich der katalytischen Aktivität variieren. Dazu wurden die vier Varianten zunächst mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems in *Sf*9-Insektenzellen exprimiert und die rekombinanten Proteine anschließend mit Hilfe biochemischer Methoden charakterisiert. Um die Proteine mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C und mGRK6-D in *Sf*9-Zellen produzieren zu können, mussten die für diese Polypeptide kodierenden cDNAs in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 kloniert werden. Die aus der Thymus-cDNA-Bank vollständig isolierte und in den Vektor pBluescript™ II SK(-) klonierte cDNA der mGRK6-B (vgl. Abb. 7) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Apa*I geschnitten. Das dabei erhaltene 2184 bp große und für die mGRK6-B kodierende cDNA-Fragment wurde in einem 1 % (m/V) Agarosegel elektrophoretisch von der Vektor-DNA getrennt und aus dem Gel extrahiert. Nach erfolgter Auffüllreaktion der 5´-Überhänge des cDNA-Fragments der mGRK6-B wurde dieses in einen mit der Endonuklease *Sma*I linearisierten und mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierten Vektor pVL1393 kloniert. Da die mGRK6-D aus der Thymus-cDNA-Bank nur partiell (ab Kodon 11) isoliert werden konnte, wurde diese Variante zusammen mit den Varianten mGRK6-A und mGRK6-C durch RT-PCR aus mesenteriellen Lymphknoten amplifiziert und in pBluescript™ II SK(-) kloniert. Die mGRK6-D-cDNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III aus dem Konstukt pBluescript™ II SK(-)/mGRK6-D herausgeschnitten und in den vorbereiteten (s. mGRK6-B) pVL1393 ligiert. Aus den Konstrukten pBluescript™ II SK(-)/mGRK6-A bzw. pBluescript™ II SK(-)/mGRK6-C wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III (mGRK6-A) bzw. *Xba*I und *Sal*I (mGRK6-C) ein 1790 bp (mGRK6-A) bzw. ein 1763 bp (mGRK6-C) großes cDNA-Fragment der mGRK6-A bzw. der mGRK6-C herausgeschnit-

ten und nach Extraktion aus dem 1 % (m/V) Agarosegel analog dem mGRK6-B-Fragment in den linearisierten dephosphorylierten pVL1393 kloniert. Alle pVL1393/mGRK6-Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung kontrolliert.

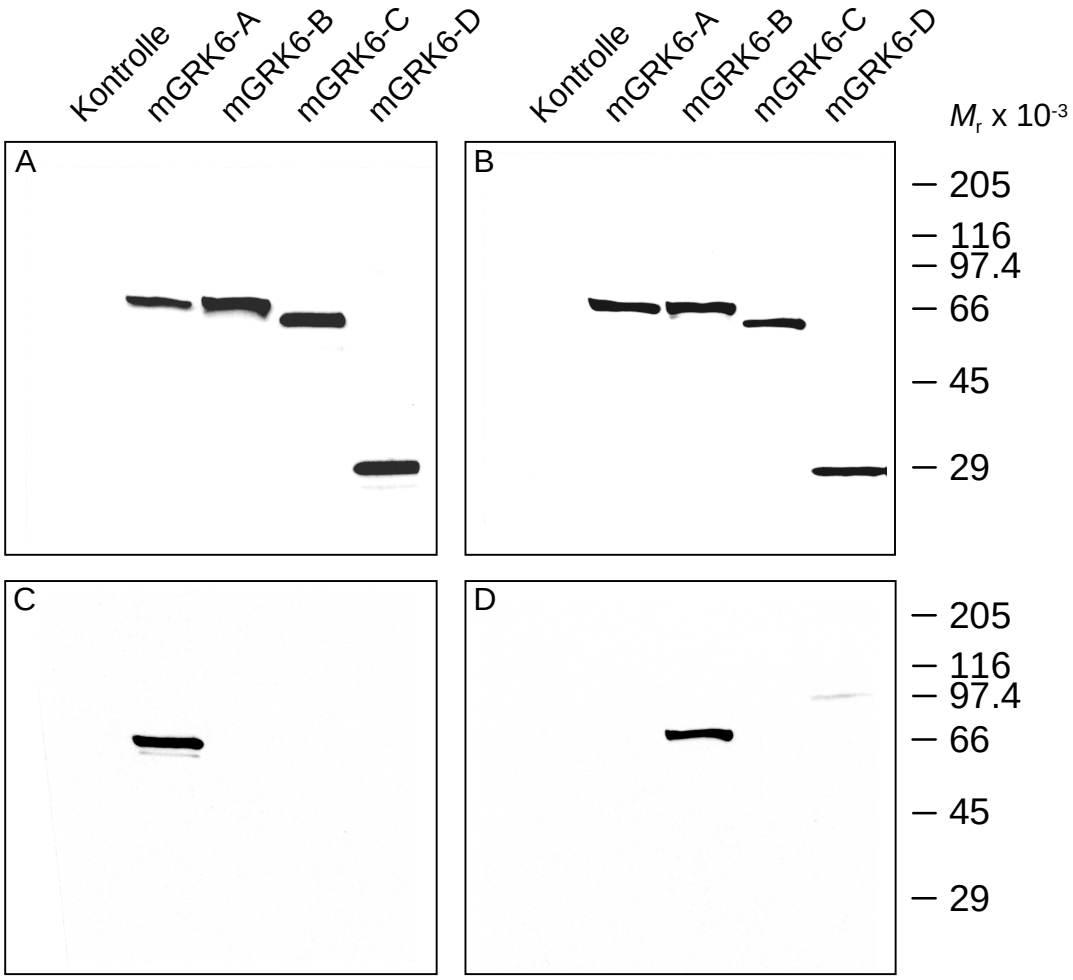


Abb. 22: Nachweis der in *Sf*9-Insektenzellen rekombinant hergestellten Proteine mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C und mGRK6-D im *Western blot*. Die Zellen wurden 48 h nach Infektion geerntet und aufgearbeitet. Die in den 300.000 *g*-Überständen enthaltenen Proteine mGRK6-A (9 µg Gesamtprotein/Spur), mGRK6-B (13 µg Gesamtprotein/Spur), mGRK6-C (4 µg Gesamtprotein/Spur) und mGRK6D (45 µg Gesamtprotein/Spur) wurden mittels 10 % (m/V) SDS-PAGE separiert, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit den Antikörpern Anti-Pep1 (**A**), Anti-Pep2 (**B**), Anti-GRK6 (**C**) und Anti-Pep4 (**D**) detektiert. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte *Sf*9-Zellen verwendet. Die Position des Molekulargewichtsstandards ist angegeben.

Zur Herstellung der Baculoviren wurden *Sf*9-Zellen mit den Konstrukten in Anwesenheit von Baculovirus-DNA transfiziert und die Baculoviren bis zu einem geeigneten Titer am-

plifiziert. Eine optimale Expression der rekombinanten Polypeptide mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C und mGRK6-D in infizierten Insektenzellen konnte 48 h nach Infektion mit den entsprechenden Baculoviren beobachtet werden. Die Insektenzellen wurden in Anwesenheit von 250 mM NaCl mit Lysepuffer I aufgeschlossen. Bei dieser Salzkonzentration war es möglich, den Teil der über hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran haftenden überexprimierten Rezeptorkinasen abzulösen. Die in den löslichen Fraktionen (300.000 *g*-Überstand) der infizierten Zellen enthaltenen mGRK6-Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 10 % (m/V) SDS-Polyacrylamidgel auf Nitrozellulose transferiert und mit den verschiedenen Antiseren detektiert (Abb. 22). Wie erwartet, konnten die gegen den Aminoterminus gerichteten Anti-Pep1- und Anti-Pep2-Antikörper (vgl. Abb. 19) alle vier rekombinant hergestellten mGRK6-Varianten erkennen: die 64 kD große mGRK6-A, die 67 kD große mGRK6-B, die mGRK6-C mit 66 kD und die mGRK6-D mit einer Größe von 28 kD, wobei die Molekulargewichte der exprimierten Proteine mit den anhand der Aminosäuresequenz berechneten übereinstimmten. Die spezifischen Anti-mGRK6-A- und Anti-mGRK6-B-Antikörper reagierten selektiv nur mit den Varianten A und B. Der Anti-Pep3-Antikörper konnte sein im N-terminalen Bereich der katalytischen Domäne lokalisiertes Epitop in den rekombinanten mGRK6-Proteinen nicht erkennen (nicht abgebildet), das synthetische Kontrollpeptid Pep 3 konnte aber von dem Antikörper im *Dot blot* (10 µg Peptid) detektiert werden (nicht abgebildet).

Die Rezeptorkinasen gehören zur Familie der Ser/Thr-Kinasen, d. h. sie können die γ-Phosphatgruppe von ATP auf Serin- und Threoninreste ihrer Substrate übertragen. Die katalytische Aktivität der Rezeptorkinasen kann deshalb in Phosphorylierungsversuchen bestimmt werden. Die Aktivität der exprimierten Rezeptorkinase 6-Varianten der Maus wurde über Phosphorylierung in Anwesenheit von [γ–^{32}P]ATP untersucht. Als unphysiologisches Substrat für die humane GRK6 wurde Phosvitin, ein 45 kD großes saures Protein beschrieben (Loudon und Benovic, 1994). Die rekombinanten Polypeptide mGRK6-B und mGRK6-C wurden mit Phosvitin als Substrat in einer Phosphorylierungsreaktion eingesetzt, um die Aktivität der mGRK6-Proteine zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. In Abwesenheit von Phosvitin erfolgte keine Phosphorylierung, nach Zusatz von Phosvitin konnten sowohl die Rezeptorkinase mGRK6-B als auch die mGRK6-C die radioaktiv markierte γ-Phosphatgruppe auf Phosvitin übertragen. Ebenso wurde in

Anwesenheit von Phosvitin aber ohne Rezeptorkinase keine Phosphorylierung beobachtet (nicht abgebildet).

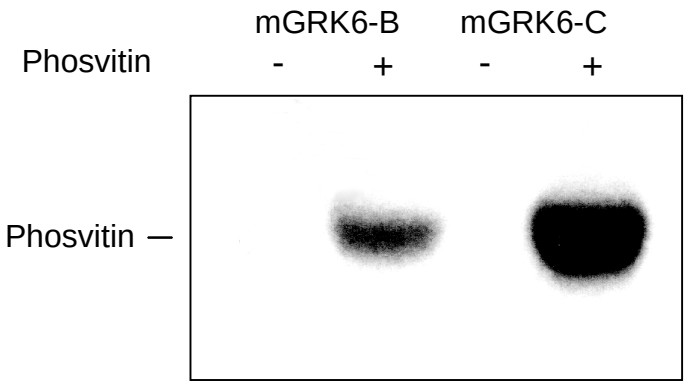


Abb. 23: Phosphorylierung von Phosvitin durch die rekombinant exprimierten Rezeptorkinasen mGRK6-B und mGRK6-C. Die in den 300.000 *g*-Überständen infizierter *Sf*9-Zellen enthaltenen Proteine mGRK6-B und mGRK6-C (jeweils 30 µg Gesamtprotein) wurden in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM $MgCl_2$ ohne oder mit 12.5 µg Phosvitin in Anwesenheit von 100 µM [γ–^{32}P]ATP für 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-PAGE auf einem 10 % (m/V) Acrylamidgel aufgetrennt. Der Röntgenfilm wurde 1.5 h mit dem fixierten Gel exponiert. Die Position des phosphorylierten Phosvitins ist angegeben.

Die meisten der bisher identifizierten Mitglieder der Rezeptorkinase-Familie (GRK1, GRK2, GRK3, GRK4α, GRK5, GRK6 und GRK7) können den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Rhodopsin phosphorylieren (Freedman und Lefkowitz, 1996; Sallese *et al.*, 1997; Weiss *et al.*, 1998). Rhodopsin ist der für den Sehprozess entscheidende Photorezeptor und in hoher Konzentration (10^5 Moleküle Rhodopsin pro µm^2) in den Membranen der äußeren Segmente von Stäbchenzellen (sog. ROS-Membranen) enthalten (Alberts *et al.*, 1987). Um festzustellen, ob auch die rekombinanten mGRK6-Varianten Rhodopsin phosphorylieren konnten, mussten zunächst rhodopsinreiche ROS-Membranen aus der Retina von Rinderaugen isoliert werden. Die gleichfalls in den Membranen befindliche bovine Rhodopsinkinase (bGRK1) wurde durch Inkubation mit Harnstoff inaktiviert. Aus den Retinas von 25 Rinderaugen konnten 4.9 mg Rhodopsin (8.1 µg/µl) isoliert werden. Das entsprach bei einer abgeschätzten 90 %igen Reinheit der Rhodopsinlösung einer Rhodopsinkonzentration von 182 µmol/l. Für die Phosphorylierungsversuche wurde Rhodopsin 1:2 (91 µM) bis 1:200 (910 nM) in 50 mM Tris/HCl pH 7.4 verdünnt. Die Aktivität der in Insektenzellen

exprimierten Rezeptorkinasen mGRK6-C und der bovinen GRK2 (bGRK2) sowie die Aktivität der nicht infizierten *Sf*9-Zellen und der nicht vollständig inaktivierten bGRK1 zeigt Abbildung 24. In Anwesenheit vergleichbarer Mengen Gesamtprotein und einer relativ hohen Rhodopsinkonzentration von 6 µM in den Reaktionsansätzen fiel auf, dass in den ROS-Membranen Spuren noch aktiver bGRK1 enthalten waren und dass Insektenzellen geringe Mengen intrinsischer Rezeptorkinase aufwiesen, die Rhodopsin lichtabhängig phosphorylierten. Verglichen mit den basalen Aktivitäten der bGRK1 und insektenzellspezifischen Rezeptorkinasen konnte Rhodopsin von beiden rekombinant hergestellten Rezeptorkinasen, der bGRK2 als auch der mGRK6-C, nach Belichtung phosphoryliert werden.

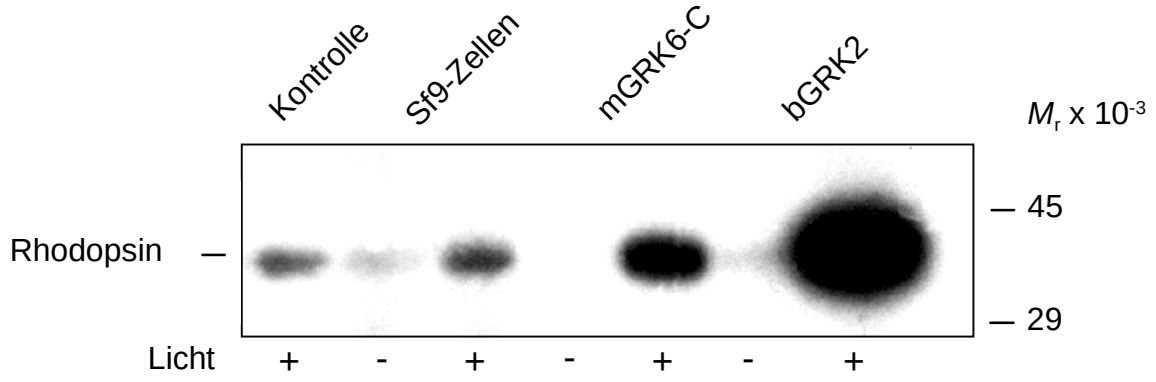


Abb. 24: Phosphorylierung von Rhodopsin durch die rekombinant exprimierten Rezeptorkinasen mGRK6-C und bGRK2. Jeweils 14.7 µg der mGRK6-C und bGKR2 enthaltenden 300.000 *g*-Überstände infizierter *Sf*9-Zellen bzw. 14.7 µg Protein aus dem 300.000 *g*-Überstand nicht infizierter *Sf*9-Zellen wurden in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM $MgCl_2$ in Anwesenheit von 6 µM Rhodopsin und 100 µM [γ–^{32}P]ATP für 10 min bei 30 °C in Ab- oder in Anwesenheit von Licht inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-PAGE auf einem 10 % (m/V) Acrylamidgel aufgetrennt. Der Röntgenfilm wurde 7 h mit dem fixierten Gel exponiert. Die Position des phosphorylierten Rhodopsins ist angegeben.

Mit Hilfe der Antikörper war es möglich, vergleichbare Mengen der exprimierten Rezeptorkinasen mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C und mGRK6-D über einen Immunoblot einzustellen. In der Phosphorylierungsreaktion konnte die katalytische Aktivität der vier titrierten Proteine gegenübergestellt werden. Das Resultat dieses Aktivitätsvergleichs ist in Abbildung 25 dargestellt. Das Substrat Rhodopsin wurde in einer Endkonzentration von

120 nM verwendet. Bei der Phosphorylierung lichtaktivierten Rhodopsins fiel auf, dass die Variante C wesentlich aktiver war, als die anderen beiden Varianten A und B. Die Polypeptide mGRK6-A und in geringerem Maße auch mGRK6-B konnten Rhodopsin ebenfalls phosphorylieren. Die innerhalb der katalytischen Domäne trunkierte mGRK6-D (vgl. Abb. 11B) war enzymatisch inaktiv.

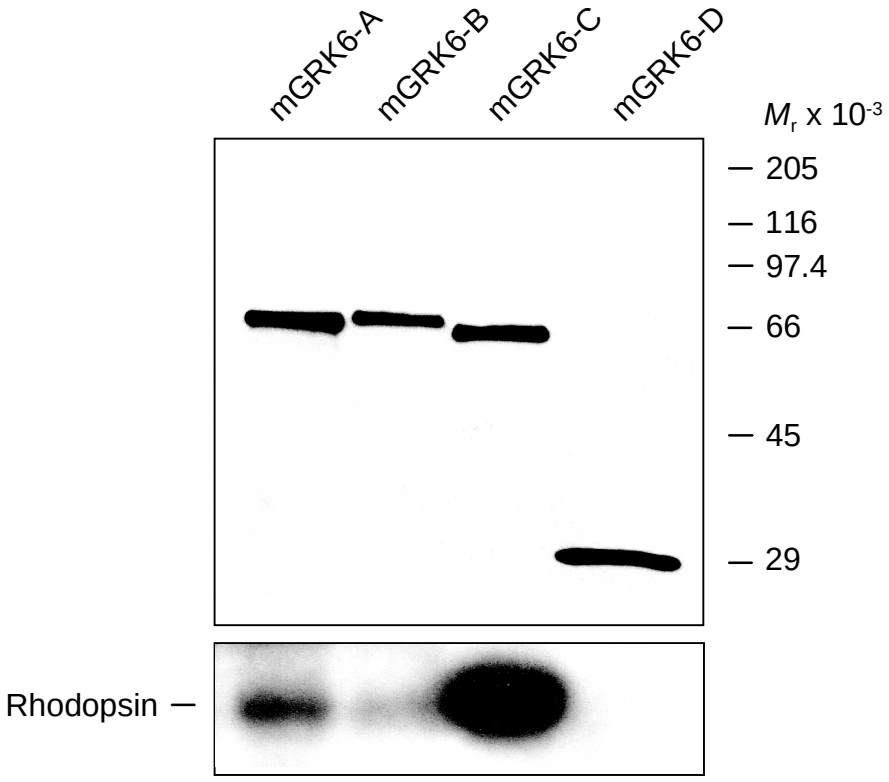


Abb. 25: Phosphorylierung von Rhodopsin durch die rekombinant exprimierten Rezeptorkinasen mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C und mGRK6-D. Die Menge der in den 300.000 *g*-Überständen der infizierten *Sf*9-Zellen enthaltenen Proteine mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C und mGRK6-D wurde über einen *Western blot* angeglichen (**oben**). Die titrierten Proteine wurden in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM $MgCl_2$ in Anwesenheit von 120 nM Rhodopsin und 100 µM [γ–^{32}P]ATP für 10 min bei 30 °C belichtet (**unten**). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-PAGE auf einem 10 % (m/V) Acrylamidgel aufgetrennt. Der Röntgenfilm wurde über Nacht mit dem fixierten Gel exponiert. Die Positionen des phosphorylierten Rhodopsins und des Molekulargewichtsstandards sind angegeben.

Für die weitere Charakterisierung wurden die in Insektenzellen exprimierten und mit Ausnahme der mGRK6-D katalytisch aktiven Rezeptorkinase 6-Varianten der Maus durch Anwendung chromatographischer Methoden gereinigt.

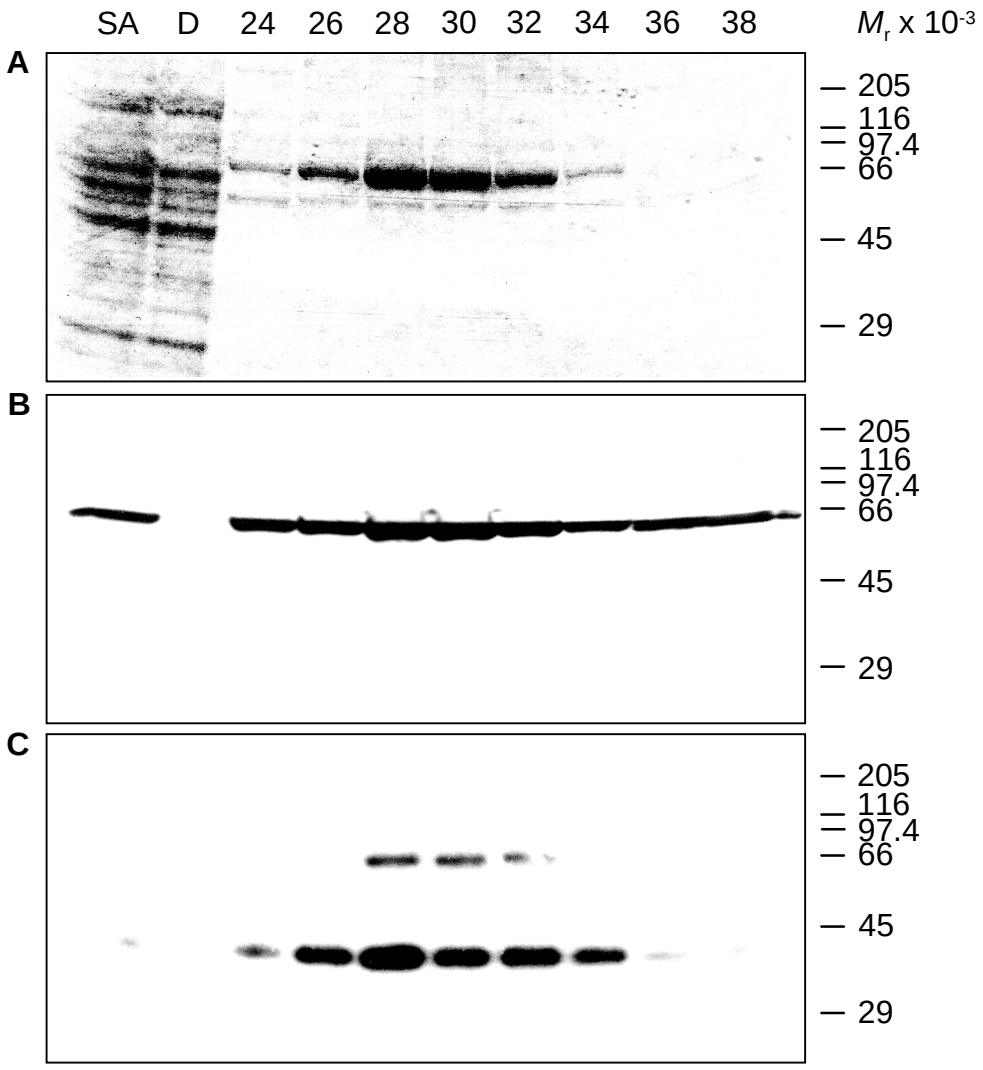


Abb. 26: Analyse der säulenchromatographisch an einer SP-Sepharose-Matrix gereinigten rekombinanten mGRK6-C durch Coomassie Blau-Färbung, *Western blot* und Phosphorylierung lichtaktivierten Rhodopsins. Der 300.000 *g*-Überstand von Insektenzellen, die mit für mGRK6-C kodierenden Baculoviren infiziert waren (260 mg Gesamtprotein), wurde mit HE-Puffer 1:5 verdünnt, um die NaCl-Konzentration auf 200 mM NaCl zu reduzieren und an einer SP-Sepharose-Matrix (5 ml HiTrap-Säule, ÄKTA-System) chromatographiert (50 ml-Gradient von 200-500 mM NaCl, Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die eluierten Proteine wurden mittels 10 % (m/V) SDS-PAGE aufgetrennt (**A**: 15 µl/Fraktion, **B**: 5 µl/Fraktion), mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (**A**) oder auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (**B**). Die Aktivität der Kinase wurde durch lichtabhängige Phosphorylierung (1 µl/Fraktion) mit Rhodopsin als Substrat (120 nM Endkonzentration) untersucht (**C**). Der Röntgenfilm wurde für 2 h mit dem fixierten Gel exponiert. Der Säulenauftrag (**SA**), der Säulendurchfluss (**D**), die Nummer der analysierten Fraktionen und die Lage des Molekulargewichtsstandards sind markiert.

Um für die Reinigung eine ausreichende Menge an Ausgangsmaterial zu produzieren, wurden 400 ml *Sf*9-Schüttelkultur mit Baculoviren infiziert und in Fernbachkolben inkubiert. Daraus konnten nach erfolgter Lyse und Zentrifugation der *Sf*9-Zellen 300.000 *g*-Überstande gewonnen werden, in denen die rekombinanten Kinasen mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C oder mGRK6-D enthalten waren. Da die anhand der Aminosäuresequenz berechneten p*I*-Werte (PHYSCHEM, PC/GENE-Programm) der Rezeptorkinasen gleich oder größer pH 8.0 sind (mGRK6-A, p*I* 8.03; mGRK6-B, p*I* 8.73; mGRK6-C, p*I* 8.55; mGRK6-D, p*I* 9.93), können die Proteine bei einem pH-Wert des Puffers von 7.5 an der Kationenaustausch-Matrix SP-Sepharose angereichert werden. In den folgenden drei Abbildungen 26 bis 28 ist exemplarisch die Reinigung der mGRK6-C dargestellt. Nach Chromatographie an der SP-Sepharose-Matrix wurden die in den Fraktionen um den Elutionspeak (300-400 mM NaCl) enthaltenen Proteine analysiert (Abb. 26). Dazu wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und zum einen mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (Abb. 26A) oder zum anderen auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (Abb. 26B). Außerdem erfolgte über lichtabhängige Phosphorylierung mit Rhodopsin als Substrat eine Aktivitätsanalyse der eluierten Proteine (Abb. 26C). Im Coomassie-gefärbten Gel war in den Fraktionen 24 bis 34 ein angereichertes Protein mit einer Größe von 64 kD zu erkennen. Der Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper konnte bestätigen, dass es sich bei dem in den Fraktionen 24 bis 34 befindlichen Protein um die in den Insektenzellen überexprimierte mGRK6-C handelte. In dem im Vergleich zum Coomassie-gefärbten Gel sensitiveren *Western blot* konnte auch in den benachbarten Fraktionen 36 und 38 noch mGRK6-C-Protein detektiert werden. Der *blot* zeigte auch, dass die mGRK6-C quantitativ an die Säulenmatrix gebunden hatte, da dieses Protein nicht im Durchfluss nachgewiesen werden konnte. Die Phosphorylierungsaktivität der angereicherten mGRK6-C korrelierte mit der in den Fraktionen enthaltenen Menge an Rezeptorkinase. Nach der Phosphorylierung war im Autoradiogramm auf der Höhe von ungefähr 64 kD eine zweites Signal zu erkennen, das der autophosphorylierten mGRK6-C zuzuordnen war.

Die Fraktionen 26 bis 33 (316-363 mM NaCl) wurden vereinigt, um die darin befindliche mGRK6-C durch Chromatographie an einer Heparin-Separose-Affinitätsmatrix weiter zu reinigen.

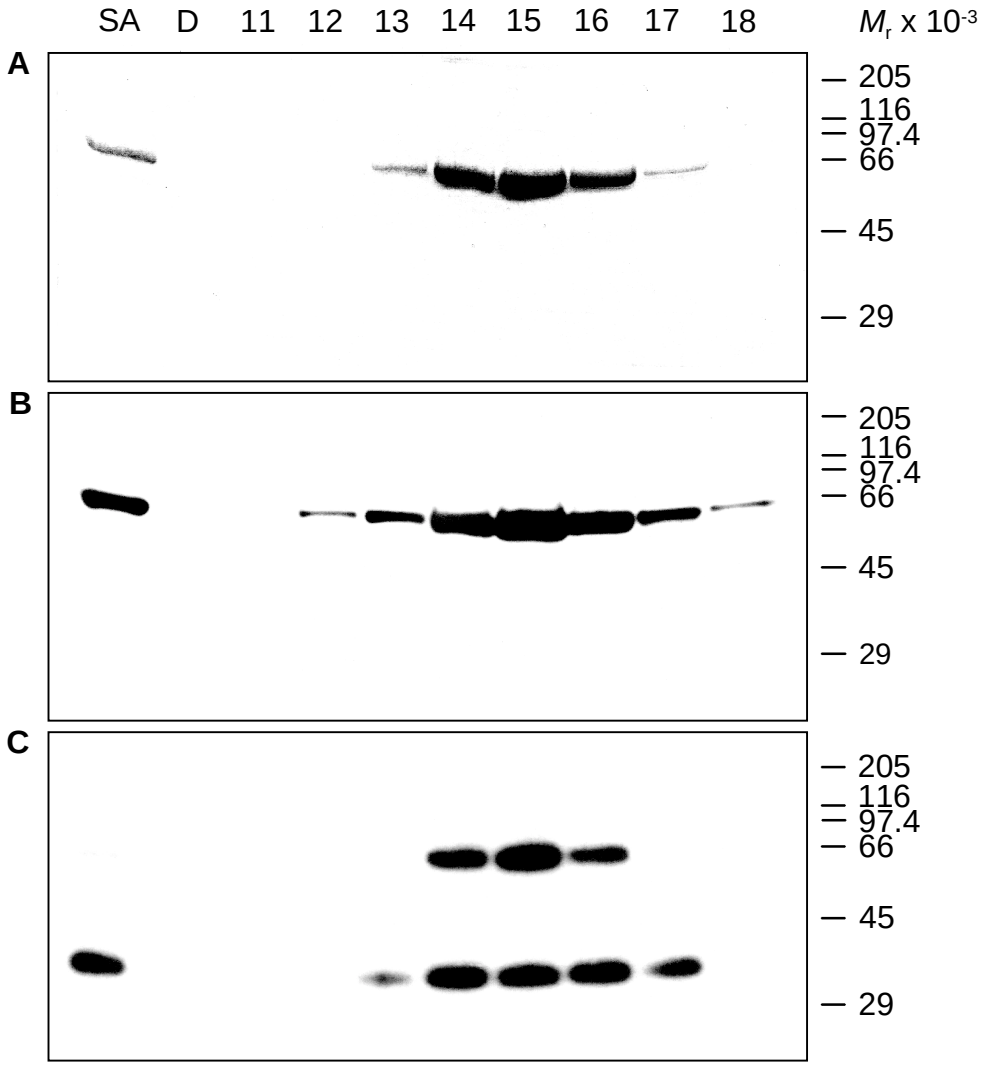


Abb. 27: Analyse der säulenchromatographisch an einer Heparin-Sepharose-Matrix gereinigten rekombinanten mGRK6-C durch Coomassie Blau-Färbung, *Western blot* und Phosphorylierung lichtaktivierten Rhodopsins. Die in den von der SP-Sepharose-Matrix eluierten Fraktionen 26 bis 33 (340 mM NaCl) enthaltene rekombinante mGRK6-C (20 mg Gesamtprotein) wurde mit HE-Puffer verdünnt, um die Salzkonzentration auf 300 mM NaCl zu reduzieren und an einer Heparin-Sepharose-Matrix (1 ml HiTrap-Säule, ÄKTA-System) chromatographiert (40 ml-Gradient von 0.3-1 M NaCl, Flussgeschwindigkeit: 0.5 ml/min, Fraktionsgröße: 1 ml). Die eluierten Proteine wurden mittels 10 % (m/V) SDS-PAGE aufgetrennt (**A**: 10 µl/Fraktion, **B**: 5 µl/Fraktion), mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (**A**) oder auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert (**B**). Die Aktivität der Kinase wurde durch lichtabhängige Phosphorylierung (1 µl/Fraktion) mit Rhodopsin als Substrat (120 nM Endkonzentration) untersucht (**C**). Der Röntgenfilm wurde 2 h mit dem fixierten Gel exponiert. Der Säulenauftrag (**SA**), der Säulendurchfluss (**D**), die Nummer der analysierten Fraktionen und die Lage des Molekulargewichtsstandards sind markiert.

Die in den Fraktionen um den Elutionspeak (525-685 mM NaCl) enthaltene mGRK6-C wurde wieder mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten Gels, eines *Western blots* und über lichtabhängige Phosphorylierung von Rhodopsin untersucht (Abb. 27). Die mGRK6-C wurde in den Fraktionen 14, 15 und 16 (585-645 mM NaCl) sowohl im Gel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt als auch im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper identifiziert. In der Coomassie-Färbung konnte in diesen Fraktionen neben der mGRK6-C kein weiteres Protein festgestellt werden. Die Phosphorylierung von Rhodopsin durch die nahezu homogen vorliegende mGRK6-C bestätigte die katalytische Aktivität des eluierten Proteins. Auch hier konnte im Autoradiogramm des Phosphorylierungsversuches Autophosphorylierung der mGRK6-C beobachtet werden. Die Fraktionen 14 bis 16 wurden vereinigt. Die anschließende Proteinbestimmung nach Bradford ergab 3 mg nahezu homogenes rekombinantes Protein mGRK6C (20 µM mGRK6C) in einer Pufferlösung mit 615 mM NaCl.

Die in Insektenzellen exprimierte rekombinante mGRK6-A konnte analog der mGRK6-C über Kationenaustauschchromatographie an einer SP-Sepharose-Matrix und anschließender Affinitätschromatographie an einer Heparin-Sepharose-Matrix in nahezu homogener Form erhalten werden. Aus 100 ml mit für mGRK6-A kodierenden Baculoviren infizierter *Sf*9-Schüttelkultur konnte ein 300.000 *g*-Überstand mit 39 mg Gesamtprotein gewonnen werden, aus dem die rekombinante mGRK6-A nach Reduktion der Salzkonzentration auf 50 mM NaCl über eine SP-Sepharose-Matrix mit einem 60 ml-Gradient von 50 bis 500 mM NaCl angereichert wurde. Die nach SDS-PAGE mit Coomassie Blau-Färbung oder im Immunoblot mit dem Anti-GRK6-Antikörper (vgl. Abb. 19) identifizierten und bezüglich der Phosphorylierung lichtaktivierten Rhodopsins enzymatisch aktiven mGRK6-positiven Fraktionen 41 bis 49 (275-310 mM NaCl) wurden vereinigt. Die in dieser Proteinlösung enthaltene mGRK6-A (2.7 mg Gesamtprotein) wurde chromatographisch über eine Heparin-Sepharose-Matrix gereinigt (50 ml-Gradient von 0.5-1 M NaCl) und die Proteinfraktionen wie bereits beschrieben analysiert. In den Fraktionen 18 bis 20 (540-585 mM NaCl) konnte nahezu homogene rekombinante mGRK6-A nachgewiesen werden, die aber kaum noch in der Lage war, Rhodopsin zu phosphorylieren. Diese Fraktionen wurden vereinigt und der Proteingehalt nach der Methode von Bradford mit 66 µg Gesamtprotein ermittelt. In Abbildung 28 ist ein mit Silber gefärbtes Gel nach SDS-PAGE der über SP- und Heparin-Sepharose gereinigten mGRK6-A und mGRK6-C dargestellt. Mit dieser sensitiven Färbemethode konnten neben den Rezeptorkinase-Varianten A und C keine weiteren Pro-

teine festgestellt werden, die mGRK6-A oder mGRK6-C enthaltenden Proteinlösungen waren also nahezu homogen.

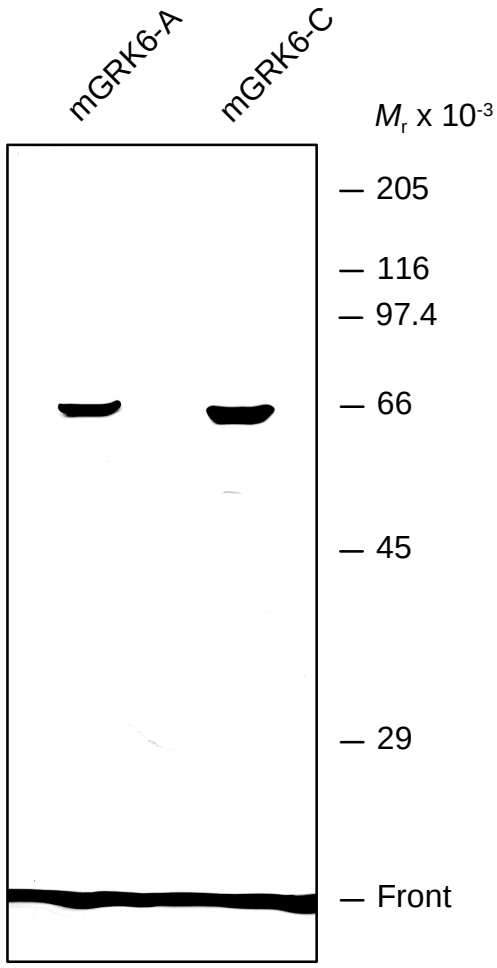


Abb. 28: Analyse der gereinigten rekombinanten Proteine mGRK6-A und mGRK6-C mittels SDS-PAGE und Silberfärbung. Die Rezeptorkinasen mGRK6-A und mGRK6-C wurden aus dem 300.000 *g*-Überstand von Baculovirus-infizierten Insektenzellen durch sequentielle Chromatographie an SP- und Heparin-Sepharose gereinigt. Zwei µg mGRK6-A und 4 µg mGRK6-C wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend mit Silber gefärbt. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards und der Lauffront sind angegeben.

Die gereinigte rekombinante mGRK6-C sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hilgenfeld am Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena kristallisiert werden, um Einblick in die Tertiärstruktur des gesamten Proteins und insbesondere in die katalytische Domäne dieser Rezeptorkinase zu erhalten. Dazu war eine möglichst NaCl-freie und hochkonzentrierte (10 bis 15 mg/ml Protein) Proteinlösung nötig. Über Gelfiltration an

Superdex™ 75-Material wurde zum einen die NaCl-Konzentration auf 100 mM NaCl, die Konzentration des Gelfiltrationspuffers, reduziert, zum anderen konnten die in größeren Ansätzen, d. h. in ungefähr 200 ml 300.000 *g*-Überstand, nach Chromatographie an SP- und Heparin-Sepharose-Matrix noch enthaltenen Spuren verunreinigender Proteine mit Molekülmassen über 90 kD abgetrennt werden. Abbildung 29 zeigt exemplarisch das Elutionsprofil der Gelfiltration eines Aliquots der über SP- und Heparin-Sepharose gereinigten mGRK6-C an Superdex™ 75-Material (SMART-System) und die dazugehörigen eluierten Proteine im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Die in den Fraktionen 11, 12 und 13 befindliche mGRK6-C wurde von den höhermolekularen, verunreinigenden Proteinen in den Fraktionen 9 und 10 abgetrennt.

Der weitaus größere Anteil (25 mg Gesamtprotein in 8 ml) der aus 200 ml 300.000 *g*-Überstand sequentiell über SP- und Heparin-Sepharose gereinigten mGRK6-C wurde über eine mit Superdex™ 75-Matrix gefüllte HiLoad-Säule (320 ml Gelbettvolumen) filtriert. Da die mGRK6-C enthaltende Proteinlösung bei der Gelfiltration stark verdünnt wurde, musste die Probe (20 mg Gesamtprotein in 40 ml) in einer Rührzelle, die mit einer Omega-Disc Membran (10 kDa Ausschluss) beschickt worden war, einkonzentriert und entsalzt werden. Mit dieser Methode wurden 4 mg NaCl-freie mGRK6-C-Proteinlösung (17 mg/ml Proteinkonzentration) mit hohem Reinheitsgrad erhalten. Diese Lösung wurde aliquotiert (50 µl-Portionen), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Trockeneis versandt. Die Kristallisationsversuche unter verschiedenen Pufferbedingungen blieben bisher ohne Erfolg.

Die Rezeptorkinasen GRK1, GRK2 und GRK5 werden u. a. durch Phosphorylierung reguliert (Pitcher *et al.*, 1998). Die Ergebnisse eines mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (PY20) inkubierten *Western blots* (nicht abgebildet), auf dem die chromatographisch über SP- und Heparin-Sepharose gereinigte mGRK6-C nach SDS-PAGE im *semidry*-Verfahren transferiert worden war, deuteten darauf hin, dass die mGRK6-C Phosphotyrosinreste enthielt. In den Immunoblots nach den ersten 2D-Gelelektrophorese-Experimenten der gereinigten rekombinanten mGRK6-C (nicht abgebildet) konnten mindestens drei verschiedene Signale mit unterschiedlichen p*I*-Werten detektiert werden.

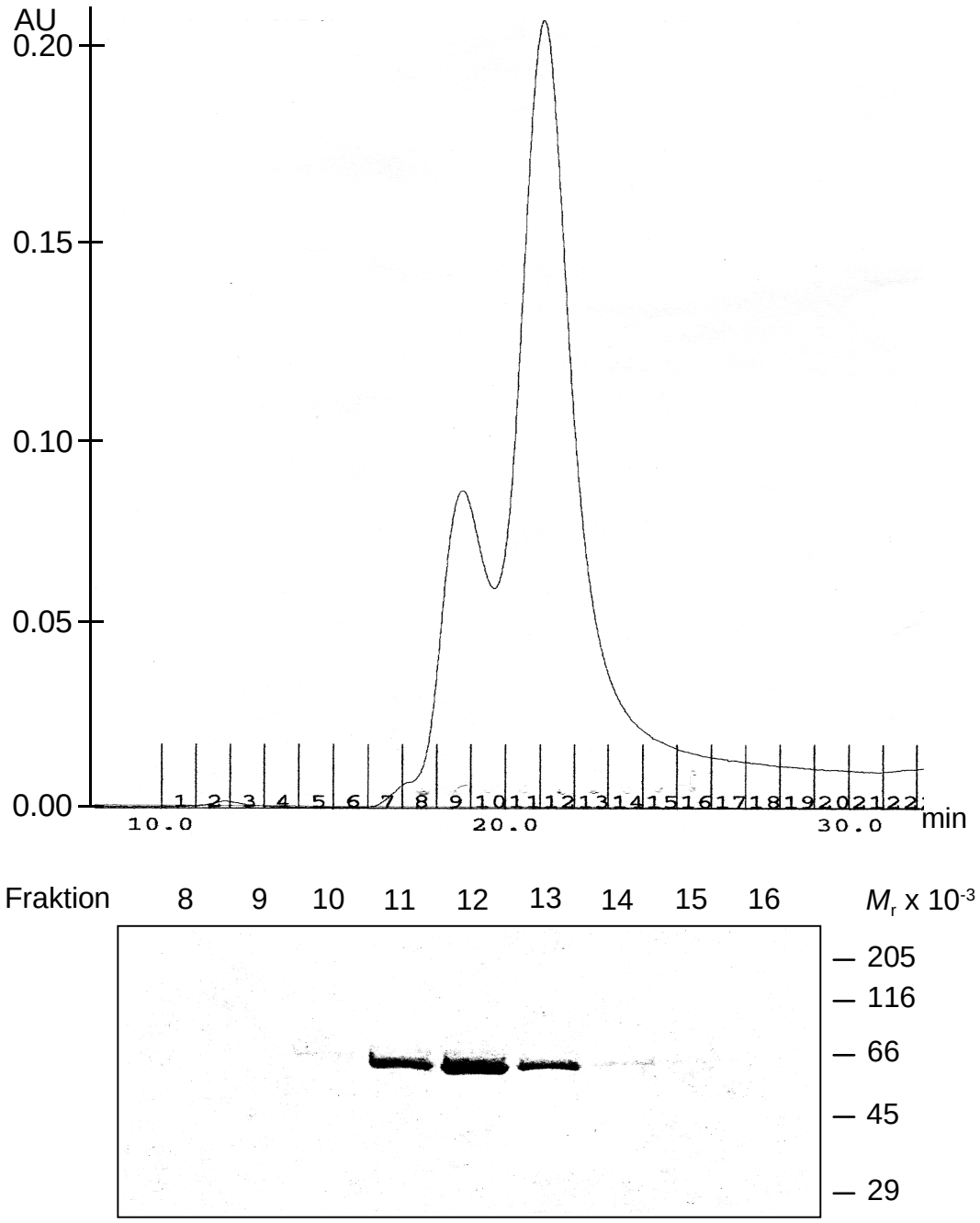


Abb. 29: Gelfiltration von mGRK6-C über Superdex™ 75-Material. Ein Aliquot (80 µg) der chromatographisch über SP- und Heparin-Sepharose gereinigten mGRK6-C wurde mittels Gelfiltration über Superdex™ 75-Material (Superdex™ 75-PC 3.2/30-Säule, SMART-System) von höhermolekularen, verunreinigenden Proteinen abgetrennt. Die im Elutionsprofil (**oben**) um den Elutionspeak liegenden Proteinfraktionen 8 bis 16 wurden über SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung der Proteine (**unten**) analysiert. Die Fraktionsnummern sowie die Position des Molekulargewichtsstandards sind angegeben.

Um zu klären, ob die mGRK6-C posttranslational modifiziert war, wurde mGRK6-C mit hohem Reinheitsgrad in nahezu NaCl-freiem Puffer zur genauen Massenbestimmung im MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert (Abb. 30). Dabei konnte für die rekombinante mGRK6-C ein Molekulargewicht von M_r = 64.287 ermittelt werden, das mit dem anhand der cDNA-Sequenz berechneten theoretischen Molekulargewicht von M_r = 64.282 übereinstimmt, d. h. die analysierte mGRK6-C war nicht posttranslational modifiziert.

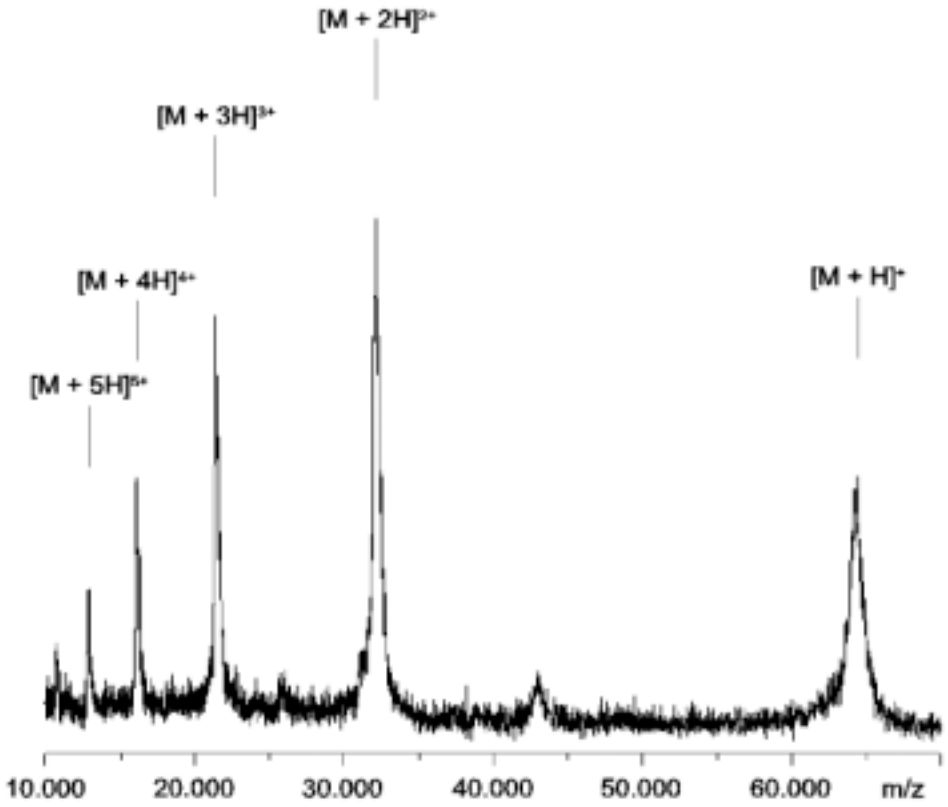


Abb. 30: MALDI-Massenspektrum von mGRK6-C mit den 1-5fach protonierten Molekülionensignalen bei m/z 64.287, 42.905, 32.142, 21.392 und 16.135 (theoret. Molekulargewicht der mGRK6-C: 64.282). Das Spektrum wurde mit einem Bruker Reflex-III-TOF-Massenspektrometer aufgenommen. Die Probenpräparation erfolgte mit α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure als Matrix (gesättigte Lösung in Acetonitril:0.1 % (V/V) TFA (2:1)). Die Matrixlösung wurde zu gleichen Teilen mit der Proteinlösung (1 µg/µl in 0.1% (V/V) TFA) gemischt und auf dem Probenträger auskristallisiert. Zur Aufnahme des Spektrums wurden 140 Einzelspektren aufsummiert. Die Kalibrierung erfolgte extern mit den Molekülionen von BSA.

Die in *Sf*9-Zellen exprimierten rekombinanten Proteine mGRK6-B und mGRK6-D konnten aus den 300.000 *g*-Überständen weder über Kationenaustauschchromatographie an SP-

Sepharose noch über Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose angereichert werden. Deshalb sollten diese beiden Varianten als Glutathion-S-transferase (GST)-Fusionsproteine in Insektenzellen produziert werden. Bei diesen GST-Fusionsproteinen wird die hohe Affinität zwischen Enzym (GST) und Substrat (Glutathion) ausgenutzt, um das GST-Fusionsprotein über eine spezifische Affinitätsmatrix, an die das Glutathion kovalent gebunden ist (z. B. Glutathion-Sepharose), von den restlichen Proteinen abzutrennen. Der Transfervektor ist so konstruiert, dass das exprimierte GST-Fusionsprotein zwischen dem GST- und dem gewünschten Protein eine Erkennungssequenz für die Protease Thrombin besitzt, mit der das GST-Protein bei Bedarf nach erfolgter Reinigung über Glutathion-Sepharose 4B vom restlichen Protein abgespalten werden kann. Zur Herstellung der GST-Fusionsproteine wurde der baculovirale Transfervektor pAcG2T eingesetzt, der am 5´-Ende der *multiple cloning site* eine für das GST-Protein kodierende Sequenz besitzt. Die cDNA der Rezeptorkinasen mGRK6-B oder mGRK6-D wurde so in den Vektor kloniert, dass der Leserahmen der GST mit dem der Rezeptorkinasen übereinstimmte. Dazu wurden sowohl der Vektor pAcG2T als auch die Konstrukte pVL1393/mGRK6-B bzw. pVL1393/mGRK6-D mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI linearisiert und die 5´-Überhänge mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Der anschließende Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI entfernte aus dem linearisierten Vektor ein 10 bp-Fragment mit einem 5´-Überhang, aus den linearisierten Konstrukten wurde die für mGRK6-B bzw. mGRK6-D kodierende cDNA herausgeschnitten. Die auf diese Weise vorbereitete Vektor- und *insert*-DNA konnten in der folgenden Ligation gerichtet verknüpft werden, um die Konstrukte pAcG2T/mGRK6-B bzw. pAcG2T/mGRK6-D zu erhalten. Die Konstrukte wurden zusammen mit Baculovirus-DNA in Insektenzellen transfiziert und die Baculoviren bis zu einem geeigneten Titer amplifiziert. Die *Sf*9-Zellen wurden analog den mit für Rezeptorkinase kodierenden Baculoviren infizierten Zellen 48 h nach Infektion geerntet und in Anwesenheit von 250 mM NaCl lysiert. Die im 300.000 *g*-Überstand befindlichen GST-mGRK6-B- bzw. GST-mGRK6-D-Fusionsproteine wurden im *Batch*-Verfahren selektiv an Glutathion-Sepharose 4B-Matrix gebunden und durch Zugabe von 10 mM Glutathion eluiert. Ein Aliquot des Überstandes nach Inkubation mit der Glutathion-Sepharose 4B-Matrix und das Eluat sowie die verbleibende Glutathion-Sepharose 4B-Matrix wurden auf einem SDS-Polyacrylamid aufgetrennt und mittels *Western blot* mit einem Anti-GST-Antikörper analysiert (Abb. 31). Beide Fusionsproteine GST-mGRK6-B und GST-mGRK6-D konnten nahezu quantitativ an die Glutathion-Sepharose 4B-Matrix gebunden werden. Durch Zuga-

be von Glutathion konnten im Falle von GST-mGRK6-B etwa 25 %, bei dem GST-mGRK6-D-Polypeptid ungefähr die Hälfte des gebundenen Proteins eluiert werden, das restliche Protein war noch an die Glutathion-Sepharose 4B-Matrix gebunden. Im anschließend mit Amidoschwarz-gefärbten *blot* (nicht abgebildet) zeigte sich, dass ein Großteil der im 300.000 *g*-Überstand enthaltenen anderen Proteine nicht an die Matrix gebunden hatte und in einem Schritt von den gewünschten und an die Matrix gebundenen Fusionsproteinen abgetrennt werden konnte. Die von der Matrix eluierten Fusionsproteine GST-mGRK6-B und GST-mGRK6-D waren gegenüber den in Spuren noch vorhandenen verunreinigenden Proteinen angereichert.

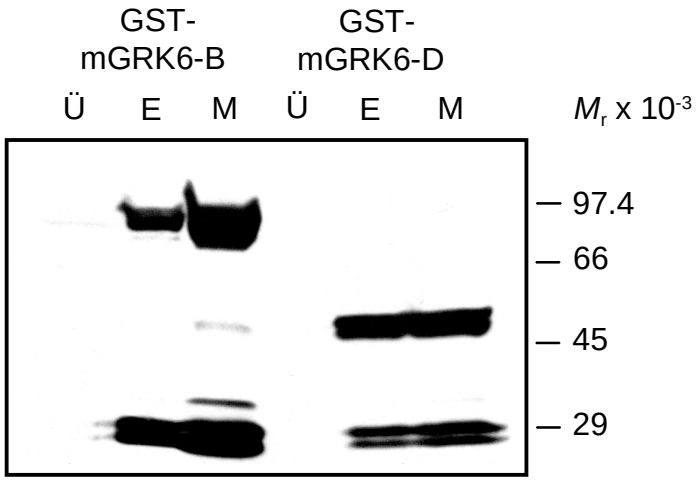


Abb. 31: Analyse der im *Batch*-Verfahren gereinigten Fusionsproteine GST-mGRK6-B und GST-mGRK6-D durch SDS-PAGE und *Western blot*. Insektenzellen wurden mit Baculoviren infiziert, die für GST-mGRK6-B bzw. GST-mGRK6-D kodieren. Jeweils 27 µg Gesamtprotein der 300.000 *g*-Überstände infizierter Insektenzellen wurden für 1 h bei 4 °C an je 100 µl Glutathion-Sepharose 4B-Matrix gebunden. Der Überstand (**Ü**) wurde abgenommen, die Matrix zweimal mit CMF-PBS gewaschen und die gebundenen Proteine durch Zugabe von 10 mM Glutathion eluiert (**E**). Die im Überstand, im Eluat und an der Matrix (**M**) befindlichen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und im Immunoblot mit einem Anti-GST-Antikörper detektiert. Die Position des Molekulargewichtsstandards ist angegeben.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die an die Glutathion-Sepharose 4B-Matrix gebundenen Fusionsproteine GST-mGRK6-B und GST mGRK6-D für 2 h bei Raumtemperatur mit 1 U Thrombin inkubiert, um die Proteine mGRK6-B und mGRK6-D von dem GST-Protein abzuspalten. Die katalytische Aktivität der danach im Überstand enthaltenen

Polypeptide mGRK6-B und mGRK6-D wurde durch lichtabhängige Phosphorylierung mit Rhodopsin als Substrat untersucht (nicht abgebildet). Das rekombinante Protein mGRK6-B war im Gegensatz zu mGRK6-D enzymatisch aktiv.

4.5 Zelluläre Lokalisation der mGRK6-Proteine

Die Rezeptorkinase-Varianten mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C sind wie unter 4.1 beschrieben bis zu der Aminosäure in Position 559 identisch. Durch alternatives Spleißen der 3´-Region der hnRNA entstehen unterschiedliche mRNAs, welche für die drei Polypeptide mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C kodieren. In Abbildung 32 sind die C-terminalen Aminosäuresequenzunterschiede dargestellt.

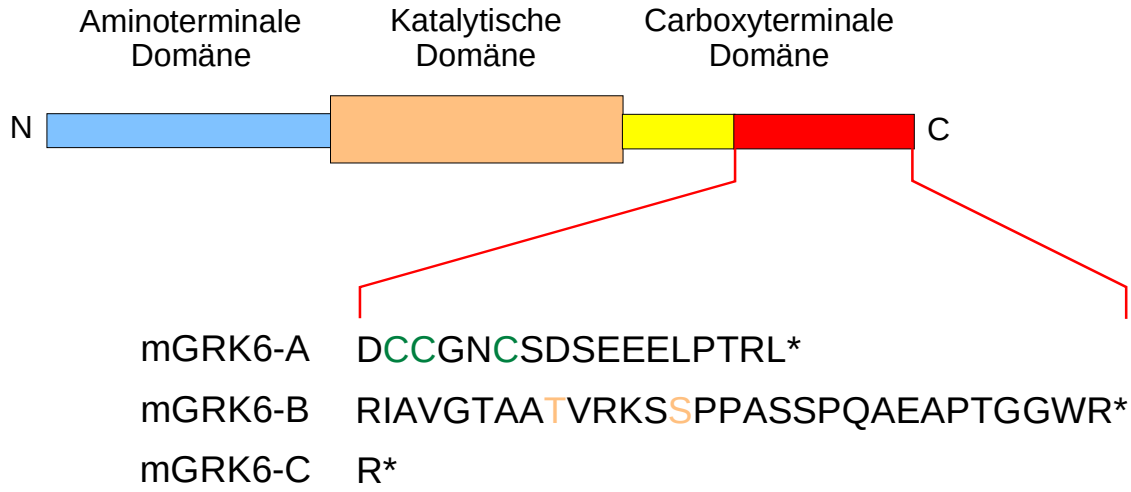


Abb. 32: Carboxyterminale Aminosäuresequenzunterschiede der Proteine mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C. Die Rezeptorkinase-Varianten mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C sind von Aminosäure 1 bis 559 der kodierenden Sequenz identisch. Die mGRK6-A- und mGRK6-B-Polypeptide unterscheiden sich ab der Aminosäure in Position 560, die mGRK6-C-Isoform enthält in Position 561 des kodierenden Proteins ein Stopkodon. Die laut Computeranalyse potentiell modifizierten Aminosäuren sind farbig markiert (palmitoylierte Cysteine grün, Phosphorylierungsstellen an Serin und Threonin orange).

Die Primärstruktur des Carboxyterminus der mGRK6-A besitzt wie die humane GRK6 Cysteine, die in Analogie zu der humanen GRK6 palmitoyliert werden könnten. Der Carboxyterminus der mGRK6-B ist reich an positiv geladenen, hydroxyl- oder aminhaltigen Aminosäuren. Computeranalysen haben ergeben, dass die Primärstruktur des Carboxyter-

minus der mGRK6-B Konsensussequenzen für Phosphorylierungen durch Proteinkinasen C und cAMP- oder cGMP-regulierte Kinasen aufweist. Der/die Fettsäurerest(e) der höchstwahrscheinlich palmitoylierten mGRK6-A und die positiv geladene C-terminale Domäne der mGRK6-B können über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen als Membrananker dienen. Der mGRK6-C-Isoform fehlen wegen ihres verkürzten Carboxyterminus derartige Interaktionsstellen.

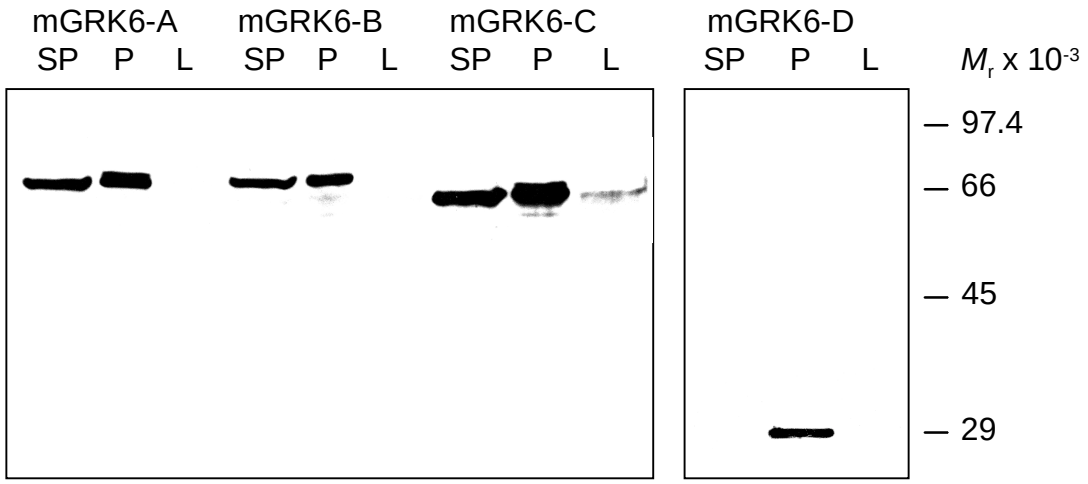


Abb. 33: Analyse der in transient transfizierten COS-7-Zellen exprimierten Rezeptorkinase 6-Varianten der Maus im Immunoblot. Plasmid-DNA der verschiedenen Varianten mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C und mGRK6-D wurde in COS-7-Zellen transfiziert (je 4 µg DNA/6 x 10^5 Zellen). Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet, lysiert und durch Zentrifugation in eine lösliche (**L**) und eine partikuläre (**P**) Fraktion separiert. Mit Hilfe des Detergenz Triton X-100 wurden die in der partikulären Fraktion befindlichen Proteine solubilisiert (**SP**). Von den löslichen und solubilisierten partikulären Fraktionen der mGRK6-A, mGRK6-B oder mGRK6-C exprimierenden Zellen wurden jeweils 70 µg, von den partikulären Fraktionen jeweils 40 µg Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Auf einem zweiten SDS-Polyacrylamidgel wurden die lösliche (5 µg), partikuläre (28.5 µg) und solubilisierte partikuläre Fraktion (5 µg) der mGRK6-D exprimierenden COS-7-Zellen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert. Die Position des Molekulargewichtsstandards ist angegeben.

Um festzustellen, ob die unterschiedlichen Carboxytermini der Rezeptorkinase 6-Varianten Einfluss auf die zelluläre Lokalisation der einzelnen Proteine hatten, wurden die mGRK6-Isoformen transient in COS-7-Zellen exprimiert. Dazu wurden die für diese Kinasen kodierenden cDNAs in den eukaryontischen Expressionsvektor pMT2SM kloniert, um mit den

erhaltenen Konstrukten pMT2SM/mGRK6-A, -B, -C oder -D COS-7-Zellen zu transfizieren. Die Verteilung der mGRK6-Polypeptide innerhalb der Zelle zeigen die in Abbildung 33 dargestellten Immunoblots. Alle vier Proteinvarianten mGRK6-A, mGRK6-B, mGRK6-C und mGRK6-D waren vorwiegend in der partikulären Fraktion lokalisiert und konnten mit Ausnahme der mGRK6-D solubilisiert werden. Die mGRK6-C-Isoform fand sich zu einem geringen Prozentsatz auch in der löslichen Fraktion. Bei längerer Exposition des Röntgenfilms konnten in den löslichen Fraktionen der mit für mGRK6-A bzw. mGRK6-B kodierenden Konstrukten transfizierten COS-7-Zellen Spuren der Varianten A bzw. B detektiert werden.

Parallel dazu wurden transient mit Rezeptorkinase 6-cDNAs transfizierte COS-7-Zellen in der Immunfluoreszenz untersucht. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen sind in Abbildung 34 dargestellt. Die Proteine mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C konnten im Zytosol und membranständig vorgefunden werden, wobei sich die drei Varianten bezüglich der Verteilung innerhalb der beiden Kompartimente unterschieden. Der größere Anteil der mGRK6-A war im Zytosol lokalisiert, während die Varianten mGRK6-B und mGRK6-C vorwiegend mit der Membran assoziiert waren. Die mGRK6-D war hauptsächlich im Nukleus lokalisiert. Die Spezifität der Fluoreszenzsignale wurde durch mehrere Kontrollexperimente bestätigt: weder der erste noch der zweite Antikörper ergaben einzeln mit transfizierten COS-7-Zellen inkubiert ein Fluoreszenzsignal und auch in nichttransfizierten COS-7-Zellen konnten nach Antikörperinkubation keine Signale detektiert werden.

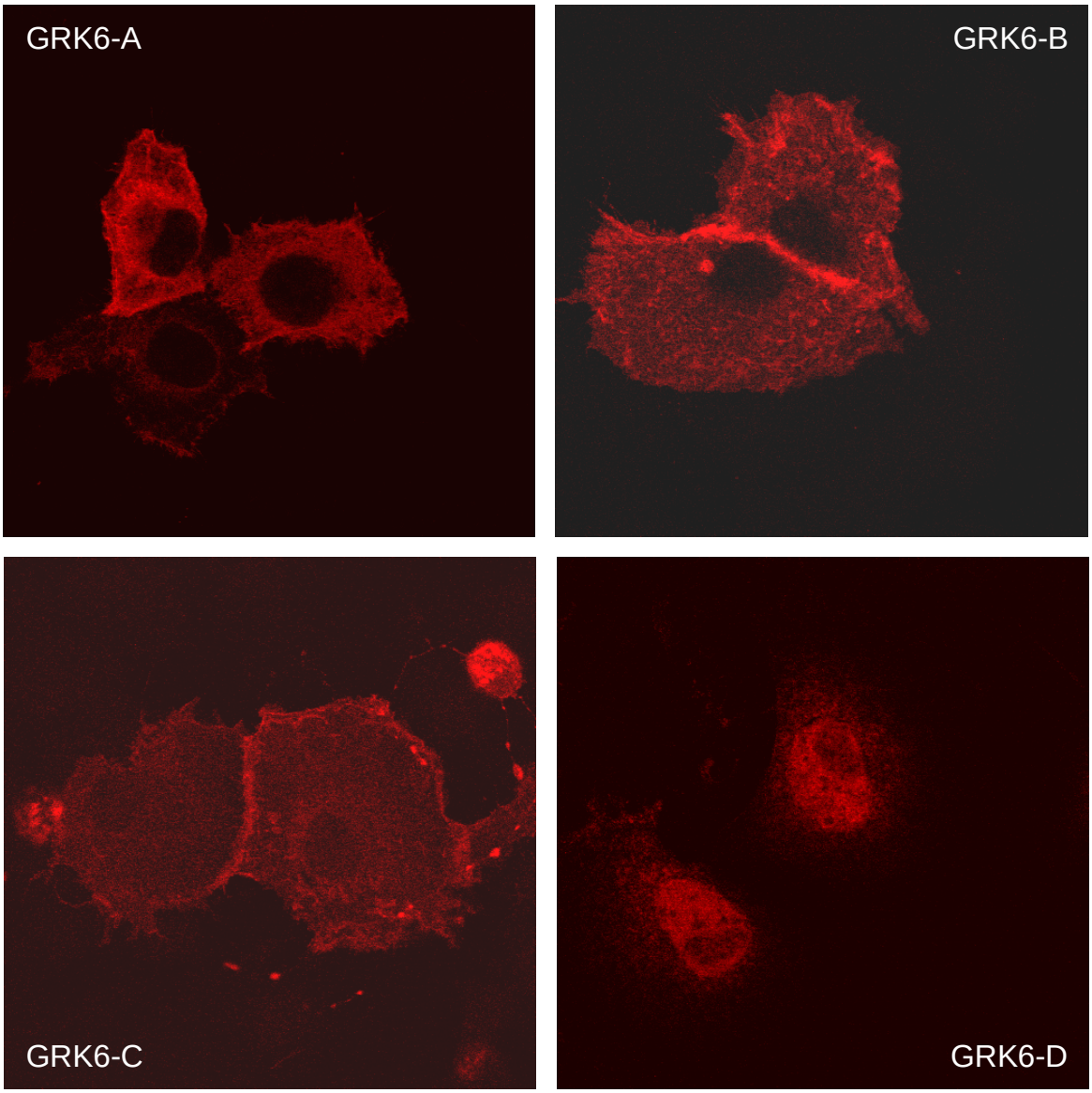


Abb. 34: Immunfluoreszenz an transient mit mGRK6-A-, mGRK6-B-, mGRK6-C- und mGRK6-D-cDNA transfizierten COS-7-Zellen. Pro Ansatz wurden 1 x 10^5 COS-7-Zellen mit jeweils 0.8 µg pMT2SM/mGRK6-Konstrukt und dem Transfektionsreagenz SuperFect™ transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit 4 % (m/V) Paraformaldehyd fixiert, mit 0.2 % (V/V) Triton X-100 permeabilisiert, mit 5 % (m/V) Milchpulver abgesättigt und mit dem affinitätschromatographisch über Protein-A-Sepharose gereinigten und anschließend für 15 min bei 125.000 *g* zentrifugierten Anti-Pep2-Antikörper (1:200 in Milchpulver verdünnt) inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein Anti-Kaninchen-Antikörper (1:500 in Milchpulver verdünnt) eingesetzt, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3 (Cy™ 3) markiert war. Die COS-7-Zellen wurden mit Elvanol eingedeckelt und dunkel gelagert. Die Bilder wurden an einem konfokalen Mikroskop aufgenommen.

4.6 GRK-Lipid-Wechselwirkungen

In transient mit Rezeptorkinase 6-cDNA transfizierten COS-7-Zellen wurde sowohl im Immunoblot als auch in der Immunfluoreszenz gezeigt, dass die Proteine der mGRK6-A, mGRK6-B und auch der mGRK6-C vorwiegend mit der Membran assoziiert vorliegen. Für die Varianten A und B war eine Verankerung in der Membran über palmitoylierte Cysteine (Variante mGRK6-A) oder positiv geladene carboxyterminale Bereiche (Variante mGRK6-B) denkbar (vgl. Abb. 32), unklar war aber, wie die carboxyterminal verkürzte Variante C an die Membran binden konnte. Von Mitgliedern der Rezeptorkinase-Familie ist bekannt, dass sie amino- oder carboxyterminal mit den Phospholipiden Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdInsP_2) oder Phosphatidylserin (PS) interagieren können (vgl. Abb. 5). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen den mGRK6-Varianten und Rezeptorkinasen, für die eine Phospholipid-Bindungsdomäne beschrieben ist, deutete auf eine Interaktion der mGRK6-Isoformen mit Phospholipiden hin. Um zu klären, ob die mGRK6-Polypeptide mit Phospholipiden wechselwirken konnten, wurden Bindungsstudien an Phospholipidvesikeln durchgeführt. Dabei wurden sequentiell über SP- und Heparin-Sepharose-Matrix gereinigte Proteine mGRK6-A bzw. mGRK6-C mit steigenden Konzentrationen verschiedener Phospholipidvesikel inkubiert und anschließend in eine lipidfreie lösliche und eine lipidhaltige partikuläre Fraktion separiert. Die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Rezeptorkinase-Varianten A bzw. C wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel durch *Western blotting* analysiert. Abbildung 35 zeigt die erhaltenen Ergebnisse. In Abwesenheit von Phospholipiden befanden sich beide Proteine mGRK6-A und mGRK6-C ausschließlich in der lipidfreien löslichen Fraktion. Steigende Konzentrationen Phosphatidylcholin (PC) oder Phosphatidylserin (PS) hatten keinen signifikanten Effekt auf die Umverteilung der Rezeptorkinasen mGRK6-A und mGRK6-C von der lipidfreien in die lipidhaltige partikuläre Fraktion, d. h die Varianten A und C konnten weder mit dem positiv geladenen PC noch mit dem neutralen PS wechselwirken. Im Gegensatz dazu wurde in Anwesenheit von Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdInsP_2) mit zunehmender Lipidkonzentration eine Verschiebung des Anteils der Proteine mGRK6-A und -C von der lipidfreien löslichen in die lipidhaltige partikuläre Fraktion beobachtet. Beide Rezeptorkinase 6-Varianten mGRK6-A und mGRK6-C konnten mit PtdInsP_2 interagieren und auf diese Weise an die Membran transloziert werden.

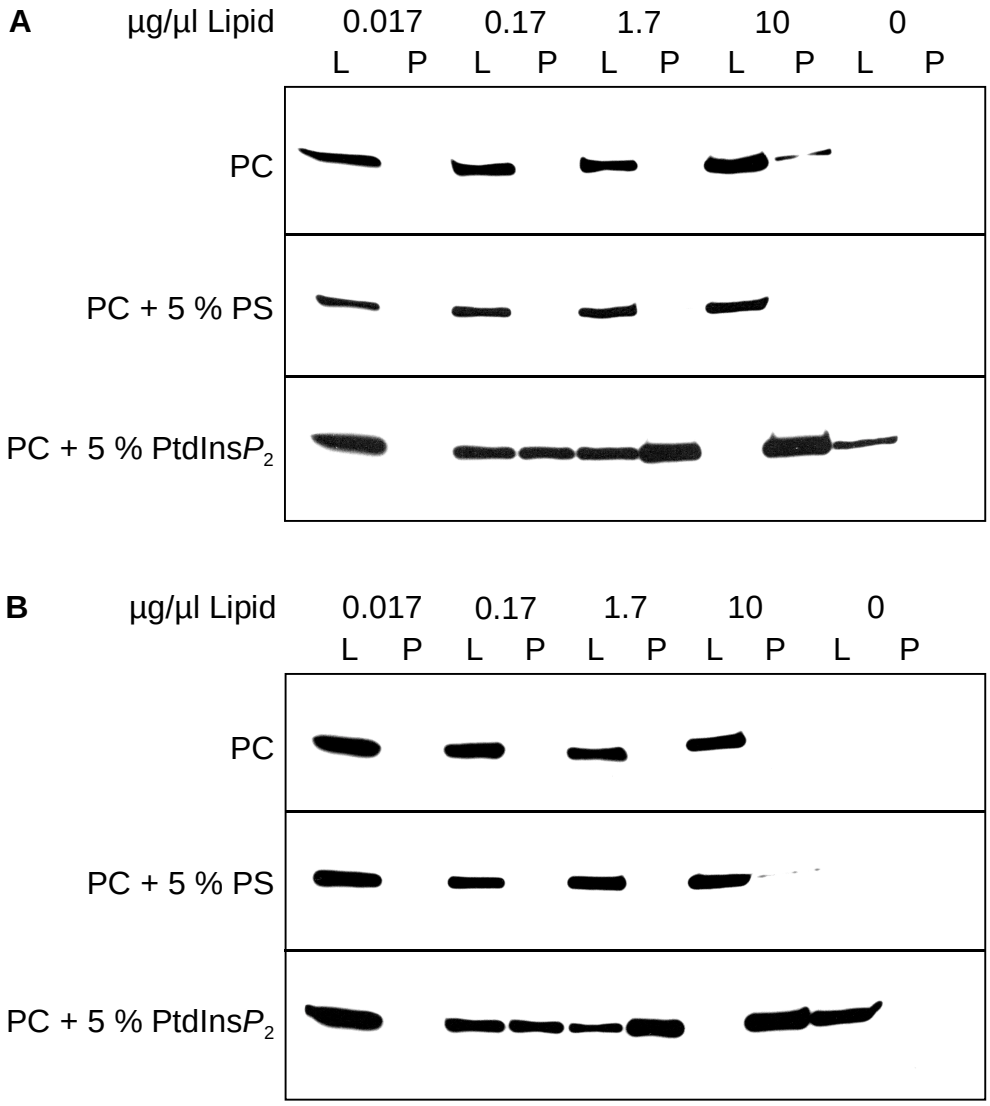


Abb. 35: Analyse der Wechselwirkung zwischen den Rezeptorkinasen mGRK6-A und mGRK6-C und verschiedenen Phospholipidvesikeln im Immunoblot. Dreißig pmol sequentiell über SP- und Heparin-Sepharose-Matrix gereinigte mGRK6-A (**A**) oder mGRK6-C (**B**) wurden ohne oder mit 0.017, 0.17, 1.7 und 10 µg/µl Phospholipidvesikeln aus reinem Phosphatidylcholin (PC) oder unter Zusatz von 5 % Phosphatidylserin (PS) bzw. Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdInsP_2) in Anwesenheit von 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM $MgCl_2$ und 100 mM NaCl für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 200.000 *g* wurden die Ansätze in eine lösliche lipidfreie (**L**) und eine partikuläre lipidhaltige Fraktion (**P**) separiert. Jeweils 15 µl der löslichen und partikulären Proteinfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose-membranen transferiert und im Immunoblot mit dem (**A**) Anti-GRK6- oder (**B**) Anti-Pep2-Antikörper detektiert.

4.7 Struktur-Funktions-Analyse der mGRK6-Varianten

Die Bindungsstudien an Phospholipidvesikeln hatten gezeigt, dass sowohl die mGRK6-A- als auch die mGRK6-C-Isoform über die Wechselwirkung mit PtdInsP_2 an die Membran binden können. Dieser Befund erklärte aber noch nicht, weshalb das rekombinant in Insektenzellen exprimierte mGRK6-C-Polypeptid im Vergleich mit den anderen Proteinen mGRK6-A und mGRK6-B eine höhere Phosphorylierungsaktivität bezüglich lichtaktivierten Rhodopsins (vgl. Abb. 25) besitzt. Neuere Untersuchungen von Pronin *et al.* (1998) über die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 5 (GRK5) konnten eine autoinhibitorische Funktion des Carboxyterminus nachweisen. Da die C-Termini von GRK5 und mGRK6-B homologe Bereiche aufweisen, bestand die Möglichkeit, dass der carboxyterminale Bereich der mGRK6-B ebenfalls autoinhibitorisch wirken könnte. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden Mutanten der Rezeptorkinase mGRK6-B hergestellt, in denen der C-Terminus der mGRK6-B schrittweise auf die Länge der aktiveren mGRK6-C reduziert wurde. Die carboxyterminale Aminosäuresequenz der mGRK6-B-Mutanten 1 bis 3 und der Wildtyp (WT)-Varianten mGRK6-B und mGRK6-C sind in Abbildung 36 dargestellt. Mit der Verkürzung des Carboxyterminus wurden auch die putativen Phosphorylierungsstellen der mGRK6-B sowie bestimmte basische Aminosäuren entfernt.

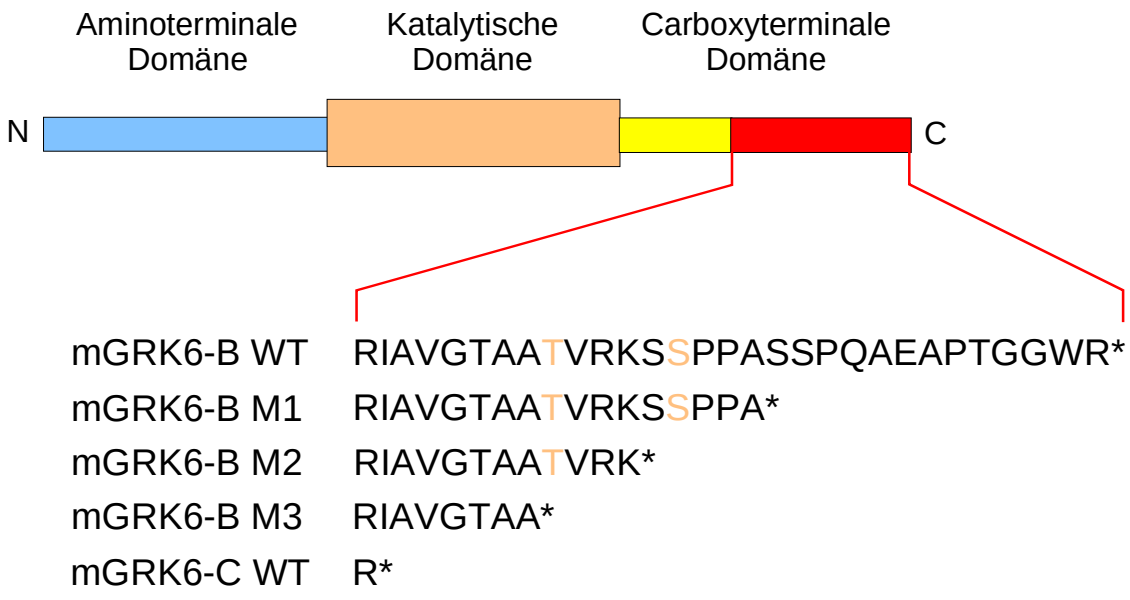


Abb. 36: Primärstruktur der Carboxytermini der Wildtyp-Proteine mGRK6-B und mGRK6-C sowie der mGRK6-B Mutanten 1, 2 und 3. Die putativen Phosphorylierungsstellen an Serin- und Threoninresten sind farbig (orange) hervorgehoben.

Die Mutanten 1, 2 und 3 der mGRK6-B und die Wildtyp-Varianten mGRK6-A und mGRK6-C wurden in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert und die Aktivität der rekombinanten Proteine durch lichtabhängige Phosphorylierung mit Rhodopsin als Substrat untersucht (Abb. 37).

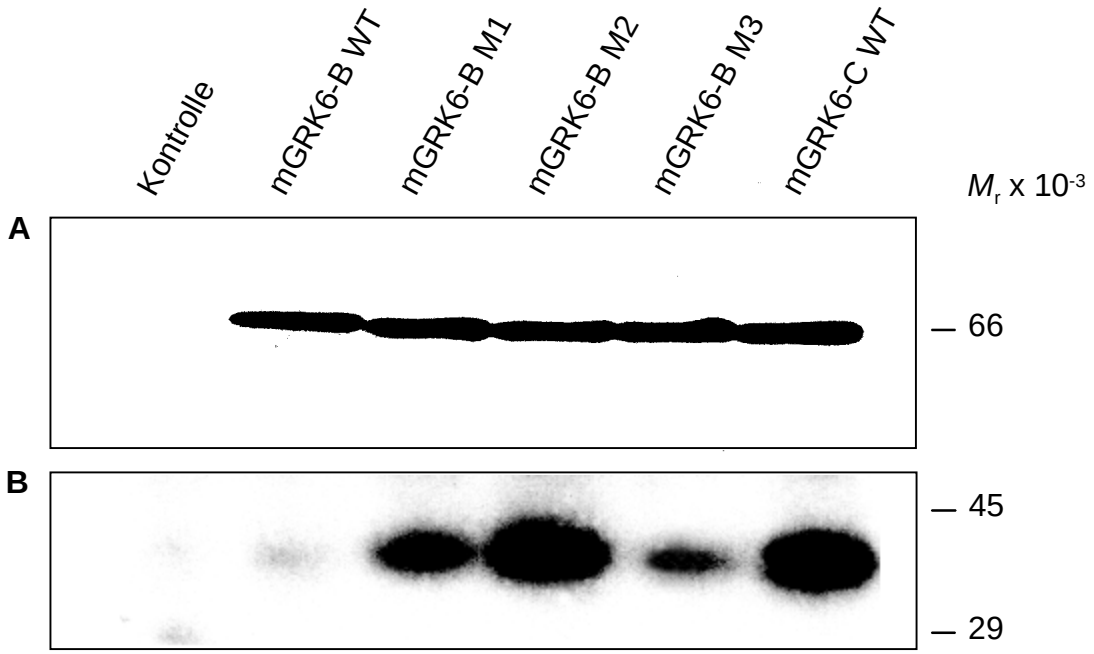


Abb. 37: Aktivitätsvergleich zwischen den mGRK6-B-Mutanten 1, 2 und 3 und den Wildtyp-Varianten mGRK6-A und mGRK6-C. (**A**) Die in den 300.000 *g*-Überständen nicht infizierter und mGRK6-B WT, mGRK6-B Mutanten 1, 2 oder 3 oder mGRK6-C WT exprimierender *Sf*9-Zellen enthaltenen Rezeptorkinasen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper detektiert. (**B**) Die über den Immunoblot eingestellten, Rezeptorkinase enthaltenden 300.000 *g*-Überstände wurden in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 3.7 mM $MgCl_2$ in Anwesenheit von 120 nM Rhodopsin und 100 µM [γ–^{32}P]ATP für 10 min bei 30 °C belichtet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 x Probenpuffer gestoppt und die Proteine über SDS-PAGE auf einem 10 % (m/V) Acrylamidgel aufgetrennt. Der Röntgenfilm wurde 5 h mit dem fixierten Gel exponiert. Die Positionen des phosphorylierten Rhodopsins und des Molekulargewichtsstandards sind angegeben.

Die für die Phosphorylierung eingesetzten Mengen an im 300.000 *g*-Überstand befindlichen Rezeptorkinasen wurden über einen Immunoblot mit dem Anti-Pep2-Antikörper eingestellt. Bei der Phosphorylierung lichtaktivierten Rhodopsins fiel auf, dass alle drei mGRK6-B-Mutanten aktiver waren als der mGRK6-B-Wildtyp. Allerdings korrelierte die

Aktivität der Mutanten nicht ausschließlich mit der Länge des Carboxyterminus, da die kürzeste der drei Mutanten, die mGRK6-B M3, weniger aktiv war als die um 4 bzw. 9 Aminosäuren längeren Mutanten mGRK6-B M2 bzw. M1. Die Mutante mGRK6-B M2 besaß eine der Wildtyp-Variante mGRK6-C vergleichbare Aktivität. Die als Negativkontrolle eingesetzten Proteine des 300.000 *g*-Überstandes nicht infizierter *Sf*9-Zellen konnten Rhodopsin in einer Endkonzentration von 120 nM nicht phosphorylieren.

4.8 GRK-Rezeptor-Wechselwirkungen

Mit Hilfe der mRNA- und Proteinexpressionsanalysen in verschiedenen Mausgeweben konnten die vier Varianten der mGRK6 vorwiegend in lymphatischen Geweben lokalisiert werden. Es ist wahrscheinlich, dass u. a. diese Rezeptorkinasen an der homologen Desensibilisierung der in Leukozyten vorhandenen Chemokinrezeptoren beteiligt sind. Auf der Suche nach physiologisch relevanten Substraten für die mGRK6-Proteine wurden verschiedene Ansätze gewählt.

4.8.1 *In vitro*-Phosphorylierung von Chemokinrezeptoren

Verschiedene, zum Teil aminoterminal mit Hämagglutinin (HA)-gekoppelte, Chemokinrezeptoren wie der murine HA-CXCR4, der humane HA-CCR2b, der humane HA-CCR2a, der humane CXCR4 und der humane CXCR2 wurden in Baculovirus-infizierten Insektenzellen ohne oder mit den G-Protein-Untereinheiten $G_{\alpha i2}$ und $G_{\beta 1\gamma 3}$ exprimiert und nach 48 h geerntet. Die Expression der Proteine wurde im Falle der HA-gekoppelten Rezeptoren im Immunoblot mit einem Anti-HA-Antikörper oder bei den anderen Rezeptoren, die dafür mit G-Protein-Untereinheiten koexprimiert werden mussten, über Bindung von [^{35}S]GTP[S] an die rezeptorhaltigen Membranen der infizierten *Sf*9-Zellen kontrolliert (Moepps *et al.*, 1997). Als Rezeptorkinasen wurden die in den 300.000 *g*-Überständen enthaltene, rekombinant exprimierte und in der lichtabhängigen Rhodopsinphosphorylierung aktive bovine GRK2, die mGRK6-A und die mGRK6C eingesetzt. In keinem der *in vitro*-Phosphorylierungsversuche der verschiedenen Chemokinrezeptoren durch die rekombinanten Rezeptorkinasen konnte nach Auftrennung der in den Reaktionsansätzen enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blau-Färbung im Autoradiogramm ein Unterschied zwischen nicht stimulierten und mit Ligand stimulierten Ansät-

zen festgestellt werden. Zudem war es kaum möglich, innerhalb der Vielzahl von Signalen das zu identifizieren, welches für den phosphorylierten Chemokinrezeptor spezifisch war (nicht abgebildet).

4.8.2 *Crosslinking*-Experimente

Da die *in vitro*-Phosphorylierungsversuche keine Aussage über die GRK-Rezeptor-Interaktion erlaubten, musste zunächst geklärt werden, ob Chemokinrezeptoren und Rezeptorkinasen miteinander wechselwirken können. Dazu sollten *crosslinking*-Experimente durchgeführt werden, in denen HA-gekoppelter Chemokinrezeptor und Kinase in Baculovirus-infizierten Insektenzellen koexprimiert und die infizierten *Sf*9-Zellen vor der Zelllyse mit dem *crosslinking*-Reagenz Dithiobissuccinimidylpropionat (DSP) behandelt werden. Bei DSP handelt es sich um einen lipophilen, homobifunktionalen N-Hydroxysuccinimid-Ester, der nach Passage der Zellmembran mit primären Aminen in AS-Seitenketten von benachbarten Proteinen wie Rezeptor und Rezeptorkinase reagieren und diese kovalent verknüpfen kann. Diese kovalente Bindung kann vor der SDS-PAGE durch Reduktion der Disulfidbrücke des DSP mit β-Mercaptoethanol wieder gespalten werden. Die interagierenden Proteine können getrennt im *Western blot* nachgewiesen werden. Insektenzellen wurden mit für HA-mCXCR4, HA-hCCR2a, mGRK6-C und bGRK2 kodierenden Baculoviren infiziert. Die Chemokinrezeptoren und Rezeptorkinasen wurden entweder einzeln oder zusammen in *Sf*9-Zellen exprimiert. Nach 40stündiger Infektion wurden die Insektenzellen mit den entsprechenden Chemokinen stimuliert, die HA-mCXCR4 exprimierenden sowie die nicht infizierten Zellen mit 100 nM SDF-1α (*stromal cell-derived factor* 1α), die HA-hCCR2a exprimierenden Zellen mit MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein* 1), mit DSP behandelt, lysiert, mit dem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert und im *Western blot* analysiert. Die Ergebnisse sind in den folgenden drei Abbildungen 38 bis 40 dargestellt. Der Immunoblot (Abb. 38) zeigt die nach Immunpräzipitation mit dem Anti-HA-Antikörper im Überstand verbliebenen und nacheinander mit dem Anti-Pep2- bzw. dem Anti-GRK2-Antikörper detektierten Rezeptorkinasen mGRK6-C (64 kDa) bzw. bGRK2 (80 kDa laut Benovic *et al.*, 1987). Beide Proteine wurden in allen Überständen der mit den entsprechenden Baculoviren für mGRK6-C bzw. bGRK2 infizierten oder mit den Chemokinrezeptoren koinfizierten *Sf*9-Zellen nachgewiesen.

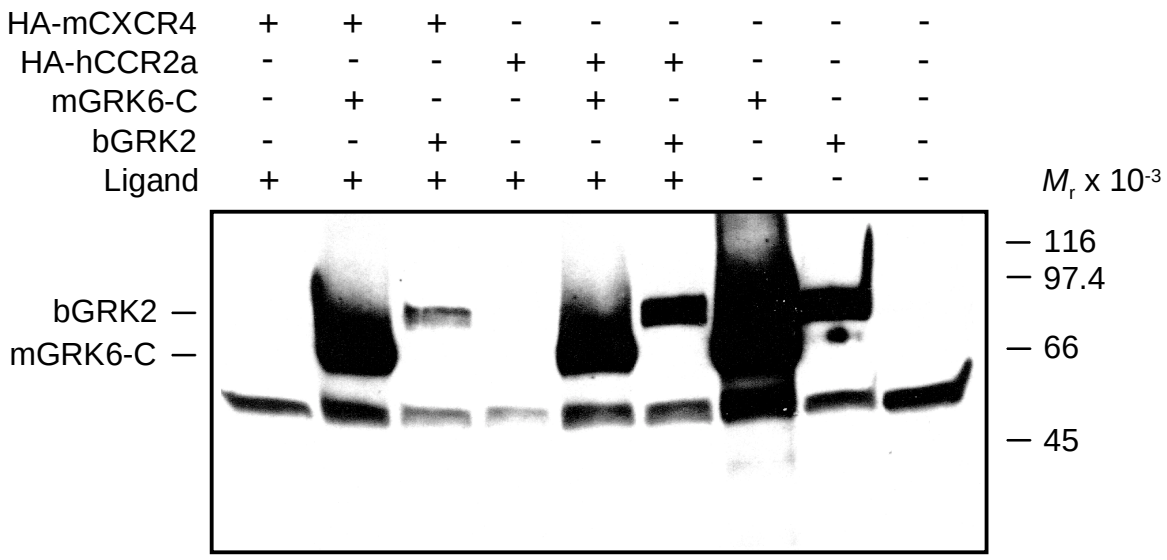


Abb. 38: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Chemokinrezeptoren HA-mCXCR4 und HA-hCCR2a und den Rezeptorkinasen mGRK6-C und bGRK2. Die mit den für HA-mCXCR4, HA-hCCR2, mGRK6-C und bGRK2 kodierenden Baculoviren infizierten bzw. koinfizierten *Sf*9-Insektenzellen wurden 40 h nach Infektion für 15 min mit den Chemokin-Liganden SDF-1α (HA-mCXCR4) oder MCP-1 (HA-hCCR2a) stimuliert, anschließend mit dem *crosslinking*-Reagenz DSP behandelt, lysiert und mit dem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Die nach der Immunpräzipitation im Überstand enthaltenen Proteine (je 15 µl) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im *Western blot* nacheinander mit dem Anti-Pep2- und dem Anti-GRK2-Antikörper detektiert. Die Positionen der Proteine bGRK2 bzw. mGRK6-C sowie des Größenstandards sind angegeben.

Die selektiv an die Protein G-Agarose gebundenen HA-gekoppelten Rezeptor- bzw. Rezeptor/Rezeptorkinase-Antikörper-Komplexe wurden ebenfalls im *Western blot* untersucht. Die beiden in Abbildung 39 dargestellten Immunoblots wurden nacheinander mit dem Anti-Pep2- und mit dem Anti-GRK2-Antikörper inkubiert. Die mGRK6-C konnte in den mit für HA-mCXCR4 und mGRK6-C kodierenden Baculoviren koinfizierten und mit Ligand stimulierten und unstimulierten *Sf*9-Zellen nachgewiesen werden, nicht aber in den HA-hCCR2a und mGRK6-C koexprimierenden Insektenzellen. Im Immunpräzipitat der ausschließlich mit für mGRK6-C kodierenden Baculoviren infizierten Zellen war nahezu kein mGRK6-C-Protein enthalten. Die Rezeptorkinase mGRK6-C konnte selektiv mit dem HA-gekoppelten Chemokinrezeptor mCXCR4, nicht aber mit dem hCCR2a interagieren. Dabei war der Aktivierungszustand des Rezeptors nicht von Bedeutung. Die Rezeptorkinase 2 kopräzipitierte ebenfalls unabhängig von der Ab- oder Anwesenheit des Liganden sowohl mit dem Chemokinrezeptor HA-mCXCR4 als auch mit dem Chemokinrezeptor HA-hCCR2a. Im Präzipitat der ausschließlich bGRK2 exprimierenden, unstimulierten *Sf*9-

Zellen konnten Spuren dieses Proteins detektiert werden. In nichtinfizierten, unstimulierten und mit SDF-1α stimulierten Insektenzellen konnte keine der Rezeptorkinasen nachgewiesen werden.

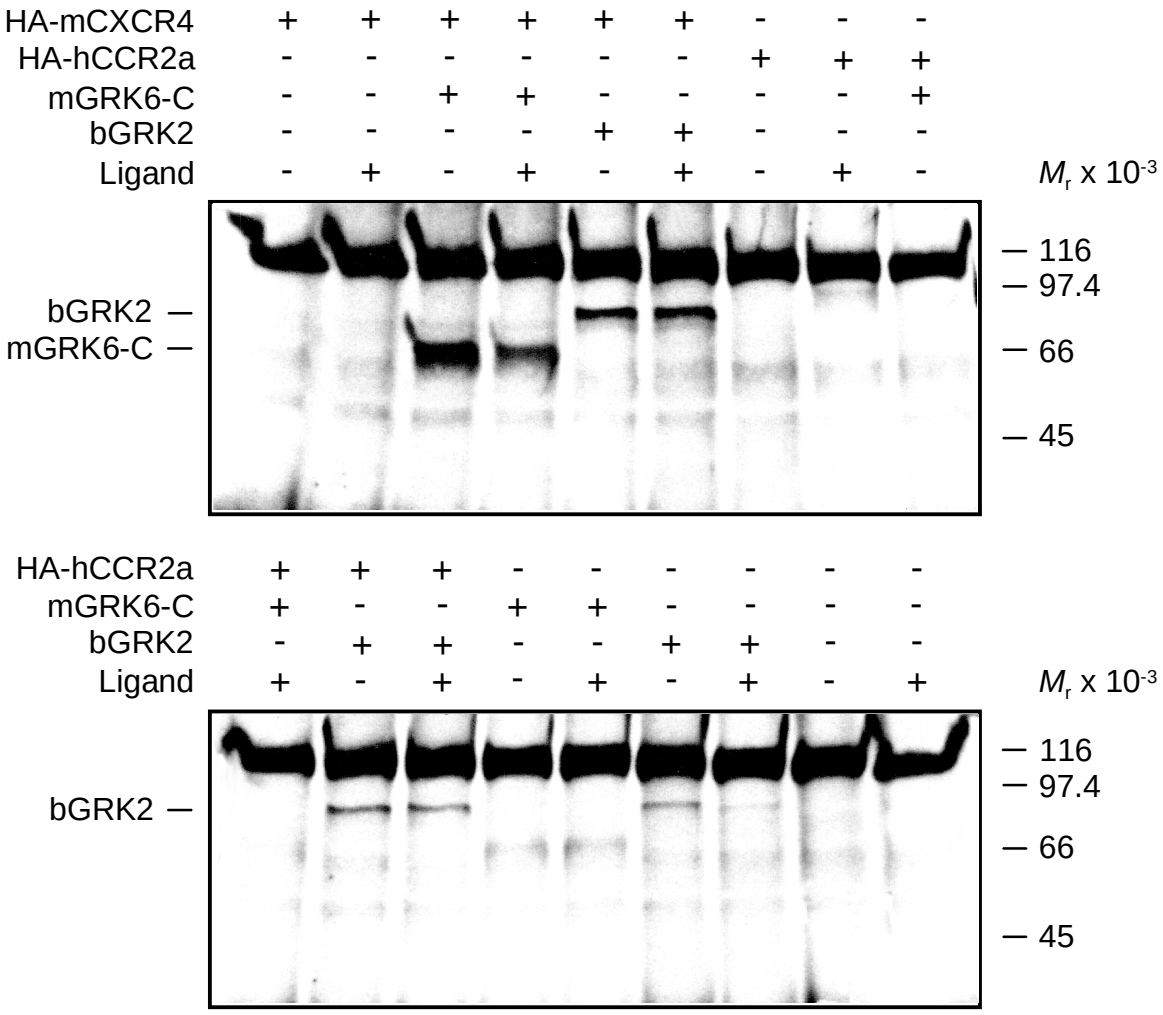


Abb. 39: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Chemokinrezeptoren HA-mCXCR4 und HA-hCCR2a und den Rezeptorkinasen mGRK6-C und bGRK2. Die mit den für HA-mCXCR4, HA-hCCR2, mGRK6-C und bGRK2 kodierenden Baculoviren infizierten bzw. koinfizierten *Sf*9-Insektenzellen wurden 40 h nach Infektion für 15 min mit den Chemokin-Liganden SDF-1α (HA-mCXCR4) oder MCP-1 (HA-hCCR2a) stimuliert, anschließend mit dem *crosslinking*-Reagenz DSP behandelt, lysiert und mit dem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Die nach der Immunpräzipitation über den Anti-HA-Antikörper an die Protein G-Agarose gebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im *Western blot* nacheinander mit dem Anti-Pep2- und dem Anti-GRK2-Antikörper detektiert. Die Positionen der Proteine bGRK2 bzw. mGRK6-C sowie des Größenstandards sind angegeben.

Die gleichen *blots* wurden anschließend mit dem Anti-HA-Antikörper inkubiert, um die Menge der an die Protein G-Agarose gebundenen Chemokinrezeptoren zu vergleichen (Abb. 40). Abgesehen von den Signalen der leichten und schweren Ketten des ursprünglich an die Protein G-Agarose gebundenen Anti-HA-Antikörpers mit Molekulargewichten um 30 und 60 kDa konnten in allen mit den für HA-mCXCR4 bzw. HA-hCCR2a kodierenden Baculoviren infizierten *Sf*9-Zellpräzipitaten die Chemokinrezeptoren HA-mCXCR4 bzw. HA-hCCR2a in ungefähr gleichen Mengen nachgewiesen werden.

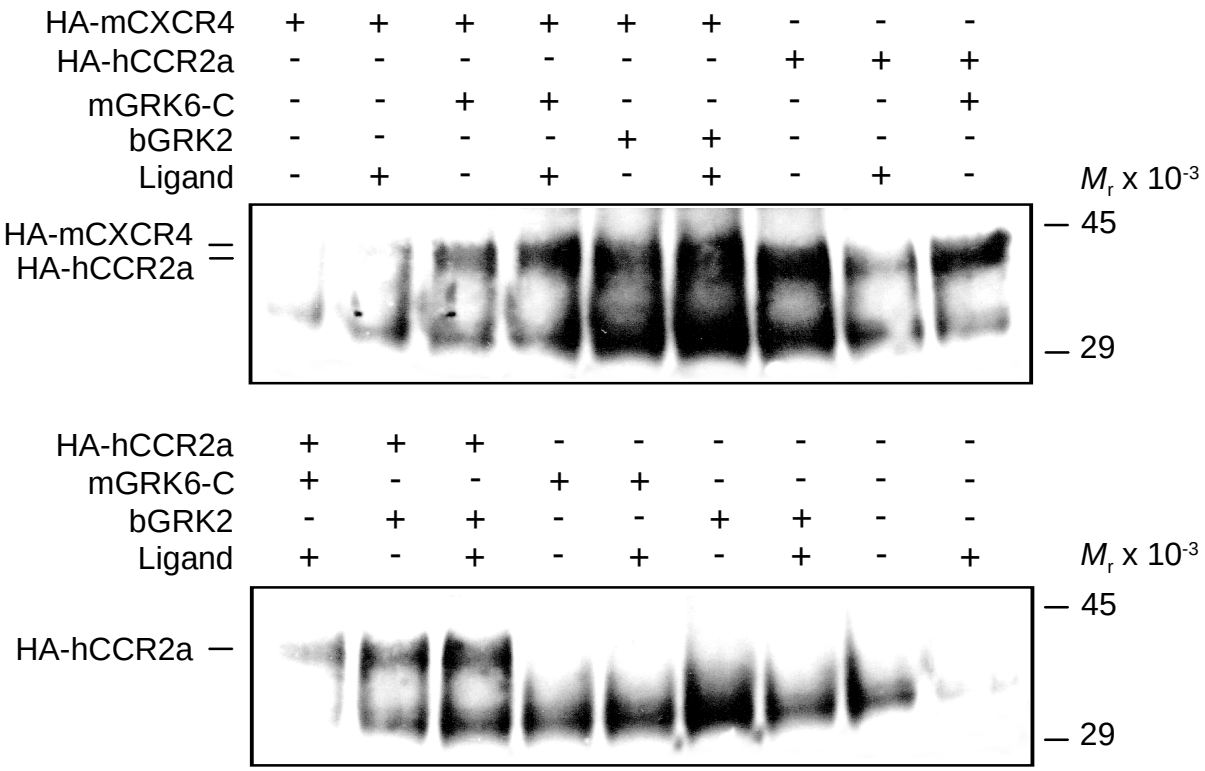


Abb. 40: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Chemokinrezeptoren HA-mCXCR4 und HA-hCCR2a und den Rezeptorkinasen mGRK6-C und bGRK2. Die mit den für HA-mCXCR4, HA-hCCR2, mGRK6-C und bGRK2 kodierenden Baculoviren infizierten bzw. koinfizierten *Sf*9-Insektenzellen wurden 40 h nach Infektion für 15 min mit den Chemokin-Liganden SDF-1α (HA-mCXCR4) oder MCP-1 (HA-hCCR2a) stimuliert, anschließend mit dem *crosslinking*-Reagenz DSP behandelt, lysiert und mit dem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Die nach der Immunpräzipitation über den Anti-HA-Antikörper an die Protein G-Agarose gebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im *Western blot* mit dem Anti-HA-Antikörper detektiert. Die Positionen der Proteine HA-mCXCR4 und HA-hCCR2a sowie des Größenstandards sind angegeben.

4.8.3 *In vivo*-Phosphorylierung von Chemokinrezeptoren

In den *crosslinking*-Versuchen konnte die Wechselwirkung zwischen der Rezeptorkinase mGRK6-C und dem HA-gekoppelten Chemokinrezeptor mCXCR4 gezeigt werden. Es wär denkbar, dass die *in vitro*-Phosphorylierungsversuche mit rekombinant in Insektenzellen exprimiertem mGRK6-C- und mCXCR4-Protein nicht aussagekräftig waren, weil die Rezeptordichte des in den Membranen infizierter Insektenzellen enthaltenen Chemokinrezeptors zu gering war, um das für den phosphorylierten Rezeptor spezifische Signal im Autoradiogramm von den vielen anderen, ebenfalls phosphorylierten Proteinen zu unterscheiden. Die Technik der *in vivo*-Phosphorylierung besitzt den Vorteil, alle rekombinant exprimierten HA-gekoppelten Rezeptoren mit Hilfe von Anti-HA-Antikörpern aus dem Zelllysat zu präzipitieren, um die Rezeptoren von vielen anderen, teilweise auch phosphorylierten, Proteinen abzutrennen und an der mit Anti-HA-Antikörper beladenen Protein G-Agarose-Matrix anzureichern. Bei der *in vivo*-Phosphorylierung wurde der HA-gekoppelte Chemokinrezeptor mCXCR4 zusammen mit der Rezeptorkinase mGRK6-C sowohl in infizierten *Sf*9-Insektenzellen als auch in transient transfizierten COS-7-Zellen exprimiert. Nach erfolgter Markierung der Zellen mit [^{32}P]Orthophosphat wurden die Zellen mit 100 nM SDF-1α stimuliert, anschließend lysiert und die von der Zelle exprimierten HA-gekoppelten Rezeptoren mit dem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. Im Autoradiogramm konnte zum einen weder in den *Sf*9-Zellen noch in den COS-7-Zellen zwischen unstimulierten und mit Ligand stimulierten Zellen unterschieden werden, zum anderen war auch keine Differenz zwischen Zellen zu erkennen, die den Rezeptor allein oder zusammen mit der Rezeptorkinase exprimierten. In den parallel aufgearbeiteten, aber nicht radioaktiv markierten *Sf*9- und COS-7-Zellen wurden im *Western blot* sowohl der Rezeptor HA-mCXCR4 als auch die Kinase mGRK6-C detektiert, die rekombinanten Proteine waren also vorhanden. Auch die Ergebnisse der *in vivo*-Phosphorylierung deuteten darauf hin, dass der Chemokinrezeptor mCXCR4 unabhängig vom Aktivierungszustand mit der Rezeptorkinase assoziiert ist und von dieser phosphoryliert werden kann.

5 Diskussion

Bei kontinuierlicher Anwesenheit von Agonisten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren im Extrazellulärraum kommt es normalerweise im Rahmen einer als Desensibilisierung bezeichneten Reaktion zur Verminderung oder sogar zum völligen Verlust der Aktivierbarkeit der Rezeptoren durch ihre Liganden. An der funktionellen Entkopplung membranständiger Rezeptoren sind neben anderen Proteinen Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) beteiligt. Bei den Rezeptorkinasen handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, die Agonist-aktivierte Rezeptoren in ihrem carboxyterminalen Bereich phosphorylieren. Die GRKs gehören zu einer größeren Genfamilie mit derzeit mindestens sechs Mitgliedern (GRK1 bis 6).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass von der GRK6 der Maus (mGRK6) vier verschiedene mGRK6-Transkripte existieren, die durch alternatives RNA-Spleißen aus einem einzigen Gen gebildet werden. Alternatives RNA-Spleißen ist auch für die Entstehung von vier verschiedenen humanen GRK4-mRNAs bzw. zwei mRNA-Transkripten der humanen GRK1 aus einem Gen verantworlich (Premont *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998). Firsov und Elalouf (1997) konnten in der Ratte zwei alternativ gespleißte GRK6-Varianten identifizieren, GRK6a und GRK6b. Die GRK6a und GRK6b der Ratte entsprechen den in dieser Arbeit mit mGRK6-A und mGRK6-B bezeichneten Varianten der Maus. Wie GRK6a und GRK6b der Ratte stellen die Mausvarianten mGRK6-A und mGRK6-B Produkte eines alternativen Spleißprozesses an zwei unterschiedlichen Spleißakzeptorstellen des gleichen Exons dar, wobei eine Stelle, das Dinukleotid CC, nicht mit dem Konsensusdinukleotid AG der Spleißakzeptorstelle übereinstimmt (Breathnach und Chambon, 1981). Ungewöhnliche Spleißakzeptorstellen werden ebenfalls bei der Bildung alternativ gespleißter Transkripte des *Drosophila clock*-Gens und des humanen $G_S\alpha$-Gens verwendet (Citri *et al.*, 1987; Kozasa *et al.*, 1988). Die Tatsache, dass durch Sequenzierung von RT-PCR-Produkten und cDNA-Klonen sowie durch SNuPE mGRK6-B-Transkripte in verschiedenen Mausgeweben detektiert wurden und dass pro haploidem Genom ein einziges mGRK6-Gen gefunden werden konnte, unterstützt die Annahme, dass anstelle des Konsensusdinukleotids AG das Dinukleotid CC als 3´-Spleißakzeptorstelle genutzt wird, um die mRNA der mGRK6-B zu transkribieren. Premont *et al.* (1999) konnten im Rahmen der Charakterisierung der GRK4-Subfamilie ebenfalls die Entstehung dieser drei Spleißvari-

anten mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C aus einem Gen der murinen GRK6 nachweisen. Die Ergebnisse lassen des Weiteren erkennen, dass sich mGRK6-C und mGRK6-D durch alternative Auswahl des Exons 16 von mGRK6-A und mGRK6-B unterscheiden, woraus verschiedene nicht translatierte 3´-Regionen resultieren. Für diese nichttranslatierten Bereiche ist eine Beteiligung an der posttranskriptionalen Kontrolle der Genexpression durch Regulation der mRNA-Stabilität und/oder der translationalen Stabilität gezeigt worden (Day und Tuite, 1998). Das in Abbildung 5 des Ergebnisteils vorgeschlagene Modell zur Bildung der für die mGRK6-D kodierenden mRNA basiert auf der alternativen Verwendung einer internen Spleißdonorstelle nahe dem 3´-Ende von Exon 8, die eine Verschiebung des Leserahmens und einen vorzeitigen Kettenabbruch bei Kodon 245 zur Folge hat. Deletionen nichtintegraler Basentripletts, die eine Veränderung des Leserasters und eine verfrühte Termination verursachen, sind normalerweise charakteristisch für prozessierte Pseudogene (Vanin, 1985). Zudem konnte im Mensch ein transkriptionell inaktives, prozessiertes Pseudogen des GRK6-Gens mit abweichender chromosomaler Lokalisation identifiziert werden (Gagnon und Benovic, 1997). Jedoch sprechen die Tatsache, dass es nicht möglich war, intronfreie mGRK6-DNA aus genomischer Maus-DNA zu amplifizieren, die im *Southern blot* erhaltenen Ergebnisse (Wächter, 1999) und die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung dagegen, dass die mGRK6-D das Produkt eines prozessierten Pseudogens der mGRK6 repräsentiert. Unterstützt wird diese Annahme sowohl von Firsov und Elalouf (1997) als auch von Premont *et al.* (1999), die das Vorkommen eines Pseudogens der GRK6 in Nagern ausschließen. Sollte dennoch ein prozessiertes Pseudogen der mGRK6 existieren, sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass das Pseudogen transkriptionell aktiv ist, da die mRNA der mGRK6-D in mehreren lymphatischen Geweben wie Thymus, Milz und Lymphknoten durch Sequenzierung der klonierten cDNA und in SNuPE-Experimenten nachgewiesen werden konnte. Wie in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, sind die Exon/Exon-Übergänge zwischen der murinen GRK6 und der humanen GRK4-α vollständig konserviert. Ein Vergleich zwischen dem murinen GRK5- und GRK6-Gen hat ergeben, dass auch hier die Exon/Intron-Organisation identisch ist (Premont *et al.*, 1999). Die auf Aminosäuresequenzhomologien basierende Festlegung einer GRK4-Subfamilie (GRK4, 5 und 6) innerhalb der GRK-Familie (Premont *et el.*, 1995) konnte anhand dieser Ergebnisse auf genomischer Ebene bestätigt werden.

Transkripte der humanen GRK6 konnten in verschiedensten Geweben und Zelltypen, einschließlich lymphatischen Geweben und Leukozyten, gefunden werden (Benovic und Gomez, 1993; Haribabu und Snyderman, 1993; De Blasi *et al.*, 1995; Loudon *et al.*, 1996). Nach Stimulation peripherer Blutlymphozyten mit Phytohämagglutinin, Anti-CD3-Antikörper plus Interleukin-2 oder 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) plus Calcium-Ionophor A23187 wurde eine Aufregulation der humanen GRK6-mRNA beschrieben (Loudon *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit waren mGRK6-Transkripte in Lymphknoten, Milz und Thymus besonders häufig. Die mit Hilfe der RNA *in situ*-Hybridisierung ermittelte mRNA-Expression der mGRK6 im gesamten Thymus und in der weißen Pulpa der Milz adulter Mäuse spricht dafür, dass die mGRK6 in Thymozyten verschiedener Reifestadien und in B-Lymphozyten exprimiert wird. Zusammengefasst unterstützen diese Ergebnisse die Vorstellung, dass GRK6-Isoformen an der Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in Leukozyten beteiligt sind. Mit Hilfe der für die mGRK6-Subtypen selektiven RT-PCR und SNuPE war es möglich, *in vivo* die differentielle Expression der vier mGRK6-Transkripte in verschiedenen Mausgeweben nachzuweisen. So konnte für mGRK6-A oder mGRK6-B kodierende mRNA in allen analysierten Geweben gefunden werden, während Transkripte der Varianten mGRK6-C oder mGRK6-D eine etwas eingeschränktere Verteilung mit häufiger Expression in Lymphknoten und Milz aufwiesen. In den meisten Geweben dominierte der Anteil an mGRK6-B- und mGRK6-C-mRNA gegenüber dem an mGRK6-A- und mGRK6-D-Transkripten. Ähnliche Beobachtungen sind bezüglich des Verhältnisses zwischen den für mGRK6a und mGRK6b kodierenden mRNAs in der Ratte beschrieben worden (Firsov und Elalouf, 1997). Basierend auf den hier erhaltenen Ergebnissen und der Arbeit von Firsov und Elalouf (1997) scheint das Gehirn das einzige Gewebe zu sein, in dem die palmitoylierte Variante, d. h. die GRK6-A der Maus oder die GRK6a der Ratte, überwiegt. In der vorliegenden Arbeit konnte im *Northern blot* nur eine mRNA-Spezies der murinen GRK6 detektiert werden. Die von Premont *et al.* (1999) beschriebene räumliche mRNA-Expression der mGRK6 in verschiedenen Mausgeweben stimmt mit diesen Daten überein. Sowohl mit einer gegen die 5´-Region gerichteten als auch mit einer mGRK6-C spezifischen Sonde konnte, wenn auch etwas schwächer, in allen analysierten Mausgeweben ein 3.8 kb großes Transkript erkannt werden. Dagegen konnten im Mensch zwei GRK6-mRNAs von ungefähr 2.2 und 3.0 kb Länge identifiziert werden (Haribabu und Snyderman, 1993; Benovic und Gomez, 1993). Interessanterweise konnte die kleinere mRNA nicht mit einer von der nicht kodierenden 3´-

Region der humanen GRK6-cDNA stammenden Sonde hybridisieren, was darauf zurückgeführt werden könnte, dass sich diese mRNA in der 3´-Region von der größeren mRNA unterscheidet. Während die 3.0 kb große mRNA in den meisten Geweben, insbesondere im Pankreas, überwog, war die 2.2 kb-Spezies im Skelettmuskel vorherrschend (Haribabu und Snyderman, 1993; Benovic und Gomez, 1993). Vor kurzem wurden auch im Mensch die drei Spleißvarianten hGRK6-A, hGRK6-B und hGRK6-C identifiziert (Premont *et al.*, 1999). Ausgehend von diesen Resultaten ist anzunehmen, dass im Mensch während des alternativen Spleißens mindestens zwei differenziell exprimierte GRK6-mRNAs mit 3.0 und 2.2 kb gebildet werden, welche den für die Polypeptide mGRK6-A und/oder mGRK6-B bzw. mGRK6-C und/oder mGRK6-D kodierenden Transkripten entsprechen.

GRK2 und GRK6 von Maus, Ratte und Mensch weisen 96 %, die GRK5 der Säuger 94 % identische Aminosäuren auf. Diese hoch konservierten Aminosäuresequenzen sprechen dafür, dass diesen Rezeptorkinasen eine fundamentale Bedeutung für lebenswichtige Prozesse zukommt, die in den verschiedenen Spezies erhalten sind (Premont *et al.*, 1999). Die GRK5 wird vorwiegend in Herz, Lunge und Retina exprimiert (Premont *et al.*, 1994). GRK5 *knock-out*-Mäuse weisen cholinerge Überempfindlichkeit und beeinträchtigte Desensibilisierung muskariner Rezeptoren auf (Gainetdinov *et al.*, 1999). Die GRK2 wird ubiquitär im gesamten Organismus exprimiert und scheint viele verschiedene Rezeptoren diverser Zelltypen zu regulieren (Pitcher *et al.*, 1998). Die Ausschaltung des GRK2-Gens ist aufgrund einer Fehlbildung des Herzens während der Entwicklung für den Mausembryo letal (Jaber *et al.*, 1996). Mit der RNA *in situ*-Hybridisierungstechnik konnte in dieser Arbeit sowohl die räumliche als auch die zeitliche Expression der mGRK6 im Mausembryo untersucht werden. Transkripte der murinen GRK6 fanden sich während der gesamten Embryonalentwicklung bevorzugt in Proliferationszonen einzelner Organe sowie im Thymus, dem Ort der Thymozytenreifung, und in der für die B-Zell-Entwicklung verantwortlichen fötalen Leber. Die in allen Entwicklungsstadien persistente Expression der mGRK6 im *Northern blot* von ganzen Embryonen (Premont *et al.*, 1999) unterstützt das erhaltene Verteilungsmuster. Diese Ergebnisse geben Grund zu der Annahme, dass die (m)GRK6 in grundlegende, entwicklungsphysiologisch relevante Prozesse, insbesondere in die Entwicklung von B- und T-Lymphozyten involviert ist und eine konstitutive Ausschaltung des GRK6-Gens der Maus vermutlich letal sein wird.

Die Anzahl der mRNA-Transkripte korreliert nicht zwangsläufig mit der Proteinexpression. Beispielsweise konnte für die humane GRK4 gezeigt werden, dass die längste mRNA-Variante, die hGRK4-α, in Testis am häufigsten ist (Premont *et al.*, 1996), während das entsprechende Protein nicht detektiert werden konnte. Statt dessen wurde im *Western blot* das Protein hGRK4-γ identifiziert, das Translationsprodukt der kürzesten Spleißvariante (Sallese *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit ermöglichten Subtyp-spezifische Antikörper eine qualitative Analyse der differentiellen Proteinexpression der Varianten mGRK6-A und mGRK6-B. In allen untersuchten und vorwiegend lymphatischen Geweben konnten in Analogie zu den mRNA-Transkripten Polypeptide beider mGRK6-Varianten A und B nachgewiesen werden. Eine quantitative Aussage über das Verhältnis der Proteine mGRK6-A und mGRK6-B zueinander wie mit Hilfe der SNuPE-Experimente auf mRNA-Ebene war im Immunoblot nicht möglich, da die beiden Antikörper unterschiedliche Epitope erkennen und keine Titration der affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper mit einer definierten Menge Peptid oder gereinigtem rekombinanten Protein erfolgt war. Die auf den Immunoblots in Abbildung 14 sichtbaren etwas kleineren immunoreaktiven Signale könnten proteolytische Abbauprodukte der mGRK6-A- und mGRK6-B-Proteine reflektieren. Proteolyse von GRK6-Proteinen wurde auch von Loudon *et al.* (1996) im *Western blot* von myeloiden und T-Zelllinien beobachtet. Diese Arbeitsgruppe konnte mit einem affinitätsgereinigten, polyklonalen Anti-GST-hGRK6(98-136)-Antikörper in Lysaten aus humanen Neutrophilen und peripheren Blutlymphozyten zwei Proteine mit Molekulargewichten von ungefähr M_r = 65.000 und M_r = 67.000 nachweisen, in Lysaten aus humanen Monozyten ein 65 kD großes Polypeptid. Es wäre denkbar, dass diese beiden Proteine den Varianten mGRK6-A (64 kD) und mGRK6-B (67 kD) entsprechen oder unterschiedlich posttranslational modifizierte Proteine einer Variante darstellen. Das in der vorliegenden Arbeit mit dem käuflichen Anti-GRK6-A-Antikörper in den partikulären Fraktionen von Milz und Lymphknoten detektierte Duplett mit Molekulargewichten um M_r = 66.000 wurde mit dem gleichen Antikörper auch von Lombardi *et al.* (1999) in GRK6 exprimierenden humanen peripheren mononukleären Blutleukozyten beobachtet, und es ist wahrscheinlich, dass es sich dabei sowohl bei Maus als auch bei Mensch um unterschiedlich modifizierte Formen der mGRK6-A handelt. Zum einen könnten die nicht palmitoylierte und die palmitoylierte Variante der mGRK6-A vorliegen, die beide in mit Baculoviren für die hGRK6 infizierten Insektenzellen (Stoffel *et al.*, 1994) und in transient mit hGRK6-cDNA transfizierten COS-1- und COS-7-Zellen (Loudon und Benovic, 1997; Stof-

fel *et al.*, 1998) nachgewiesen werden konnten. Es wäre aber auch möglich, dass das beobachtete Duplett die mGRK6-A in zwei Phosphorylierungszuständen widerspiegelt. Dafür spricht die Existenz zweier unterschiedlich phosphorylierter Varianten der hGRK6 in transient transfizierten COS-7-Zellen (Milcent *et al.*, 1999). Im Immunoblot mit dem mGRK6-B-spezifischen Antikörper konnte in den löslichen Fraktionen aus Thymus-, Lymphknoten-, Milz- und Gehirngewebe ein mGRK6-B-Protein mit einem gegenüber der mGRK6-B der partikulären Fraktion etwas geringeren Molekulargewicht identifiziert werden. Die Tatsache, dass die humane GRK5 und alle vier Varianten der mGRK6 das putative Autophosphorylierungsmotiv DIEQFSTVKG (AS 479 bis 488) besitzen (Kunapuli und Benovic, 1993; Wächter, 1999) und für die humane GRK5 als auch für die hGRK6, die dem humanen Äquivalent der mGRK6-A entspricht, nach Autophosphorylierung der Aminosäurereste Ser^{484} und Thr^{485} eine verminderte elektrophoretische Mobilität im SDS-Polyacrylamidgel beobachtet werden konnte (Pronin und Benovic, 1997; Milcent *et al.*, 1999), spricht für unterschiedlich phosphorylierte Polypeptide der mGRK6-B in den beiden Fraktionen, die folglich auch ein anderes Laufverhalten in der SDS-PAGE zeigen. Auffällig war auch der relativ geringe Anteil der mGRK6-B in den löslichen Fraktionen der untersuchten Gewebe. Diese Verteilung deckt sich mit der Vorstellung, dass die mGRK6-B analog der GRK5 keiner Agonist-abhängigen Translokation vom Cytosol an die Plasmamembran unterliegt, sondern konstitutiv mit der Membran assoziiert ist (Premont *et al.*, 1994). Der eindeutige Nachweis der 560 Aminosäuren langen mGRK6-C in verschiedenen Mausgeweben mit einem spezifischen Antikörper war nicht möglich, da die Proteine mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C bis zu der Aminosäure in Position 559 identisch sind. Anhand des Größenunterschiedes der drei Proteine konnte in der löslichen Fraktion aus Thymusgewebe mit dem Anti-Pep1-Antikörper, der alle drei Varianten der mGRK6 erkennt, ein Protein detektiert werden, das der Größe der rekombinant in *Sf*9-Zellen exprimierten mGRK6-C entspricht und bei dem es sich höchstwahrscheinlich um die Variante C der mGRK6 handelt. Das Protein der mGRK6-D konnte im Immunoblot nicht identifiziert werden. Es ist denkbar, dass das mGRK6-D-Polypeptid in so geringen Mengen in der Maus exprimiert wird, die unter der Nachweisgrenze des Antikörpers liegen oder dass es sich bei der mGRK6-D um ein extrem instabiles Protein handelt.

Die rekombinant in Insektenzellen exprimierten Proteine mGRK6-A und mGRK6-C konnten nach sequenzieller Chromatographie an einer SP- und Heparin-Sepharose-Matrix

mit hohem Reinheitsgrad erhalten werden. Während die auf diese Weise gereinigte mGRK6-C immer noch katalytisch aktiv war, konnte die mGRK6-A, die dem murinen Äquivalent der humanen GRK6 entspricht, lichtaktiviertes Rhodopsin nur noch zu einem geringen Anteil phosphorylieren. Für die palmitoylierungsdefiziente Mutante und die nicht palmitoylierte Form der hGRK6 wurde, verglichen mit dem palmitoylierten Wildtyp der hGRK6, eine signifikant geringere Aktivität gegenüber Rhodopsin und β_2-Adrenozeptoren als Substrat beschrieben (Loudon und Benovic, 1997; Stoffel *et al.*, 1998). Es ist denkbar, dass der palmitoylierte Anteil der mGRK6-A während der chromatographischen Reinigung von dem nicht palmitoylierten Protein abgetrennt wurde und in den nach dem zweiten Reinigungsschritt analysierten Fraktionen nur die gegenüber Rezeptorsubstraten inaktivere, nicht palmitoylierte Variante mGRK6-A enthalten war. Bei der Rhodopsinphosphorylierung durch die nahezu homogen vorliegende mGRK6-C war eine zweites Phosphorylierungssignal auf der Höhe von 64 kD zu beobachten. Die bis vor kurzem einzig bekannte, rekombinant in *Sf*9-Insektenzellen exprimierte humane GRK6 zeigte *in vitro* nur schwache Autophosphorylierungsaktivität (Loudon und Benovic, 1994). Milcent *et al.* (1999) konnten aber nachweisen, dass die transient in COS-7-Zellen exprimierte humane GRK6 an den Aminosäureresten Ser^{484} und Thr^{485} phosphoryliert ist. Die Ergebnisse der Phosphorylierungsversuche deuten darauf hin, dass die mGRK6-C in hohem Maße autophosphoryliert wird. Erste Versuche der isoelektrischen Fokussierung (IEF) der gereinigten mGRK6-C lassen mindestens drei Spezies der Variante C mit unterschiedlichen p*I*-Werten vermuten, die auf verschiedene Phosphorylierungszustände der mGRK6-C zurückgeführt werden könnten. Zudem konnten in der mGRK6-C durch einen Immunoblot Phosphotyrosinreste identifiziert werden. Da vor kurzem für die in COS-7-Zellen exprimierte bovine GRK2 in COS-7-Zellen eine Phosphorylierung an Tyrosinresten durch die koexprimierte Src-Tyrosinkinase nach Stimulation des ebenfalls koexprimierten β_2-adrenergen Rezeptors beschrieben wurde (Sarnago *et al.*, 1999), wäre eine Regulation der GRK6 durch Src-Tyrosinkinasen nicht ausgeschlossen. Das in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des MALDI-TOF-Massenspektrometers ermittelte Molekulargewicht der mGRK6-C von M_r = 64.287 stimmte mit dem anhand der Aminosäuresequenz berechneten theoretischen Molekulargewicht der mGRK6-C von M_r = 64.282 überein, die gemessene mGRK6-C war demnach nicht phosphoryliert. Es ist aber möglich, dass die ursprünglich vorhandenen Phosphatgruppen im Laufe der Reinigung von Phosphatasen abgespalten wurden, da in den Puffern keine Phosphataseinhibitoren enthalten waren. Unterstützt wird diese Hypothese

von der Beobachtung, dass von der in COS-7-Zellen exprimierten und phosphorylierten hGRK6 in Abwesenheit von Phosphataseinhibitoren im Lysepuffer bei 37 °C in weniger als einer Minute bereits 50 % der Phosphate entfernt wurden (Milcent *et al.*, 1999). Die rekombinant hergestellten Proteine mGRK6-B und mGRK6-D konnten nicht an der Kationenaustauschmatrix SP-Sepharose angereichert werden, obwohl die Varianten B und D aufgrund der berechneten p*I*-Werte von 8.7 und 9.9 bei einem pH-Wert des Puffers kleiner p*I* eine positive Nettoladung aufweisen und somit an die SP-Sepharose-Matrix binden sollten. Für die mGRK6-B ist dieses Verhalten umso erstaunlicher, als die der Variante mGRK6-B homologe hGRK5 aus infizierten *Sf*9-Zellen über S-Sepharose angereichert werden konnte (Premont *et al.*, 1994). Bei beiden Proteinen, der mGRK6-B und der mGRK6-D befand sich nach der Ernte der infizierten Insektenzellen und der Separation von löslicher und partikulärer Fraktion trotz Anwesenheit von 250 mM NaCl der größere Anteil der Rezeptorkinasen in der partikulären Fraktion, d. h. schon vor dem ersten chromatographischen Reinigungsschritt war im Vergleich zu den Proteinen mGRK6-A und mGRK6-C der Anteil an rekombinanten Proteinen mGRK6-B und mGRK6-D gegenüber dem Gesamtprotein im 300.000 *g*-Überstand reduziert. Erste Versuche mit den in Insektenzellen exprimierten GST-Fusionsproteinen der mGRK6-B und der mGRK6-D lassen vermuten, dass diese beiden Varianten über Glutathion-Sepharose in größeren Mengen angereichert werden können.

Sequenzvergleiche innerhalb einer großen Anzahl von Proteinkinasen, inklusive der GRKs, haben gezeigt, dass diese Proteine einen gemeinsamen katalytischen Kern besitzen, der aus ungefähr 250 bis 300 Aminosäureresten besteht und aus 12 konservierten Subdomänen (I bis XI) aufgebaut ist (Hanks und Hunter, 1995). Für zwölf unregelmäßig auf die 12 Subdomänen verteilte Bereiche der Kinasedomäne wurde festgestellt, dass diese in der gesamten Proteinkinase-Superfamilie konserviert oder nahezu invariabel sind. Vergleiche der Primärstrukturen der identifizierten mGRK6-Isoformen mit den Sequenzen der von Hanks und Hunter (1995) definierten katalytischen Domänen zeigen, dass die mGRK6-D die Subdomänen I, II und III enthält, während die Subdomänen IV bis XI fehlen. Somit verfügt die mGRK6-D über die strukturellen Elemente, die sehr wahrscheinlich an der Bindung und Orientierung des Phosphatdonors ATP beteiligt sind. Die für die Bindung und Orientierung der Substratpeptide, für die Komplexierung der primären und sekundären Mg^{2+}-Ionen und/oder für die Übertragung der γ-Phosphatgruppe von ATP auf die Akzeptor-

Aminosäurereste Serin oder Threonin verantwortlichen AS-Reste sind dagegen nicht vorhanden. Frühere Untersuchungen haben ergeben, dass ein Asp-Rest, der in allen bekannten GRKs in Subdomäne V (entspricht in der mGRK6 dem AS-Rest Asp^{270}) konserviert ist, für die katalytische Aktivität der GRK2 benötigt wird (Iino *et al.*, 1997). Für die Deletion in Exon 5 des humanen GRK1-Gens, welches für Teile der Subdomänen VIII und IX der katalytischen Domäne kodiert, ist nachgewiesen worden, dass sie die Ursache für bestimmte Formen der stationären Ogushi-Nachtblindheit ist (Yamamoto *et al.*, 1997). Diese Deletion verursacht den Verlust aller von Exon 5 kodierten Aminosäuren und eine Verschiebung des Leserasters mit einer vorzeitigen Termination 18 Kodons stromabwärts. Für das in Subdomäne VIII der katalytischen Domäne endende mutierte Polypeptid wurde der Verlust der katalytischen Aktivität gezeigt (Cideciyan *et al.*, 1998). Diese Gesichtspunkte veranlaßten zu der Annahme, die mGRK6-D als katalytisch inaktive Variante der mGRK6 zu betrachten. Diese Vermutung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da rekombinant in Insektenzellen exprimierte mGRK6-D nicht in der Lage war, Rhodopsin lichtabhängig zu phosphorylieren, während die anderen drei Varianten mGRK6-A, mGRK6-B und mGRK6-C katalytisch aktiv waren. Die aminoterminale Domäne, welche in der mGRK6-D vollständig erhalten ist, weist innerhalb der GRK-Familie Homologie auf. Konservierte AS-Reste können im gesamten Bereich gefunden werden, weshalb vermutet werden kann, dass diese Region in allen GRKs eine ähnliche Sekundärstruktur besitzt und vergleichbare Aufgaben erfüllt. Mit Antikörpern gegen den N-terminalen Bereich der GRK1 konnte die Phosphorylierung lichtaktivierten Rhodopsins, nicht jedoch die Phosphorylierung synthetischer Peptidsubstrate blockiert werden, da vermutlich dieser Anteil der GRK an der Erkennung aktivierter Rezeptoren beteiligt ist (Palczewski *et al.*, 1993). Für das mGRK6-D-Polypeptid, das mit dem intakten Aminoterminus vermutlich in der Lage ist, mit dem aktivierten Rezeptor zu interagieren, wäre es möglich, als natürlicher Inhibitor der mGRK6-Varianten oder sogar aller GRKs zu fungieren. Beispielsweise konnte eine GRK2-Mutante, in der das hochkonservierte Lysin in der Subdomäne II der katalytischen Domäne (entsprechend der Aminosäure Lys^{215} in der mGRK6) durch den AS-Rest Arg substituiert wurde, als dominant negativer Inhibitor der GRK2 oder anderer GRKs eingesetzt werden (Kong *et al.*, 1994; Tsuga *et al.*, 1997; Freedman *et al.*, 1995; Pei *et al.*, 1994; Mundell *et al.*, 1997). Die Adenovirus-vermittelte Expression eines GRK2-Inhibitors in ventrikulären Myozyten verstärkte die β-Adrenozeptor-Empfindlichkeit und inhibierte die Desensibilisierung des β-Adrenozeptors (Drazner *et al.*, 1997). Ob die mGRK6-D einen physiologischen GRK-

Inhibitor darstellt, und ob Änderungen der mGRK6-D-Expression pathophysiologische Konsequenzen haben, ist noch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Interessanterweise konnte die mGRK6-D in der vorliegenden Arbei mit Hilfe der Immunfluoreszenz an transient transfizierten COS-7-Zellen im Nukleus lokalisiert werden. Die Aminosäure-Sequenzanalyse der mGRK6-D (244 Aminosäuren) hat ergeben, dass der Carboxyterminus eine Ansammlung basischer Aminosäuren aufweist ($\underline{K^{219}}$KL$\underline{E}$K$\underline{KR}$I$\underline{KKRK}$, die basischen Aminosäuren sind unterstrichen), die möglicherweise eine Kernlokalisationssequenz darstellen (Mattaj und Englmeier, 1998) und die beobachtete nukleäre Lokalistion der mGRK6-D erklären könnte. Welche Funktion der mGRK6-D im Zellkern zukommt, ist allerdings noch unklar.

Den bisher bekannten 6 Mitgliedern der GRK-Familie stehen über tausend bis jetzt identifizierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) gegenüber (Iacovelli *et al.*, 1999; Bünemann und Hosey, 1999; Pitcher *et al.*, 1998). Die Frage nach der Substratspezifität *in vivo* kann zum jetzigen Zeitpunkt nur für die GRK1 und mit Einschränkungen für die GRK4 beantwortet werden, da diese Kinasen ein definiertes Expressionsmuster aufweisen. Die GRK1 wird fast ausschließlich in den Stäbchen und Zapfen der Retina und zu einem geringen Anteil im Pinealorgan exprimiert (Lorenz *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 1998) und phosphoryliert *in vivo* Rhodopsin (Pitcher *et al.*, 1998). RNA-Transkripte und Protein der GRK4 finden sich nur in Testis; als mögliche Substrate für die GRK4 kommen der *platelet activating factor* (PAF)-Rezeptor, atriale natriuretische Peptid-Rezeptoren, muscarinische Rezeptoren und Geruchsrezeptor-ähnliche GPCRs in Frage, die wahrscheinlich an der Mobilität der Spermien und an der Acrosomenreaktion beteiligt sind (Sallese *et al.*, 1997). Die nahezu ubiquitäre Expression der anderen Rezeptorkinasen lässt vermuten, dass *in vivo* mehrere Mechanismen die Rezeptorspezifität der GRKs bestimmen. Aramori *et al.* (1997) konnten für die Desensibilisierung des Chemokinrezeptors CCR5 eine Abhängigkeit von der relativ und absolut exprimierten Menge der einzelnen GRKs in der Zelle nachweisen. Iacovelli *et al.* (1999) postulieren eine durch membranäre (aktivierter GPCR, Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat und G-Protein-Untereinheiten $\beta\gamma$) und intrazelluläre Modulatoren (Ca^{2+}, Proteinkinase C und Calciumsensorproteine) regulierte Interaktion zwischen Rezeptor und GRK. Da die Spezifität der Rezeptor/Kinase-Wechselwirkung auch durch die zelluläre und subzelluläre Kolokalisation von GPCR und Rezeptorkinase festgelegt wird (Bünemann und Hosey, 1999) und in der vorliegenden Arbeit sowohl mRNA als auch

Protein der verschiedenen Varianten der murinen GRK6 besonders häufig in lymphatischen Geweben nachgewiesen werden konnten, lag die Vermutung nahe, dass die GRK6-Isoformen für die homologe Desensibilisierung der in Leukozyten exprimierten Chemokinrezeptoren verantwortlich sind. Die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung durch GRKs für die Desensibilisierung von Chemokinrezeptoren wurde bereits für mehrere Chemokinrezeptoren nachgewiesen. Im Falle der humanen IL-8-Rezeptoren (IL-8R) konnte gezeigt werden, dass die Ligandenbindung sowohl bei dem IL-8RA (CXCR1) als auch bei dem IL-8RB (CXCR2) eine schnelle Phosphorylierung des Carboxyterminus der Rezeptoren mit anschließender Desensibilisierung und Sequestrierung zur Folge hat (Mueller *et al.*, 1995; Mueller *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 1995). Die Resultate dieser Arbeiten können mit einer GRK-vermittelten Agonist-abhängigen Phosphorylierung und einer Agonist-unabhängigen Phosphorylierung durch die Proteinkinase C erklärt werden (Aragay *et al.*, 1998b). Die Signaltransduktion und die Internalisierung des humanen CXCR4 wird ebenfalls über zwei Mechanismen reguliert: auf der Ebene der Rezeptorphosphorylierung und unabhängig davon über die Aktivierung der Phospholipase C (Haribabu *et al.*, 1997). Aragay *et al.* (1998a) konnten in Monozyten nachweisen, dass der Chemokinrezeptor CCR2b nach Stimulation der Zellen mit dem Chemokin MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein* 1) von der GRK2 phosphoryliert wird. Obwohl beide Chemokinrezeptoren CCR2a und CCR2b gleichzeitig als Spleißvarianten eines Genes von Charo *et al.* (1994) identifiziert worden sind und sich die kodierenden Proteine CCR2a (374 AS) und CCR2b (360 AS) nur innerhalb ihres Carboxyterminus unterscheiden, existieren kaum Untersuchungen über die Variante a des CCR2. In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* und *in vivo* versucht, verschiedene CXC- und CC-Chemokinrezeptoren, u. a. auch den CCR2a, durch die Varianten A oder C der mGRK6 zu phosphorylieren. Die Ergebnisse beider Versuchsansätze deuten darauf hin, dass die untersuchten Chemokinrezeptoren unabhängig vom Aktivierungszustand mit der Rezeptorkinase assoziiert vorliegen und von dieser phosphoryliert werden. Die in den Autoradiogrammen der *in vitro*-Phosphorylierungs-Experimente beobachtete und durch andere phosphorylierte Proteine verursachte Hintergrundschwärzung wurde auch von Debburman *et al.* (1995) beschrieben. Eine Vorbehandlung der rezeptorhaltigen Membranen mit 5 M Harnstoff konnte die störenden Membranproteine ohne (Aktivitäts-)Verlust des gewünschten GPCR zu 75 % eliminieren (Debburman *et al.*, 1995). Für weitere *in vitro*-Phosphorylierungsversuche wäre eine derartige Vorbehandlung der rezeptorhaltigen *Sf*9-Zellmembranen empfehlenswert. Der in HEK293-Zellen zusammen mit der humanen

GRK6 exprimierte Chemokinrezeptor CCR5 wurde *in vivo* ebenfalls Agonist-unabhängig phosphoryliert (Aramori *et al.*, 1997). Mit Hilfe von *crosslinking*-Experimenten in mit Baculoviren infizierten Insektenzellen konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass der humane Hämagglutinin (HA)-gekoppelte CCR2a unabhängig vom Aktivierungszustand des Rezeptors selektiv mit der bovinen GRK2, nicht jedoch mit der mGRK6-C interagiert. Im Gegensatz dazu konnte der HA-mCXCR4 sowohl mit der bovinen GRK2 als auch mit der mGRK6-C wechselwirken; die Rezeptor/GRK-Interaktion war aber ebenfalls unabhängig von der Anwesenheit eines Liganden. Eine vergleichbare Agonist-unabhängige Koimmunpräzipitation wurde für die in HEK293-Zellen transient transfizierten Proteine GRK2 und CCR2b festgestellt (Aragay *et al.*, 1998b). Diese in der vorliegenden Arbeit in den *in vivo*-Phosphorylierungs- und *crosslinking*-Experimenten beobachtete und auch von anderen Arbeitsgruppen beschriebene unabhängige Assoziation eines unstimulierten Rezeptors mit einer GRK könnte auf eine Überexpression der Rezeptorkinasen zurückgeführt werden. Dagegen spricht, dass die Rezeptor/GRK-Wechselwirkung in den *crosslinking*-Experimenten eine gewisse Spezifität zeigte, da die in einer der GRK2 vergleichbaren Menge in Insektenzellen exprimierte mGRK6-C nicht an den koexprimierten HA-CCR2a gebunden hatte. Weitere Analysen mit unterschiedlichen Verhältnissen und Kombinationen von Rezeptor und Rezeptorkinase werden nötig sein, um detaillierte Aussagen über die Substratspezifität der mGRK6-Isoformen machen zu können. Bei diesen Untersuchungen, in denen die Kinasen zusammen mit verschiedenen Rezeptoren in diversen Zellsystemen zusammen gebracht werden, darf nicht vergessen werden, dass diese Ansätze nicht unbedingt die Situation *in vivo* widerspiegeln (Bünemann und Hosey, 1999).

Die Rezeptorkinasen sind lipidabhängige Enzyme, die ihre Substrate, die Agonist-gebundenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), nur dann phosphorylieren können, wenn die GPCRs in physiologischen Membranen oder in rekonstituierten Lipidvesikeln enthalten sind. Die Lipide dienen zum einen der Membranverankerung der GRKs, zum anderen haben bestimmte Lipide direkten Einfluss auf die katalytische Aktivität einzelner GRKs (Stoffel *et al.*, 1997; Pitcher *et al.*, 1998). Die Aminosäuresequenz der GRK1 endet mit einem CVLS-Motiv, das die Farnesylierung des Proteins zur Folge hat (Inglese *et al.*, 1992). Die C-Termini der GRKs 2 und 3 enthalten eine Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne und können über diese mit den G-Protein-Untereinheiten $\beta\gamma$ interagieren (Pitcher

et al., 1992; Boekhoff *et al.*, 1994; Touhara *et al.*, 1994). GRK4 und die bis vor kurzem einzig bekannte humane GRK6 sind an einem oder mehreren carboxyterminal lokalisierten Cystein-Resten palmitoyliert (Premont *et al.*, 1996; Stoffel *et al.*, 1994; Loudon und Benovic, 1997). Die GRK5, die PtdInsP_2-Bindungsstellen am Aminoterminus und einen basischen C-Terminus besitzt, der aber die carboxyterminalen Palmitoylierungsstellen fehlen, ist konstitutiv mit der Membran assoziiert, vermutlich aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen basischen und polaren Aminosäuren mit negativ geladenen Phospholipidkopfgruppen der Lipiddoppelschicht (Premont *et al.*, 1994; Pitcher *et al.*, 1996). In der Aminosäuresequenz der GRK6-A der Maus sind drei Cystein-Reste Cys^{561}, Cys^{562} und Cys^{565} vorhanden, die analog der humanen GRK6 palmitoyliert werden könnten. Da der Carboxyterminus der Variante B der mGRK6 reich an basischen Aminosäuren ist (p*I* 12.2, AS 560-589), könnte die mGRK6-B vergleichbar der GRK5 mit der Membran interagieren. Der mGRK6-C fehlt der am häufigsten durch Palmitoylierung oder Phosphorylierung modifizierte carboxyterminale Bereich. Die mGRK6-C weist auch keine Bindungsdomäne für die G-Protein-Untereinheiten βγ auf, die für die Translokation der GRKs 2 und 3 an die Membran verantwortlich sind. Dennoch konnte in dieser Arbeit die Variante C wie die Varianten A und B der mGRK6 sowohl im *Western blot* als auch in der Immunfluoreszenz transient transfizierter COS-7-Zellen mit der Membran assoziiert vorgefunden werden. Bisher wurde angenommen, dass die Carboxytermini bzw. deren posttranslationale Modifikationen in der GRK-Familie von entscheidender Bedeutung für die Lokalisation der Kinasen an der Plasmamembran sind (Inglese *et al.*, 1993; Stoffel *et al.*, 1997). Das Verhalten der mGRK6-A und mGRK6-B steht im Einklang mit dieser Vorstellung, die Daten über die mGRK6-C deutet aber darauf hin, dass für die Interaktion der Rezeptorkinase mit der Membran auch andere Mechanismen existieren müssen.

Neben der bereits beschriebenen und primär für die Membranverankerung verantwortlichen Palmitoylierung wechselwirkt die humane GRK6, die der GRK6-A der Maus entspricht, höchstwahrscheinlich über eine aminoterminale Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdInsP_2)-Bindungsstelle mit der Membran (Pitcher *et al.*, 1996). Diese PtdInsP_2-Bindungsstelle liegt zwischen den AS-Resten 22 und 29 der humanen GRK6, ist innerhalb der GRK4-Subfamilie konserviert (Pitcher *et al.*, 1996) und muss folglich auch in allen vier mGRK6-Varianten präsent sein. Pronin *et al.* (1998) konnten eine weitere Phospholipidbindungsstelle im C-Terminus der humanen GRK5 (AS 552 bis 562) identifi-

zieren, in der die Phospholipide über ionische Wechselwirkungen mit den positiv geladenen basischen Aminosäuren (Lys^{547}, Lys^{548}, Arg^{553}, Lys^{556}, Arg^{557} und His^{559}) interagieren. Eine vergleichbare Region findet sich auch in den Isoformen B und C der mGRK6: Lys^{548}, Lys^{549}, Arg^{554}, Arg^{558} und Arg^{560}. In der mGRK6-A ist an der Position 560 der Argininrest durch einen Aspartatrest ersetzt. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Bindungsexperimente an Phospholipidvesikel nachgewiesen werden, dass sowohl die mGRK6-A als auch die mGRK6-C mit PtdInsP_2, nicht aber mit Phosphatidylcholin oder Phosphatidylserin interagieren können. Es ist wahrscheinlich, dass die Wechselwirkung mit dem Membranphospholipid PtdInsP_2 bei beiden Proteinen mGRK6-A und mGRK6-C über die aminoterminale und im Falle der mGRK6-C auch über die C-terminale Phospholipid-Bindungsdomäne erfolgt. Vermutlich wird auch die Varianten B in der Lage sein, PtdInsP_2 über beide Interaktionsstellen zu binden. Weitere Experimente werden nötig sein, um zu klären, ob die PtdInsP_2-Wechselwirkung ähnlich der für die Rezeptorkinasen GRK2 und GRK5 beschriebenen (Pitcher *et al.*, 1995; Pitcher *et al.*, 1996) ausschließlich der Membranverankerung dient. Womöglich besitzt die Interaktion zwischen Lipid und Protein auch direkten Einfluss auf die katalytische Aktivität der mGRK6-Varianten, vergleichbar dem Phosphatidylserin (PS), welches die katalytische Aktivität der GRK2 steigert (Onorato *et al.*, 1995; Debburman *et al.*, 1996).

Überraschenderweise war die in Insektenzellen exprimierte C-terminal kürzeste Variante mGRK6-C bezüglich der Phosphorylierung lichtaktivierten Rhodopsins deutlich aktiver als die anderen beiden rekombinant hergestellten Isoformen A und B der mGRK6. Dieser Aktivitätsunterschied war umso erstaunlicher, als bisher davon ausgegangen wurde, dass der Carboxyterminus wesentlich an der Membranverankerung der GRKs beteiligt ist (Stoffel *et al.*, 1997) und die Aktivität einer Rezeptorkinase gegenüber membranständigen Rezeptorsubstraten die Lokalisation der GRK an der Membran voraussetzt (Inglese *et al.*, 1993; Premont *et al.*, 1995), die mGRK6-C im Vergleich mit den Varianten A und B der mGRK6 aber keine sichtbar effektivere Möglichkeit besitzt, mit der Membran zu interagieren. Ein Ansatzpunkt für die Regulation der Rezeptorkinaseaktivität bietet die bereits erwähnte Interaktion mit PtdInsP_2. Die bisher bekannten Mitglieder der GRK4-Subfamilie (GRK4, GRK5 und GRK6) zeigen im Gegensatz zu GRK1, GRK2 und GRK3 keine Agonist-abhängige Membranassoziation, sondern können auch in nicht stimulierten Zellen membranständig vorliegen (Premont *et al.*, 1995; Stoffel *et al.*, 1997), wodurch die von Premont

et al. (1994) beobachtete erhöhte basale, d. h. Agonist-unabhängige, Aktivität der GRK5 erklärt werden könnte. Pitcher *et al.* (1996) konnten zeigen, dass die humane GRK4-α, die bovine GRK5 und die humane GRK6 eine N-terminal lokalisierte PtdInsP_2-Bindungsdomäne besitzen (AS 22 bis 29) und eine durch PtdInsP_2 verstärkte Phosphorylierungsaktivität gegenüber dem gereinigten und in Phospholipidvesikeln rekonstituierten β_2-Adrenorezeptor aufweisen. Die C-terminale Phospholipidbindungsdomäne der humanen GRK5 ist sowohl für die intrazelluläre Lokalisation als auch für die katalytische Aktivität dieser Kinase von Bedeutung (Pronin *et al.*, 1998). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete hohe Phosphorylierungsaktivität der mGRK6-C kann jedoch nicht auf die Bindung von PtdInsP_2 zurückgeführt werden, da auch für die weniger aktive mGRK6-A eine Interaktion mit PtdInsP_2 nachweisbar war. Offensichtlich unterliegt die mGRK6-C einem weiteren, für die GRK-Familie noch nicht beschriebenen Regulationsmechanismus, da die Interaktion mit Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat in Anbetracht der permanenten Präsenz dieses Phospholipids in der Membran (0.25-1.0 % des Gesamtlipidanteils; Pitcher *et al.*, 1996) kaum ausreichen dürfte, allein die Aktivität der Kinase zu steuern. In neueren Untersuchungen an der humanen GRK5 wurde eine autoinhibitorische Funktion des Carboxyterminus postuliert (Pronin *et al.*, 1998). Die C-Termini von hGRK5 (Kunapuli und Benovic, 1993) und mGRK6-B sind, wie bereits erwähnt, reich an basischen Aminosäuren. Außerdem enthält die mGRK6-B Konsensussequenzen (Bairoch *et al.*, 1997) für die Phosphorylierung durch Proteinkinasen C (Thr^{568}-Val-Arg-Lys, wobei die zu phosphorylierende AS unterstrichen ist) und cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinasen (Arg^{570}-Lys-Ser-Ser). Die hGRK5 kann von der Proteinkinase C an zwei Positionen innerhalb der letzten C-terminalen 26 AS-Reste phosphoryliert werden. Die GRK5-Phosphorylierung an diesen Stellen hat einen deutlichen Aktivitätsverlust der Rezeptorkinase gegenüber Rezeptor- und Peptidsubstraten zur Folge (Pronin und Benovic, 1997). In der vorliegenden Arbeit zeigte der Aktivitätsvergleich zwischen den rekombinant in Insektenzellen exprimierten Wildtyp-Proteinen mGRK6-B, mGRK6-C und den mGRK6-B-Mutanten M1, M2 und M3, dass die Fähigkeit, Rhodopsin zu phosphorylieren, mit der Reduktion des Carboxyterminus zunimmt. Dieses Verhalten wurde auch für die C-terminal verkürzten Mutanten der humanen GRK5 beschrieben (Pronin *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur GRK5 korrelierte die katalytische Aktivität der mGRK6-B aber nicht nur mit der Länge des Carboxyterminus, da die gegenüber den beiden Mutanten M1 und M2 um 9 bzw. 4 Aminosäuren kürzere Mutante M3 der mGRK6-B an Aktivität verlor. Es scheint, als würde das in der besonders aktiven

Mutante M2 noch vorhandene, vier Aminosäuren lange Peptid TVRK einen positiven Einfluss auf die Aktivität der mGRK6-B besitzen, der aber erst zum Tragen kommt, wenn die letzten 13 (mGRK6-B M1) bzw. 18 Aminosäuren (mGRK6-B M2) entfernt werden. Dieses Peptid repräsentiert die bereits erwähnte Konsensussequenz (Bairoch *et al.*, 1997) für die Phosphorylierung durch Proteinkinase C (Thr^{568}-Val-Arg-Lys, wobei die zu phosphorylierende AS unterstrichen ist). Vielleicht hat die Phosphorylierung dieses Threonin-Restes eine Aktivierung der mGRK6-B zur Folge, ähnlich der GRK2, die durch Proteinkinase C-vermittelte Phosphorylierung an ein oder mehreren Positionen innerhalb der carboxyterminalen 137 Aminosäuren aktiviert wird (Chuang *et al.*, 1995; Winstel *et al.*, 1996). Möglicherweise kann diese Phosphorylierung nur dann erfolgen, wenn die letzten 18 Aminosäuren entfernt sind, womit die beobachtete Aktivitätszunahme der mGRK6-B Mutanten nach Verkürzung des C-Terminus erklärt werden könnte. Eine weitere Mutante der mGRK6-B M2-Mutante, in der das Threonin an Position 568 durch eine aliphatische Aminosäure ersetzt wäre, könnte zur Klärung dieses Sachverhaltes beitragen. Vermutlich kommt den letzten 18 Aminosäuren der mGRK6-B eine den C-terminalen AS 563 bis 590 der humanen GRK5 vergleichbare autoinhibitorische Funktion zu (Pronin *et al.*, 1998). Ähnlich der GRK5, die u. a. höchstwahrscheinlich an der Position Lys^{564}-Ser-Ser-Pro (die zu phosphorylierende AS ist unterstrichen) von der Proteinkinase C phosphoryliert wird (Pronin und Benovic, 1997), wäre eine Phosphorylierung der mGRK6-B an der Position Lys^{571}-Ser-Ser-Pro durch die Proteinkinase C (PKC) oder durch eine cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinase denkbar. Dadurch könnte unter der Annahme, dass die katalytische Aktivität der mGRK6-B gleich der GRK5 durch PKC-Phosphorylierung reduziert wird (Pronin und Benovic, 1997), die für die Mutante mGRK6-B M2 (AS 1 bis 571) beobachtete Aktivitätszunahme gegenüber dem Wildtyp mGRK6-B erklärt werden, da dieser Mutante die zu phosphorylierende Aminosäure Ser^{573} fehlt. Zunächst müsste aber festgestellt werden, ob die mGRK6-B duch Proteinkinase C phosphoryliert wird und ob die Aktivität der Variante B durch diese Modifikation(en) positiv oder negativ beeinflusst wird. In Analogie zu der für die GRK5 postulierten Funktion der durch PKC vermittelte Phosphorylierung oder durch Calmodulin-stimulierte Autophosphorylierung regulierten Bereiche (AS 565 bis 584) als „Verstärker“ der Autoinhibition (Pronin *et al.*, 1998) wäre eine derartige Funktion auch für den, die Aminosäuren 572 bis 576 umfassenden, Sequenzabschnitt der mGRK6-B vorstellbar. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Mutante M2 der mGRK6-B und der Wildtyp mGRK6-C eine vergleichbar hohe Phosphorylierungsaktivität. Auffällig ist, dass beiden

Proteinen der postulierte autoinhibitorische C-Terminus fehlt und beide Proteine mit einer oder zwei positiv geladenen basischen Aminosäure enden, die mGRK6-B Mutante M2 mit Arginin und Lysin, die mGRK6-C mit Arginin. Vielleicht kommen diese basischen Aminosäuren im nativen Zustand des Proteins in die Nähe des aktiven Zentrums der Rezeptorkinase und erleichtern die Übertragung des negativ geladenen γ-Phosphatrestes von ATP auf das Substrat der GRK. Diese Hypothese könnte durch Aktivitätsuntersuchungen an Mutanten überprüft werden, in denen diese basischen Aminosäuren durch neutrale oder saure Aminosäuren ausgetauscht werden. Bei der Regulation der drei katalytisch aktiven Varianten der mGRK6 darf der Einfluss von Calciumsensorproteinen nicht außer Acht gelassen werden (Chuang *et al.*, 1996; Iacovelli *et al.*, 1999). Für die humane GRK5 konnten eine N-terminale (AS 20-39) und eine C-terminale (AS 552-562) Calmodulin (CaM)-Bindungsdomäne identifiziert werden (Pronin *et al.*, 1997; Levay *et al.*, 1998; Pronin *et al.*, 1998), die ein Cluster basischer und hydrophober Aminosäuren aufweisen, größtenteils mit den ebenfalls in der GRK5 vorhandenen Phopholipidbindungsstellen (AS 22-29 und AS 552-562) (Pitcher *et al.*, 1996; Pronin *et al.*, 1998) überlappen und innerhalb der GRK4-Subfamilie konserviert sind. Calmodulin inhibiert die humane GRK5 und mit etwas geringerer Potenz auch die humane GRK6 (Pronin *et al.*, 1997), und es ist wahrscheinlich, dass auch die Isoformen der GRK6 der Maus, eventuell sogar unterschiedlich sensibel, auf CaM reagieren. Es werden weitere Experimente nötig sein, um die Regulationsmechanismen der mGRK6-Isoformen im Detail verstehen zu können, aber vermutlich wird die Aktivität der mGRK6-A in Analogie zu der humanen GRK4 (Premont *et al.*, 1996) und der bereits beschriebenen humanen GRK6 (Stoffel *et al.*, 1994; Loudon und Benovic, 1997; Stoffel *et al.*, 1998) vorwiegend über den Palmitoylierungszustand reguliert. Die mGRK6-B-Aktivität scheint vergleichbar der GRK5 (Pronin *et al.*, 1998) über einen autoinhibitorisch wirksamen C-Terminus gesteuert zu werden, der wiederum der Kontrolle calciumabhängiger Prozesse, wie etwa der PKC-Phosphorylierung und der Bindung von Calmodulin unterliegt. Die C-terminal verkürzte mGRK6-C besitzt im Gegensatz zu allen anderen bisher beschriebenen Rezeptorkinasen keinerlei Motive, die eine Lipidierung oder eine Interaktion mit βγ-Untereinheiten erlauben. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Membranassoziation und erhöhte Aktivität der mGRK6-C ist ein Beweis dafür, dass nicht nur, wie bisher angenommen, die carboxyterminalen Motive für die Translokation und Aktivierung der GRKs entscheidend sind. Vielmehr kommt dem autoinhibitorisch wirksamen C-Terminus und der Interaktion mit Phospholipiden eine besondere Bedeutung bei der Regulation der

mGRK6-Isoformen zu. Darüber hinaus könnten der Phosphorylierungszustand, bestimmte C-terminale, basische Aminosäuren und die Wechselwirkung mit Calciumsensorproteinen an der Regulation der mGRK6-Isoformen beteiligt sein.

6 Zusammenfassung

Die Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) phosphorylieren Agonist-besetzte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), ein Vorgang, der als homologe Desensibilisierung bezeichnet wird. Von den bisher beschriebenen sieben Mitgliedern der GRK-Familie sind von der GRK1 zwei und von der GRK4 vier Spleißvarianten bekannt. In unserer Arbeitsgruppe konnten von der GRK6 der Maus (mGRK6) vier verschiedene cDNAs isoliert werden, welche für die Varianten mGRK6-A, -B, -C und -D kodieren. Die mGRK6-A entspricht dem murinen Äquivalent der einzigen bislang bekannten humanen GRK6 (576 Aminosäuren). GRK6-B und GRK6-C der Maus unterscheiden sich ab Aminosäure 560 von der Variante mGRK6-A und sind 13 Aminosäuren länger bzw. 16 Aminosäuren kürzer als diese. Der aminoterminale Bereich der mGRK6-D ist mit dem der anderen drei Isoformen identisch, die mGRK6-D besitzt aber nur 59 der 263 Aminosäuren der putativen katalytischen Domäne. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass diese vier mGRK6-Varianten Produkte eines Gens darstellen und aus diesem durch alternatives Spleißen hervorgehen. Das GRK6-Gen der Maus ist 14.5 kbp lang, besteht aus 17 Exons und ist auf Chromosom 13 der Maus lokalisiert. Mit Hilfe von *Northern blot*-, RT-PCR (reverse Transkriptase-*polymerase chain reaction*)-, SNuPE (*single nucleotide primer extension*)-Analysen und der RNA *in situ*-Hybridisierung wurde in Geweben adulter Mäuse eine differentielle Expression der verschiedenen mGRK6-Transkripte nachgewiesen, wobei diese vorwiegend in lymphatischen Geweben lokalisiert wurden. Darüber hinaus konnte GRK6-mRNA während der Embryonalentwicklung der Maus u. a. in Thymus und Leber detektiert werden, also in Organen, die an der Entwicklung und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten beteiligt sind. Sowohl das mRNA-Expressionsmuster als auch die Verteilung der mGRK6-Isoformen A, B und C in lymphatischen Geweben der Maus im *Western blot* lässt vermuten, dass die GRK6-Varianten *in vivo* an der Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in Leukozyten beteiligt sind. Die Ergebnisse der Phosphorylierungs- und *crosslinking*-Experimente mit rekombinanten mGRK6-Proteinen und verschiedenen Chemokinrezeptoren deuten auf eine selektive, aber Agonist-unabhängige Phosphorylierung dieser GPCRs durch mGRK6-Isoformen hin. Für die in Insektenzellen exprimierten Varianten mGRK6-A, -B und -C konnte gezeigt werden, dass diese Isoformen im Gegensatz zu der innerhalb der katalytischen Domäne trunkierten mGRK6-D katalytisch aktiv sind. Die enzymatische Aktivität der GRKs setzt die Translokation an die Plasmamembran voraus.

Für den Carboxyterminus der GRKs wird eine entscheidende Rolle bei der Membranverankerung und somit auch bei der Aktivierung diskutiert. Die mGRK6-A enthält carboxyterminal Cysteinreste, die wahrscheinlich reversibel palmitoyliert werden, wobei ein oder mehrere Palmitoylreste als Membrananker dienen können. Der Carboxyterminus der mGRK6-B ist reich an basischen Aminosäuren, die mit negativ geladenen Phospholipidkopfgruppen der Plasmamembran interagieren können. Obwohl der carboxyterminal kürzesten Variante mGRK6-C im Bereich des Carboxyterminus derartige Motive fehlen, die eine Membraninteraktion vermitteln könnten, war neben den Proteinen mGRK6-A und mGRK6-B auch diese mGRK6-Isoform in transient transfizierten COS-7-Zellen membranassoziiert. Zudem wies die mGRK6-C eine deutlich höhere Phosphorylierungsaktivität für das Substrat Rhodopsin auf als die Varianten A und B. Diese Befunde stützen die Hypothese, dass für die GRKs nicht nur, wie bisher angenommen, die C-terminalen Motive bzw. Modifikationen für die Translokation entscheidend sind, sondern darüber hinaus andere Mechanismen existieren, welche die Assoziation mit der Membran und die Aktivierung der Rezeptorkinasen vermitteln. Für die rekombinante mGRK6-C konnte nachgewiesen werden, dass die Membranassoziation auch über eine Wechselwirkung mit Phosphatidylinosit-4, 5-bisphosphat (PtdInsP_2) vermittelt werden kann. Dieses Ergebnis kann die Interaktion der mGRK6-C mit der Membran, nicht aber deren erhöhte Phosphorylierungsaktivität erklären. Die Aktivität anderer GRKs kann z. B. durch (Auto-)Phosphorylierung und Interaktion mit Calciumsensorproteinen moduliert oder, wie für die GRK5 beschrieben, über einen autoinhibitorisch wirksamen C-Terminus reguliert werden. Durch schrittweise Reduktion des C-Terminus der mGRK6-B auf die Länge der mGRK6-C wurden mGRK6-B-Mutanten hergestellt, mit deren Hilfe untersucht wurde, ob auch bei der mGRK6-B ein autoinhibitorischer C-Terminus vorliegt. Der Aktivitätsvergleich der rekombinant in Insektenzellen exprimierten mGRK6-B-Mutanten untereinander und mit den Wildtyp-Formen mGRK6-B und mGRK6-C zeigte, dass die katalytische Aktivität der mGRK6-B tatsächlich, wenn auch nicht ausschließlich, mit der Länge des C-Terminus korreliert. Möglicherweise beeinflussen die C-terminalen, basischen Aminosäuren und/oder der Phosphorylierungszustand der putativen Phosphorylierungsstellen zusätzlich die Aktivität der mGRK6-B. Die erhöhte Aktivität der C-terminal verkürzten mGRK6-C deutet darauf hin, dass neben der C-terminalen posttranslationalen Modifikation die autoinhibitorische Funktion des C-Terminus sowie die Interaktion mit Phospholipiden für die Regulation der mGRK6-Isoformen entscheidend sind.

7 Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1987) Molekularbiologie der Zelle. Jaenicke, L. (Hrsg.) Kapitel 18.5.3: 1189-1190. 1. Nachdruck der 1.Auflage, VCH Weinheim.

Aramori, I., Zhang, J., Ferguson, S.S.G., Bieniasz, P.D., Cullen, B.R., Caron, M.G. (1997) Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. *EMBO J.* **16**:4606-4616.

Aragay, A.M., Mellado, M., Frade, J.M.R., Martin, A.M., Jimenez-Sainz, M.C., Martinez-A, C., Mayor, F.Jr. (1998a) Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:2985-2990.

Aragay, A.M., Ruiz-Gomez, A., Penela, P., Sarnago, S., Elorza, A., Jimenez-Sainz., M.C., Mayor, F.Jr. (1998b) G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions. *FEBS Lett.* **430**:37-40.

Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1997) Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:675-705.

Bairoch, A., Bucher, P., Hofmann, K. (1997) The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res.* **25**:217-221.

Barnard, E.A. (1992) Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biochem. Sci.* **17**:368-374.

Benovic, J.L., Mayor, F.Jr., Staniszewski, C., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1987) Purification and characterization of the β-adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **262**:9026-9032.

Benovic, J.L., Gomez, J. (1993). Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family. *J. Biol. Chem.* **268**:19521-19527.

Berman, D.M., Gilman, A.G. (1998) Mammalian RGS Proteins: Barbarians at the Gate. *J. Biol. Chem.* **273**:1269-1272.

Blaukat, A., Herzer, K., Schroeder, C., Bachmann, M., Nash, N., Müller-Esterl, W. (1999) Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. *Biochemistry* **38**:1300-1309.

Bockaert, J., Pin, J.P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**:1723-1729.

Boekhoff, I., Inglese, J., Schleicher, S., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J., Breer, H. (1994) Olfactory desensitization requires membrane targeting of receptor kinase mediated by beta gamma-subunits of heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* **269**: 37-40.

Bourne, H.R. (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:134-142.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

Bristow, M.R., Hershberger, R.E., Port, J.D., Gilbert, E.M., Sandoval, A., Rasmussen, R., Cates, A.E., Feldman, A.M. (1990) Beta-adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* **82**:I12-25.

Breathnach, R., Chambon, P. (1981) Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**:349-383.

Bünemann, M., Lee, K.B., Pals-Rylaarsdam, R., Roseberry, A.G., Hosey, M.M. (1999) Desensitization of G protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* **61**:169-192.

Bünemann, M., Hosey, M.M. (1999) G protein-coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J. Physiol.* **517.1**:5-23.

Bullrich, F., Druck, T., Kunapuli, P., Gomez, J., Gripp, K.W., Schlegelberger, B., Lasota, J., Aronson, M., Cannizzaro,. L.A., Huebner, K., and Benovic, J.L. (1995) Chromosomal mapping of the genes GPRK5 and GPRK6 encoding G protein-coupled receptor kinases GRK5 and GRK6. *Cytogenet. Cell Genet.* **70**:250-254.

Carty, D.J., Padrell, E., Codina, J., Birnbaumer, L., Hildebrandt, J.D., Iyengar, R. (1990) Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three Gi proteins. *J. Biol. Chem.* **265**:6268-6273.

Casey, P.J., Seabra, M.C. (1996) Protein prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **271**:5289-5292.

Charo, I.F., Myers, S.J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A.J., Coughlin, S.R. (1994) Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2752-2756.

Chen, J., Makino, C.L., Peachey, N.S., Baylor, D.A., Simon, M.I. (1995) Mechanisms of rhodopsin inactivation in vivo as revealed by a COOH-terminal truncation mutant. *Science* **267**:374-377.

Chruch, G.M., Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1991-1995.

Chuang, T.T., LeVine, H.III, De Blasi, A. (1995) Phosphorylation and activation of β-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **270**:18660-18665.

Chuang, T.T., Iacovelli, L., Sallese, M., De Blasi, A. (1996) G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and ist implications. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**:416-421.

Cideciyan, A.V., Zhao, X., Nielsen, L., Khani, S.C., Jacobson, S.G., Palczewski, K. (1998) Null mutation in the rhodopsin kinase gene slows recovery kinetics of rod and cone phototransduction in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:328-333.

Citri, Y., Colot, H.V., Jaquier, A.C., Yu, Q., Hall, J.C., Baltimore, D. Rosbash, M. (1987) A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene. *Nature* **326**:42-47.

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

Clapham, D.E., Neer, E.J. (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**:167-203.

Day, D.A., Tuite, M.F. (1998) Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J. Endocrinol.* **157**:361-371.

Debburman, S.K., Kunapuli, P., Benovic, J.L., Hosey, M.M. (1995) Agonist-dependent phosphorylation of human muscarinic receptors in *Spodoptera frugiperda* insect cell membranes by G protein-coupled receptor kinases. *Mol. Pharmacol.* **47**:224-233.

Debburman, S.K., Ptasienski, J., Benovic, J.L., Hosey, M.M. (1996) G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein βγ subunits. *J. Biol. Chem.* **271**:22552-22562.

De Blasi, A., Parruti, G., Sallese, M. (1995) Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. Selective increase of β-adrenergic receptor kinase 1 and 2. *J. Clin. Invest.* **95**:203-210.

Devalaraja, M.N., Richmond, A. (1999) Multiple chemotactic factors: fine control or redundancy? *Trends Pharmacol. Sci.* **20**:151-156.

Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:653-688.

Drazner, M.H., Peppel, K.C., Dyer, S., Grant, A.O., Koch, W.J., Lefkowitz R.J. (1997) Potentiation of β-adrenergic signaling by adenoviral-mediated gene transfer in adult rabbit ventricular myocytes. *J. Clin. Invest.* **99**:288-296.

Duncan, J.A., Gilman, A.G. (1996) Autoacylation of G protein alpha subunits. *J. Biol. Chem.* **271**:23594-23600.

Edmonds, M., Vaughan, M.H.Jr., Nakazato, H. (1971) Polyadenylic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapidly-labeled polyribosomal RNA of HeLa cells: possible evidence for a precursor relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**:1336-1340.

Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**:6-13.

Firsov, D., Elalouf, J.M. (1997) Molecular cloning of two rat GRK6 splice variants. *Am. J. Physiol.* **273**:C953-C961.

Freedman, N.J., Liggett, S.B., Drachman, D.E., Pei, G., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1995) Phosphorylation and desensitization of the human β_1-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **270**:17953-17961.

Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J. (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog. Horm. Res.* **51**:319-353.

Gagnon, A.W., Benovic, J.L. (1997) Identification and chromosomal localization of a processed pseudogene of human GRK6. *Gene* **184**:13-19.

Gainetdinov, R.R., Bohn, L.M., Walker, J.K., Laporte, S.A., Macrae, A.D., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Premont, R.T. (1999) Muscarinic supersensitivity and impaired receptor desensitization in G protein-coupled receptor kinase 5-deficient mice. *Neuron* **24**: 1029-1036.

Gether, U., Kobilka, B.K. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.* **273**:17979-17982.

Gierschik, P., Jakobs, K.H. (1987) Receptor-mediated ADP-ribosylation of a phospholipase C-stimulating G protein. *FEBS Lett.* **224**:219-223.

Gierschik, P. (1992) ADP-ribosylation of signal-transducing guanine nucleotide-binding proteins by pertussis toxin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **175**:69-96.

Gierschik, P., Jakobs, K.H. (1992) ADP-ribosylation of signal-transducing guanine nucleotide-binding proteins by cholera and pertussis toxin, *Handbook of Experimental Pharmacology "Selective Neurotoxicity"* **102** (Herken, H., Hucho, F., eds.), Springer Verlag, Berlin, 807-839.

Gilman, A.G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**:615-649.

Graham, F.L., Eb, A.Jvd. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**:456-467.

Gros, R., Benovic, J.L., Tan, C.M., Feldman, R.D. (1997) G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J. Clin. Invest.* **99**:2087-2093.

Gros, R., Tan, C.M., Chorazyczewski, J., Klevin, D.J., Benovic, J.L., Feldman, R.D. (1999) G-protein-coupled receptor kinase expression in hypertension. *Clin. Pharmacol. Ther.* **65**:545-551.

Gudermann, T., Schoneberg, T., Schultz, G. (1997) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**: 399-427.

Gutkind, J.S. (1998) The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* **273**:1839-1842.

Hall, R.A., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J. (1999) Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.* **145**:927-932.

Hamm, H.E. (1998) The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **273**:669-672.

Hanks, S.K., Hunter, T. (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**:576-596.

Haribabu, B., Snyderman, R. (1993) Identification of additional members of the G-protein-coupled receptor kinase multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:9398-9402.

Haribabu, B., Richardson, R.M., Fisher, I., Sozzani, S., Peiper, S.C., Horuk, R., Ali, H., Snyderman, R. (1997) Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J. Biol. Chem.* **272**:28726-28731.

Hepler, J.R., Gilman, A.G. (1992) G proteins. Trends Biochem. Sci. 17:383-387.

Hisatomi, O., Matsuda, S., Satoh, T., Kotaka, S., Imanishi, Y., Tokunaga, F. (1998) A novel subtype of G-protein-coupled receptor kinase, GRK7, in teleost cone photoreceptors. *FEBS Lett.* **424**:159-164.

Iacovelli, L., Sallese, M., Mariggio, S., De Blasi, A. (1999) Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *FASEB J.* **13**:1-8.

Iino, M., Furugohri, T., Fukuzawa, A., Shibano, T. (1997) Asp278 of human beta-adrenergic receptor kinase 1 is essential for phosphorylation activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**:548-551.

Inglese, J., Koch, W.J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992a) Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature* **359**:147-150.

Inglese, J., Glickman, J.F., Lorenz, W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992b) Isoprenylation of a protein kinase. Requirement of farnesylation/alpha-carboxyl methylation for full enzymatic activity of rhodopsin kinase. *J. Biol. Chem.* **267**:1422-1425.

Inglese, J., Freedman, N.J., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J. (1993) Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* **268**:23735-23738.

Jaber, M., Koch, W.J., Rockman, H., Smith, B., Bond, R.A., Sulik, K.K., Ross, J.Jr., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Giros, B. (1996) Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:12974-12979.

Ji, T.H., Grossmann, M., Ji.I. (1998) G protein-coupled receptors: I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **273**:17299-17302.

Kong, G., Penn, R., Benovic, J. L. (1994) A β-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the β_2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **269**:13084-13087.

Kozasa, T., Itoh, H., Tsukamoto, T., Kaziro, Y. (1988) Isolation and characterization of the human $G_s\alpha$ gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2081-2085.

Krupnick, J.G., Benovic, J.L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**:289-319.

Kunapuli, P., Benovic, J.L. (1993) Cloning and expression of GRK5: a member of the G protein-coupled receptor kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:5588-5592.

Kunapuli, P., Gurevich, V.V., Benovic, J. L.(1994) Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *J. Biol. Chem.* **269**:10209-10212.

Laemmli, U.K. (1970) Clevage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Lefkowitz, R. J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and β-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* **273**:18677-18680.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**:4743-4751.

Levay, K., Satpaev, D.K., Pronin, A.N., Benovic, J.L., Slepak, V.Z. (1998) Localization of the sites for Ca^{2+}-binding proteins on G protein-coupled receptor kinases. *Biochemistry* **37**:13650-13659.

Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., Ward, D.C. (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* **80**:224-234.

Locati, M., Murphy, P.M. (1999) Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu. Rev. Med.* **50**:425-440.

Lohse, M.J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.* **267**:8558-8564.

Lombardi, M.S., Kavelaars, A., Schedlowski, M., Bijlsma, J.W.J. Okihara, K.L., Van de Pol, M., Ochsmann, S., Pawlak, C., Schmidt, R.E., Heijnen, C.J. (1999) Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* **13**:715-725.

Lorenz, W., Inglese, J., Palczewski, K., Onorato, J.J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1991) The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the beta-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8715-8719.

Loudon, R.P., Benovic, J.L. (1994) Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK6. *J. Biol. Chem.* **269**:22691-22697.

Loudon, R.P., Perussia, B., Benovic, J.L. (1996) Differentially regulated expression of the G-protein-coupled receptor kinases, βARK and GRK6, during myelomonocytic cell development in vitro. *Blood*. **88**:4547-4557.

Loudon, R.P., Benovic, J.L. (1997) Altered activity of palmitoylation-deficient and isoprenylated forms of the G protein-coupled receptor kinase GRK6. *J. Biol. Chem.* **272**:27422-27427.

Luecke, H., Richter, H.T., Lanyi, J.K. (1998) Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. *Science* **280**:1934-1937.

Lupas, A.N., Lupas, J.M., Stock, J.B. (1992) Do G protein subunits associate via a three-stranded coiled coil? *FEBS Lett.* **314**: 105-108.

Luster, A.D. (1998) Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* **338:**436-445.

Luttrell, L.M., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J. (1999) Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:177-183.

Malarkey, K., Belham, C.M., Paul, A., Graham, A., McLees, A., Scott, P.H., Plevin, R. (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **309**:361-375.

Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F.S. (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* **19:**1154.

Mattaj, I.W., Englmeier, L. (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:265-306.

Milcent, M.D., Christophe, T., Rabiet, M.-J., Tardif, M., Boulay, F. (1999) Overexpression of wild-type and catalytically inactive forms of GRK2 and GRK6 fails to alter the agonist-induced phosphorylation of the C5a receptor (CD88): evidence that GRK6 is autophosphorylated in COS-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **259**:224-229.

Moepps, B., Frodl, R., Rodewald, H.-R., Baggiolini, M., Gierschik, P. (1997) Two murine homologues of the human chemokine receptor CXCR4 mediating stromal cell-derived factor 1α activation of G_{i2} are differentially expressed *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* **27**:2102-2112.

Morales, J., Homey, B., Vicari, A.P., Hudak, S., Oldham, E., Hedrick, J., Orozco, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., McEvoy, L.M., Zlotnik, A. (1999) CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:14470-14475.

Morris, A.J., Malbon, C.C. (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol. Rev.* **79**:1373-1430.

Mueller, S.G., Schraw, W.P., Richmond, A. (1995) Activation of protein kinase C enhances the phosphorylation of the type B interleukin-8 receptor and stimulates its degradation in non-hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **270**:10439-10448.

Mueller, S.G., White, J.R., Schraw, W.P., Lam, V., Richmond, A. (1997) Ligand-induced desensitization of the human CXC chemokine receptor-2 is modulated by multiple serine residues in the carboxyl-terminal domain of the receptor. *J. Biol. Chem.* **272**:8207-8214.

Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.

Mundell, S.J., Benovic, J.L., Kelly, E. (1997) A dominant negative mutant of the G protein-coupled receptor kinase 2 selectively attenuates adenosine A_2 receptor desensitization. *Mol. Pharmacol.* **51**:991-998.

Murphy, P.M. (1996) Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Fact. Rev.* **7**:47-64.

Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**:249-257.

Nelson, T., Brutlag, D. (1979) Addition of homopolymers to the 3´-ends of duplex DNA with terminal transferase. *Methods Enzymol.* **68**:41-50.

Onorato, J.J., Gillis, M.E., Benovic, J.L., Ruoho, A.E. (1995) The beta-adrenergic receptor kinase (GRK2) is regulated by phospholipids. *J. Biol. Chem.* **270**:21346-21353.

Palczewski, K., Buczylko, J., Lebioda, L., Crabb, J.W., Polans, A.S. (1993) Identification of the N-terminal region in rhodopsin kinase involved in its interaction with rhodopsin. *J. Biol. Chem.* **268**:6004-6013.

Palczewski, K., Ohguro, H., Premont, R.T., Inglese, J. (1995) Rhodopsin kinase autophosphorylation. Characterization of site-specific mutations. *J. Biol. Chem.* **270**:15294-15298.

Palczewski, K. (1997) GTP-binding-protein-coupled receptor kinases. Two mechanistic models. *Eur. J. Biochem.* **248**:261-269.

Papermaster, D.S. (1982) Preparation of retinal rod outer segments. *Methods Enzymol.* **81**:48-52.

Parsons T.J., Parsons S.J. (1997) Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:187-192.

Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J.P., Landau, E,M. (1997) X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* **277**:16776-1681.

Pei, G., Tiberi, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1994) An approach to the study of G-protein-coupled receptor kinases: An *in vitro*-purified membrane assay reveals differential receptor specificity and regulation by Gβγ subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:3633-3636.

Pitcher, J.A., Inglese, J., Higgins, J.B., Arriza, J.L., Casey, P.J., Kim, C., Benovic, J.L., Kwatra, M.M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992) Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinases to membrane-bound receptors. *Science* **257**:1264-1267.

Pitcher, J.A., Touhara, K., Payne, E.S., Lefkowitz, R.J. (1995) Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the β-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with Gβγ subunits and lipid. *J. Biol. Chem.* **270**:11707-11710.

Pitcher, J.A., Fredericks, Z.L., Stone, W.C., Premont, R.T., Stoffel, R.H., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J. (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. *J. Biol. Chem.* **271**:24907-24913.

Pitcher, J.A., Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:653-692.

Pouyssegur, J., Seuwen, K. (1992) Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. *Annu. Rev. Physiol.* **54**:195-210.

Premont, R.T., Koch, W.J., Inglese, J., Lefkowitz, R.J. (1994) Identification, purification, and charakterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* **269**:6832-6841.

Premont, R.T., Inglese, J., Lefkowitz, R.J. (1995) Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J.* **9**:175-182.

Premont, R.T., Macrae, A.D., Stoffel, R.H., Chung, N., Pitcher, J.A., Ambrose, C., Inglese, J., MacDonald, M.E., Lefkowitz, R.J. (1996) Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J. Biol. Chem.* **271**:6403-6410.

Premont, R.T., Macrae, A.D., Apricio, S.A.J.R., Kendall, H.E., Welch, J.E., Lefkowitz, R.J. (1999) The GRK4 subfamily of G protein-coupled receptor kinases. Alternative splicing, gene organization, and sequence conservation. *J. Biol. Chem.* **274**:29381-29389.

Pronin, A.N., Benovic, J.L. (1997) Regulation of the G protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **272**:3806-3812.

Pronin, A.N., Carman, C.V., Benovic, J.L. (1998) Structure-function analysis of G protein-coupled receptor kinase 5. Role of the carboxyl terminus in kinase regulation. *J. Biol. Chem.* **273**:31510-31518.

Richardson, R.M., DuBose, R.A., Ali, H., Tomhave, E.D., Haribabu, B., and Snyderman, R. (1995) Regulation of human interleukin-8 receptor A: Identification of a phosphorylation site involved in modulating receptor functions. *Biochemistry* **34**:14193-14201.

Rollins, B.J. (1997) Chemokines. *Blood* **90**:909-928.

Said, K., Jacquart, T., Montgelard, C., Sonjaya, H., Hela, A.N., Britton-Davidian, J. (1986) Robertsonian house mouse populations in Tunisia: a karyological and biochemical study. *Genetica* **68**:151-156.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a termostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.

Sallese, M., Mariggio, S., Collodel, G., Moretti, E., Piomboni, P., Baccetti, B., DeBlasi, A. (1997) G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells. *J. Biol. Chem.* **272**:10188-10195.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.

Sarnago, S., Elorza, A., Mayor, F.Jr. (1999) Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by src tyrosin kinase. *J. Biol. Chem.* **274**:34411-34416.

Shichi, H., Somers, R.L. (1978) Light-dependent phosphorylation of rhodopsin. *J. Biol. Chem.* **253**:7040-7046.

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

Singer-Sam, J., Riggs, A.D. (1993) Quantitative analysis of messenger RNA levels: reverse transcription-polymerase chain reaction single nucleotide primer extension assay. *Methods. Enzymol.* **225:**344-351.

Sprang, S.R. (1997) G-protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.* **66**:639-678.

Stoffel, R.H., Randall, R.R., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J., Inglese, J. (1994) Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family. *J. Biol. Chem.* **269**:27791-27794.

Stoffel, R.H., Pitcher, J.A., Lefkowitz, R.J. (1997) Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates. *J. Membrane Biol.* **157**:1-8.

Stoffel, R.H., Inglese, J., Macrae, A.D., Lefkowitz, R.J., Premont, R.T. (1998) Palmitoylation increases the kinase activity of the G protein-coupled receptor kinase, GRK6. *Biochemistry* **37**:16053-16059.

Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R., Underwood, D., Dixon, R.A. (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:101-132.

Swan, D., Aviv, H., Leder, P. (1972) Purification and properties of biologically active messenger RNA for a myeloma light chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:1967-1971.

Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J.A., Shaw, G., Lefkowitz, R.J. (1994) Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* **268**:10217-10220.

Touhara, K., Koch, W.J., Hawes, B.E., Lefkowitz, R.J. (1995) Mutational analysis of the pleckstrin homology domain of the beta-adrenergic receptor kinase. Differential effects on G beta gamma and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding. *J. Biol. Chem.* **270**:17000-17005.

Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Kurose, H., Nagao, T. (1994) Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Facilitation by G protein-coupled receptor kinase (GRK2) and attenuation by a dominant-negative mutant of GRK2. *J. Biol. Chem.* **269**:32522-32527.

Ungerer, M., Kessebohm, K., Kronsbein, K., Lohse, M.J., Richardt, G. (1996) Activation of beta-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia. *Circ. Res.* **79**:455-460.

Vanin, E.F. (1985) Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu. Rev. Genet.* **19**:253-272.

Wächter, F.A. (1999) Identifizierung und Charakterisierung neuer Varianten der murinen Kinase G-Protein-gekoppelter Rezeptoren GKR6. Med. Dissertation, Universität Ulm.

Ward, S.G., Westwick, J. (1998) Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem. J.* **333**:457-470.

Watson, S., Arkinstall, S. (1994) The G-Protein linked receptor. Facts Book, Academic Press, London.

Wedegaertner, P.B., Wilson, P.T., Bourne, H.R. (1995) Lipid modifications of trimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* **270**:503-506.

Wedegaertner, P.B. (1998) Lipid modifications and membrane targeting of G alpha. *Biol. Signals Recept.* **7**:125-35.

Weiss, E.R., Raman, D., Shirakawa, S., Ducceschi, M.H., Bertram, P.T., Wong, F., Kraft, T.W., Osawa, S. (1998) The cloninig of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. *Mol. Vis.* 4:27.

Wells, T.N.C., Power, C.A., Proudfoot, A.E.I. (1998) Definition, function and pathophysiological significance of chemokine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**:376-380.

Wess, J. (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* **11**:346-354.

Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E., Lohse, M.J. (1996) Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the β-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:2105-2109.

Yamamoto, S., Sippel, K.C., Berson, E.L., Dryja, T.P. (1997) Defects in the rhodopsin kinase gene in the Oguchi form of stationary night blindness. *Nature Genet.* **15**:175-178.

Zhao, X., Huang, J., Khani, S.C., Palczewski, K. (1998) Molecular forms of human rhodopsin kinase (GRK1). *J. Biol. Chem.* **273**:5124-5131.

Zlotnik, A., Yoshie, O. (2000) Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**:121-127.

Zörnig, M., Klett, C., Lovec, H., Hameister, H., Winking, H., Adolph, S., Möröy, T. (1995) Establishment of permanent wild-mouse cell lines with readily identifiable marker chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* **71**:37-40

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei

Herrn Prof. Dr. P. Gierschik für die Aufnahme in sein Team, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die wissenschaftliche Betreuung und das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Knöchel für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. B. Möpps für ihre Betreuung, ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft, ihren Enthusiasmus und ihr Engagement, vor allem aber für ihr Vertrauen.

allen Mitarbeitern des „Open*lab*“ 4202 für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung, insbesondere Herrn M. Braun für die unzähligen Gespräche und für seine Hilfe bei Problemen mit dem PC.

allen anderen Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfe und Kollegialität, im Besonderen bei Herrn Dr. F. Schwald, Herrn Dr. M. Wunderlin, Frau Dr. D. Illenberger und Frau Dr. K. Giehl und I. Stephan.

Frau Dr. M. Wilda für ihre methodische Unterstützung und ihre Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Ch. Dixkens für die Durchführung der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung.

den Mitarbeitern der Abteilung „Isotopenanwendung“.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann für sein Verständnis, seine Unterstützung und vor allem für den Rückhalt in manch schwieriger Situation.

9 Lebenslauf

11.04.1971	geboren in Ulm
1977 – 1981	Besuch der Grundschule Pfuhl
1981 – 1983	Besuch der Hauptschule Pfuhl
1983 – 1987	Besuch der Realschule Pfuhl
1987 – 1990	Besuch des Ernährungswissenschaftlichen Gymnasiums Ulm
1990	Abitur
1990 – 1991	Studium der Biologie und Chemie an der Universität Ulm
1991 – 1994	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen
1994 – 1995	Praktikum am MPI für Biochemie in Martinsried
1995 – 1997	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen
1997	Diplom in Biochemie
1997 - 2000	Stipendiatin im Graduiertenkolleg „Biomolekulare Medizin“ an der Universität Ulm in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie
ab 16.04.2000	Wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm
Juli 2000	Promotion zum Dr. biol. hum.